

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

EROS LUIZ DE SOUSA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DA ANASTOMOSE
INTESTINAL DE RATOS WISTAR APÓS O USO DE MELOXICAM NO
PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO**

**(Histological and Histochemical evaluation of intestinal
anastomosis of Wistar rats after the use of Meloxicam in the
immediate postoperative)**

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2009

EROS LUIZ DE SOUSA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DA ANASTOMOSE INTESTINAL
DE RATOS WISTAR APÓS O USO DE MELOXICAM NO PÓS-OPERATÓRIO
IMEDIATO**

(Histological and Histochemical evaluation of intestinal anastomosis of
Wistar rats after the use of Meloxicam in the immediate postoperative)

Artigos apresentados ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Área de concentração: Patologia Animal e Comparada, Cirurgia e Clínica, do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk

São José dos Pinhais

2009

TERMO DE APROVAÇÃO

AGRADECIMENTOS

Dedico meu trabalho ao meu sempre orientador, Dr. Felipe Wouk, que desde a graduação seguida da especialização rege minha escolha na ampla e encantadora Medicina Veterinária.

Agradeço à Professora Dra. Maria Fernanda Torres, da Universidade Positivo, pela amizade e pela recepção nos laboratórios da instituição.

Ao Professor Dr. Alan Giovanini, da Universidade Positivo, pelo acolhimento no Laboratório de Patologia.

Agradeço em especial à Professora Dra. Silvana Círio, da PUC-PR, pelas orientações e pelo carinho que dedicou ao meu trabalho e à patologia como um todo. Espero conseguir retribuir toda sua gentileza.

Agradeço à Professora Dra. Claudia T. Pimpão pela co-orientação e pela paciência que me dedicou.

Agradeço à Dra. Lucia de Noronha, Médica Patologista, Prof. Adjunta da UFPR e da PUC-PR e sua equipe, as Biólogas Ana e Camilla, do Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR pela simpatia e colaboração incondicional à conclusão da pesquisa.

Agradeço à Residente e amiga Stephanie Alberti pelos serviços anestésicos e de enfermagem aos animais utilizados. Você foi fundamental nesta fase da minha vida. Muito Obrigado.

Agradeço à Prof.^a Tatiana Giordano, da Faculdade Evangélica do Paraná, pela amizade e serviços anestésicos.

Agradeço à Dra. Érica Pauls, minha Coordenadora na FEPAR e à Dra. Patrícia Freitas pela amizade e compreensão nos momentos de ausência para realização da pesquisa.

Ao Dr. Daniel Dantas Ferrarin, Cirurgião do Aparelho Digestivo do Hospital Angelina Caron, pelo companheirismo e dedicação neste trabalho.

À Dra. Alessandra Borges, Cirurgiã do Aparelho Digestivo, do Hospital de Clínicas da UFPR, pela amizade e colaboração ao aprimoramento da técnica.

À Dra. Keila Ribeiro, Médica Mastologista, do Centro de Oncologia do Paraná, pela amizade e colaboração na confecção da tese.

Aos Meus pais agradeço eternamente a compreensão pela falta de presença em suas vidas, na busca do aperfeiçoamento da carreira que escolhi.

Aos animais que por mim foram sacrificados e que se prestaram em defesa da saúde das outras espécies, mesmo sem optarem por este mérito. Espero, que na escala da evolução acreditada pelos humanos, vocês sejam contemplados e usufruam dos benefícios que nos fazemos valer. Infelizmente não somos tão evoluídos como nos julgamos e talvez não mereçamos seu sacrifício. Agradeço e peço perdão a Deus por promover a morte em prol da vida.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
CAPÍTULO 1 -	
BIOLOGIA DA CICATRIZAÇÃO E ASPECTOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 BIOLOGIA DO PROCESSO DE REPARO	14
2.1 CICATRIZAÇÃO	14
2.2 CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES INTESTINAIS	15
2.3 ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO-ESTEROIDAIIS	15
2.4 OPIÓIDES.....	19
2.5 COLÁGENO NA ANASTOMOSE INTESTINAL DE RATOS.....	22
2.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES	24
2.7 ANGIOGÊNESE.....	26
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
4 REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2 -	
AVALIAÇÃO DA ANASTOMOSE ENTÉRICA DE RATOS WISTAR APÓS O USO DE MELOXICAM NO PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO, ATRAVÉS DO ESTUDO HISTOLÓGICO DO COLÁGENO E IMUNOHISTOQUÍMICO DA ANGIOGÊNESE NA CICATRIZAÇÃO	44
1 INTRODUÇÃO.....	47
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
2.1 ANIMAIS.....	50
2.2 CONSIDERAÇÕES AMBIENTAIS.....	50
2.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	50
2.3.1 Anestesia.....	51
2.3.2 Ato cirúrgico.....	52
2.3.3 Pós-operatório e morte dos animais.....	54
2.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	54
2.5 AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA.....	57

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
3 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	59
4 CONCLUSÕES.....	63
5 REFERÊNCIAS.....	64

RESUMO GERAL DA DISSERTAÇÃO

RESUMO – O meloxicam é um antiinflamatório com ação preferencial sobre ciclooxigenase 2 e seu efeito sobre a cicatrização intestinal é pouco evidenciado. O objetivo do estudo foi avaliar o processo de cicatrização após o uso do meloxicam no pós-operatório imediato nas anastomoses intestinais do íleo de ratos Wistar, através da avaliação histológica do colágeno tipo I e III, e imunohistoquímica da expressão do receptor para o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGFr) e da metaloproteinase 9 (MMP-9). Foram utilizados quarenta e dois animais divididos em dois grupos, ou seja, controle e meloxicam, sendo que sete animais por grupo foram eutanasiados nos dias 5, 10 e 21 pós-operatório de uma anastomose do íleo. Foi realizada avaliação histológica das fibras de colágeno tipo I e III com uso do Sirius-red F3BA e avaliação imunohistoquímica da expressão do receptor para o Fator de Crescimento Vascular Endotelial e da metaloproteinase 9. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) na avaliação histológica da quantificação da fibras nas amostras dos dois grupos estudados. Na avaliação imunohistoquímica das amostras comparando os grupos que utilizaram meloxicam com os grupos que não utilizaram a droga, através da expressão dos receptores nas células endoteliais para o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGFr) e da metaloproteinase 9 (MMP 9), foi possível observar que o uso da droga não altera o processo de reparo, por não haver diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos. Assim sendo, foi possível concluir que a utilização do antiinflamatório meloxicam para a modulação da inflamação e consequentemente o controle da dor nos pacientes após submissão à cirurgia intestinal, pode oferecer uma condição terapêutica que não interfere no processo de cicatrização das anastomoses do intestino delgado de ratos Wistar.

Palavras-chave : Cicatrização, intestino, antiinflamatórios, angiogênese.

ABSTRACT – The meloxicam is a preferential cicloxygenase 2 antiinflammatory and its effects in intestinal healing is unclear. The purpose of this research is evaluate the healing process with meloxicam administration during immediate postoperative period of ileum anastomosis in Wistar rats through histological evaluation of type-I and type-II collagen and imunohistochemical evaluation of the receptor to vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9. Forty two animals were randomized in two groups, meloxicam and control, being seven animals per group euthanized in 5, 10 and 21 days after the surgery. We performed an histochemical evaluation of fibres type-I and type-III collagen with sirius-red F3BA and imunohistochemical evaluation of the receptor to vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9. There were no significative diference ($p>0,05$) with histological evaluation of fibres in samples of both groups. The imunohistochemical evaluation comparing samples that used and do not used meloxicam, with expression of receptors to vascular endothelial growth factor (VEGFr) and metalloproteinase-9 (MMP 9), demonstrated that the drug did not alter healing process, because there were no significative diference ($p>0,05$) among groups. The use of meloxicam to modulate inflammation and consequently pain control of patients after intestinal surgery, can offer a therapeutic condition that do not meddle with healing process of intestinal anastomosis of Wistar rats.

Key words : Healing. Intestine. Antiinflammatory, Angiogenesis

CAPÍTULO I

BIOLOGIA DA CICATRIZAÇÃO E ASPECTOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL – REVISAO

Biology of wound healing and aspects related to tissue repair – Review.

BIOLOGIA DA CICATRIZAÇÃO E ASPECTOS RELACIONADOS AO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL

Biology of wound healing and aspects related to tissue repair – Review.

Eros Luiz de Sousa¹; Antonio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk², Claudia Turra Pimpão³, Stephanie Alberti⁴, Tatiana Giordano⁵, Maria Fernanda Torres⁶, Silvana Maris Cirio⁷, Daniel Dantas Ferrarin⁸

¹ Mestrado em Ciência Animal PUCPR, Médico Veterinário, Faculdade Evangélica do Paraná, Pe. Agostinho 2885, ap 103 torre 3, CEP 80710-000, Curitiba-PR. eros@faculdadeevangelica.edu.br

² Professor Titular de Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários S/N, Curitiba, PR. wouk@sau.com.br

³ Professora Adjunta da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rod 376, Km 14, Caixa Postal 129, S.J. Pinhais, PR. claudia.pimpao@pucpr.br

⁴ Medica Veterinária Residente, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários S/N, Curitiba PR. stephaniealberti@hotmail.com

⁵ Professora Titular de Anestesiologia da Faculdade Evangélica do Paraná, R. Pe Anchieta 2770, CEP 80730-000, Curitiba-PR. tatigiordano@gmail.com

⁶ Professora da Universidade Positivo, Rua Pedro Viriato Parigot de Souza 5300, CEP 81280-300, Curitiba, PR. biotério@up.edu.br

⁷ Professora do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, Rua XV de Novembro 1299, CEP 80060-000, Curitiba, PR. silvana.cirio@gmail.com

⁸ Médico, Cirurgião do Aparelho Digestivo, Rua Júlia da Costa 1447, CEP 80730-060, Curitiba, PR. danovix@uol.com.br

RESUMO - O processo de reparo de tecidos é complexo e dependente da harmonização dos eventos celulares e bioquímicos. O intestino delgado é um ambiente que sofre interferências diversas, como a exercida pela microbiota e pelas enzimas digestivas. O sucesso da reparação tecidual depende de inúmeros fatores adversos à técnica operatória, principalmente pela terapia analgésica e antiinflamatória instituída pelo cirurgião no pós-operatório imediato. O conhecimento dessas participações biológicas e bioquímicas é fundamental para que o profissional conduza as possíveis complicações oriundas da sua prescrição. Este capítulo

apresenta o processo de cicatrização e os fatores que podem influenciá-lo, trazendo uma revisão ampla sobre os fatores avaliados nesta pesquisa como o colágeno, o receptor para o fator de crescimento vascular endotelial e os receptores para a metaloproteinase 9.

Palavras-chave: Cicatrização. Intestino. Antiinflamatórios.

ABSTRACT - The process of tissue repair is complex and dependent of cellular and biochemists events. The small bowel is an environment that suffers diverse interferences, as microbiota and digestive enzymes. The success of tissue repairing depends on innumerable adverse factors to surgery technique, mainly for the analgesic and antiinflammatory therapy instituted by the postoperative surgeon in the immediate one. The knowledge of these biological participation and biochemists are basic so that the professional leads the possible deriving complications of its lapsing. This chapter presents the wound healing and the factors that can influence it, bringing an ample revision of the factors evaluated in this research, as the collagen and the vascular endothelial growth factor.

Key words: Healing. Intestine. Antiinflammatory.

1 INTRODUÇÃO

A evolução da cicatrização das anastomoses intestinais pode ser adversamente influenciada por vários fatores locais ou sistêmicos, documentados em estudos clínicos e experimentais. Dentre eles, podemos citar a técnica cirúrgica e o fio de sutura utilizado, a desnutrição, a anemia, o diabetes, a irradiação, a utilização de drenos, e a infecção, sendo esta, uma das causas mais freqüentes de deiscência das feridas cirúrgicas (HENDRIKS & MASTBOOM, 1990). Os efeitos das drogas antiinflamatórias não hormonais (AINE) sobre a cicatrização intestinal ainda são pouco conhecidos e controversos. Alguns autores relatam que os AINE favorecem a cicatrização intestinal, enquanto outros demonstram efeitos deletérios sobre a cicatrização intestinal, por aumentarem a taxa de deiscência das

anastomoses e, conseqüentemente, favorecerem uma maior taxa de mortalidade. No período pós-operatório, os AINE são utilizados como analgésicos e antiinflamatórios, administrados de forma preventiva antes da incisão cirúrgica, ou terapêutica após o término do efeito anestésico, com o objetivo de bloquear a liberação de substâncias que modificam o limiar de excitabilidade dos nociceptores periféricos. Como agentes isolados, são úteis nas dores de intensidade leve e moderada e, associados aos opióides, nas dores intensas ou no pós-operatório por períodos curtos, 1 a 4 dias, sendo no início administrados preferencialmente por via parenteral, oral ou retal. Os primeiros relatos sobre os efeitos dos AINE sobre a cicatrização intestinal foram feitos por Ballantyne (1984), tidos como promotores da cicatrização intestinal. Outros estudos, no entanto, revelam que os AINE são prejudiciais à evolução da cicatrização intestinal (MINOSSI et al. 1998).

Embora os AINE sejam estruturalmente diferentes, apresentam mecanismo de ação semelhante que é atribuído, principalmente, ao bloqueio da biossíntese das prostaglandinas, através da inibição da enzima cicloxigenase e/ou da lipoxigenase. As prostaglandinas, particularmente as dos grupos E1 e E2, exercem um efeito citoprotetor sobre todo trato digestivo, através do aumento do fluxo sangüíneo na mucosa, desempenhando papel importante na proliferação celular e na neovascularização tecidual. Os AINE, por sua vez, também determinam alterações importantes na fosforilação oxidativa mitocondrial, podendo resultar na perda da junção intercelular dos enterócitos, favorecendo a translocação bacteriana (PAULUS, 1991; JAFFE et al. 1971).

Desta forma, os AINE, poderiam levar a um retardo na cicatrização intestinal através de dois mecanismos, o primeiro, inibindo a formação de prostaglandinas, e, conseqüentemente, retardando a regeneração celular e a revascularização da cicatriz. O segundo, por um processo direto da injúria celular, ao nível mitocondrial dos enterócitos, que favorece o aumento do processo inflamatório através da proliferação e da translocação bacteriana. Apesar desses conhecimentos, os efeitos dos AINE sobre a cicatrização intestinal, ainda são passíveis de discussão (MINOSSI et al., 1998).

2 BIOLOGIA DO PROCESSO DE REPARO

2.1 CICATRIZAÇÃO

A cicatrização é uma resposta fibroproliferativa com interação de diferentes tipos de células e mediadores químicos na tentativa de reparo do defeito lesional.

Em 1910, Carrel descreveu os mecanismos cicatriciais em seqüência ordenada de eventos, que foram divididos por Orgill e Deming (1988) em cinco elementos principais: inflamação, proliferação celular, formação do tecido de granulação, contração e remodelamento da ferida. Recentemente, Clark (2005) representou esse processo em três fases: coagulação, proliferação e remodelação.

A lesão tecidual coloca elementos sanguíneos em contato com o colágeno e outras substâncias da matriz extracelular, provocando degranulação de plaquetas e ativação das cascatas de coagulação e do complemento. Com isso, há liberação de vários mediadores vasoativos e quimiotáticos que conduzem o processo cicatricial mediante aumento de células inflamatórias na região da ferida (BENNETT & SCHULTZ, 1993).

Os neutrófilos ocupam precocemente a região lesada fagocitando debris e são, progressivamente, substituídos por macrófagos durante a evolução favorável da cicatrização. Dessa forma, o padrão celular representa marcador evolutivo do reparo tecidual (GRECA; et al. 2004; COSTA; et al, 2003).

Os processos de angiogênese, multiplicação fibroblástica e epitelização são os principais eventos de proliferação celular envolvidos no desenvolvimento do tecido de granulação. A neovascularização permite a sustentação nutricional da área de reparo. Os fibroblastos multiplicam-se e produzem o colágeno, importante componente estrutural do tecido cicatricial. A epitelização reveste a ferida evitando contaminação e a perda de umidade e proteínas da região cicatricial (MANDELBAUM; et al. 2003).

A contração gera forças que aproximam as bordas da ferida através da ação do miofibroblasto, que invade a área cicatricial no final da primeira semana após a lesão tecidual (WINKLE, 1969). Na fase seguinte, algumas modificações ocorrem no tecido de granulação durante o remodelamento da ferida: regressão da rede capilar,

remoção do excesso de colágeno com organização espacial de suas fibras e diminuições da demanda metabólica, do edema e da quantidade de proteoglicanos da área de cicatrização (ORGILL & DEMLING, 1988).

Em condições normais, esses eventos constituem os mecanismos habituais do processo de cicatrização desencadeados pela ferida, que conduzirão à restituição da integridade tecidual. Eles são normalmente representados de forma didática sobre a superfície cutânea, porém, apesar de serem constantes em qualquer ferida, apresentam particularidades quando envolvem o trato gastrointestinal (THORNTON; BARBUL, 1997). A cicatrização do cólon e de outros órgãos intra-abdominais apresenta, ainda, maior complexidade que o reparo da superfície cutânea, em função do maior número de camadas estruturais e pela presença do peritônio, que reage ativamente com peritonite e formação de aderências ao ser estimulado.

2.2 CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES INTESTINAIS

As fases de inflamação e formação do tecido de granulação correspondem aos momentos mais críticos para o sucesso cicatricial das anastomoses de íleo. Nestas fases, ocorrem grande parte dos déficits cicatriciais que levam à deiscência anastomótica. A resposta inflamatória nas anastomoses é rápida. Os mediadores quimiotáticos atraem neutrófilos, que se acumulam na área anastomótica três horas após a sua realização, e aumentam a proporção de monócitos a partir de 12 horas pós-operatórias (HESP; et al. 1985). Os agentes vasoativos contribuem no edema anastomótico que persiste os primeiros sete dias pós-operatórios (GETZEN & HOLLOWAY, 1966).

Vários tipos celulares aumentam sua concentração na área anastomótica durante a proliferação celular. Evidencia-se neovascularização entre o segundo e terceiro dia pós-operatório (WISE; et al. 1975). Os fibroblastos atingem a região da ferida nas primeiras 12 horas após a anastomose multiplicando-se no local (HESP; et al. 1985).

Os eventos cicatriciais sobre a anastomose afetam toda a estrutura laminar do íleo. Cada camada da parede do íleo exhibe características próprias e sofre alterações em diferentes intensidades. A aproximação das bordas da anastomose afeta a velocidade do reparo epitelial. Essa camada pode se reconstituir em três dias quando há ótima coaptação (THORNTON & BARBUL, 1997).

Mori e colaboradores (1992) demonstraram que a reconstituição da camada muscular depende da diferenciação de células musculares lisas a partir de células mesenquimais indiferenciadas, as quais invadem a região entre o terceiro e quinto dia após o ferimento. As primeiras, aliadas aos fibroblastos locais, são as responsáveis pela produção da totalidade do colágeno cicatricial intestinal (GRAHAM; et al. 1987).

A importância do peritônio visceral no processo de cicatrização foi evidenciada no estudo de Goligher e colaboradores (1970). Os autores provaram que estruturas extra-peritoneais, desprovidas de serosa, estavam mais sujeitas a fístulas.

A observação direta dos eventos cicatriciais que envolvem o reparo de anastomoses de íleo exige que os dados sejam obtidos através de estudos experimentais. Dessa forma, a maior parte das evidências relacionadas à cicatrização desse segmento, avalia a integridade anastomótica a partir das alterações mecânicas e histológicas no intestino de animais.

2.3 Antiinflamatórios não-esteroidais

O controle e tratamento da dor perioperatória é de vital importância para prevenir o desconforto e sofrimento desnecessário do paciente, principalmente no período pós-cirúrgico. Além da questão ética e humanitária envolvendo o bem estar do paciente, a redução da ocorrência de complicações pós-operatórias, bem como a diminuição do tempo de hospitalização e dos riscos de injúrias, são alguns dos benefícios agregados à terapia anti-álgica. No entanto, quando o manejo da dor não é feito da forma adequada, ela deixa de ser um mecanismo natural de defesa do organismo e passa a desencadear uma série de distúrbios sistêmicos importantes e nocivos, como a ativação do eixo neuroendócrino, favorecendo a ocorrência de várias alterações que retardam a recuperação do paciente (SLINGSBY; WATERMAN-PEARSON, 2008; FANTONI & MASTOCINQUE, 2004). Na tentativa de prevenir a instalação da dor, muitas são as estratégias que podem ser empregadas. Entre elas consta a analgesia preemptiva, que consiste na aplicação de técnicas multimodais de analgesia nos diferentes momentos cirúrgicos, pré, trans e pós-operatório (FANTONI & MASTROCINQUE, 2004).

O emprego de antiinflamatórios não esteroidais (AINES) têm sido extremamente efetivo no que diz respeito à analgesia preemptiva. O prolongado tempo de duração do efeito, as propriedades antiinflamatórias, ausência de alterações comportamentais, efeitos respiratórios e cardiovasculares mínimos e a disponibilidade de formulação oral são algumas das vantagens agregadas ao uso desse grupo de fármacos. Além disso, diferentemente dos opióides, os antiinflamatórios não esteroidais não são drogas controladas, tornando-os uma escolha atrativa para a prática clínica de pequenos animais (KERR, 2007).

Os agentes antiinflamatórios não esteroidais agem através da inibição da atividade das cicloxigenases (COX), responsáveis estas pela conversão do ácido aracdônico em prostaglandinas, prostaciclinas e tromboxanos. Estes componentes sintetizados a partir do ácido aracdônico têm diversas funções no organismo, como as prostaglandinas na regulação do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, rim e trato intestinal, os tromboxanos na agregação plaquetária e os bioprodutos do ácido aracdônico na propagação da inflamação, hiperalgesia e alodinia (CLARK, 2006).

A enzima cicloxigenase apresenta inúmeras isoformas, sendo as principais identificadas COX 1, COX 2 e COX 3. A isoforma COX 1 foi inicialmente caracterizada como enzima constitutiva, produzida em consistentes quantidades pelo organismo e sendo responsável pela produção de bioprodutos importantes para a homeostase, como a manutenção do fluxo sanguíneo em órgãos e tecidos e a função plaquetária. A isoforma COX 2 é a forma induzível da enzima, sintetizada por macrófagos e células inflamatórias e produzida em resposta a estímulos como citocinas e outros mediadores inflamatórios liberados por tecidos lesados. A COX 3 foi recentemente identificada e é considerada uma variante da isoforma COX 1, com papel constitutivo no cérebro. A princípio, foi hipotetizado que as drogas inibidoras exclusivas da enzima COX 2 seriam efetivas inibidoras da inflamação, livres dos efeitos adversos. No entanto, algumas exceções a classificação funcional são notadas: COX 1 é induzível em determinadas extensões de inflamação e a COX 2 está envolvida com muitas funções fisiológicas no sistema nervoso central, na função tubular renal, na perfusão renal na hipovolemia, reparos em mucosa gástrica e cicatrização (ENBERG et al. 2006).

O meloxicam é um inibidor COX 2 preferencial disponível no mercado sob a forma injetável ou oral. Embora seu uso não seja aprovado para o tratamento da dor pós-operatória (CLARK, 2006), a administração pré-operatória de meloxicam, na

dose 0,2 mg/kg pelas vias intravenosa ou subcutânea, tem mostrado uma efetiva analgesia pós-operatória tanto para procedimentos ortopédicos como de tecido mole (KERR, 2007). Em cães, os níveis plasmáticos de meloxicam são alcançados entre 2 a 3 horas após injeção subcutânea, e a meia vida varia de 10 a 24 horas (GOGNY, 1999). Dessa forma, os efeitos antiinflamatórios e analgésicos permanecem presentes por até 24 horas após a injeção.

Em relação ao efeito analgésico, estudos em cães comparando o uso de diferentes antiinflamatórios não esteroidais têm encontrado comparável analgesia com a administração perioperatória de carprofeno e meloxicam. O meloxicam também se comportou de forma similar ao cetoprofeno em procedimentos ortopédicos (DENEUCHE et al. 2004). Embora o grau de analgesia no período pós-operatório imediato não seja tão intenso quanto o fornecido por opióides agonistas *mu* puros, a prolongada duração do efeito do meloxicam combinada com o uso de opióides favorecem uma boa analgesia (KERR, 2007). Em uma avaliação limitada ao dia do procedimento, Caukett e colaboradores (2003) compararam os efeitos analgésicos do butorfanol e do meloxicam em cadelas submetidas à ovariectomia. Os animais que receberam meloxicam demonstraram significativo escore de dor inferior em relação aos animais que receberam butorfanol. Em outro estudo, Leece e colaboradores (2005) compararam os efeitos analgésicos da administração injetável e oral de carprofeno e meloxicam durante 72 horas em cadelas submetidas à ovariectomia e ambos forneceram analgesia satisfatória por 72 horas, sustentando a possibilidade de a terapia ser estendida por alguns dias após a cirurgia. Além disso, Nakagawa e colaboradores (2007) constataram em seu estudo que a analgesia prévia com meloxicam previne não só a síntese de prostaglandinas, mas também a dor prolongada, e conseqüentemente a hipertensão, proporcionando maior estabilidade cardiovascular para o paciente no período pós-operatório.

Quanto aos efeitos deletérios, Elwood e colaboradores (1992) e McNeil (1992) referem que os anestésicos gerais interferem na regulação da pressão sanguínea, e que durante o procedimento cirúrgico a supressão da síntese de prostaglandinas causada pelo uso perioperatório de antiinflamatórios não esteroidais pode desencadear um processo de isquemia e insuficiência renal. No entanto, Bostrom e colaboradores (2006) avaliaram os efeitos do meloxicam sob a função renal de cães anestesiados com acepromazina, tiopental e isoflurano. A utilização destes

fármacos foi determinada com o objetivo de garantir que a pressão arterial média atingida durante o estudo (54 mmHg) acarretasse hipotensão e, mesmo sobre estas condições, os animais submetidos a este estudo não apresentaram nenhum efeito adverso em relação à função renal. Também não foram demonstrados prejuízos em relação à função plaquetária, nem alteração hemodinâmica, coincidindo com os resultados obtidos por Caukett e colaboradores (2003).

Embora o meloxicam seja um efetivo e seguro analgésico e antiinflamatório, alguns estudos discorrem sobre o aparecimento de desordens gastrointestinais subseqüentes ao uso deste fármaco. Enberg e colaboradores (2006) revisaram cinco casos de cães com perfuração gastrointestinal e peritonite séptica associadas ao uso diário do meloxicam. Os autores associam o aumento da incidência dessas complicações à dosagem inapropriada, ao uso de produtos não veterinários e a presença de desordens gastrointestinais prévias ocultas, favorecendo a evolução da injúria. A administração de altas doses de meloxicam estaria relacionada à perda da seletividade COX 2 e subseqüente aumento da inibição COX 1, facilitando assim a instalação da intoxicação.

2.4 OPIÓIDES

De acordo com a IASP ("International Association for the Study of Pain") conceitua-se dor como uma experiência sensorial ou emocional desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial (HELLEBREKERS, 2002). O processo de dor pode levar ao catabolismo protéico, estresse, imunossupressão, retardo na cicatrização de feridas e aceleração dos processos patológicos (LASCELLES et al. 1999).

O termo nocicepção está relacionado com o reconhecimento de sinais sensoriais desencadeados pela lesão tecidual, que ocorre pelo estímulo de nociceptores. Os nociceptores são terminações nervosas aferentes (sensitivas) presentes em classes específicas de fibras (HELLEBREKERS, 2002). Eles podem ser definidos com transdutores que convertem várias formas de energia em potenciais de ação, que são o código de transmissão da informação no sistema nervoso (PISERA, 2005).

As fibras A β são de diâmetro grande, mielinizadas e sua velocidade de condução é rápida. Essas fibras são de baixo limiar, e em condições fisiológicas, frente a um estímulo mecânico, ocorre uma sensação inócua primariamente ativada pelo toque, vibração, pressão e movimentação. As fibras A-delta são mielinizadas, de diâmetro intermediário e quando ativadas por estímulos térmicos e mecânicos, produzem uma percepção rápida e resposta de dor aguda. As fibras C, vinculadas a receptores polimodais, apresentam baixa velocidade de condução por não apresentarem mielina e são ativadas por estímulos mecânico, térmico e químico. Estas fibras apresentam uma percepção lenta e resposta de longa duração ou dor lenta (PISERA, 2005).

A dor clínica pode ser dividida em inflamatória e neuropática. Ambas são caracterizadas por alterações na sensibilidade, a partir da redução da intensidade do estímulo necessário para desencadear a dor, que não seria reconhecido como nociceptivo em uma situação normal, ou alodinia, bem como uma resposta exagerada ao estímulo ou hiperalgesia (HELLEBREKERS, 2002).

A atividade destes receptores é modulada por várias substâncias químicas, liberadas em decorrência de processos inflamatórios, traumáticos ou isquêmicos. Entre estas substâncias estão as prostaglandinas, histamina, serotonina, bradicinina, leucotrienos, substância P, tromboxano, fator de ativação plaquetária e íons potássio (FANTONI & MASTROCINQUE, 2002).

A dor somática é aquela que se origina na pele, músculos, ossos e outros tecidos do organismo, exceto vísceras. A dor visceral advém de órgãos internos, como trato gastrointestinal, sistema respiratório, cardiovascular, urinário, reprodutor, entre outros. Já a dor referida tem origem num local, como por exemplo, a víscera e se reflete em outro local, como por exemplo, a pele. Isso se dá por sinapses compartilhadas por fibras nervosas de tecidos diferentes (TEIXEIRA, 2005).

Resumidamente, na transdução, os nociceptores reconhecem e transformam os estímulos mecânicos, térmicos e químicos em sinais elétricos, chamados de potencial de ação, que por meio da transmissão são conduzidos ao corno dorsal da medula espinhal, onde sofrem modulação e projeção para o tronco cerebral e encéfalo. Neste local ocorre a percepção, onde os sinais são integrados, reconhecidos, identificados e por meio da modulação secundária, transformados em respostas motoras e outros fenômenos de autodefesa (MUIR, 2002).

A maioria das escalas de dor é adaptada da medicina humana e a maior parte dos estudos em medicina veterinária está focada em cães e extrapolada para gatos. Uma variedade de técnicas tem sido utilizada para avaliar a dor em pequenos animais (GRINT; et al. 2006). Segundo Hellyer (2002), as escalas disponíveis são classificadas em: (1) escala analógica visual (EAV); (2) escala descritiva simples; (3) escala de contagem numérica; (4) escala da Universidade de Melbourne (FIRTH; HALDANE, 1999); (5) *"The Glasgow composite the pain tool"* (HOLTON; et al. 2001). Esses sistemas não são específicos para dor sendo passíveis de variação intra e inter-usuário. O grau atribuído depende da impressão do observador e não necessariamente da dor que o animal sente. A subjetividade do avaliador talvez seja o ponto crítico desse tipo de avaliação, porém o EAV por não definir categorias é considerada uma escala mais sensível que a descritiva e a numérica (HELLEBREKERS, 2002). A utilização de uma interação física com o paciente por meio de uma abordagem dinâmica e interativa (EAVID), ao invés de uma simples observação da aparência e comportamento do animal tem sido reivindicada para melhorar a sensibilidade da EAV (LASCELLES; et al. 1998).

A associação de opióides e antiinflamatórios é uma rotina no pós-operatório das diversas intervenções da medicina veterinária. Esta associação permite o controle eficaz da dor e a modulação da resposta inflamatória. Nas cirurgias que envolvem o trato digestório, o jejum é um fator relevante e a apresentação farmacêutica das drogas é um pré-requisito na escolha terapêutica. Assim, o meloxicam e a morfina compõem uma terapia analgésica e antiinflamatória acessível na rotina veterinária. Esta prescrição objetiva o controle dor do paciente e a modulação inflamatória sem comprometer a cicatrização das porções digestivas operadas, visto que interferências negativas nesta cicatriz resultam em graves complicações ao paciente. A avaliação do sofrimento animal é subjetiva e como tal, difícil de ser padronizada. A dor é uma experiência individual, e o quanto desta se traduz em um comportamento observável depende de alguns fatores como idade, sexo, estado nutricional, espécie, raça e tempo de exposição ao estímulo nocivo. Desta forma saber reconhecê-la é fundamental para o tratamento correto (HELLEBREKERS, 2002).

Os fármacos opióides são o principal suporte para o tratamento da dor devido sua eficácia e boa margem de segurança. Quando utilizados em doses apropriadas, os opióides apresentam bom efeito analgésico (ROBERTSON; et al. 2005). Estes

fármacos se ligam a receptores específicos no sistema nervoso central (SNC) e medula espinhal e seus efeitos e a potência variam conforme interação com estes receptores (LASCELLES; et al. 1999). Os opióides alteram a nocicepção e a percepção da dor (FANTONI & MASTROCINQUE, 2002) e no mesencéfalo e medula, ativam as vias nociceptivas descendentes que modulam a nocicepção, por liberação de serotonina e talvez norepinefrina. Desta forma, reduzem a dor sem interferir na função motora. Estes fármacos não causam inconsciência, a menos que doses excessivas sejam administradas (THURMON; et al.1996; PASCOE, 2000; WRIGHT, 2002).

Há uma variedade de receptores opióides que quando ativados podem resultar em analgesia, bem como efeitos farmacológicos colaterais tais como vômito, náusea, bradicardia, hipertermia, depressão respiratória e inapetência. Os principais receptores são designados δ (sigma), κ (kappa) e μ (mu). Dependendo de sua ação nos receptores, os opióides podem ser classificados em agonistas, antagonistas e agonistas - antagonistas (HELLEBREKS, 2002).

A concentração de receptores opióides na amígdala e no córtex frontal de espécies que apresentam depressão do sistema nervoso central em resposta aos opióides, como cães e primatas, é cerca de duas vezes maior do que naquelas espécies que podem apresentar excitação em resposta aos mesmos, como em gatos e cavalos (BENSON, 2002).

2.5 COLÁGENO NA ANASTOMOSE INTESTINAL DE RATOS

O colágeno é o principal componente da matriz extracelular dos tecidos. Estrutura-se numa rede densa e dinâmica resultante da sua constante deposição e reabsorção. A quantidade de colágeno modifica-se no intestino durante o pós-operatório de anastomoses, principalmente na região peri-anastomótica (JIBORN; et al. 1980). Essa variação é resultado da interação entre sua síntese, fixação e degradação no tecido cicatricial. (NIMNI; et al. 1967).

Cronin e colaboradores (1968) demonstraram que os níveis absolutos de colágeno em anastomoses intestinais de ratos permanecem baixos até o 5º dia pós-operatório, ocorrendo aumento progressivo da sua quantidade até atingir valores quase normais em torno do 10º dia pós-operatório. Irvin e Hunt (1974a) utilizando

radioisótopos confirmaram os achados de Cronin e colaboradores (1968), mas observaram que as alterações na concentração do colágeno ocorriam em proporções menos intensas devido à formação de edema na região anastomótica. Segundo Irvin e Hunt (1974b), o conteúdo de colágeno peri-anastomótico permanece constante durante os três primeiros dias pós-operatórios, com aumento significativo após esse período e alcançando valores máximos no 7º dia pós-operatório. Três subtipos de colágeno (I, III e V) são identificados durante o processo cicatricial do intestino delgado. Os colágenos I e III atingem proporções mais significativas e a relação entre eles têm importância maior no estudo da cicatrização anastomótica.

Evidências mais recentes associaram as alterações da rede de colágeno como as principais responsáveis pelas modificações mecânicas das anastomoses intestinais (JONSSON; et al. 1985, 1987).

As anastomoses intestinais perdem 72% a 95% da sua força tecidual original, durante os três primeiros dias do processo cicatricial, quando há atividade mais intensa da collagenase (JIBORN; et al. 1980). Após esse período inicial de déficit mecânico, ocorre ganho de força anastomótica acompanhada de progressiva deposição de colágeno na área cicatricial.

Entretanto, as características qualitativas do colágeno depositado são mais importantes para o suporte estrutural da anastomose do que sua concentração tecidual (HENDRIKS & MASTBOOM, 1990).

O aumento de força tênsil é mais relacionado com o colágeno I do que com o colágeno III. Doillon e colaboradores (1985) evidenciaram que a deposição e o remodelamento das fibras de colágeno I são os principais determinantes do ganho de força da área cicatrizada exercendo influência sobre a integridade anastomótica.

Jonsson e colaboradores (1983); Hendriks e Mastboom (1990) estabeleceram a correlação clínica dessas evidências. Verificaram que havia um período mais vulnerável para deiscência anastomótica (entre 4º e 7º dia pós-operatório), que correspondia aos momentos de déficit mecânico e de baixa quantidade de colágeno depositado na anastomose.

A degradação do colágeno, na matriz extracelular, é obtida por uma família de metaloproteinases (MMP) que clivam suas fibras intactas em fragmentos menores que podem ser fagocitados e, subsequentemente, degradados por enzimas lisossômicas até seus aminoácidos constituintes (CHAMPE e HARVEY, 1996).

Wysocki et al. (1998) sugeriram que altos níveis de metaloproteinase aumentariam a degradação de componentes moleculares essenciais ao processo cicatricial e, também, que a diminuição dessas enzimas, em feridas, impediria a cronicidade das lesões e as dificuldades de cicatrização. Os fibroblastos são induzidos, pela interleucina-1 (IL1) e pela linfotóxina (TNF), a produzirem metaloproteinases, as quais são mediadoras de eventos importantes de proteção e regeneração de tecidos lesados, mas que, em condições especiais, podem estar envolvidas em destruição de tecido sadio (WYSOCKI et al., 1998).

2.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES

O colágeno é uma proteína rica em aminoácidos básicos, os quais reagem fortemente com corantes ácidos. As moléculas de colágeno dispõem-se em orientação espacial paralela, apresentando birrefringência característica (JUNQUEIRA; et al. 1979).

Sweat, e colaboradores (1964) adotaram o uso do Sirius-red F3BA (SRF) como corante alternativo na identificação do colágeno tecidual devido ao rápido desbotamento da coloração de picrofucsina. As moléculas de SRF (ácido) interagem individualmente com as moléculas de colágeno mantendo um relacionamento espacial paralelo com as mesmas, ressaltando a birrefringência. A combinação seletiva com o colágeno permite sua visualização como fibras amarelo-brilhantes, sendo que o uso da microscopia polarizada aumenta a especificidade, a sensibilidade e a resolução do método.

Junqueira, e colaboradores (1979) padronizaram a metodologia de uso do SRF e após a análise histológica de cortes teciduais de 15 espécies de vertebrados, consideraram a coloração específica para o colágeno tecidual. Em outro estudo, Junqueira e colaboradores (1978) compararam o colágeno de diferentes regiões de animais demonstrando correlação entre diferentes cores e birrefringências e a distribuição bioquímica dos colágenos I e III (SRF + polarização). Esses autores observaram que o colágeno tipo I apresentava-se como fibras espessas, fortemente birrefringentes e com coloração que variava do amarelo ao vermelho, diferentemente do colágeno tipo III (fibras finas, fracamente birrefringentes e esverdeadas).

A cor e a intensidade da birrefringência correlacionam-se diretamente com a espessura da fibra de colágeno (diferentes padrões de agregação física das moléculas) e do tecido analisado (JUNQUEIRA; et al. 1982).

Dayan e colaboradores (1989) analisaram vários tipos de fibras colágenas e evidenciaram que a espessura da fibra não era o único fator determinante do padrão de birrefringência. Constataram que o alinhamento das moléculas e o entrelaçamento das fibras afetavam a refração da luz, sendo que fibras espessas e entrelaçadas apresentavam-se laranja-avermelhadas (fibras de colágeno tipo I - maduras), enquanto que fibras finas e pouco entrelaçadas apresentavam-se esverdeadas (fibras de colágeno tipo III - imaturas).

Rabau e colaboradores (1995) realizaram estudo da concentração de colágeno em anastomoses intestinais de ratos utilizando SRF e microscopia de polarização. Verificaram que no intestino de ratos não operados havia predomínio de fibras colágenas de coloração que variava do amarelo ao laranja. Por outro lado, durante a primeira semana pós-operatória a maioria das fibras no sítio anastomótico apresentavam-se finas, de colágeno imaturo com coloração que variava do verde ao amarelo e pouco integradas. Entretanto, as fibras gradualmente retornavam as suas colorações pré-operatórias até o 21º pós-operatório, acompanhando as modificações mecânicas da ferida, sugerindo que a quantidade das fibras de colágeno tem importância na integridade da anastomose intestinal durante sua cicatrização.

A quantificação de fibras maduras e imaturas de acordo com a sua coloração permite avaliação qualitativa do colágeno em estudos de cicatrização de anastomoses. No entanto, os parâmetros histológicos mesmo quando examinados por patologistas experientes podem apresentar variabilidade inter-observadores. A utilização de equipamentos que digitalizam imagens histológicas permite a quantificação de dados morfológicos com minimização de vieses. Com esse propósito, vários estudos informatizaram a análise histológica (LEMOS, 2002; COSTA; et al. 2003; TRUBIAN, 2004).

Mediante esses recursos pode-se realizar estudo densitométrico que avalia a concentração e qualidade do colágeno, determinando sua maturação no tecido cicatricial. Lemos (2002) verificou o efeito da desnutrição intra-uterina na cicatrização da parede abdominal em ratos lactentes e acrescentou às quantificações histológicas de colágeno o índice de maturação do colágeno – IMaC (Figura 1). Esse índice reflete a maturidade do colágeno presente em determinado

campo histológico ao estabelecer a razão entre as porcentagens de colágeno tipo I e tipo III:

$$\text{IMaC} = \frac{\% \text{ Colágeno Tipo I}}{\% \text{ Colágeno Tipo III}}$$

Figura 1 - Índice de Maturação do Colágeno (IMaC)

Fonte: LEMOS, 2002.

Nota: IMaC = Índice de Maturação do colágeno; % = porcentagem

2.7 ANGIOGÊNESE

A formação dos vasos sangüíneos ocorre por dois mecanismos diferentes, a vasculogênese e a angiogênese. Na vasculogênese ocorre a diferenciação de células endoteliais a partir de precursores mesodérmicos (angioblastos), manifestando-se somente durante o período embrionário, levando à formação de um plexo vascular primário. Com o tempo, esses canais endoteliais desenvolvem-se formando um sistema mais complexo e ramificam-se em vasos maiores e menores. Na angiogênese, os novos vasos são formados a partir de outros já existentes. Assim, novos capilares são formados, por meio da angiogênese, pela divisão dos vasos de origem (AUERBACH & AUERBACH, 2002). Em adultos, a angiogênese é essencial para o ciclo reprodutivo feminino e para o reparo, remodelação e regeneração dos tecidos durante o processo de cicatrização (FOLKMAN & SHING, 1992, AUERBACH & AUERBACH, 2002).

Angiogênese é um processo fundamental para formação de novos vasos sangüíneos a partir de capilares pré-existentes (CHAIN; et al. 2004). É um evento importante em vários fenômenos fisiológicos tais como no desenvolvimento embrionário, inflamação crônica e no reparo tecidual (POLVERINI, 1995). Levando-se em conta essas condições, angiogênese é altamente regulada, inicia-se sobre

breves períodos (dias) e então é inibida completamente (FOLKMAN & SHING, 1992).

O processo de angiogênese é regulado por fatores de crescimento, citocinas pró-angiogênicas e inibidores da neovascularização. Medidores angiogênicos podem ser divididos em 2 grupos: estimuladores e inibidores (POLVERINI, 1995). A maioria das moléculas estimuladoras são proteínas e muitas delas são fatores de crescimento, moléculas de adesão celular, sinais de diferenciação, quimiotáticos e enzimas que participam do controle da formação de um novo capilar (POLVERINI, 1995, CARMELIET & JAIN, 2000). Os inibidores fornecem o equilíbrio requerido para manter a população de células endoteliais inativa, porém altamente responsiva através de sinais anulados que, se ativados, podem levar a uma resposta angiogênica deletéria para o organismo. Eles são diversos em sua função e composição, agindo bloqueando ou atenuando a proliferação de células endoteliais, transdução sinalizadora, migração celular, expressão da metaloproteinase matricial, sobrevivência celular, desenvolvimento de precursor celular endotelial e ou recrutamento (POLVERINI, 1995; CARMELIET & JAIN 2000, YANCOPOULOS et al., 2000).

Fatores angiogênicos e anti-angiogênicos têm sido investigados durante décadas quanto a suas propriedades, porém o estudo de suas interações está apenas começando. O mesmo pode ser atribuído para as células não vasculares como os macrófagos, os quais podem modular a resposta angiogênica (FOLKMAN & SHING, 1992).

Os fatores angiogênicos são classificados como direto e indireto. O fator angiogênico direto, como o VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), tem a função de estimular a proliferação das células endoteliais e ou migração das mesmas. Quando o fator angiogênico não estimula as células endoteliais *in vitro*, ele é chamado fator angiogênico indireto porque é assumido que a proliferação endotelial e migração, observada *in vivo*, deve ter sido induzida por algum outro fator ou célula, por exemplo, o macrófago. O macrófago, além de reger o papel central na orquestra do processo de reparo, é responsável por coordenar a formação e remodelação do tecido durante o processo de cicatrização (POLVERINI, 1995). Ele libera fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e sua atividade angiogênica ocorre em locais profundos do processo de cicatrização, quando a tensão de oxigênio é baixa e propícia para o

metabolismo anaeróbico. A hipóxia que ocorre no centro do tumor é que propicia aos macrófagos tornarem-se angiogênicos (FOLKMAN & SHING, 1992).

VEGF é um mitógeno específico para as células endoteliais, produzido por vários tipos celulares, como queratinócitos, macrófagos e fibroblastos (NÖR & POLVERINI, 1999; FERRARA, 2004).

O mesmo também é conhecido por aumentar a permeabilidade vascular e estar envolvido na ocorrência e progressão do processo inflamatório (DVORAK et al., 1995). VEGF é 50.000 vezes mais potente do que a histamina na habilidade de aumentar a permeabilidade vascular (DVORAK, 2002, HICKLIN & ELLIS, 2005).

O VEGF desempenha um papel fundamental durante o processo de desenvolvimento do reparo tecidual e para a manutenção da vida. Essa importância está vinculada à observação de que a inativação de um único alelo VEGF em cobaias resulta na letalidade embrionária entre os dias 11 e 12. (FERRARA, 1996; FERRARA, 2002). O VEGF, porém, deixa de ser essencial para a sobrevivência quando as células endoteliais sofrem um processo de maturação, isso ocorrendo por volta da quarta semana pós-natal em camundongos (FERRARA, 1999). Já no adulto plenamente desenvolvido, o VEGF pode ser primariamente requerido para ativação de processos angiogênicos como o desenvolvimento do corpo lúteo e processo de reparo (FERRARA, 1999).

O papel central que o VEGF apresenta mediando o processo de angiogênese durante o reparo tecidual foi observado em estudos desenvolvidos por Nissen e colaboradores, (1998), quando constataram que o VEGF é produzido e liberado localmente em áreas de cicatrização quando o crescimento de novos vasos é iniciado e mantido. Os mesmos autores observaram que a neutralização de VEGF diminui amplamente a atividade angiogênica e atividade quimiotática para células endoteliais nos fluidos do reparo tecidual. Booth e colaboradores, em 1998, relataram que o processo de cicatrização está associado com o aumento da produção de VEGF, porém em cobaias com diabetes este processo foi retardado e a expressão do mRNA para VEGF apresentou níveis mais baixos em comparação com o normal, sugerindo, desta forma, que um defeito na regulação do fator de crescimento vascular endotelial pode estar associado com as alterações no processo de reparo tecidual.

O fator de crescimento vascular endotelial é o regulador mais importante tanto da neovascularização fisiológica quanto da patológica. O fato do VEGF ser um mitógeno relativamente específico para células endoteliais vasculares permite uma resposta angiogênica pronunciada numa variedade de modelos *in vivo*. O VEGF estimula as células endoteliais na degradação da matriz extracelular, migração e formação de túbulos *in vitro*. *In vivo*, o VEGF também funciona como regulador da permeabilidade vascular, que é considerada importante para o início da angiogênese. A sobrevivência de células endoteliais nos vasos recém-formados é VEGF-dependente. Coerente com seu papel na sobrevivência celular, o VEGF induz a expressão de proteínas anti-apoptóticas nas células endoteliais (FERRARA et al., 2003; FERRARA, 2004; NÖR et al., 2001).

A distribuição tecidual de receptores de VEGF inclui células do músculo vascular liso, osteoblastos, miócitos cardíacos, miofibroblastos, neurônios e várias células tumorais (LOMONTE et al., 2003)

Os receptores de VEGF (VEGFr) pertencem a uma subfamília dos receptores tirosina quinase (RTK) e são classificados em três: VEGFr-1, VEGFr-2 os mais importantes para a angiogênese e VEGFr-3, ligado à proliferação dos vasos linfáticos. Nos seres humanos, VEGFr-1 e VEGFr-2 são compostos por 1338 e 1356 aminoácidos, respectivamente, e são constituídos por quatro regiões: o domínio ligante-ligante extracelular, o domínio transmembrana, o domínio da tirosina quinase e a região carboxi terminal. VEGFr-1 e VEGFr-2 são homólogos em sua estrutura e os domínios extracelulares dos VEGFr apresentam homologia às porções variáveis das imunoglobulinas (SHIBUYA, 2000; TAMMELA, 2005)

A angiogênese não pode ser comentada sem citar a importância das metaloproteinases em eventos celulares como migração celular, invasão, proliferação e apoptose (VU, WERN, 2000). Elas são responsáveis pela regulação de processos como a morfogênese, angiogênese, cicatrização e degradação da matriz extracelular. As metaloproteinases não só remodelam a matriz extracelular (ECM), mas também influenciam diversas reações celulares. Elas (I) degradam as moléculas da ECM e permitem a migração celular; (II) alteram o microambiente da ECM resultando na alteração do comportamento celular e (III) modulam a atividade de moléculas bioativas através da clivagem direta, liberação de substâncias armazenadas ou através da modulação dos seus inibidores (VU, WERB, 2000).

A matriz extracelular desempenha papel crucial no desenvolvimento e na manutenção da arquitetura tecidual, é composta por colágenos, lamininas, fibronectina, vitronectina e proteoglicanos (YOON et al., 2003). A degradação da matriz extracelular leva à perda da integridade tecidual, fato que é fundamental em processos fisiológicos, tais como: remodelação óssea, implantação trofoblástica e cicatrização, porém esse mesmo fenômeno está envolvido em processos inflamatórios (KRAIEN & KOREN, 2000).

Proteinases participam de todas as etapas do processo de degradação da matriz extracelular, sendo essenciais para a interação das células com o meio circundante. Existem diversas famílias de enzimas que atuam nesse processo, destaca-se, por sua participação em praticamente todos os passos da degradação dos componentes da matriz extracelular: a família de metaloproteinases (MMP) (YOON et al., 2003).

A atividade da maioria das metaloproteinases é muito baixa ou insignificante nos tecidos normais, sendo a expressão transcricionalmente controlada por citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, hormônios, interação célula-célula e célula-matriz (NAGASE & WOESSNER, 1999).

As MMP interferem umas com as outras à medida que muitas delas podem ativar outras pró-enzimas, o que sugere que a ativação controlada das mesmas pode envolver uma cascata, englobando diferentes membros da família das MMP (CAWSTON, 1998).

As células endoteliais sintetizam várias MMP: MMP1, MMP2, MMP9 e MT1MMP. Dentre estas a MMP2, MMP9 e a MT1MMP foram descritas como exercendo importante papel na angiogênese (STETLER & STEVENSON, 1999). A angiogênese envolve proliferação e migração de células endoteliais, remodelamento da matriz extracelular, formação tubular, recrutamento de estruturas adjacentes para a sustentação dos neovasos, anastomoses e desenvolvimento de membrana basal (RAMSDEN, 2000). As metaloproteinases participam desde a ruptura da membrana basal vascular até a proliferação endotelial, sendo parte de sua ação sobre moléculas pró-angiogênicas como a família dos fatores de crescimento endotelial vascular, e angiogênicas como a angiostatina (YOON et al., 2003). Nguyen e colaboradores (2001) postularam um modelo para o papel das MMP2 e MMP9 na angiogênese. A MMP2, constitutivamente secretada pelas células endoteliais, seria ativada através de uma cascata de ações enzimáticas a partir da trombina. Em

2003, Wilmoth e colaboradores descrevem que as MMP são conhecidas por participarem da fisiologia normal do metabolismo do colágeno, mas também estão associadas com a absorção patológica da matriz extracelular de processos inflamatórios crônicos de pele, tumor e metástases.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos adversos dos AINEs parecem estar relacionados ao papel de cada ciclooxigenase. Um possível efeito colateral indesejado relacionado ao uso dos AINES é a alteração no processo de cicatrização, no entanto, os resultados são conflitantes, não existindo um consenso entre os pesquisadores. Os AINEs inibidores preferenciais da COX 2 parecem ser menos ulcerogênicos, porém tanto eles quanto os inibidores de COX 1 são citados como importantes na formação do colágeno e na promoção da angiogênese e sua deficiência pelo uso de AINEs poderia retardar o processo cicatricial. O meloxicam, inibidor preferencial da COX 2, objeto de estudo neste trabalho, tem um papel fundamental na cicatrização e sua administração pode promover o retardo na cicatrização da anastomose intestinal. O amplo uso na medicina veterinária, devido a satisfação no controle da dor, apresentação injetável e economicamente viável, nos levou a avaliá-lo por alguns critérios no capítulo seguinte.

4 REFERÊNCIAS

AUERBACH, R. AUERBACH, W. Vasculogenesis and angiogenesis. In: FAN, T.D.; KONH, E. C. **The new angiotherapy**. Totowa: Humana Press, 2002. Cap.1, p. 1-6.

BENNETT; N.T., SCHULTZ; G. S. Growth factors and wound healing: **biochemical** properties of growth factors and their receptors. **Am. J. Surg.**, v. 165, n. 6, p. 728-37, 1993.

BENSON, G. J. Opióides. In: GREENE, S.A. **Segredos em Anestesia Veterinária e Manejo da Dor**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002. p.1-6.

BERENGER, B. *et al.* **Chronic gastric ulcer healing in rats subject to selective and non-selective cyclooxygenase-2 inhibitors.** European Journal of Pharmacology, v. 442, n. 1-2, p. 125-135, 2002.

BOOTH, et al. **Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. J. Periodont Res**, Copenhagen, v. 33, p. 491-499, Aug. 1998.

BOSTROM, I. M.; NYMAN, G.; HOPPE, A.; LORD, P. Effects of meloxicam on renal function in dogs with hypotension during anesthesia. **Veterinary Anesthesia and Analgesia**, n. 33, p. 62-69, 2006.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis and cancer and other. **Nature**, London, v. 407, n. 7, p. 249-257, sept., 2000.

CARREL, A. The treatment of wounds. **JAMA**, v. 55, p. 2148, 1910.

CAULKETT, N.; READ, M.; FOWLER, D.; WALDNER, C. A comparasion of the analgesic effects of butorphanol with those of meloxicam after elective ovariohysterectomy in dogs. **Canadian Veterinary Journal**, n.44, p.565-570, jul., 2003.

CAWSTON, T. Matrix metalloproteinases and timp: properties and implications for the rheumatic diseases. **Mol Med Today**, 4 : 130-7, 1998.

CHAIN, J.; JONES, M.K.; TARNAWSKI, A. S. Serum response factor is a critical requirement for VEGF signaling in endothelial cells and VEGF-induced angiogenesis. **The Faseb Journal**, p. 1-19, Jun. 2004.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2^a ed. Editora Artes Médicas, 1996.

CLARK, R. A. F: Wound repair. In: KUMAR, V.; ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Pathologic Basis of Disease**. 7th ed. Local: Ed. Saunders, 2005. p. 112

CLARK, T. P. The clinical pharmacology of cyclooxygenase-2-selective and dual inhibitors. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, n.36, p.1061-1085, 2006.

COSTA, M. R. M.; CAMPOS, A. C. L.; COELHO, J. C. U. BARROS; MATSUMOTO. Oral Glutamine and the Healing of Colonic Anastomoses in Rats. **J. Parent. Enteral. Nutr.**, v. 27, n. 3, p.182-6, 2003.

CRONIN, K., JACKSON, D. S., DUMPHY, J. E. Changing bursting strength and collagen content of the healing colon. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 126, n. 4, p.747-53, 1968.

DAYAN; D., HISS; Y.; HIRSHBERG, A., BUBIS, J. J., WOLMAN, M. Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers ? **Histochemistry**, v. 93, p.27-29, 1989.

DENEUCHE, A. J.; DUFAYET, C.; GOBY, L.; FAYOLLE, P.; DESBOIS, C. Analgesic comparison of meloxicam or ketoprofen for orthopedic surgery in dogs. **Veterinary Surgery**, n.33, p.650-660, 2004.

DOILLON, C. J.; DUNN, M. G.; BENDER, E. Collagen fiber formation in repair tissue: development of strength and toughness. **Coll Relat Res**, v. 5, p.481,1985.

DVORAK, H. F. Vascular Permeability Factor / Vascular Endothelial Growth Factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **J. Clin Oncol**, v. 20, n. 21, p. 4368-4380, nov. 2002.

DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and angiogenesis. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 146, n. 5, p. 1029-1035, May 1995.

ELWOOD, C.; BOSWOOD, A.; SIMPSON, K. Renal failure after flunixin **meglumine** administration. **Veterinary Record**, n.130, p.582-583, 1992.

ENBERG, T. B.; BRAUN, L. D.; KUZMA, A. B. Gastrointestinal perforation in five dogs associated with the administration of meloxicam. **Veterinary Emergency and Critical Care Society**, n.16, p.34-43, 2006.

ENGELHARDT, G. Pharmacology of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory drug with an improved safety profile through preferential **inhibition of COX-2**. **Br J Rheumatol.**, v. 35, suppl.1, p. 4-12, 1996a.

FANTONI, D.T.; MASTROCINQUE, S. Fisiopatologia da dor. *In*: FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S.R.G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002. p.321-336.

FANTONI, D. T.; MASTROCINQUE, S. Analgesia preemptiva: mito ou fato? **Clínica Veterinária**, n.49, p.24-32, 2004.

FERRARA, N. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. **Nature**, London, v. 380, n. 6573, p. 49-442, Apr. 1996.

FERRARA, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. **J. Mol Med**, v.77, n. 7, p. 527-543, July 1999.

FERRARA, N. VEGF and quest for tumor angiogenesis factors. **Nat Rev Cancer**, London, v. 2, n.10, p. 795-803, Oct. 2002.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581-611, Aug. 2004.

FERRARA, N; GERBER, H.P.; LeCOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, New York, v. 9, n. 6, p. 669-676, June, 2003.

FIRTH, A.M.; HALDANE, S.L. Development of a scale to evaluate postoperative pain in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 214, n.5, p.651-659, 1999.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J. Biol Chem, Baltimore**, v. 267, n. 16, p. 10931-10934, June, 1992.

GETZEN, L. C., HOLLOWAY, C. K. Comparative study of intestinal anastomotic healing in inverted and everted closures. **Surg Gynecol Obstet.**, v. 123, p.1219-1227, 1966.

GOGNY, M. Pharmacological profile and therapeutic value of meloxicam. Recent Advances in Non-Steroidal Anti-Inflammatory Therapy in Small Animals. **Boehringer Ingelheim**, Paris, p. 35-40, 1999.

GOLIGHER, J. C.; GRAHAM, N. G.; DOMBAL, F. T. de Anastomotic dehiscence after anterior resection of rectum and sigmoid. **Br J. Surg**, v. 57, n.2, p.109-18, 1970.

GRAHAM, M. F.; DRUCKER, D. E.; DIEGELMANN, R. F; ELSON, C. O. Collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells in culture. **Gastroenterology**, v. 92, p.400, 1987.

GRECA, F.H.; NORONHA, L.; BENDHACK, M.; FERES, A.; SOCCOL, A.; DUDA, J. R. Use of small intestine submucosa as ureteral allograft in pigs. **Intern. Braz. J. Urol.**, v. 30, n. 4, p. 327-35, 2004.

GRINT, N. J.; MURISON, P. J.; COE, R. J.; WATERMAN-PEARSON, A. E. Assessment of the influence of surgical techniques on postoperative pain and wound tenderness in cats following ovariohysterectomy. **J. Fel. Med. Surg.**, v.8, p.15-21, 2006.

HELLEBREKERS, L.J. A dor em animais. In: HELLEBREKERS, L. J. **Dor em animais**. 2 ed. São Paulo: Manole, 2002. p.11-17.

HELLYER, P. W. Objective, categoric methods for assessing pain and analgesia. In: **Handbook of veterinary pain management**. Missouri: Mosby Inc, 2002. p. 82-107.

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

HESP, F.; HENDRIKS, T.; SCHILLING, P. H.; LUBBERS, E. J.; DeBOER, H. H. Histological features of wound repair: a comparison between experimental ileal and colonic anastomoses. **Br J Exp Pathol**, v. 66, p.511-518, 1985.

HICKLIN, D.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J. Clin Oncol**, New York, v. 23, n. 5, p. 1011-1027, Feb., 2005.

HOLTON, L.; HREID, J.; SCOTT, E.M.; PAWSON, M.; NOLAN, A. Development of a behaviour-based scale to measure acute pain in dogs. **Vet. Rec.**, v.148, p.525-531, 2001.

HOWES, E.L.; SOOY, J.W.; HARVEY, S.C. The healing of wounds as determined by their tensile strength. **JAMA**, v. 92, n.1, p. 42-45, 1929.

IRVIN, T.T.; HUNT, T.K. Reappraisal of the healing process of anastomosis of the colon. **Surg Gynecol Obstet.**, v. 138, p. 741-6, 1974a.

IRVIN, T.T., HUNT, T.K. Effect of malnutrition on colonic healing. **Ann Surg.**, v. 180, n. 5, p. 765-72, 1974b.

JAFFE, B. M.; PARKER, C.N.; PHILPOTT, G.W. Immunochemical measurement of prostaglandin of prostaglandin-like activity from normal and neoplastic cultured tissue. **Surg. Forum**, v. 2, p. 22-90, 1971.

JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of Experimental Colonic Anastomoses III: Collagen Metabolism in the Colon after Left Colon Resection. **Am. J. Surg.** 139:398-405, 1980.

JONSSON, K.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. Breaking strength of small **intestinal** anastomoses. **Am. J. Surg.**, v. 145, p. 800-3, 1983.

JONSSON, K.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. Changes in collagen content of the small intestinal wall after anastomosis. **Am. J. Surg.**, v. 150, n. 9, p. 315-7, 1985.

JONSSON, K.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. Collagen metabolism in small intestinal anastomosis. **Am. J. Surg.**, v. 154, n. 9, p. 288-91, 1987.

JUNQUEIRA; L.C.U., BIGNOLAS; G., BRENTANI; R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.**, v. 11, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L.C.U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens tipe I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Arch Histol Jpn**, v. 41, p. 267-74, 1978.

JUNQUEIRA, L.C.U.; MONTES, G.S.; SANCHES, E.M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-Polarization Method. **Histochemistry**, v. 74, p.153-6, 1982.

KERR, C. Pain management I: systemic analgesics. In: BSAVA Manual of Canine and Feline Anaesthesia and Analgesia. 2. ed. London: **British Small Animal Veterinary Association**, p.96-101, 2007.

KHOURY, G. A.; WAXMAN, B. P. Large bowel anastomose: I. The healing process and sutured anastomoses: a review. **Br J Surg** 1983; 70:61-3.

KRAIEM, Z.; KOREN, S. Matrix metalloproteinases and the thyroid. **Thyroid**, 10 : 1061-9, 2000.

LASCELLES, B. D.; CRIPPS, P.; MIRCHANDANIM, S.; WATERMAN A. E. Carprofen as an analgesic for postoperative pain in cats: dose titration and assessment of efficacy in comparison to pethidine hydrochloride. **J. Small Anim. Pract.**, v.36, p.535-541, 1995.

LASCELLES, B. D.; CRIPPS, P.; JONES, A.; WATERMAN A. E. Efficacy and kinetics of carprofen, administered preoperatively or postoperatively, for the prevention of pain in dogs undergoing ovariohysterectomy. **Vet. Surg.**, v.27, p. 568-82, 1998.

LASCELLES, B. D. ; CAPNER, C. A.; WATERMAN-PEARSON, A. E. Current British veterinary attitudes to perioperative analgesia for cats and small mammals. **Vet. Rec.**, v. 145, p.601-604, 1999.

LEE, J. L. P. *et. al.* Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and **toxicological** implications. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 192, n. 3, p. 294-306, 2003.

LEECE, E. A.; BREARLEY, J. C.; HARDING, E. F. Comparison of carprofen and meloxicam for 72 hours following ovariohysterectomy in dogs. **Veterinary Anesthesia and Analgesia**, n.32, p. 184-92, 2005.

LEMOS, I. C. M. C. **Influência da desnutrição intra-uterina na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes avaliada mediante estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno.** 2002. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

LOMONTE, B.; YAMILETH, A.; SANTAMARIA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. **Toxicon**, 42(3): p. 307-12, 2003.

MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P. D.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

McNEIL, P. E. Acute tubule-interstitial nephritis in a dog after halothane anesthesia and administration of flunixin meglumine and trimethoprim-sulphadiazine. **Veterinary Record.**, n. 131, p.148-151, 1992.

MINOSSI, J. G.; LEITE, C.V.S.; NARESSE, L. E.; RODRIGUES, M. A. M.; CURI, P. R.; KOBAYASI, S. Ação do diclofenaco de sódio em anastomoses realizadas no intestino delgado de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 13, n. 1, p. 37-43, 1998.

MORI, N.; DOI, Y.; HARA, K.; YOSHIZUKA, M.; OHSATO, K.; FUJIMOTO, S. Role of multipotent fibroblasts in the healing colonic mucosa of rabbits: ultrastructural and immunocytochemical study. **Histol Histopathol.**, v. 7, p. 583-86, 1992.

MUIR, W. W. Pain and stress In: GAYNOR, J. S.; MUIR, W. W. **Handbook of veterinary pain management.**, Missouri: Mosby Inc, p.46-59, 2002.

NAGASE, H.; WOESSNER, J.F. Matrix metalloproteinases. **J. Biol Chem.**, n.274, p. 21491-4, 1999.

NAKAGAWA, K.; MIYAGAWA, Y.; TAKEMURA, N.; HIROSE, H. Influence of preemptive analgesia with meloxicam before resection of the unilateral mammary gland on postoperative cardiovascular parameters in dogs. **Journal of Veterinary Medicine Science.**, n. 69, p. 939-944, 2007.

NGUYEN, M.; AUKELL, J.; JACKSON, C.J. Humon endothelial gelatinases and angiogenesis. **Int J. Biochem Cell Biol.**, v. 33, p. 960 – 70.

NIMNI, M. E.; DeGUIA, E.; BAVETTA, L. A. Synthesis and turnover of collagen precursors in rabbit skin. **Biochem. J.**, v. 102, p.143-7, 1967.

NISSEN, N. N. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 152, n. 6, p. 1445-1452, June, 1998.

NÖR, J. E.; POLVERINI, P. Role of endothelial growth factor – mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and **induction** of Bcl-2 expression. **Am J Pathol**, Philadelphia, v.154, n.2, p. 3475-384, feb., 1999.

NÖR, J. E. Up-regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth. **Cancer Res**, Chicago, v. 61, n. 5, p. 2183-2188, Mar. 2001.

ORGILL, D.; DEMLING, R. H. Current concepts and approaches to wound healing. **Crit. Care Med.**, v.16, n. 9, p. 899-908, 1988.

PASCOE, P. J. Opioid analgesics. **Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.**, v.30, p.757-772, 2000.

PAULUS, H. E. Nonsteroidal anti-inflammatory – drugs: major side effects. **J. Musculoskel. Med.**, v. 8, p. 29-33, 1991.

PISERA, D. Fisiologia da dor. In: OTERO, P. **Dor:** avaliação e tratamento em pequenos animais. São Caetano do Sul : Editora Interbook, 2005. p.30-75.

POLVERINI, P. J. The pathophysiology of angiogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v.6, n.3, p. 230-247, 1995.

RABAU, M. Y.; HIRSHBERG, A.; HISS, Y.; DAYAN, D. Intestinal Anastomosis Healing in Rat: Collagen Concentration and Histochemical Characterization by Picrosirius Red Staining and Polarizing Microscopy. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 62, p. 160-5, 1995.

RAMSDEN, J. D. Angiogenesis in the thyroid gland. **J. Endocrinol.**, v. 166, p. 475-80, 2000.

ROBERTSON, S. A.; LASCELLES, B. D. X.; TAYLOR, P. M.; SEAR, J. W. PK-PD. PK-PD Modeling of buprenorphine in cats: intravenous and oral transmucosal administration. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v.28, n.5, p.453-460, 2005.

SHIBUYA, M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. **J Biochem Mol Biol**, 2006. 39(5): p. 469-78.

SLINGSBY, L. S.; WATERMAN-PEARSON, A. E. Posoperative analgesia in the cat after ovariohysterectomy by use of carprofen, ketoprofen, meloxicam or tolafenamic acid. **Journal of Small Animal Practice**, v.41, n. 10, p.447-450, 2008.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S. I. Sirius Red F3BA as a Stain for Connective Tissue. **Arch. Pathol.**, v. 78, p. 69-72, 1964.

SAVASSI-ROCHA, P. R.; LOPES, R. L. C. Anastomoses intestinais: bases da cicatrização e análise dos diferentes tipos. In: CASTRO, L. P.; SAVASSI-ROCHA, P. R.; CUNHA-MELLO, J. R. **Tópicos em Gastroenterologia número 5**. Rio de Janeiro, p. 493-521, 1994.

STETLER-STEVENSON, W.G.; Matrix metalloproteinase angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. **J Clin Invest.**,v. 103, p. 1237-41, 1999.

TAMMELA, T., et al., The biology of vascular endothelial growth factors. **Cardiovasc Res**, 2005. 65 (3): p. 550-63.

TEIXEIRA, M. W. Dor em pequenos animais. **Revista CFMV.**, v.11, p.31-41, 2005.

THORNTON, F.J., BARBUL, A. Healing in the gastrointestinal tract. **Surg. Clin. North Am.**, v. 77, n. 3, p. 549-573, 1997.

THURMON, J. C.; TRANQUILLI, W.J.; BENSON, G.J. Preanesthetics and anesthetics adjuncts. *In*: _____. **Veterinary Anesthesia**. 3.ed. Baltimore: Willian and Wilkins, 1996. p.183-209.

TRUBIAN, P. **Octreotide subcutâneo e cicatrização de sutura gástrica em ratos: estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno**. Curitiba, 2004. 68 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

VU, T.H., WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev.** v.14 (17), p. 2123-33, 2000.

WINKLE JR, W. van. The tensile strength of wounds and factors that influence it. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 129, n. 4, p. 819-42, 1969.

WILGUS, T. A. *et. al.* Reduction of scar formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment. **Wound Repair and Regeneration**, v. 11, n. 1, p. 25-35, 2003.

WILMOTH, J. G.; SCHULTZ, G.S.; ANTONELLI, P. J. Tympanic membrane metalloproteinase inflammatory response. **Otolaryngol head neck surg.** v. 129 (6), p. 647-54.

WISE, L.; McALISER, W.; STEIN, T.; SCHUCK, P. Studies on the healing of anastomoses of small and large intestine. **Surg Gynecol Obstet.**, v. 141, p. 190-194, 1975.

WRIGHT, B. D. Clinical pain management techniques for cats. **Clin. Tech. Small. Anim. Pract.**, v.17, p.151-157, 2002.

WYSOCKI, A.; SCHULTZ, G.; PARKS, W. W. Proteinases e feridas: vantagens e desvantagens. **Revista Pelle Sana Soc. Bras. De Enfermagem em Dermatologia.**, v.1, n.1, p. 27-8, 1998.

YANCOPOULOS, G. D. et al. Vascular-specific growth factor and blood vessel formation. **Nature**, London, v. 407, n. 6801, p. 242-248, sept., 2000.

YOON, S. O.; PARK, S. J.; YUN, C. H.; CHUNG, A. S. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. **J. Biochem.** v. 275 p. 31226-32

CAPITULO II

AVALIAÇÃO DA ANASTOMOSE ENTÉRICA DE RATOS WISTAR APÓS O USO DE MELOXICAM NO PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO, ATRAVÉS DO ESTUDO HISTOLÓGICO DO COLÁGENO E IMUNOHISTOQUÍMICO DA ANGIOGÊNESE NA CICATRIZAÇÃO

Evaluation of intestinal anastomosis in Wistar rats after the use of meloxicam during immediate postoperative period, with histological study of collagen and immunohistochemical study of angiogenesis in the healing

AVALIAÇÃO DA ANASTOMOSE ENTÉRICA DE RATOS WISTAR APÓS O USO DE MELOXICAM NO PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO, ATRAVÉS DO ESTUDO HISTOLÓGICO DO COLÁGENO E IMUNOHISTOQUÍMICO DA ANGIOGÊNESE NA CICATRIZAÇÃO

Evaluation of intestinal anastomosis in Wistar rats after the use of meloxicam during immediate postoperative period, with histological study of collagen and imunohistochemical study of angiogenesis in the healing.

Eros Luiz de Sousa¹; Antonio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk², Claudia Turra Pimpão³, Stephanie Alberti⁴, Tatiana Giordano⁵, Maria Fernanda Torres⁶, Silvana Maris Cirio⁷, Daniel Dantas Ferrarin⁸

¹ Mestrado em Ciência Animal PUCPR, Médico Veterinário, Faculdade Evangélica do Paraná, Pe. Agostinho 2885, ap 103 torre 3, CEP 80710-000, Curitiba-PR. eros@faculdadeevangelica.edu.br

² Professor Titular de Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários S/N, Curitiba, PR. wouk@sau.com.br

³ Professora Adjunta da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rod 376, Km 14, Caixa Postal 129, S.J. Pinhais, PR. claudia.pimpao@pucpr.br

⁴ Medica Veterinária Residente, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários S/N, Curitiba PR. stephaniealberti@hotmail.com

⁵ Professora Titular de Anestesiologia da Faculdade Evangélica do Paraná, R. Pe Anchieta 2770, CEP 80730-000, Curitiba-PR. tatigiordano@gmail.com

⁶ Professora da Universidade Positivo, Rua Pedro Viriato Parigot de Souza 5300, CEP 81280-300, Curitiba, PR. biotério@up.edu.br

⁷ Professora do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, Rua XV de Novembro 1299, CEP 80060-000, Curitiba, PR. silvana.cirio@gmail.com

⁸ Médico, Cirurgião do Aparelho Digestivo, Rua Júlia da Costa 1447, CEP 80730-060, Curitiba, PR. danovix@uol.com.br

Resumo – A cicatrização das anastomoses intestinais pode ser adversamente influenciada por vários fatores locais ou sistêmicos. Os efeitos das drogas antiinflamatórias não hormonais sobre a cicatrização das anastomoses intestinais são pouco conhecidos e controversos. Este estudo apresenta dados das comparações entre os grupos que foram medicados no pós-operatório imediato com meloxicam e morfina por quatro dias consecutivos e os grupos controle, que apenas fizeram uso de morfina. O estudo parte do princípio que o grupo controle deve ser apreciado com o controle da dor através do uso de um opióide, mimetizando a rotina da prescrição do cirurgião veterinário. As estruturas avaliadas no processo de reparo foram o colágeno tipo I e tipo III através das colorações de sirius-red e as expressões do receptor para o fator de crescimento vascular endotelial e da metaloproteinase 9 presente nas amostras de anastomoses do íleo de ratos Wistar. Foram utilizados quarenta e dois animais, divididos em dois grandes grupos denominados COX (meloxicam) e controle, os quais foram subdivididos em três grupos, conforme o tempo pós-operatório quando eutanasiados. Ambos os grupos fizeram uso de morfina a cada oito horas e o grupo COX de meloxicam, 0,5 mg por quilograma, a cada vinte e quatro horas. Para a análise dos dados foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5 % ($p>0,05$). Todos os cálculos foram realizados utilizando o software Graph Pad Prism 3.0. A avaliação das amostras nos dias 5, 10 e 21 do processo de cicatrização nos grupos controle e COX, utilizando-se da quantificação dos colágenos I e III e das expressões do receptor do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGFr), bem como das expressões da metaloproteinase 9 (MMP 9), não demonstrou diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos em todos os períodos avaliados. Este resultado ampara o uso do meloxicam no pós-operatório de cirurgias intestinais por não interferir no processo de cicatrização.

Palavras-chave : Cicatrização. Intestino. Meloxicam. Angiogênese.

Abstract - Healing of intestinal anastomosis can be adversely influenced for many local and systemic factors. Effects of non-hormonal antiinflammatory drugs over the healing of intestinal anastomosis are poorly known and controversial. This research presents data of comparison between a group that received meloxicam and

morphine during four days and a control group that received only morphine. The research supposes that control group must be appreciated with pain control using opioid, as utilized in routine of veterinary surgeon prescription. The evaluated structures of repair process were type-I and type-III collagen with sirius-red dye and expression of receptors to vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9, present in samples of ileum anastomosis of Wistar rats. Forty two animals were randomized in two large groups denominate COX (meloxicam) and control, that were subdivided in three groups, according with the postoperative period that they were euthanized. Both of groups received morphine every eight hours and COX group received meloxicam every twenty four hours. To analyze results we used non parametric test of Mann-Whitney. The significance level adopted was 5 % ($p>0,05$). All measurements have been done with Graph Pad Prism 3.0 software. Evaluation of samples 5, 10 and 21 days of healing process in COX group used quantification of type-I and type-III collagen and expression of receptors to vascular endothelial growth factor as well as matrix metalloproteinase-9.

Key Word: Healing. Intestine. Meloxicam. Angiogenesis

1 INTRODUÇÃO

Os efeitos das drogas antiinflamatórias não hormonais (AINE) sobre a cicatrização intestinal ainda são pouco conhecidos e controversos. Alguns autores relatam que os AINE favorecem a cicatrização intestinal, enquanto outros mostram efeitos deletérios sobre a cicatrização intestinal, por aumentarem a taxa de deiscência das anastomoses e, conseqüentemente, favorecerem uma maior taxa de mortalidade (TOGNINI et al. 2000).

JONES et al. (1999) demonstraram que tanto a ciclooxigenase 1 (COX 1) quanto a ciclooxigenase 2 (COX 2) são importantes na regulação da angiogênese e que antiinflamatórios não hormonais (AINES) inibidores seletivos ou preferenciais para COX2 inibem os efeitos da angiogênese de maneira similar aos AINES convencionais.

Outros estudos ainda sugerem que tanto a COX 1 como a COX 2 são importantes na formação do colágeno durante a cicatrização e que sua deficiência pode produzir alterações no desenvolvimento do tecido de granulação e reepitelização por inibição da proliferação de queratinócitos (BERENGER et al., 2002; LEE et. al., 2003; WILGUS et. al., 2003.)

O meloxicam é um moderno derivado do oxicano que desenvolve uma atividade inibitória preferencial sobre a COX 2 na cascata biossintética das prostaglandinas, disponível no mercado sob a forma injetável ou oral (FROLICH, 1997). Embora seu uso não seja aprovado para o tratamento da dor pós-operatória (CLARK, 2006), a administração pré-operatória de meloxicam em cães, na dose 0,2 mg/kg pelas vias intravenosa ou subcutânea, tem mostrado uma efetiva analgesia pós-operatória tanto para procedimentos ortopédicos como de tecido mole (KERR, 2007). Em cães, os níveis plasmáticos de meloxicam são alcançados entre 2 a 3 horas após injeção subcutânea, e a meia vida varia de 10 a 24 horas (GOGNY,

1999). Dessa forma, os efeitos antiinflamatórios e analgésicos permanecem presentes por até 24 horas após a injeção.

O colágeno é o principal componente da matriz extracelular dos tecidos. Estrutura-se numa rede densa e dinâmica resultante da sua constante deposição e reabsorção. A quantidade de colágeno modifica-se no intestino durante o pós-operatório de anastomoses, principalmente na região peri-anastomótica (JIBORN et al. 1980). Essa variação é resultado da interação entre sua síntese, fixação e degradação no tecido cicatricial. (NIMNI et al. 1967). Três subtipos de colágeno (I, III e V) são identificados durante o processo cicatricial do intestino delgado. Os colágenos I e III atingem proporções mais significativas e a relação entre eles têm importância maior no estudo da cicatrização anastomótica (JIBORN et al. 1980).

A degradação do colágeno, na matriz extracelular, é obtida por uma família de metaloproteinases (MMP) que clivam suas fibras intactas em fragmentos menores que podem ser fagocitados e, subsequentemente, degradados por enzimas lisossômicas até seus aminoácidos constituintes (Champe e Harvey, 1996).

Sweat, et al., (1964) adotaram o uso do Sirius-red F3BA (SRF) como corante alternativo na identificação do colágeno tecidual devido ao rápido desbotamento da coloração de picrofucsina. As moléculas de SRF (ácido) interagem individualmente com as moléculas de colágeno mantendo um relacionamento espacial paralelo com as mesmas, ressaltando a birrefringência. A combinação seletiva com o colágeno permite sua visualização como fibras amarelo-brilhantes, sendo que o uso da microscopia polarizada aumenta a especificidade, a sensibilidade e a resolução do método.

Angiogênese é um processo fundamental para formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares pré-existent (CHAIN et al. 2004). É um evento importante em vários fenômenos fisiológicos, tais como, no desenvolvimento embrionário, na inflamação crônica e no reparo tecidual (POLVERINI, 1995). Levando-se em conta essas condições, a angiogênese é altamente regulada, inicia-se sobre breves períodos (dias) e então é inibida completamente (FOLKMAN & SHING, 1992). A angiogênese envolve proliferação e migração de células endoteliais, remodelamento da matriz extracelular, formação tubular, recrutamento de estruturas adjacentes para a sustentação dos neovasos, anastomoses e desenvolvimento de membrana basal (RAMSDEN, 2000).

O Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) é um mitógeno específico para as células endoteliais, produzido por vários tipos celulares, como queratinócitos, macrófagos e fibroblastos (NÖR & POLVERINI, 1999; FERRARA, 2004). Também é conhecido por aumentar a permeabilidade vascular e estar envolvido na ocorrência e progressão do processo inflamatório (DVORAK et al., 1995). VEGF é 50.000 vezes mais potente do que a histamina na habilidade de aumentar a permeabilidade vascular (DVORAK, 2002; HICKLIN & ELLIS, 2005).

Os receptores de VEGF (VEGFR) pertencem a uma subfamília dos receptores tirosina quinase (RTK) e são classificados em três: VEGFR-1, VEGFR-2 os mais importantes para a angiogênese e VEGFR-3, ligado à proliferação dos vasos linfáticos (SHIBUYA, 2000; TAMMELA, 2005).

A angiogênese não pode ser comentada sem citar a importância das metaloproteinases em eventos celulares como migração celular, invasão, proliferação e apoptose (VU & WERN, 2000). Elas são responsáveis pela regulação de processos como a morfogênese, angiogênese, cicatrização e degradação da matriz extracelular. As metaloproteinases não só remodelam a matriz extracelular (ECM), mas também influenciam diversas reações celulares, ou seja, (I) degradam as moléculas da ECM e permitem a migração celular; (II) alteram o microambiente da ECM resultando na alteração do comportamento celular e (III) modulam a atividade de moléculas bioativas através da clivagem direta, liberação de substâncias armazenadas ou através da modulação dos seus inibidores (VU, WERN, 2000).

As células endoteliais sintetizam várias MMP: MMP1, MMP2, MMP9 e MT1MMP. Dentre estas, a MMP2, MMP9 e a MT1MMP foram descritas como exercendo importante papel na angiogênese (STETLER & STEVENSON, 1999).

O objetivo deste estudo foi avaliar a cicatrização do intestino delgado de ratos Wistar, após enteroanastomose. A avaliação foi feita comparando a quantificação das fibras de colágeno tipo I e tipo III e a expressão de componentes da angiogênese entre os grupos que utilizaram apenas morfina (controle) e o grupo que fez uso de morfina e meloxicam durante os quatro dias pós-operatório. Os momentos cinco, dez e vinte e um dias de cicatrização foram avaliados. A hipótese testada era de que interferindo na biossíntese das prostaglandinas retardaríamos a cicatrização, representada neste estudo pelos colágenos tipo I e tipo III, metaloproteinase 9 e receptor do fator de crescimento vascular endotelial.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados 42 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso médio de 250g, oriundos do biotério de criação da Universidade Positivo, Curitiba/PR. O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Positivo, protocolo 016/2008.

2.2. Considerações ambientais

O experimento foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Biotério da Universidade Positivo (UP). As condições ambientais foram controladas eletronicamente, sendo mantido temperatura de 22°C e ciclo claro-escuro de 12 horas.

Os animais foram identificados e mantidos, individualmente, em gaiolas metabólicas de aço inoxidável. Durante período de aclimação de três dias antes do início do experimento os ratos receberam água potável e ração *ad libitum*.

2.3. Protocolo Experimental

Após o período de aclimação os animais foram pesados e divididos de forma randomizada em dois grupos de acordo com o tipo de tratamento instituído: grupo controle (CTL); grupo COX 2 (COX). Cada um contendo 21 animais.

No pós-operatório, cada grupo foi dividido em 3 subgrupos contendo 7 animais cada, conforme a data em que foram eutanasiados, ou seja, nos dias 5, 10 e 21 de pós-operatório.

O método de controle inflamatório e da dor dos animais envolveu o grupo CTL que recebeu 2 mg/kg de morfina a cada doze horas durante três dias e o

grupo COX que recebeu a mesma dose de morfina do grupo CTL mais 0,5mg/kg de meloxicam a cada doze horas. O sacrifício dos animais foi realizado em três fases distintas, nos dias 5, 10 e 21 do pós-operatório. O método de eutanásia empregado foi a administração em dose letal de isoflurano em sistema fechado de câmara de vidro.

2.3.1 Anestesia

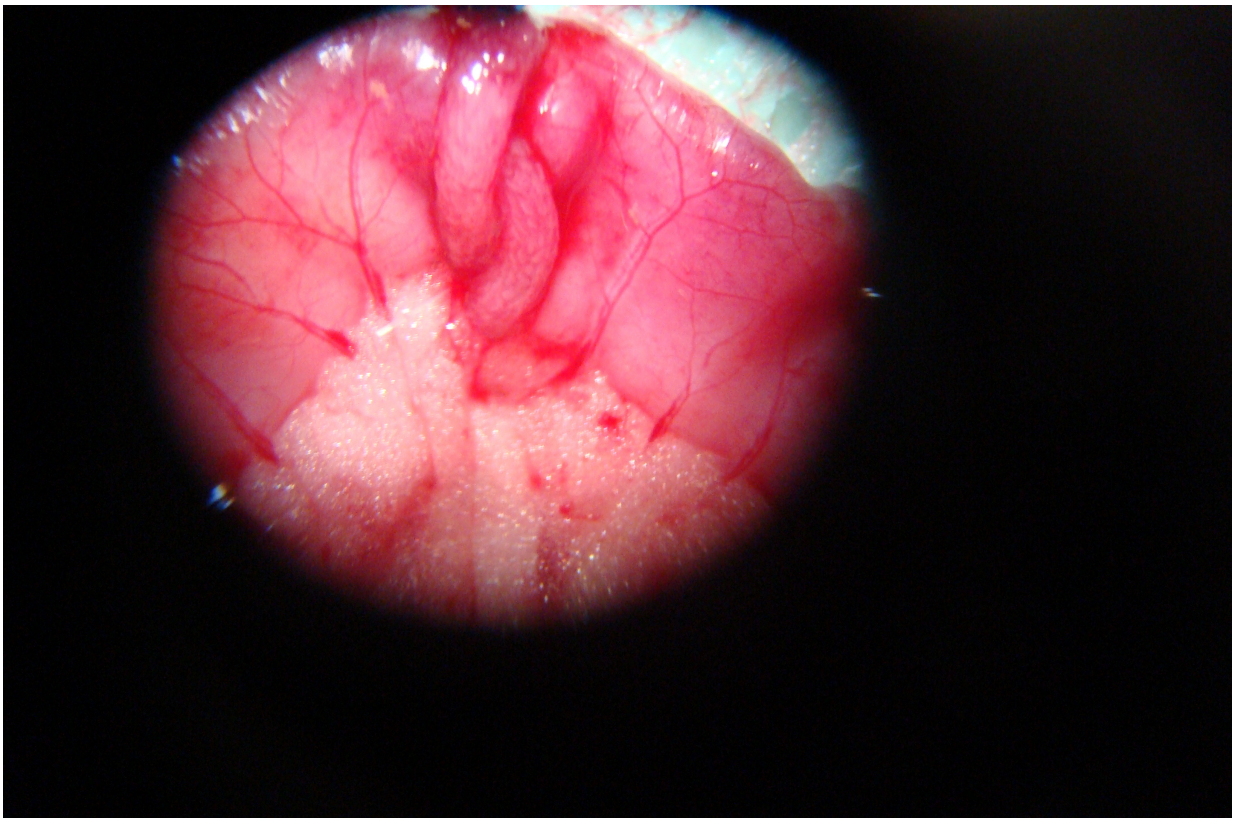
O procedimento anestésico foi realizado com butorfanol e manutenção inalatória com isoflurano, sendo o controle da dor e avaliação trans-operatória promovido por anestesiolistas veterinários.

2.3.2 Ato cirúrgico

O animal anestesiado foi fixado à mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com elásticos de látex, colocando os quatro membros em extensão para expor o campo operatório. Em seguida, foi realizada tricotomia e anti-sepsia da *regio abdominis media* (região abdominal média). Uma laparotomia mediana de cerca de 4 cm de comprimento deu acesso ao *cavum abdominis* (cavidade abdominal) (FIGURA 1). Foi realizada uma secção completa do íleo distal, como demonstrado na figura 2 e 3. Posteriormente, foi realizada a reconstrução do íleo com anastomose término-terminal suturada em plano único total com 8 pontos interrompidos simples de fio monofilamentar de náilon 6.0 (FIGURA 4).



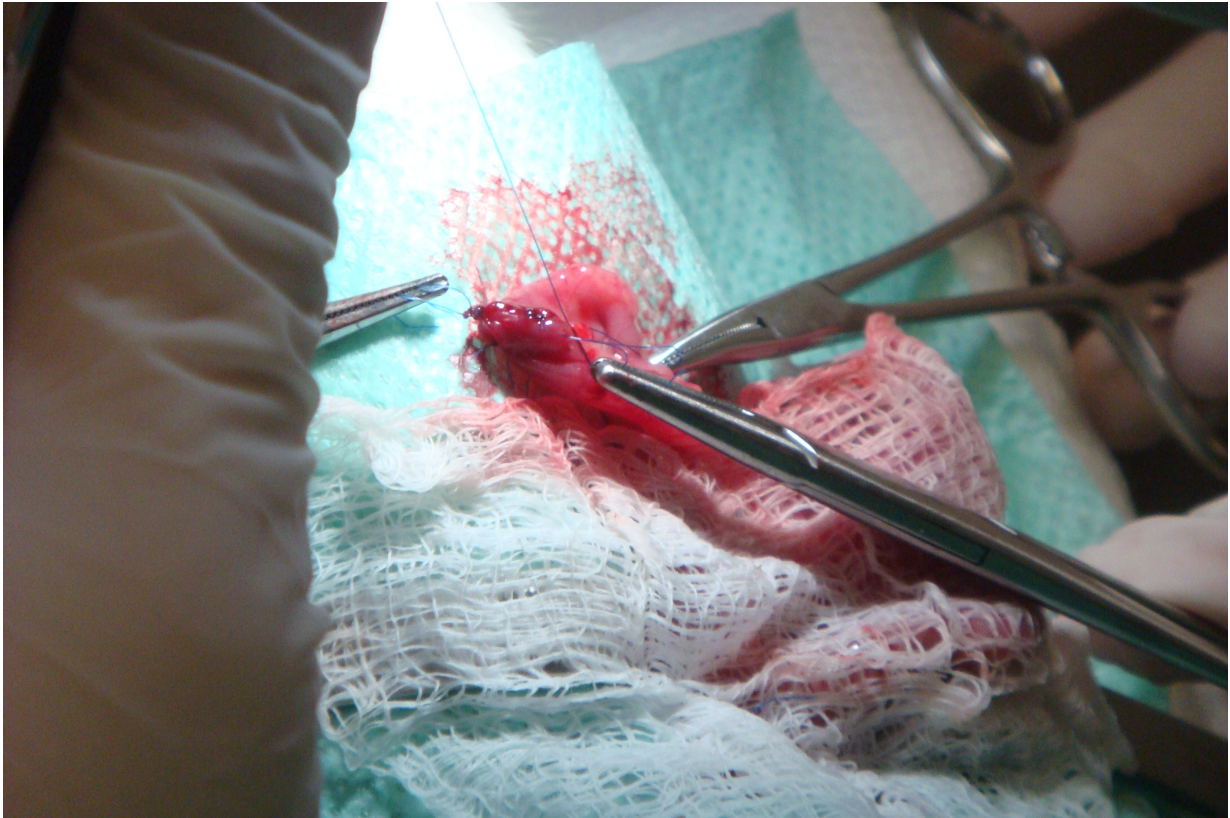
Celiotomia com exposição do íleo terminal e indicação do local da enterectomia.
FIGURA 1



Secção do íleo, aproximadamente 5 cm da válvula íleocecocólica. FIGURA 2



Secção do íleo. FIGURA 3



Enteroanastomose término-terminal do íleo. FIGURA 4

2.3.3 Pós-operatório e Morte dos animais

O fornecimento de água e ração foi normalizado no primeiro dia pós-operatório (PO) e as drogas foram administradas conforme o protocolo da pesquisa. Nos dias 5, 10 e 21 de PO os animais foram eutanasiados com dose letal de isoflurano em sistema fechado de campânula de vidro. Imediatamente após constatação do óbito, cada rato foi submetido à laparotomia mediana com inspeção cuidadosa da cavidade.

Após a lise das aderências, as anastomoses foram ressecadas em segmento de 3 cm de comprimento, seccionada longitudinalmente na borda anti-mesentérica, estendida sobre pedaço de papel filtro e armazenada em frasco com formol a 10% para estudo anatomopatológico e imunohistoquímico.

2.4 Avaliação histológica

Nas peças armazenadas para avaliação histológica foram realizadas duas secções perpendiculares ao maior eixo da linha de sutura e após os processos de desidratação e diafanização, as peças foram emblocadas paralelamente em parafina. Assim, um único corte do micrótomo (4 μ m de espessura) retirou cinco amostras da mesma anastomose. As lâminas foram coradas com três métodos diferentes; hematoxilina-eosina (HE), Tricrômio de Masson e Picrosirius-red F3BA (PSR). Outras duas lâminas foram utilizadas para marcação por imunohistoquímica com anticorpos para metaloproteinase 9 e VEGFr (receptor do fator de crescimento endotelial vascular) (FIGURA 6 e 7)

As avaliações na região da anastomose foram concluídas a partir de dados obtidos da média quantitativa da expressão do colágeno de cinco campos da amostra da parede do íleo de cada rato. Cinco campos microscópicos com aumento total de 200 vezes representativos da área anastomótica, foram capturados pelo sistema informatizado Image Pro Plus®, versão 6.0, utilizando-se microscópio Olympus® BX-40, com polarizador de luz e uma máquina fotográfica Sony®. Com a ferramenta “conta-gotas” selecionava-se o objeto de interesse e o programa automaticamente gerava a medida. Uma vez que a área total de exame era constante, selecionava-se a estatística do programa que fornecia o percentual da área ocupada pelo objeto de estudo, ou seja, o colágeno tipo I e tipo III. As colorações eram de acordo com a espessura das fibras e sua birrefringência (FIGURA 5). Através desse sistema foi possível a quantificação da área ocupada por cada tipo de colágeno em cada campo pré-determinado de corte histológico.



Cicatriz com exposição das fibras colágenas coradas com Picrosirius-red F3BA, onde os pontos em vermelho demonstram o colágeno tipo III e os pontos amarelos demonstram o colágeno tipo I. FIGURA 5

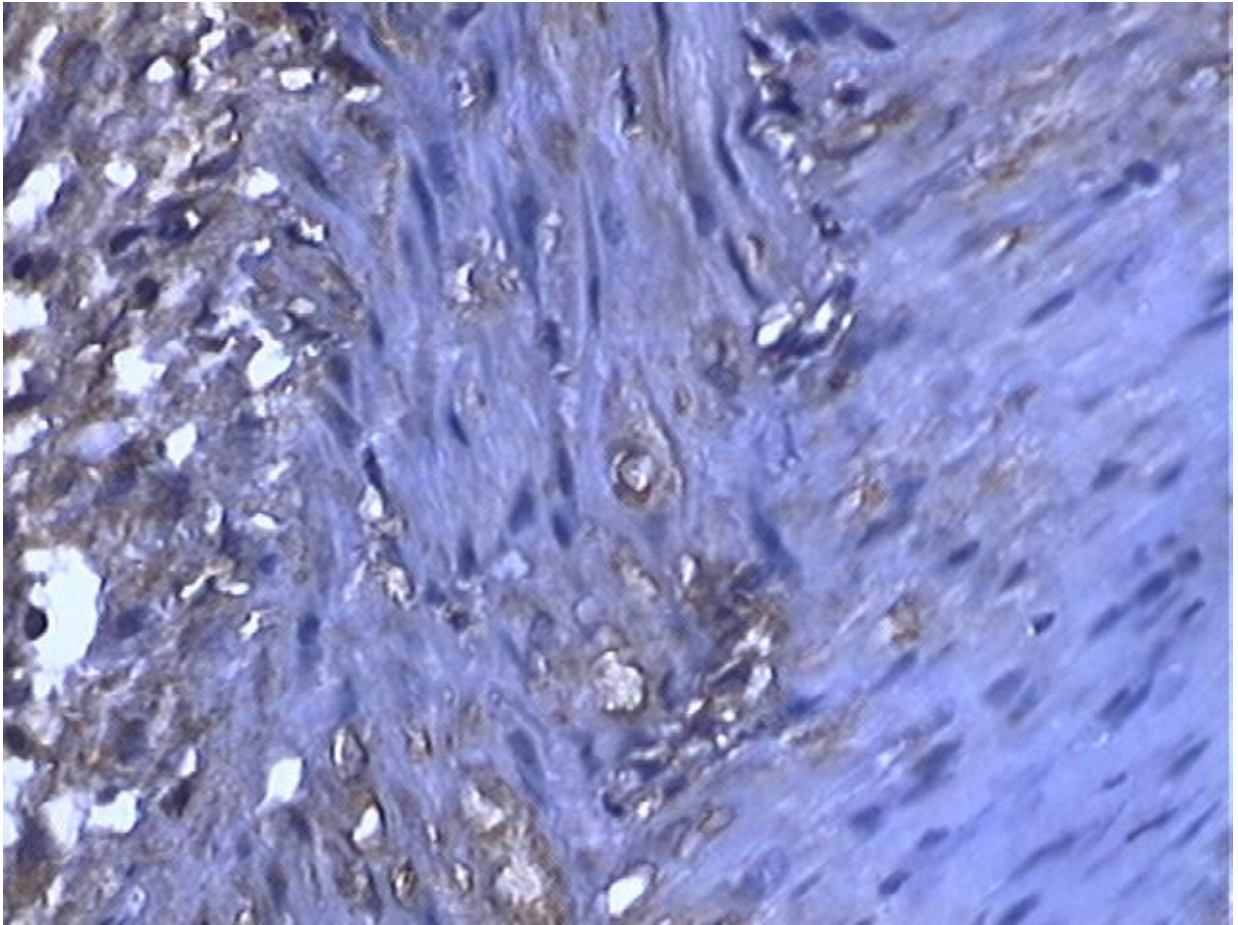


Imagem da cicatriz do grupo controle 5 dias (PO) com marcação em cor castanho da metaloproteinase 9 (anticorpo conjugado com peroxidase). FIGURA 6

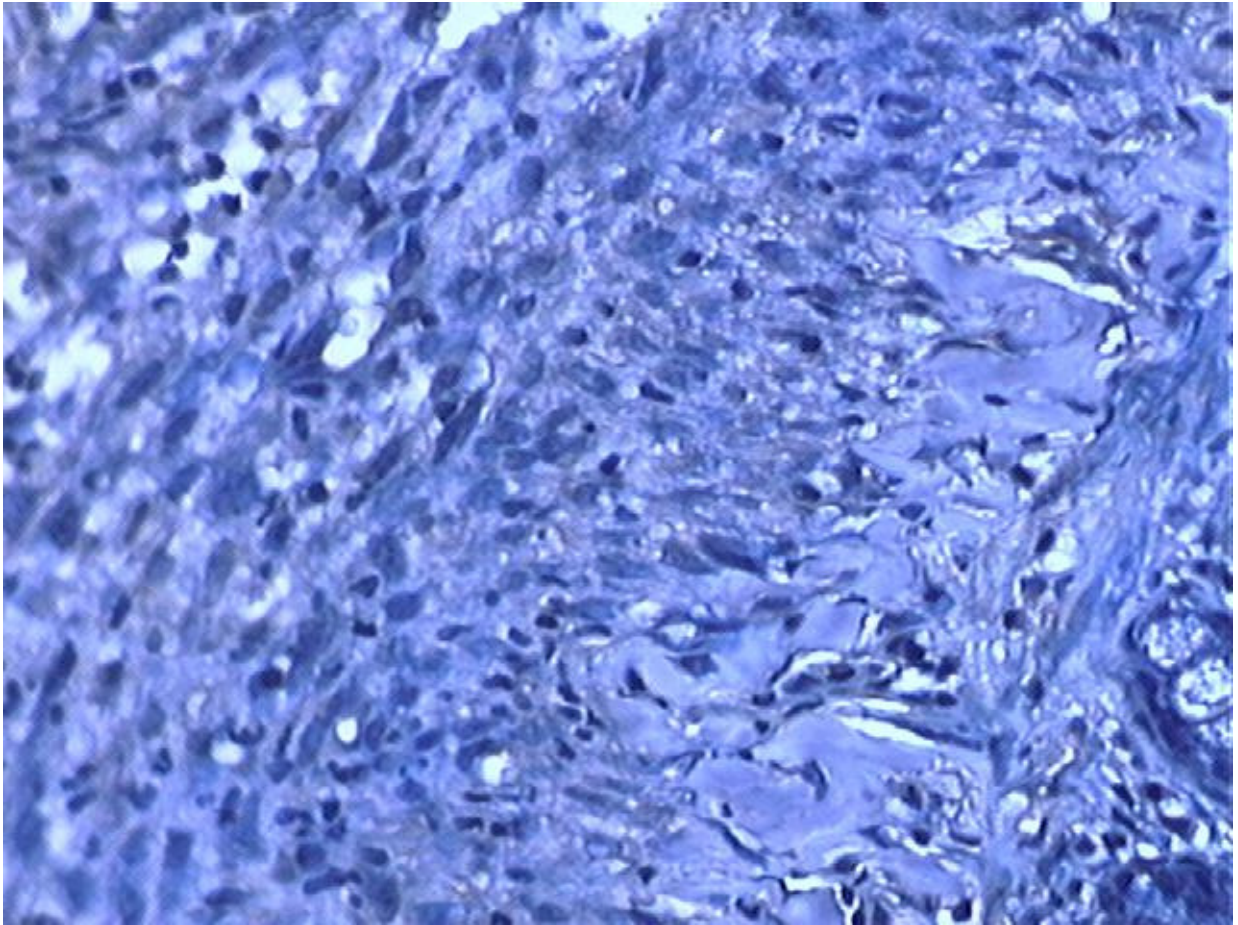


Imagem da cicatriz anastomótica do grupo controle 5 dias (PO), demonstrando as células marcadas com receptores para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) em cinza. FIGURA 7

2.5 Avaliação Imunohistoquímica

Para quantificação das expressões da metaloproteinase 9 e o VEGFr-1 foram submetidas ao kit Advance (Dako®) no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Os controles positivos que provam a eficiência do anticorpo foram em amostras de placenta humana para metaloproteinase 9 e artéria lesada para VEGFr. Os cortes foram desparafinizados seguindo o bloqueio da peroxidase endógena pela solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5%. A recuperação antigênica foi feita em recuperador Imuno Retriever (Dako®). A delimitação da área do corte foi feita com caneta hidrofóbica Dako pen (Dako®). As alíquotas de anticorpos para MMP-9 (metaloproteinase 9) e para VEGFr foram pingados. Os cortes foram lavados e banhados por 15 minutos em tampão TBS tris pH 7.3. Após, os cortes receberam o Advance link (Dako®).

Após trinta minutos foram lavadas em tampão e receberam o Advance enzyme (Dako®). Após trinta minutos, os cortes foram lavados em tampão, secos e expostos ao cromógeno DAB na diluição 1:1 em tampão, até a visualização da cor castanha. Rapidamente foram lavadas em água destilada para interromper a reação de precipitação. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris durante cinco minutos, seguida da lavagem em água corrente. A desidratação com álcool etílico absoluto foi seguida pela diafanização com xilol.

Três campos microscópicos com aumento total de 200 vezes representativos da área anastomótica, foram capturados pelo sistema informatizado Image Pro Plus, versão 6.0, utilizando-se microscópio Olympus® BX-51, com polarizador de luz. Através desse sistema foi possível a quantificação da área ocupada por cada tipo de complexo, ou seja, a expressão da metaloproteinase 9 e o VEGFr na cicatriz anastomótica.

2.6 Análise Estatística

Para análise estatística dos dados foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi 5% ($\alpha = 0,05$). Os cálculos foram realizados utilizando software estatístico Graph Pad Prism Version 3.0 for Windows, San Diego – Califórnia, EUA. Os dados obtidos como áreas ocupados pelos elementos estudados foram comparados entre os dois grupos no três momentos que as amostras foram coletadas.

3 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

De acordo com os dados obtidos, não houve diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos controle e meloxicam (COX), na fase proliferativa da cicatrização da anastomose do intestino delgado, resgatamos a hipótese da integridade da ferida, fato muito importante quando nos referimos à cicatrização intestinal. Esta integridade amparada pela disponibilidade de opção terapêutica na modulação inflamatória e conforto do paciente no pós-operatório imediato, oferta ao cirurgião segurança ao prescrever (GOGNY, 1999; ENBERG et al. 2006).

Segundo Minossi et al. (1996), o meloxicam poderia levar ao retardo da cicatrização intestinal por dois mecanismos, o primeiro, inibindo a formação das prostaglandinas, e, conseqüentemente, retardando a regeneração celular e a revascularização da cicatriz. O segundo, por um processo direto de injúria tecidual, ao nível mitocondrial dos enterócitos, que favorece o aumento do processo inflamatório através da proliferação e da translocação bacteriana. Para avaliarmos estas citações de Minossi, produzimos um estudo onde avaliamos o processo de cicatrização intestinal pela quantificação e qualificação do colágeno e a imunohistoquímica de fatores relacionados à neovascularização. Este modelo de estudo nos mostrou que a inibição ou a modulação da síntese das prostaglandinas pelo meloxicam, não afetou o processo de reparo da anastomose intestinal, quando observados o comportamento das fibras de colágeno tipo I e tipo III, bem como a expressão da metaloproteinase 9 e das células endotélias com receptores para o VEGF (Fator de Crescimento Vascular Endotelial). Os elementos avaliados refletem a fase proliferativa da cicatrização incluindo a angiogênese.

Ao analisarmos os dados que se referem ao comportamento das fibras de colágeno I e III nos momentos cinco, dez e vinte e um dias de pós-operatório, observamos homogeneidade dos dados ($p>0,05$), demonstrando que a fase proliferativa da cicatrização não é afetada pelo meloxicam a ponto de alterar a sínteses destas fibras (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Tognini et al. (1999), bem como, os sinais de dor avaliados pelo autor em 1999, como a perda de peso, perda de apetite e eriçamento piloso no grupo controle, que também foram relatados por Hellebrekers (2002), de forma subjetiva ao avaliar o sofrimento animal.

TABELA 1 – Médias e desvio padrão das somas das áreas ocupadas pelas fibras de colágeno tipo I e tipo III dos cinco campos capturados na cicatriz anastomótica.

Grupo	Controle Média ± Desvio padrão	Meloxicam Média ± Desvio padrão
5 dias - Colágeno tipo 3	2525 ± 545.4 (n=7)	2293 ± 200.3 (n=7)
10 dias - Colágeno tipo 3	2267 ± 377.7 (n=7)	4097 ± 1562 (n=7)
21 - Colágeno tipo 3	2895 ± 509.5 (n=7)	2986 ± 607.8 (n=7)
5 dias - Colágeno tipo 1	907.0 ± 188.5 (n=7)	753.5 ± 133.8 (n=7)
10 dias - Colágeno tipo 1	976.1 ± 177.1 (n=7)	2422 ± 741.3 (n=7)
21 - Colágeno tipo 1	1634 ± 294.4 (n=7)	1487 ± 388.6 (n=7)

A lesão tecidual promovida pela enterectomia expõe elementos sanguíneos e substâncias da matriz extracelular, que funcionam como mediadores químicos e conduzem o processo cicatricial mediante aumento de células inflamatórias na região da ferida. A segunda onda de mediadores são os bioprodutos da degradação do ácido aracdônico. Esta segunda onda é primordial ao processo de reparo, pois são pró-inflamatórios. Os antiinflamatórios não esteroidais podem diminuir esta segunda onda de mediadores, interferindo no processo de cicatrização (GRECA et al. 2004; COSTA et al. 2003; BENNETT & SCHULTZ, 1993). A interferência na fase inflamatória pelo meloxicam, parece não ser significativa ao processo de reparo dos tecidos, talvez pelo fato de ser preferencial à inibição da cicloxigenase 2, que acredita-se ser indutiva em lesões teciduais e ao mesmo tempo não inibir completamente as cicloxigenases, comportando-se apenas como uma droga moduladora (ENBERG et al. 2006; DENEUCHE et al. 2004; BERENGER et al. 2002). Todas estas informações citadas pelos autores quanto ao efeito modulador do meloxicam são confirmadas neste estudo, pelo fato de não ter sido observado diferenças significativas ($p>0,05$) nos elementos avaliados que refletem a fase

proliferativa da cicatrização dos animais submetidos à enteroanastomoses e tratados ou não com meloxicam.

Jones (1999) demonstrou que, inibidores seletivos e preferenciais para COX 2 inibem os efeitos da angiogênese. Outros estudos ainda sugerem que tanto a COX 1 como a COX 2 são importantes na formação do colágeno durante a cicatrização e que sua deficiência pode produzir alterações no desenvolvimento do tecido de granulação e reepitelização, por inibição da proliferação de queratinócitos (BERENGER et al., 2002; LEE et. al., 2003; WILGUS et. al., 2003). Através desta pesquisa, segundo os estudos histológicos e imunohistoquímicos utilizados para avaliar composição do colágeno na cicatriz e fatores que participam da angiogênese o inibidor preferencial da COX 2, o meloxicam, não demonstrou alterar a cicatrização.

Em 1975, Wise et al., evidenciaram a neovascularização entre o segundo e o terceiro dias pós-operatório das enterectomias e Jiborn e colaboradores em 1980 confirmou que nas primeiras doze horas os fibroblastos atingiam a região e começavam sua multiplicação, responsabilizando-se pela produção total do colágeno intestinal, conforme confirmação de Graham et al. (1987) e Mori et al. (1992). Do quinto ao décimo dia de pós-operatório observam-se a deposição máxima do colágeno e sua estabilização próxima a quantidade normal no décimo dia pós-operatório (JONSSON et al. 1987). Os eventos citados pelos autores foram objetos deste estudo e justificam a metodologia utilizada na introdução do antiinflamatório no momento inicial da lesão até o quarto dia pós-operatório.

A angiogênese é um evento que marca a fase proliferativa da cicatrização e, é passível de sofrer alterações por drogas antiinflamatórias não esteroidais preferenciais ou seletivos para COX 2, pela diminuição dos bioprodutos resultantes da quebra do ácido aracdônico (CLARK, 2006). Kerr (2007) citou os efeitos positivos ao uso dos antiinflamatórios não esteroidais preferenciais ou seletivos para COX 2, é claro em agregar o benefício à cicatrização. Esta afirmação de Kerr é amparada por Fantoni & Mastrocinque (2004). Conforme Jiborn e colaboradores em 1980, no terceiro dia pós-operatório a anastomose intestinal perde 72% a 95% da sua força original, devido à atividade intensa das metaloproteinases. Este dado coincide com relatos de Wise (1975) que provam o início da angiogênese BM como Chain et al.

(2004), Folkman e Shing (1992). Estas afirmações nos levaram a avaliar a expressão de uma metaloproteinase, a metaloproteinase 9 e a expressão da célula endotelial com receptor para o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (Tabela 2).

TABELA 2 – Médias e desvio padrão das somas das áreas ocupadas pelas metaloproteinases 9 e células com receptores para o VEGFr, respectivamente, dos cinco campos capturados na cicatriz anastomótica.

Grupo	Controle Média ± Desvio padrão	Meloxicam Média ± Desvio padrão
5 dias VEGFR	1387 ± 501,4 (n=7)	1628 ± 1236 (n=7)
10 dias VEGFR	3058 ± 1047 (n=7)	3818 ± 541,4 (n=7)
21 dias VEGFR	1624 ± 622,9 (n=7)	2264 ± 834,1 (n=7)
5 dias MMP9	5255 ± 1879 (n=7)	6322 ± 2435 (n=7)
10 dias MMP9	4936 ± 5341 (n=7)	901,5 ± 521,0 (n=7)
21 dias MMP9	5174 ± 1358 (n=7)	5430 ± 1430 (n=7)

As metaloproteinases colaboram na inativação das células endoteliais com receptores para o VEGF, como forma de manter em equilíbrio a proliferação vascular. Há homeostasia entre a presença intensificada das metaloproteinases e da ativação das células endoteliais com receptores para VEGF. O VEGF é sintetizado por macrófagos e a metaloproteinase 9 oriunda de neutrófilos, ou seja, ambos de origem inflamatória, liberados em resposta à mediadores inflamatórios (INGMAN et al., 1994). O meloxicam inibe os mediadores inflamatórios, porém sem comprometer o papel destes componentes no processo de reparo.

Oliveira et al. (2007), demonstraram que o meloxicam diminuiu a expressão de VEGF da doença inflamatória periodontal em ratos, fato que não confere com esta análise, talvez por não se tratar do mesmo tecido e motivo da ativação inflamatória.

A farmacocinética do meloxicam no rato é extremamente semelhante a que ocorre no homem, sendo este modelo animal mais adequado para comparação, inclusive sendo escolhido para prognósticos clínicos. A ligação do fármaco às

proteínas do plasma do rato é comparável a do homem, porém outros animais, incluindo o cão também são favorecidos pelo modelo animal (BUSCH et al., 1994).

4 CONCLUSÕES

- O meloxicam não interfere no processo de reparo de anastomoses intestinais conforme a avaliação da quantificação das fibras de colágeno tipo I e III.
- O meloxicam não interfere no processo de reparo de anastomoses intestinais conforme a avaliação da angiogênese pela expressão da metaloproteinase 9 (MMP9).
- O meloxicam não interfere no processo de reparo de anastomoses intestinais conforme a avaliação da angiogênese pela expressão das células endoteliais com receptores do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGFr).
- Outros componentes da angiogênese devem ser avaliados, pois os efeitos dos inibidores seletivos da COX 2 parecem inibir a angiogênese, segundo diversos autores.

5 REFERÊNCIAS

BENNETT; N.T., SCHULTZ; G. S. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. **Am. J. Surg.**, v. 165, n. 6, p. 728-37, 1993.

BERENGER, B. *et al.* Chronic gastric ulcer healing in rats subject to selective and non-selective cyclooxygenase-2 inhibitors. **European Journal of Pharmacology**, v. 442, n. 1-2, p. 125-135, 2002.

BUSCH, U.; ROTH, W.; SCHMAUS, H.;BAIERL, J.; HUBER, C. Pharmacokinetics of meloxicam in animals and the relevance to humans. **The American Society for Pharmacology and experimental Therapeutics**. v.26, n. 6. p. 576:583, 1998.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis and cancer and other. **Nature**, London, v. 407, n. 7, p. 249-257, sept., 2000.

CHAIN, J.; JONES, M.K.; TARNAWSKI, A. S. Serum response factor is a critical requirement for VEGF signaling in endothelial cells and VEGF-induced angiogenesis. **The Faseb Journal**, p. 1-19, Jun. 2004.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2^a ed. Editora Artes Médicas, 1996.

CLARK, T. P. The clinical pharmacology of cyclooxygenase-2-selective and dual inhibitors. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, n.36, p.1061-1085, 2006.

COSTA, M. R. M.; CAMPOS, A. C. L.; COELHO, J. C. U. BARROS; MATSUMOTO. Oral Glutamine and the Healing of Colonic Anastomosis in Rats. **J. Parent. Enteral. Nutr.**, v. 27, n. 3, p.182-6, 2003.

DENEUCHE, A. J.; DUFAYET, C.; GOBY, L.; FAYOLLE, P.; DESBOIS, C. Analgesic comparison of meloxicam or ketoprofen for orthopedic surgery in dogs. **Veterinary Surgery**, n.33, p.650-660, 2004.

DVORAK, H. F. Vascular Permeability Factor / Vascular Endothelial Growth Factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **J. Clin Oncol**, v. 20, n. 21, p. 4368-4380, nov. 2002.

ENBERG, T. B.; BRAUN, L. D.; KUZMA, A. B. Gastrointestinal perforation in five dogs associated with the administration of meloxicam. **Veterinary Emergency and Critical Care Society**, n.16, p.34-43, 2006.

FANTONI, D. T.; MASTROCINQUE, S. Analgesia preemptiva: mito ou fato? **Clínica Veterinária**, n.49, p.24-32, 2004.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581-611, Aug. 2004.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J. Biol Chem, Baltimore**, v. 267, n. 16, p. 10931-10934, June, 1992.

FROLICH, J.C. A classification of NSAIDS according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. **TIPS**, v. 18, p. 30-34, 1997.

GOGNY, M. Pharmacological profile and therapeutic value of meloxicam. Recent Advances in Non-Steroidal Anti-Inflammatory Therapy in Small Animals. **Boehringer Ingelheim**, Paris, p. 35-40, 1999.

GRAHAM, M. F.; DRUCKER, D. E.; DIEGELMANN, R. F; ELSON, C. O. Collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells in culture. **Gastroenterology**, v. 92, p.400, 1987.

GRECA, F.H.; NORONHA, L.; BENDHACK, M.; FERES, A.; SOCCOL, A.; DUDA, J. R. Use of small intestine submucosa as ureteral allograft in pigs. **Intern. Braz. J. Urol.**, v. 30, n. 4, p. 327-35, 2004.

HELLEBREKERS, L.J. A dor em animais. In: HELLEBREKERS, L. J. **Dor em animais**. 2 ed. São Paulo: Manole, 2002. p.11-17.

HICKLIN, D.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J. Clin Oncol**, New York, v. 23, n. 5, p. 1011-1027, Feb., 2005.

JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of Experimental Colonic Anastomosis III: Collagen Metabolism in the Colon after Left Colon Resection. **Am. J. Surg.** 139:398-405, 1980.

JONES, M. K. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. **Nat. Med.** V.5, n.12, p. 1418-23, 199.

JONSSON, K.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. Collagen metabolism in small intestinal anastomosis. **Am. J. Surg.**, v. 154, n. 9, p. 288-91, 1987.

KERR, C. Pain management I: systemic analgesics. In: BSAVA Manual of Canine and Feline Anesthesia and Analgesia. 2. ed. London: **British Small Animal Veterinary Association**, p.96-101, 2007.

LEE, J. L. P. *et. al.* Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and **toxicological** implications. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 192, n. 3, p. 294-306, 2003.

MINOSSI, J. G.; LEITE, C.V.S.; NARESSE, L. E.; RODRIGUES, M. A. M.; CURI, P. R.; KOBAYASI, S. Ação do diclofenaco de sódio em anastomoses realizadas no intestino delgado de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 13, n. 1, p. 37-43, 1998.

MINOSSI, J.G.; LEITE, C. V. S. NARESSE, L. E.; RODRIGUES, M. A. M.; BURINI, R. C.; KOBAYASI, S. Ação do diclofenaco de sódio em anastomoses realizadas no cólon distal de ratos. **Acta. Cir. Bras.**, v.11, p. 116-120, 1996.

MORI, N.; DOI, Y.; HARA, K.; YOSHIZUKA, M.; OHSATO, K.; FUJIMOTO, S. Role of multipotent fibroblasts in the healing colonic mucosa of rabbits: ultrastructural and immunocytochemical study. **Histol Histopathol.**, v. 7, p. 583-86, 1992.

NIMNI, M. E.; DeGUIA, E.; BAVETTA, L. A. Synthesis and turnover of collagen precursors in rabbit skin. **Biochem. J.**, v. 102, p.143-7, 1967.

NÖR, J. E.; POLVERINI, P. Role of endothelial growth factor – mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and **induction** of Bcl-2 expression. **Am J Pathol**, Philadelphia, v.154, n.2, p. 3475-384, feb., 1999.

OLIVEIRA, T. M. **Fator de crescimento endotelial vascular na doença periodontal inflamatória induzida experimentalmente em ratos**. São Paulo, 2007. [tese de doutorado]. Universidade de São Paulo, 2007.

POLVERINI, P. J. The pathophysiology of angiogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v.6, n.3, p. 230-247, 1995.

SHIBUYA, M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. **J Biochem Mol Biol**, 2006. 39(5): p. 469-78.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S. I. Sirius Red F3BA as a Stain for Connective Tissue. **Arch. Pathol.**, v. 78, p. 69-72, 1964.

STETLER-STEVENSON, W.G.; Matrix metalloproteinase angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. **J Clin Invest.**, v. 103, p. 1237-41, 1999.

RAMSDEN, J. D. Angiogenesis in the thyroid gland. **J. Endocrinol.**, v. 166, p. 475-80, 2000.

TAMMELA, T., et al., The biology of vascular endothelial growth factors. **Cardiovasc Res**, 2005. 65 (3): p. 550-63.

TOGNINI, J. R. F. **Estudo biomecânico e morfológico da cicatrização da parede abdominal de ratos sob ação de meloxicam**. São Paulo, 1999 [tese de doutorado]. Escola Paulista de Medicina; 1999.

TOGNINI, J. R. F.; FAGUNDES, D. J.; NOVO, N. F.; JULIANO, Y. Estudo biomecânico e morfológico da cicatrização da parede abdominal de ratos sob ação de meloxicam. **Acta Cir. Bras.** v.15, n. 3. 2000.

WILGUS, T. A. *et. al.* Reduction of scar formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment. **Wound Repair and Regeneration**, v. 11, n. 1, p. 25-35, 2003.

WISE, L.; McALISER, W.; STEIN, T.; SCHUCK, P. Studies on the healing of anastomosis of small and large intestine. **Surg Gynecol Obstet.**, v. 141, p. 190-194, 1975.

YANCOPOULOS, G. D. *et al.* Vascular-specific growth factor and blood vessel formation. **Nature**, London, v. 407, n. 6801, p. 242-248, sept., 2000.