

# Influência da suplementação pré-operatória com ácido graxo ômega-3 na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos desnutridos que receberam paclitaxel

## *Influence of preoperative supplementation of omega-3 fatty acid in the healing of colonic anastomoses in malnourished rats receiving paclitaxel*

ALVO ORLANDO VIZZOTTO JUNIOR<sup>1</sup>; ANTONIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS, TCBC-PR<sup>2</sup>; ENERI VIEIRA DE SOUZA LEITE MELLO<sup>3</sup>; TIAGO JACOMETO CASTILHO, ACBC-PR<sup>1</sup>

### R E S U M O

**Objetivo:** avaliar o efeito da suplementação pré-operatória dos ácidos graxos ômega-3 sobre a cicatrização das anastomoses colônicas em ratos desnutridos que receberam paclitaxel. **Métodos:** foram estudados 160 ratos Wistar, distribuídos em dois grupos: um submetido à desnutrição pelo *pair feeding* (D) durante quatro semanas, e outro que recebeu ração *ad libitum* (N). Na quarta semana, os grupos foram subdivididos em dois subgrupos que receberam, por gavagem, ácido graxo ômega-3 ou azeite de oliva. Os animais foram submetidos à transecção colônica e anastomose término-terminal. Após a operação, foram distribuídos em dois subgrupos que receberam soluções isovolumétricas de salina ou paclitaxel, intraperitoneal. **Resultados:** A mortalidade foi 26,8%, maior no grupo de animais que recebeu paclitaxel ( $p=0,003$ ). A força de ruptura completa foi maior no grupo nutrido-azeite-paclitaxel (NAP) em relação ao grupo desnutrido-azeite-paclitaxel (DAP). O índice de maturação de colágeno foi maior no grupo nutrido-azeite-salina (NAS) em relação ao grupo desnutrido-azeite-salina (DAS), menor no grupo desnutrido-azeite-salina (DAS) em relação ao grupo desnutrido-ômega3-salina (DOS) e menor no grupo nutrido-ômega3-salina (NOS) em relação ao desnutrido-ômega3-salina (DOS). A contagem do número de vasos sanguíneos foi maior no grupo desnutrido-azeite-salina (DAS) em relação ao grupo desnutrido-azeite-paclitaxel (DAP) e menor no grupo desnutrido-azeite-salina (DAS) em relação ao grupo desnutrido-ômega3-paclitaxel (DOP). **Conclusão:** a suplementação com ácidos graxos ômega-3 associou-se ao aumento significativo na produção de colágeno maduro nos animais desnutridos, à reversão do efeito deletério causado pela desnutrição em associação ao uso do paclitaxel, sobre a força de ruptura, e ao estímulo da neoangiogênese no grupo que recebeu paclitaxel.

**Descritores:** Anastomose Cirúrgica. Desnutrição. Acido Graxo Ômega-3. Paclitaxel.

### INTRODUÇÃO

O câncer de ovário é a segunda neoplasia ginecológica mais comum no Brasil, com mortalidade anual de cerca de 15.000 casos<sup>1</sup>. Diagnosticado com frequência num estágio em que há disseminação peritoneal, tem no tratamento operatório sua abordagem inicial, com o objetivo de ressecção citorrredutora ideal, isto é, que a doença residual seja menor que 0,5cm<sup>2</sup>. Para isso, frequentemente é necessária a ressecção de segmentos intestinais com a realização de anastomoses colônicas. A quimioterapia precoce contendo paclitaxel é elemento importante do tratamento<sup>3</sup>. O processo de cicatrização destas anastomoses colônicas transcorre em um ambiente adverso, sob os efeitos da desnutrição, bastante comum nas pacientes com câncer de ovário com disseminação peritoneal, e os efeitos imunossupressores da quimioterapia<sup>4</sup>.

A ingestão alimentar pré-operatória é determinante para garantir que o processo de cicatrização ocorra de forma adequada no pós-operatório<sup>4-6</sup>. Embora a renutrição adequada seja difícil no pré-operatório destas pacientes, a suplementação com elementos nutricionais específicos, com pequenos volumes, pode ser uma alternativa para alcançar este objetivo, principalmente se este substrato nutricional tiver papel modulador no processo de cicatrização, possibilitando que ele transcorra com menores efeitos da desnutrição<sup>7</sup>.

Estudos experimentais conduzidos para avaliar o efeito do paclitaxel na anastomose colônica de ratos evidenciaram que, quando administradas no pós-operatório, esta droga traz prejuízos ao processo de cicatrização<sup>8,9</sup>. Neste cenário, os ácidos graxos ômega-3 têm sido propostos como elemento nutricional que possibilitam aporte calórico e modulação favorável do processo inflamatório e de cicatrização<sup>4,10,11</sup>.

1. Serviço de Oncologia do Hospital Santa Rita – Maringá – PR; 2. Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR; 3. Departamento de Ciências Morfológicas da UEM, Maringá - PR.

O presente estudo avaliou o efeito da suplementação pré-operatória dos ácidos graxos ômega-3 sobre a cicatrização das anastomoses colônicas em ratos desnutridos que receberam paclitaxel intraperitoneal.

## MÉTODOS

Delineamento experimental e soluções administradas

Foram utilizados 160 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Roentia Mammalia*), machos, com peso corporal variando entre 200 e 330 gramas ( $288,76 \pm 4,45g$ ), provenientes do Biotério da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram alojados em caixas individualizadas e distribuídos em dois grupos principais: N - ratos nutridos (n=80), que receberam água e ração *ad libitum*; D - ratos desnutridos (n=80), que receberam metade da quantidade da dieta que seu par controle nutrido havia recebido no dia anterior (processo de desnutrição, método *pair feeding*). Cada grupo foi dividido em quatro subgrupos com 20 animais cada, de acordo com a suplementação lipídica e de acordo com a administração de paclitaxel ou salina.

As soluções lipídicas utilizadas foram azeite de oliva extravirgem e emulsão de ácidos graxos ômega-3 composta por ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) na proporção de 80:20 em concentração de 20mg/ml. A administração foi feita em dose única diária de 100mg/kg via gavagem orogástrica, sem anestesia.

A droga utilizada foi o paclitaxel na dose de 3,5mg/Kg em injeção intraperitoneal diluída em solução salina isotônica em concentração de 0,35mg/ml. A administração do quimioterápico ou da solução salina isotônica 0,9% foi feita intraperitonealmente imediatamente após o procedimento operatório.

Os ratos nutridos (N) receberam ração *ad libitum* nas quatro semanas anteriores ao procedimento e foram distribuídos em quatro subgrupos e receberam suplementação com: NAS - azeite de oliva e administração de salina; NOS - ômega-3 e administração de salina; NAP - azeite de oliva e administração de paclitaxel; NOP - ômega-3 e administração de paclitaxel. Os ratos desnutridos (D) foram distribuídos em quatro subgrupos e receberam suplementação com: DAS - azeite de oliva e administração de salina; DOS - ômega-3 e administração de salina; DAP - azeite de oliva e administração de paclitaxel; DOP - ômega-3 e administração de paclitaxel.

### Procedimento operatório e evolução

O procedimento operatório, sob anestesia geral com associação de xilasina 10mg/kg e ketamina 50mg/kg, constou de duas transecções do cólon (colotomia), uma no segmento proximal do cólon, a 4,0cm da válvula ileocecal e outra no segmento distal do cólon, 3,0cm aci-

ma da reflexão peritoneal do reto. As reconstruções foram realizadas por meio de anastomoses término-terminais em plano único total, com sutura interrompida utilizando oito pontos de fio monofilamentar, sintético, inabsorvível Ethicon® 6-0. Após a recuperação anestésica todos os animais receberam água e ração *ad libitum* até o momento do óbito.

Os animais foram acompanhados e pesados diariamente e os que morreram foram submetidos à necropsia para avaliação da presença de fístula ou peritonite. A eutanásia, com dose letal da associação de xilasina e ketamina, foi feita no quinto dia de pós-operatório. Após a morte, os animais foram submetidos à celiotomia para avaliação dos seguintes itens: presença de infecção de ferida operatória, aderências (pelo índice de Knighthly)<sup>12</sup> e complicações anastomóticas (deiscência ou estenose). A seguir, foram retirados os segmentos intestinais proximais e distais contendo as anastomoses. Os segmentos proximais, com cerca de 2,0cm de extensão, foram denominados corpo de prova proximal (CPP) e utilizados para estudo anátomo-patológico e imunoistoquímico. Os segmentos distais, com 4cm de comprimento, foram denominados de corpo de prova distal (CPD) e submetidos ao teste de tração.

### Tensiometria

O corpo de prova distal foi submetido ao teste de tração para avaliar a força tênsil, utilizando máquina de ensaio mecânico computadorizada, da marca EMIC®. A tração ocorreu com velocidade de 50mm/minuto. Foi utilizada uma célula de carga de 1Kg com sensibilidade de 50 gramas, para um limite de força de 4500gf, até o colapso de 100% com ruptura total da anastomose. As variáveis avaliadas foram: força máxima de tração (FMT) e força de ruptura completa (FRC), medidas em Newtons(N) e a tensão máxima (TM), medida em N/cm<sup>2</sup>.

### Avaliação histológica

O corpo de prova proximal foi fixado em formalina tamponada a 10% e encaminhado para o laboratório de histotécnica para o processamento histológico e avaliação pelas colorações de hematoxilina-eosina (HE) e de picro-sirius red (PSR) e por imunoistoquímica.

A coloração de HE foi utilizada para avaliar o grau de intensidade da reação inflamatória (infiltrado poli e monomorfonuclear), do edema intersticial, da congestão vascular, do tecido de granulação e da fibrose. Os dados foram classificados em acentuado, moderado, discreto e ausente, e transformados em variáveis quantitativas através da atribuição de índice aos achados histológicos, da seguinte maneira: ausente, índice 0; discreto, índice 1; moderado, índice 2 e acentuado, índice 3.

A coloração do *picrosirius-red* F3BA foi feita para identificação das fibras colágenas madura e imatura por técnica de microscopia com luz polarizada e análise morfométrica computadorizada. Cada corte foi avaliado por microscopia óptica em aumento de 200 vezes, utili-

zando-se fonte de luz polarizada C-SP *simple polarizer*. Foram analisados dois campos, proximal e distal à linha anastomótica, contendo toda a espessura do segmento da alça colônica. As imagens foram capturadas por câmera Nikon DS-F11C e transmitidas através do sistema D-DA *simple analyzer*, ao monitor colorido LCD G205HV®, congeladas e digitalizadas. Foi realizada a análise das imagens por meio de aplicativo *Image Pro-plus®*. No sistema RGB ("Red, Green, Blue") foram quantificadas as áreas de fibras colágenas maduras - colágeno tipo I (tons de vermelho, amarelo e laranja) e imaturas - colágeno tipo III (tons de verde). Foi calculada a razão entre as porcentagens da área de colágeno tipo I e da área de colágeno tipo III, determinado como índice de maturação de colágeno (IMaC).

### Avaliação imunoistoquímica

Pelo método imunoistoquímico avaliou-se o CD31 (*Monoclonal, código JC70, Cell Marque, Moleenstraat, NL*), Calponina (*Monoclonal, código CALP, Cell Marque, Moleenstraat, NL*) e Ki-67 (*Monoclonal, código SP6, Cell Marque, Moleenstraat, NL*), em lâminas separadas. A utilização destes marcadores foi feita objetivando a avaliação da neoangiogênese, da pesquisa de miofibroblastos e das células em replicação celular (fora de G0), respectivamente, presentes na área do processo de cicatrização. A recuperação antigênica foi feita expondo os materiais a calor e pressão. A revelação dos casos foi feita pelo cromógeno marrom *Diaminobenzidine* (DAB), sendo a técnica de detecção feita por polímero-HRP (livre de Biotina). Controles positivos e negativos foram utilizados para validar as reações. As lâminas foram analisadas no aumento de 200 vezes para contagem de vasos e de 400 vezes para a contagem de miofibroblastos e de células em proliferação. As imagens foram feitas com a utilização do sistema de captura de imagens OPT 5000 *Power Opticam*®, de 5.0 *megapixels*, conectado a um computador com *software* de análise de imagens VMS 3.5 *Measuring Software HPower*®. Realizou-se análise quantitativa do número de vasos, de fibroblastos e células replicantes na área da anastomose, em uma extensão de 10mm proximal e 10mm distal a esta, em quatro campos distintos escolhidos aleatoriamente.

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada de acordo com a natureza dos dados obtidos. Para as variáveis quantitativas com distribuição normal (Gaussiana) foram utilizados testes paramétricos. Para comparação entre todos os grupos utilizou-se a análise de variância de médias (ANOVA) e para análise dos grupos dois a dois foi utilizado o teste t de *Student*. Para as variáveis quantitativas sem distribuição normal (Gaussiana) utilizou-se a análise não paramétrica. Para comparação entre todos os grupos utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis e para análise dos grupos dois a dois foi utilizado o teste de Mann-Whitney (teste de

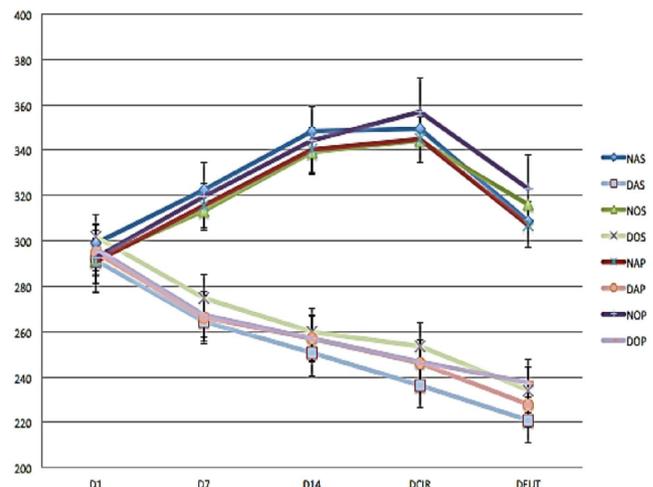
Wilcoxon para grupos independentes). As variáveis dicotômicas, como evolução a óbito, presença ou não de infecção de ferida operatória e de complicações anastomóticas (deiscência ou estenose) foram avaliadas pelo teste de Qui-quadrado e pelo teste de Cochran. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Dos 160 animais que iniciaram o experimento, 117 sobreviveram até o dia da eutanásia, sendo a taxa de mortalidade global de 26,8%. Dos 43 óbitos, 42 foram por complicações anastomóticas, 15 nos animais que receberam salina e 28 nos animais dos grupos que receberam paclitaxel, sendo significativamente maior neste grupo ( $p = 0,03$ ).

O peso médio inicial dos animais foi  $294,8 \pm 1,67$ g. Não houve diferença entre as médias dos pesos entre os grupos no primeiro dia (D1) do experimento ( $p = 0,8037$ ). Os animais dos grupos nutridos tiveram um ganho médio de peso de 23,1% entre D1 e D28. Os animais dos grupos desnutridos apresentaram uma perda média de peso de 16,6% entre D1 e D28. Entre o dia da operação e o da eutanásia houve uma perda ponderal média de 18% nos grupos nutridos e de 10% nos grupos desnutridos (Figura 1).

No dia da operação (Figura 2), a média de peso do grupo DAS ( $236,5 \pm 4,2$ g) foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que a média de peso do grupo DOS ( $253,8 \pm 4,1$ g).



**Figura 1** - Evolução do peso dos animais. Eixo X: dias do experimento - D1- dia 1, D7- dia 7, D14- dia 14, DCIR- dia do procedimento cirúrgico e DEUT- dia da morte dos ratos (eutanásia).

Eixo Y: peso em gramas (g). NAS- ratos nutridos, azeite-salina; NOS- ratos nutridos, ômega-3-salina; NAP- ratos nutridos, azeite-paclitaxel; NOP- ratos nutridos, ômega-3-paclitaxel; DAS- ratos desnutridos, azeite-salina; DOS- ratos desnutridos, ômega-3-salina; DAP- ratos desnutridos, azeite-paclitaxel; DOP- ratos desnutridos, ômega-3-paclitaxel.

A estenose de anastomose ocorreu em 14 ratos do grupo nutrido e 31 do grupo desnutrido, sendo significativamente maior neste grupo ( $p=0,007$ ).

A força de ruptura completa (Figura 3) foi significativamente maior no grupo NAP em relação ao grupo DAP ( $1,28 \pm 0,17$  vs.  $0,77 \pm 0,07$ ;  $p<0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos em relação à tensão máxima ( $p=0,2119$ ) e em relação à força máxima de tração ( $p=0,3638$ ).

A média da intensidade do infiltrado inflamatório (Figura 4) foi significativamente menor no grupo DAS em relação ao grupo DOS ( $1,61 \pm 0,78$  vs.  $2,50 \pm 0,63$ ;  $p<0,05$ ).

Em relação ao índice de maturação do colágeno (IMaC) (Figura 5), no grupo NAS, foi significativamente maior do que no grupo DAS ( $1,45 \pm 0,4$  vs.  $0,35 \pm 0,08$ ,  $p<0,05$ ), no grupo NOS foi significativamente menor do que no grupo DOS ( $2,08 \pm 0,35$  vs.  $2,82 \pm 0,33$ ,  $p<0,05$ ), no grupo DAS foi significativamente menor do que nos grupos DOS ( $0,35 \pm 0,08$  vs.  $2,82 \pm 0,33$ ,  $p<0,05$ ) e DAP ( $0,35 \pm 0,08$  vs.  $1,58 \pm 0,15$ ,  $p<0,05$ ).

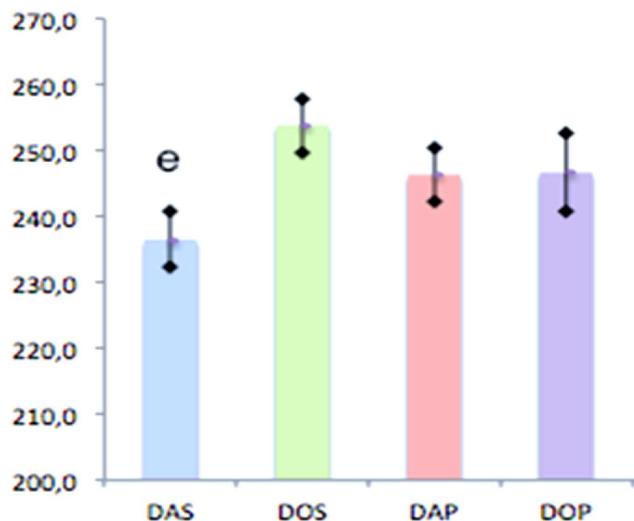
A contagem média do número de vasos sanguíneos (Figura 6) foi significativamente maior no grupo DAS em relação ao grupo DAP ( $12,64 \pm 1,7$  vs.  $6,45 \pm 0,28$ ;  $p<0,05$ ) e significativamente menor no grupo DAP em relação ao grupo DOP ( $6,45 \pm 0,28$  vs.  $8,91 \pm 0,88$ ;  $p<0,05$ ),

## DISCUSSÃO

A incidência global de óbitos no presente estudo foi 26,5%, congruente com outros estudos que utilizaram metodologias semelhantes. Trubian, que avaliou desnutrição com indução de toxemia, teve 24,5% de óbitos<sup>13</sup>. A taxa de óbitos foi maior nos grupos que receberam paclitaxel em comparação com os grupos que receberam salina, a maioria decorrente de complicações anastomóticas pós-operatórias.

A ação imunossupressora das drogas quimioterápicas, como o paclitaxel, é um dos possíveis fatores associado à maior taxa de óbitos observados nos grupos que receberam esta droga<sup>2,14</sup>. Outra possível hipótese para esta maior taxa de óbito é porque tais drogas, por diferentes mecanismos de ação, atuam inibindo a proliferação celular. Como tal proliferação é fundamental no processo de cicatrização, elas exercem importante ação atenuadora no processo de fibroplasia.<sup>8,9,15</sup> A ação inibitória sobre a fibroplasia tem como consequência maior taxa de deiscência das anastomoses, ocasionando fístula anastomótica e peritonite fecal<sup>15</sup>, o que condiz com o que foi observado na necropsia dos animais.

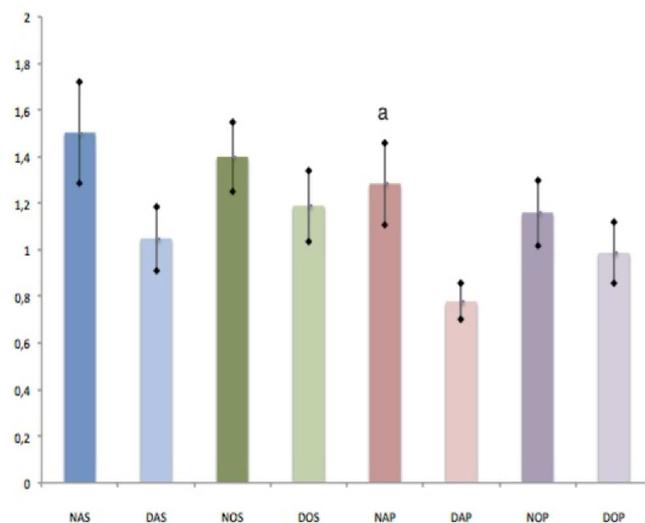
A média do peso inicial dos animais de todos os grupos foi homogênea. A indução de desnutrição protéico-energética, mediante restrição em 50% da dieta padrão, promoveu redução ponderal progressiva durante os 28 dias. Os animais dos grupos nutridos tiveram ganho médio de



**Figura 2** - Médias dos pesos nos grupos desnutridos no dia da operação.

Eixo Y: peso em gramas.

Eixo X: grupos: DAS- ratos desnutridos, azeite-salina; DOS- ratos desnutridos, ômega-3-salina; DAP- ratos desnutridos, azeite-paclitaxel; DOP- ratos desnutridos, ômega-3-paclitaxel; e- média de peso do grupo DAS é menor do que a média de peso do grupo DOS ( $p<0,05$ ).

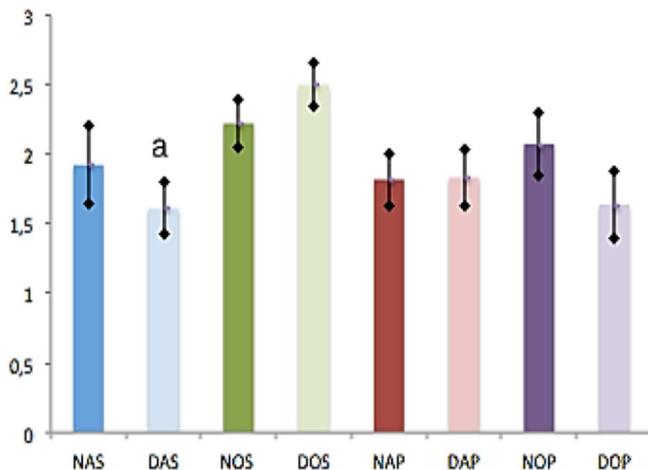


**Figura 3** - Força de ruptura completa (FRC) nos grupos.

Eixo Y: força, em Newtons.

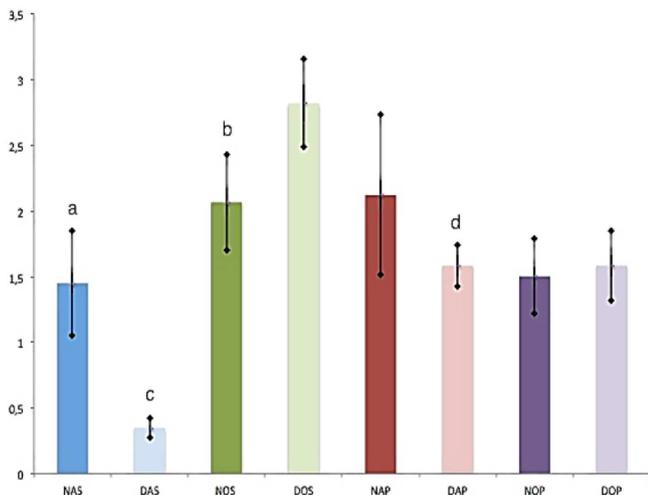
Eixo X: grupos; NAS- ratos nutridos, azeite-salina; NOS- ratos nutridos, ômega-3-salina; NAP- ratos nutridos, azeite-paclitaxel; NOP- ratos nutridos, ômega-3-paclitaxel; DAS- ratos desnutridos, azeite-salina; DOS- ratos desnutridos, ômega-3-salina; DAP- ratos desnutridos, azeite-paclitaxel; DOP- ratos desnutridos, ômega-3-paclitaxel. Não houve diferença entre os grupos ( $p=0,3638$ ).

peso de 23,1% entre D1 e D28, enquanto animais dos grupos desnutridos apresentaram perda média de peso de 16,6% entre D1 e D28. A média de peso dos grupos desnutridos foi menor em relação aos grupos nutridos no final dos 28 dias, mostrando a eficiência do processo de restrição alimentar para obtenção da desnutrição. Re-



**Figura 4** - Intensidade do infiltrado inflamatório na HE. Eixo Y: índice de intensidade do infiltrado inflamatório.

Eixo X: grupos. HE- hematoxilina-eosina; NOS- ratos nutridos, ômega-3-salina; NAP- ratos nutridos, azeite-paclitaxel; NOP- ratos nutridos, ômega-3-paclitaxel; DAS- ratos desnutridos, azeite-salina; DOS- ratos desnutridos, ômega-3-salina; DAP- ratos desnutridos, azeite-paclitaxel; DOP- ratos desnutridos, ômega-3-paclitaxel; a- intensidade do infiltrado inflamatório do grupo DAS significativamente menor em relação ao grupo DOS ( $p < 0,05$ ).

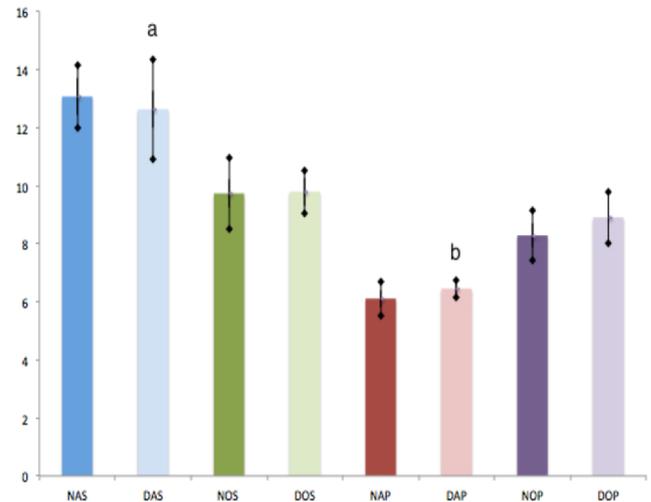


**Figura 5** - Índice de maturação do colágeno.

Eixo Y: índice de maturação do colágeno (IMaC) médio. Eixo X: grupos. NAS- ratos nutridos, azeite-salina; NOS- ratos nutridos, ômega-3-salina; NAP- ratos nutridos, azeite-paclitaxel; NOP- ratos nutridos, ômega-3-paclitaxel; DAS- ratos desnutridos, azeite-salina; DOS- ratos desnutridos, ômega-3-salina; DAP- ratos desnutridos, azeite-paclitaxel; DOP- ratos desnutridos, ômega-3-paclitaxel; a- NAS teve IMaC médio significativamente maior do que o grupo DAS ( $p < 0,05$ ); b- NOS teve IMaC médio significativamente menor do que o grupo DOS ( $p < 0,05$ ); c- DAS teve IMaC médio significativamente menor do que o grupo DOS ( $p < 0,05$ ); d- DAS teve IMaC médio significativamente menor do que o grupo DAP ( $p < 0,05$ ).

sultados semelhantes foram encontrados em outras pesquisas<sup>13,16</sup>.

Relativamente poucos trabalhos avaliaram o papel da suplementação dos ácidos graxos ômega-3 na recu-



**Figura 6** - Número de vasos sanguíneos pelo marcador CD 31. Eixo Y: número de vasos.

Eixo X: grupos. NAS- ratos nutridos, azeite-salina; NOS- ratos nutridos, ômega-3-salina; NAP- ratos nutridos, azeite-paclitaxel; NOP- ratos nutridos, ômega-3-paclitaxel; DAS- ratos desnutridos, azeite-salina; DOS- ratos desnutridos, ômega-3-salina; DAP- ratos desnutridos, azeite-paclitaxel; DOP- ratos desnutridos, ômega-3-paclitaxel; a- número de vasos do grupo DAS significativamente maior do que o número de vasos do grupo DAP ( $p < 0,05$ ); b- número de vasos do grupo DAP significativamente menor do que o número de vasos do grupo DOP ( $p < 0,05$ ).

peração pós-anastomose do trato digestivo, sendo a maioria deles estudos clínicos. Ensaios clínicos como os de Farreras *et al.*, de 2005<sup>17</sup>, Torrinhas, de 2013<sup>4</sup>, e Aoyama *et al.*, de 2013<sup>18</sup>, avaliaram a ação da suplementação de ácidos graxos ômega-3 em pacientes submetidos à anastomoses do trato digestivo, sendo que apenas neste último, o peso, como indicador de recuperação nutricional, foi avaliado, sendo que a suplementação com ácidos graxos ômega-3 teve importante papel na recuperação nutricional e no ganho de peso em pós-operatório de pacientes submetidos a anastomoses gastroentéricas por câncer de estômago<sup>18</sup>.

Observou-se ainda que, no dia da operação, após uma semana de administração de azeite de oliva ou de ácido graxo ômega-3, a média de peso do grupo DOS foi maior do que a do grupo DAS. Este achado, condizente com a literatura, sugere que a suplementação com ômega-3, além de modular favoravelmente o processo de cicatrização da anastomose, contribui também como importante fator de aporte nutricional energético na recuperação do estado de desnutrição<sup>18</sup>.

Das três forças de resistência à tração mensuradas, a força máxima de tração (FMT) e a tensão máxima (TM) não apresentaram diferenças entre os grupos. Em relação à força de ruptura completa (FRC), no grupo DAP foi menor quando comparada ao grupo NAP. A desnutrição associada ao paclitaxel teve papel prejudicial sobre a resistência tênsil da anastomose. Neste sentido, estudos experimentais que avaliaram a ação da desnutri-

ção<sup>13,16</sup> e do uso de quimioterápicos<sup>15</sup> sobre a força de ruptura de anastomoses colônicas em ratos também observaram redução significativa da mesma por ação deletéria de tais drogas sobre o processo de cicatrização.

A indução de desnutrição protéico-calórica interfere sistemicamente na síntese protéica. Possivelmente este efeito também ocorra no sítio anastomótico, prejudicando a síntese do colágeno. Como a síntese do colágeno na anastomose é um dos principais fatores de recuperação da força de resistência à tração<sup>13,19</sup>, perturbações nesta síntese possivelmente se associam com redução na força de resistência à tração. Este mecanismo possivelmente explique o achado da redução da força de ruptura completa (FRC) no grupo DAP em relação ao grupo NAP. Corrobora com esta ideia o achado de que o índice de maturação do colágeno (razão entre colágeno maduro e imaturo) também seja menor, embora não de forma significativa, no grupo DAP quando comparada ao grupo NAP.

A ação dos quimioterápicos sobre a proliferação celular atenua o processo de fibroplasia<sup>8,9,15</sup>. Possivelmente isto seja elemento potencializador dos efeitos inibitórios da desnutrição sobre a síntese protéica, em especial do colágeno no sítio anastomótico. Estes elementos, desnutrição e administração de paclitaxel, atuando de forma concomitante, provavelmente expliquem a redução da FRC no grupo DAP em relação ao grupo NAP, pois tal redução não foi observada no grupo de animais submetidos apenas à desnutrição, sem a administração de paclitaxel (DAS) em relação ao grupo NAS.

Por outro lado, não se observou diferença significativa na FRC entre os grupos DOP e NOP. Este achado sugere que a suplementação nutricional com ácidos graxos ômega-3 possa reverter o efeito deletério causado pela associação de desnutrição e administração de paclitaxel na FRC da anastomose colônica, pois a redução significativa desta força, observada no grupo DAP em relação ao grupo NAP, não foi observada no grupo DOP em relação ao grupo NOP. Este achado é concordante com os de Ekçi *et al.*<sup>20</sup>, que também observaram aumento significativo na pressão de ruptura da anastomose colônica de ratos que receberam suplementação nutricional com ômega-3, embora tenha sido utilizado em associação com o ácido ascórbico. A modulação favorável dos ácidos graxos ômega-3 sobre a síntese de colágeno no sítio anastomótico é uma das explicações possíveis para a recuperação da força de ruptura da anastomose colônica observada.

Observou-se também aumento na atividade celular no sítio anastomótico, considerada como infiltrado inflamatório, no grupo DOS em relação ao grupo DAS. Este achado contribui com a ideia de que o ômega-3 tenha ação imunomoduladora no processo inflamatório e de cicatrização, estimulando a atividade celular e corrobora os achados de McDaniel *et al.*<sup>21</sup> que observaram aumento do infiltrado inflamatório de feridas cutâneas

humanas em cicatrização, bem como, nível significativamente maior de interleucina 1 (IL-1b) no fluido inflamatório lesional no grupo que recebeu a administração do EPA e DHA. Este achado pode parecer conflitante com o proposto na literatura, de que os ácidos graxos ômega-3 tenham atividade menos pró-inflamatória por substituírem ácido araquidônico (ácido graxo ômega-6) na membrana celular e aumentarem, pela sua metabolização, a produção de eicosanoides de menor potencial inflamatório, como a prostaglandina E<sub>3</sub> e leucotrieno B<sub>5</sub><sup>10,22</sup>. Especula-se que esta maior atividade celular no ambiente da anastomose se deva a tipos celulares específicos, como macrófagos, fibroblastos e miofibroblastos. É possível que no sítio anastomótico, os eicosanoides derivados dos ácidos graxos ômega-3, embora tenham efeito inibitório sobre o processo inflamatório de forma geral, possa estimular a proliferação destes tipos celulares específicos. A maior produção de colágeno maduro (IMaC) no grupo DOS em relação ao grupo DAS contribui indiretamente com esta ideia, pois esta maior produção está correlacionada com a maior atividade de células produtoras de colágeno (fibroblasto e miofibroblasto) no ambiente anastomótico.

A avaliação da densitometria do colágeno mostrou redução significativa do colágeno maduro (tipo I) em relação ao colágeno imaturo (tipo III) avaliado pelo índice de maturação do colágeno (IMaC) no grupo DAS em relação ao grupo NAS. Este achado sugere que a desnutrição seja importante fator na redução da produção do colágeno maduro no ambiente da anastomose em cicatrização. Trubian, também observou redução do IMaC nos grupos de ratos desnutridos em relação ao grupo de ratos nutridos<sup>13</sup>.

A recuperação da força tênsil está mais relacionada ao colágeno tipo I do que com o colágeno do tipo III. A deposição e o remodelamento das fibras colágenas do tipo I é o principal fator para recuperação da resistência da anastomose<sup>19</sup>.

No grupo DOS observou-se ganho importante do colágeno maduro em relação ao imaturo quando comparado ao grupo NOS, pois o IMaC naquele grupo foi maior do que neste grupo. Este achado sugere que a administração do ômega-3 na semana que antecede a intervenção operatória estimula a produção de colágeno maduro nos animais desnutridos. O IMaC foi também significativamente maior no grupo DOS em relação ao DAS. Este achado corrobora a ideia de que a administração pré-operatória de ômega-3 possa reverter os efeitos deletérios da desnutrição na produção do colágeno maduro no ambiente da anastomose em cicatrização.

A migração e a proliferação dos fibroblastos e dos miofibroblastos no ambiente em cicatrização, e conseqüentemente a produção do colágeno, é mediada pela ação dos prostanoídes inflamatórios (prostaglandinas e leucotrienos) produzidos pelas células inflamatórias. Portanto o IMaC maior no grupo DOS em relação ao DAS

possivelmente esteja correlacionado com o maior nível da atividade celular observada no grupo DOS em relação ao grupo DAS.

Outro achado deste estudo que favorece este conceito de imunomodulação produzido pela suplementação com ômega-3 foi a observação feita em relação ao número de vasos sanguíneos (neoangiogênese) no ambiente de cicatrização da anastomose. Em imunohistoquímica, o CD31 é usado principalmente para demonstrar a presença de células endoteliais em secções histológicas teciduais. Isto permite avaliar o grau de angiogênese tecidual<sup>23</sup>. Observou-se redução no número de vasos sanguíneos no grupo DAP em relação ao grupo DAS sugerindo que a administração do paclitaxel, que é um quimioterápico com ação antiangiogênica<sup>24</sup>, seja o fator causador desta redução, concordando com outro estudo<sup>8</sup> que mostrou redução significativa da neovascularização das anastomoses colônicas de ratos que receberam paclitaxel. A suplementação com ômega-3 no grupo DOP associou-se à recuperação do número de vasos, pois este número foi maior neste grupo quando comparado com o grupo DAP. Este achado sugere que a inibição que o paclitaxel causa na neoangiogênese do processo de cicatrização da anastomose colônica possa ser revertida com a adição de ômega-3 no pré-operatório. Especula-se que os eicosanoides produzidos pela metabolização dos ácidos graxos ômega-3, como a prostaglandina E<sub>3</sub> e o leucotrieno B<sub>5</sub>, estimulem a migração e a proliferação de células precursoras das células endoteliais no ambiente da anastomose.

Os miofibroblastos são células produtoras de colágeno, predominantemente do tipo I e sua quantificação também pode ser usada como método de avaliação da cicatrização<sup>13</sup>. Os fibroblastos começam aparecer na ferida por volta do terceiro dia de pós-operatório e proliferam em resposta a fatores de crescimento e iniciam a produção de colágeno<sup>25</sup>. Foi observada redução significativa na média de número de miofibroblastos no grupo DOS em relação ao grupo NOS. Este achado sugere que a desnutrição seja fator deletério na produção de miofibroblastos. Trubian também encontrou redução significativa do número de miofibroblastos na anastomose colônica de ratos desnutridos<sup>13</sup>.

As células em proliferação são a grande marca da anastomose em cicatrização. O antígeno Ki-67 está presente em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2, e mitose), mas está ausente em células em repouso (G0)<sup>26</sup>. No presente trabalho, não se observou diferença entre os grupos no número de células em proliferação, avaliado pelo marcador Ki67. Diante dos achados anteriormente apre-

sentados e das hipóteses desenvolvidas, seria esperado encontrar maior número de células em proliferação entre os grupos que receberam ácidos graxos ômega-3, em especial nos subgrupos que não receberam o quimioterápico, em comparação com os grupos que receberam azeite, porém isto não ocorreu. Não foi possível estabelecer razões objetivas para tal fato. Uma das possibilidades aventadas é a de que os tipos celulares em proliferação sejam diferentes entre os grupos azeite e ácidos graxos ômega-3. Neste, mediados pelos eicosanoides de menor potencial inflamatório (prostaglandina E<sub>3</sub> e o leucotrieno B<sub>5</sub>), oriundos da metabolização dos ácidos graxos ômega-3, os tipos celulares seriam compostos por miofibroblastos, fibroblastos, células endoteliais e seus precursores e no outro grupo (azeite), mediados por prostanoídes de maior potencial inflamatório, seriam outros tipos celulares, como infiltrado polimorfo e monomorfonuclear.

Em concordância com a literatura, os dados aqui apresentados sugerem que o uso de ômega-3 associou-se a modulação do processo inflamatório com estímulo da produção do colágeno e na qualidade do mesmo no ambiente da anastomose<sup>19</sup>. Como já referido, a quantidade de colágeno maduro em relação ao imaturo, medido pelo IMAc, foi significativamente maior no grupo DOS em relação ao DAS. Também no grupo DOS, a atividade celular representada pelo infiltrado inflamatório no ambiente da anastomose foi maior em relação ao grupo DAS. Estes dois achados avaliados concomitantemente suportam a ideia de que a administração de ômega-3 no pré-operatório, em animais desnutridos, contribua positivamente na modulação do processo de cicatrização das anastomoses colônicas de ratos corroborando dados de outro trabalho<sup>20</sup> onde se observa a ação benéfica dos ácidos graxos.

A suplementação do ômega-3 mostrou-se também importante fator nutricional como aporte energético, pois atenuou a perda de peso no grupo DOS em relação ao grupo DAS.

Esta suplementação desempenhou ainda papel importante na recuperação dos efeitos deletérios do paclitaxel na neoangiogênese, pois o número de vasos sanguíneos no grupo DOP foi maior do que no grupo DAP.

Os mecanismos exatos pelos quais o ômega-3 possa ter atuado para produzir os achados encontrados nesta pesquisa ainda precisam ser melhor elucidados. Os ácidos graxos ômega-3 possuem atividades imunomoduladoras, ainda em estudo, sobre a produção de citocinas, a ativação dos linfócios T e na angiogênese<sup>27</sup> que, ao serem elucidadas, poderão contribuir para a melhor compreensão dos dados apresentados.

## A B S T R A C T

**Objective:** To evaluate the effect of preoperative supplementation of omega-3 fatty acids on the healing of colonic anastomoses in malnourished rats receiving paclitaxel. **Methods:** We studied 160 male Wistar rats, divided in two groups: one subjected to malnutrition by pair feeding (D) for four weeks, and another that received food ad libitum (N). In the fourth week, the groups were further divided into two subgroups that received omega-3 or olive oil by gavage. The animals were submitted to colonic transection and end-to-end anastomosis. After the operation, each of the four groups was divided into two subgroups that received intraperitoneal isovolumetric solutions of saline or paclitaxel. **Results:** Mortality was 26.8% higher in the group of animals that received paclitaxel ( $p = 0.003$ ). The complete rupture strength was greater in well-nourished-oil Paclitaxel group (WOP) compared with the malnourished-oil Paclitaxel one (MOP). The collagen maturation index was higher in well-nourished-oil saline group (WOS) in relation to the malnutrition-oil-saline group (MOS), lower in malnourished-oil-saline group (MOS) in relation to malnourished- $\omega$ -3-saline one (M3S) and lower in the well-nourished- $\omega$ -3-saline group (W3S) compared with the malnourished- $\omega$ -3-saline (M3S). The blood vessel count was higher in the malnourished-oil-saline group (MOS) than in the malnourished-oil-paclitaxel group (MOP) and lower in the malnourished-oil-saline group (MOS) in relation to the malnourished- $\omega$ -3-paclitaxel group (M3P). **Conclusion:** Supplementation with omega-3 fatty acids was associated with a significant increase in the production of mature collagen in malnourished animals, with a reversal of the harmful effects caused by malnutrition associated with the use of paclitaxel on the rupture strength, and with a stimulus to neoangiogenesis in the group receiving paclitaxel.

**Key words:** Anastomosis, Surgical. Malnutrition. Omega-3 Fatty Acids. Paclitaxel.

## REFERÊNCIAS

- Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(4):212-36.
- du Bois A, Quinn M, Thigpen T, Vermorken J, Avall-Lundqvist E, Bookman M, et al. 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GIG OCCC 2004). *Ann Oncol.* 2005;16 Suppl 8:viii7-viii12.
- Trimbos JB, Parmar M, Vergote I, Guthrie D, Bolis G, Colombo N, et al. International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1 and Adjuvant ChemoTherapy In Ovarian Neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(2):105-12.
- Campos ACL. Tratado de nutrição e metabolismo em Cirurgia. Rio de Janeiro: Rubio; 2013.
- Braga M, Gianotti L, Nespoli L, Radaelli G, Di Carlo V. Nutritional approach in malnourished surgical patients. A prospective randomized study. *Arch Surg.* 2002;137(2):174-80.
- Kavalukas SL, Barbul A. Nutrition and wound healing: an update. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127 Suppl 1:385-435.
- Balogun N, Forbes A, Windswendter M, Lanceley A. Noninvasive nutritional management of ovarian cancer patients: beyond intestinal obstruction. *Int J Gynecol Cancer.* 2012;22(6):1089-95.
- Yüceyar S, Ertürk S, Temiz M, Doğanusoy G, Gümüstas K, Özgüröglu M, et al. Role of the antiangiogenic drug paclitaxel on healing of intestinal anastomosis: an experimental study. *Tech Coloproctol.* 2005;9(3):201-5.
- Bozkurtoglu H, Bozkurt S, Celik F, Kaya MA, Zemheri E. Effect of the intraperitoneal paclitaxel on the healing of colonic anastomosis. *Int Surg.* 2005;90(1):12-7.
- Calder PC. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2007;77(5-6):327-35.
- Waitzberg DL, Torrinas RS, Jacintho TM. New parenteral lipid emulsions for clinical use. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2006;30(4):351-67.
- Knightly JJ, Agostino D, Clifton EE. The effect of fibrinolysin and heparin on the formation of peritoneal adhesions. *Surgery.* 1962;52:250-8.
- Trubian PS. Nutrição perioperatória e cicatrização de anastomoses em ratos desnutridos e toxêmicos: tensiometria, densitometria do colágeno e quantificação de angiogênese e miofibroblasto [tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Ciências da Saúde; 2008.
- von Gruenigen VE, Huang HQ, Gil KM, Frasure HE, Armstrong DK, Wenzel LB. The association between quality of life domains and overall survival in ovarian cancer patients during adjuvant chemotherapy: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol.* 2012;124(3):379-82.
- Vizzotto Júnior AO, Noronha L, Scheffel DLH, Campos ACL. Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. *J Bras Patol Med Lab.* 2003;39(2):143-9.
- Gonçalves CG, Groth AK, Ferreira M, Matias JE, Coelho JC, Campos AC. Influence of preoperative feeding on the healing of colonic anastomosis in malnourished rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2009;33(1):83-9.
- Farreras N, Artigas V, Cardona D, Rius X, Trias M, González JA. Effect of early postoperative enteral immunonutrition on wound healing in patients undergoing surgery for gastric cancer. *Clin Nutr.* 2005;24(1):55-65.
- Aoyama T, Hayashi T, Fujikawa H, Ogata T, Cho H, Wada H, et al. Effect of enteral nutrition enriched with eicosapentaenoic acid on body weight loss and compliance with S-1 adjuvant chemotherapy after gastric cancer surgery. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2013;40(12):2289-91.
- Doillon CJ, Dunn MG, Berg RA, Silver FH. Collagen deposition during wound repair. *Scan Electron Microsc.* 1985;(Pt 2):897-903.
- Ekçi B, Karabacak I, Atukeren P, Altinlio E, Tomaoglu K, Tasci I. The effect of omega-3 fatty acid and ascorbic acid on healing of ischemic colon anastomoses. *Ann Ital Chirur.* 2011;82(6):475-9.
- McDaniel JC, Belury M, Ahijevych K, Blakely W. omega-3 fatty acids effects on wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(3):337-45.
- Cockbain AJ, Toogood GJ, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids for the treatment and prevention of colorectal cancer. *Gut.* 2012;61(1):135-49.
- Jackson DE. The unfolding tale of PECAM-1. *FEBS Lett.* 2003;540(1-3):7-14.
- Klein LE, Freeze BS, Smith AB 3rd, Horwitz SB. The microtubule stabilizing agent discodermolide is a potent inducer of accelerated cell senescence. *Cell Cycle.* 2005;4(3):501-7.
- Kiyama T, Witte MB, Thornton FJ, Barbul A. The route of nutrition support affects the early phase of wound healing. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1998;22(5):276-9.

26. Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol.* 2006;206(3):624-35.
27. Segura JG. Extração e caracterização de óleos de resíduos de peixe de água doce [dissertação]. Pirassununga/SP: Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos; 2012.

Recebido em 10/07/2014

Aceito para publicação em 15/08/2014

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: nenhuma

**Endereço para correspondência:**

Alvo Orlando Vizzotto Junior

E-mail: alvovizz@hotmail.com