

O fator de crescimento de fibroblasto básico melhora a cicatrização de anastomoses duodenais em ratos¹

Aldo da Cunha Medeiros²
 Antônio Medeiros Dantas Filho³
 Tertuliano Aires Neto³
 Francisco Pignataro Lima⁴
 Ítalo Medeiros de Azevêdo⁵
 Silvana Gomes Alves⁶

Medeiros AC, Dantas Filho AM, Aires Neto T, Lima FP, Azevedo IM, Alves SG. O fator de crescimento de fibroblasto básico melhora a cicatrização de anastomoses duodenais em ratos. *Acta Cir Bras* [online] 2003 vol 18 suppl 1. Disponível em www.scielo.br/acb.

RESUMO: Objetivo: Avaliar as alterações histológicas, e o ganho de resistência em anastomoses duodenais tratadas com fator de crescimento de fibroblasto básico (FGFb). **Métodos:** Vinte ratos da raça Wistar foram submetidos a secção transversal do duodeno, seguida de anastomose. Os animais foram divididos em 4 grupos de 5 animais cada: A1 e A2 (experimentais), nos quais foi aplicado FCFb sobre a anastomose logo após seu término; e B1 e B2 (controles), nos quais foi administrada solução salina sobre a zona de anastomose. Os roedores foram mortos com superdose de anestésico, sendo A1, B1 no 5º dia e A2, B2 no 7º dia de pós-operatório. Foi feita avaliação quanto à resistência das anastomoses à pressão e análise da densidade média dos achados histopatológicos com auxílio do sistema digitalizado *Image proPlus*. **Resultados:** No grupo A1 a pressão suportada pelas anastomoses foi de 52±14,4 mmHg e no grupo A2 140±34,8 mmHg. Em B1 a pressão atingiu 33,6±15,2 mmHg e as anastomoses do grupo B2 suportaram pressão 105±30,3. No grupo A1 a densidade média dos elementos histopatológicos foi de 93±9,3 e A2 atingiu 181,8±27,6. Nos grupos de controle B1 e B2 as densidades médias foram 67,6±16,7 e 101±12,9 respectivamente. A análise estatística revelou diferença significativa entre nos dados dos grupos experimentais e controles ($p < 0,05$). **Conclusão:** a aplicação tópica do FCFb foi capaz de aumentar a resistência das feridas do duodeno suturadas e observadas após 5 e 7 dias de evolução. Estimulou a neovascularização, a formação de fibroblastos e de fibras colágenas, melhorando os escores histológicos em relação ao controle.

DESCRITORES: Fator de crescimento de fibroblasto. Cicatrização. Anastomose. Duodeno. Resistência. Colágeno.

INTRODUÇÃO

Os fatores de crescimento têm múltiplas funções, destacando-se a estimulação da divisão celular, angio-

gênese, quimiotaxia, indução ou inibição da diferenciação celular, transformação ou indução da síntese de proteínas^{1,2,3,4}. Estas substâncias polipeptídicas têm grande variedade de fontes e alvos celulares. Dentre os

1. Trabalho do Núcleo de Cirurgia Experimental da UFRN (Apoiado pelo CNPq).
2. Prof. Dr. do Departamento de cirurgia da UFRN; Chefe do Núcleo de Cirurgia Experimental; Pesquisador nível I do CNPq.
3. Prof. do Departamento de Cirurgia-UFRN; aluno do Programa de Pós-graduação.
4. Prof. Mestre do Departamento de Patologia-UFRN.
5. Aluno do Departamento de Estatística-UFRN.
6. Aluna bolsista de Iniciação Científica, CNPq – PIBIC.

fatores de crescimento, os que parecem ter mais destaque na cicatrização das feridas são os fatores de crescimento de fibroblasto (FCF), sendo que o FCF de reação básica (FCFb) exerce um maior número de reações fisiológicas⁵. As principais fontes destas citocinas são macrófagos, linfócitos e plaquetas^{6,7}. Para Davidson⁸ os fatores de crescimento são essencialmente angiogênicos, promovendo portanto o crescimento vascular, aspecto extremamente desejável em um processo cicatricial. Além disso, eles exercem ação indireta na síntese de colágeno, proteína fibrosa que dá resistência às anastomoses. Os FCFb tanto podem estimular como inibir os fibroblastos, tornando-se importante mecanismo de retroalimentação na síntese e destruição do colágeno, assim como da própria cicatrização das feridas^{9,10}.

Tomando por base as características anatômicas e fisiológicas do duodeno como um órgão sujeito a incidência não desprezível de fistulas e deiscências pós-operatórias, e os efeitos do FCFb, foi realizado estudo experimental em ratos com o propósito de testar a ação desta citocina na cicatrização de anastomoses do duodeno, consideradas como anastomoses de risco. O trabalho tem o objetivo de estudar as alterações histológicas causadas pelos FGFb nas anastomoses duodenais e observar o seu ganho de resistência sob a ação dos FGFb.

MÉTODOS

Reagentes: Foi utilizado o Fator de Crescimento de Fibroblastos básico (FCFb) associado ao colágeno solúvel, como veículo, com a finalidade de facilitar a aderência do mesmo ao duodeno em estudo (Reagentes de procedência Sigma[®]).

Procedimentos: Foram operados 20 ratos Wistar, pesando 260 ± 14 g separados aleatoriamente nos grupos A1, A2, B1 e B2, com cinco animais cada. Todos eles foram mantidos em gaiolas individuais recebendo água e alimento *ad libitum* e receberam apenas dieta líquida no pré-operatório imediato por um período de 12 horas. A anestesia processou-se com pentobarbital por via intraperitoneal e a anti-sepsia do campo operatório foi feita com solução de povidona. Uma laparotomia mediana de 4 cm a partir do apêndice xifóide foi realizada. O duodeno foi submetido a secção transversal, processando-se a anastomose com fio de polipropileno 6-0 em pontos simples separados. A parede abdominal foi fechada em dois planos com fio de nylon 4-0.

Nos animais dos grupos A1 e A2 foi aplicada sobre a anastomose solução contendo o FCFb na dose de 20mg, em veículo de colágeno solúvel imediatamente após o término da sutura. Nos animais dos grupos B1

e B2 (experimentais) um mililitro de solução salina foi aplicado sobre a anastomose. Os grupos A1 e B1 foram observados até o 5º dia e os A2 e B2 até o 7º dia de pós-operatório. Todos os animais foram mantidos em dieta oral líquida (sacarose 10%) por um período de 48 hs no pós-operatório imediato, retornando a dieta sólida (labina Purina[®]) a partir daí. Após os períodos de observação, os animais foram mortos com superdose de anestésico. A anastomose duodenal foi submetida ao teste de resistência à pressão, procedendo-se a secção do piloro e da transição duodenojejunal introduzindo-se catéter de polietileno nº 4 na sua luz proximal, aí fixado com fio de algodão 000, e feita a ligadura para oclusão da extremidade distal do duodeno. Através de catéter interligado a manômetro de mercúrio, foi feita a insuflação de ar em fluxo contínuo de 0,5 litro por minuto, antes preenchendo-se a cavidade abdominal com solução salina 0,9%. Considerou-se a pressão máxima de ruptura da alça duodenal, quando surgiu o borbulhamento na solução salina na sutura duodenal. Em seguida o duodeno foi ressecado e colocado em formol a 10 % por 48 hs, incluído em parafina e cortado em secções de 5m. As lâminas foram desparafinizadas, diafanizadas e coradas com hematoxilina-eosina e o tricrômico de Masson. A avaliação histológica das lâminas foi feita utilizando-se um sistema digitalizador e analisador de imagens. A área total dos campos microscópicos foi observada utilizando-se microscópio óptico (*Olympus*), cuja imagem foi capturada por câmera e digitalizada através de *Software Image Pro-plus*, versão 3.0 (*Media Cybernetics - LP, USA*). Cada campo digitalizado foi dividido em unidades de imagem denominadas *picture elements* ou *pixels*, com coordenadas definidas. Foram avaliados dez campos aleatórios de cada lâmina. Após selecionada a resolução desejada, os impulsos ópticos foram digitalizados, resultando em uma imagem de cada campo que foi armazenada e processada em sistema multimídia. As lâminas foram examinadas para quantificação dos elementos da reação inflamatória como quantidade de fibroblastos, de neutrófilos, neovasos, tecido de granulação e colágeno, sob a forma de densidade mínima, máxima e média.

Análise Estatística: os dados obtidos foram analisados e comparados através do teste t de Student com significância 0,05 e os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão.

RESULTADOS

Os animais estudados sobreviveram sem complicações pós-operatórias, sendo todos sacrificados nos períodos previstos. No grupo A1 (observação por 5

dias), a pressão intraluminal suportada pelo duodeno foi de 52±14,4 mmHg e no A2 (7 dias) a pressão atingiu o valor 140±34,8mmHg. No grupo B1, que não fez uso de FCFβ e foi observado por 5 dias, a média da

pressão foi de 33,6±15,2 mmHg, enquanto no grupo B2 (7 dias) a pressão intraluminal foi de 105±30,3. Os dados completos e respectiva interpretação estatística encontra-se na tabela 1.

Tabela 1 – Valores das pressões suportadas pelas alças duodenais expressas em mmHg.

Rato número	GRUPO A		GRUPO B	
	A1(5 dias)	A2 (7 dias)	B1 (5 dias)	B2 (7 dias)
1	70	185	40	160
2	55	140	20	110
3	40	95	35	75
4	35	160	55	80
5	60	120	18	100
Médias	52±14,4*	140±34,8**	33,6±15,2φ	105±30,3

* p< 0,05 comparado com A2, B2.

** p=0,01 comparado com B2

φ p<0,05 comparado com B2; p>0,05 comparado com A1.

Quando foram computados os dados histopatológicos através de sistema digitalizado, que transformou a quantificação dos elementos da reação tecidual em valores de densidade média, observou-se que os dados colhidos acompanharam aqueles referentes à resistência

dos tecidos em cicatrização. Assim, no grupo A1 a densidade média foi de 93±9,3, em A2 o valor observado foi de 181,8±27,6. Esses valores foram significativamente mais elevados (p<0,05) que os dos grupos B1 e B2, como se verifica na tabela 2.

Tabela 2 – Densidade média dos elementos histopatológicos do tecido duodenal em cicatrização.

Rato número	GRUPO A		GRUPO B	
	A1(5 dias)	A2 (7 dias)	B1 (5 dias)	B2 (7 dias)
1	102,7	190,6	76,7	90,8
2	89,5	201,4	55,9	102,6
3	95,2	142,4	49,0	88,6
4	100,9	166,9	67,1	105,5
5	79,8	210,7	91,0	120,1
Médias	93±9,3*	181,8±27,6**	67,6±16,7φ	101±12,9

* p<0,05 comparado A2, B1; p=0,22 comparado com B2

** p<0,05 comparado com B1 e B2

φ p=0,002 comparado com B2

No grupo B1 chamou a atenção a densidade mínima de colágeno nas lâminas examinadas. Em todas elas, as fibras de colágeno apareciam desorganizadas, distribuídas aleatoriamente. Observou-se maior quantidade de neovasos, células inflamatórias, fibroblastos e fibras

de colágeno no grupo A-1. As lâminas do grupo A2 mostraram sistematicamente grande celularidade à base principalmente de neutrófilos e macrófagos; a quantidade de fibroblastos, de fibras de colágeno e a neovascularização foram maiores que no grupo B-2.

DISCUSSÃO

Aspecto importante, que deve ser levado em consideração, é o fato de que, apesar da rica vascularização duodenal, este órgão está sujeito a complicações conseqüentes à isquemia, manipulação cirúrgica e agressão cloridropéptica^{11,12}.

As fistulas duodenais são na sua grande maioria conseqüentes à condição patológica denominada “duodeno difícil”. Segundo Schein e Decker¹³, as complicações do tratamento do coto duodenal difícil não têm merecido grande destaque, embora continuem ocorrendo e sendo dotadas de grande potencial mórbido. As casuísticas mais significativas sobre o assunto foram publicadas até a década de 70, tendo em vista ter sido, até aquela época, a gastrectomia subtotal o tratamento padrão para as úlceras duodenais¹⁴. Com a diminuição da indicação do tratamento cirúrgico para a úlcera duodenal, aumentou a incidência de complicações, que passaram a incidir cada vez mais em pessoas mais idosas¹⁵. A incidência atual das fistulas duodenais está em torno de 1,5 a 3,0%,¹⁶. Desse modo, os fatores que mais contribuem para a incidência das deiscências e fistulas duodenais são: as desvascularizações conseqüentes às extensas dissecções, a circulação terminal e a fibrose cicatricial nas úlceras duodenais crônicas¹⁶. Deve ser ressaltado igualmente que o duodeno apresenta outras características, que fazem com que seja um órgão sujeito a essas complicações, quais sejam: é um órgão predominantemente retroperitoneal, portanto sem a proteção da serosa peritoneal; recebe através da papila os sucos biliar e pancreático, fato que o torna mais susceptível a complicações mais graves na vigência de fistulas e deiscências; recebe ácido clorídrico do estômago, substância altamente agressiva à parede duodenal e aos fios de sutura. Essas características fizeram com que o duodeno fosse escolhido como o órgão alvo para o presente trabalho, podendo-se denominar as suturas e anastomoses do duodeno como de alto risco¹⁶.

O FCFb mostrou-se eficaz no presente trabalho em melhorar a qualidade da cicatrização de lesão do duodeno ao estimular a neovascularização, a celularidade à base de fibroblastos, neutrófilos e macrófagos, bem como a formação de colágeno, mesmo que a observação tenha sido até o sétimo dia pós-operatório. Várias técnicas têm sido usadas para a quantificação da resistência anastomoses de alças intestinais, como extensômetro de resistência elétrica¹⁷, coluna de mercúrio e selo d'água¹⁸, resistência com insuflação²⁰. Optou-se no presente estudo pela determinação da resistência da anastomose ainda na cavidade abdominal, com o objetivo de evitar a interferência de lesões acidentais da área em estudo durante a dissecção do duodeno. Witte e Barbul (21) afirmam que, para que uma cicatrização se faça a contento, são essenciais: boa irrigação, ausência de

tensão, trauma tecidual mínimo, hemostasia adequada e técnica perfeita e rigorosa.

Com a finalidade de reduzir ao máximo a interferência subjetiva do patologista ao examinar as lâminas ao exame histopatológico, foi utilizado sistema digital de captação de imagens e quantificação dos achados histológicos em densidade média. Sistema semelhante foi utilizado por Schnaider et al²⁶. Alguns outros métodos têm sido utilizados com resultados satisfatórios^{22,23,24,25}.

Os fatores do crescimento constituem um grupo de peptídeos à semelhança de hormônios, que afetam uma grande variedade de sistemas biológicos, inclusive a cicatrização das feridas, quando administrados *in vivo* ou *in vitro*²⁷. Com a descoberta dos fatores do crescimento derivados de plaquetas, do fator transformador beta e do FCFb, tem sido possível demonstrar a melhora da cicatrização das feridas em certo número de modelos *in vivo* pela aplicação tópica nas feridas²⁸. Muitos desses fatores de crescimento são produzidos por células reconhecidamente envolvidas na reparação das feridas. Estudos já comprovaram que o FCFb é um potente estimulador da angiogênese, é um mitógeno e substância quimiotáxica que atrai células endoteliais e fibroblastos. Esses efeitos foram observados com bastante evidência no presente estudo. Da mesma forma, tem-se demonstrado que o fator de crescimento de fibroblastos é um potente estimulador da produção de colagenase e do ativador do plasmonogênio, que facilitam a migração de células através da matriz do tecido em cicatrização²⁸.

CONCLUSÕES

1 – De acordo com os dados obtidos do estudo em ratos, pôde-se concluir que o FCFb foi capaz de aumentar a resistência das feridas do duodeno suturadas e observadas após 5 e 7 dias de evolução.

2 – A aplicação tópica de FCFb em feridas do duodeno de ratos estimulou a neovascularização, a formação de fibroblastos e de fibras colágenas, melhorando os escores histológicos em relação ao controle.

REFERÊNCIAS

1. McGrath MH. Peptide Growth Factors and wound healing. *Cl Plast Surg* 1990; 17:421-432.
2. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235: 442-447.
3. Hunt TK, LaVan FB. Enhancement of wound healing by growth factors. *N Engl J Med* 1989; 321:111-112.
4. Ross R. Platelet-derived growth factor. *Annu Rev Med* 1987; 38: 71-79.
5. Richard JL, Parer-Richard C, Daures JP. Effect of topical basic fibroblast growth factor on the healing of chronic diabetic neurotrophic ulcers of the foot. *Diabetes Care* 1995; 18:64-69.
6. Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB. Role of platelet-derived growth factor in the wound healing: Synergistic effects with growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7695-7697.

7. Muscoe T, Cutler N, Allman R. A phase II study to evaluate recombinant platelet-derived growth factor-BB in the treatment of stage 3 to 4 pressure ulcers. *Arch Surg* 1994;129:212-219.
8. Davidson J. Growth factors in wound healing. *Wound* 1995; 7(suppl A): 53-64.
9. Deuel TF, Kawahara RS, Muscoe TA. Growth factors and wound healing: platelet-derived growth factor as a model of cytokine. *Ann Rev Med* 1991; 42: 567-574.
10. Falanga V, Zitelli JA, Eaglstein WH. Wound healing. *J Am Acad Dermatol* 1988; 19:559-563.
11. Zollinger RM. Atlas of surgical operations. Mac millan Publishing Co. Inc. New York, 1975.
12. Tarazi R, Coutsoftides T, Steiger E. Gastric and duodenal cutaneous fistulas. *World J Surg* 1983; 7: 463-5.
13. Schein M, Decker GAG. Gastrointestinal fistulas associated with large abdominal wall defects. Experience with 43 patients. *Br J Surg* 1990; 77: 97-100.
14. Rose D, Yarborough MF, Canizaro PC. One hundred and fourteen fistulas of the gastrointestinal tract treated with total parenteral nutrition. *Surg Gynecol obstet.* 1986; 163:345.
15. Dardai E, Pirityi S, Nagy L. Parenteral and enteral nutrition and the enterocutaneous treatment. Factors influencing the outcome of treatment. *Acta Chir Hung* 1991; 32: 305-308.
16. Reber HÁ, Roberts C, Way LW, et al. Management of external gastrointestinal fistulas. *Ann Surg* 1978; 188:460-470.
17. Naresse LE, Lucchiari PH, Angelili AYO, Burini RC, Rodrigues MAM, Curi PR, Kobayasi S. Estudo comparativo de anastomoses no intestino delgado de cão: Estudos da força de ruptura, hidroxoprolina tecidual e anatomopatológico. *Acta Cir Bras* 1988; 3:106-112.
18. Petroianu A, Souza sd, Martins SG, Alberti LR, Vasconcelos LS. Influência da vitamina C e da hidrocortisona sobre a tensão anastomótica jejunal em ratos. *Acta Cir Bras* 2000;15:215-219.
19. Forrest L. Current concepts in soft connective tissue wound healing (review). *Br J Surg* 1983; 70: 133-5.
20. Polônio B, Repta JCD, Novo NF, Jiliano Y, Nigro AJT. Anastomoses esôfago-esofágicas cervicais término-terminais por invaginação e com anel biodegradável: estudo comparativo em cães. *Acta Cir Bras* 1996;11:51-57.
21. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Cl North Am* 1997; 77: 509-528.
22. Aidos RD, Magalhães AM, Meneses Filho JF, Barone B, Goldenberg S. Efeitos da diatermia cirúrgica na cicatrização de anastomoses do intestino grosso. Estudo experimental em coelhos. *Acta Cir Bras* 1994;9:190194.
23. Naresse LE, Leite CVS, Rodrigues MAM, Angelili AYO, Minossi JG, Kobayasi S. Efeito da peritonite fecal na cicatrização do cólon distal no rato: avaliação anatomopatológica, estudo da força de ruptura e da hidroxiprolina tecidual. *Acta Cir Bras* 1993;8:48-53.
24. Azevedo JLMC, Goldenberg S, Simões MJ, Stavale JN. Estudo comparativo entre as anastomoses em plano único extramucoso e total, em colo de coelho. *Acta Cir Bras* 1990;5:6-12.
25. Simões JC, Polônio B, Scaeffler Neto C, Pupo CA, Auersvald A, Collaço LM. Aspectos morfológicos da reação tecidual da película celulósica inserida em esplenectomia parcial, hepatectomia parcial e no jejuno. Estudo experimental em cães. *Acta Cir Bras* 1990;5:88-93.
26. Schnaider TB, Lázaro da Silva A, Engelman MFB, Juliano Y, Novo NF, Schnaider GS, Schnaider CS. Estudo morfométrico do efeito do tenoxicam com água bidestilada ou com cloreto de sódio a 0,9% no endotélio venoso em coelhos. *Acta Cir Bras* 2002; 17:122-129.
27. Gospodarowicz D. Biological activities of fibroblast growth factor. *Ann NY Acad Sci* 1991; 638:1-8.

Medeiros AC, Dantas Filho AM, Aires Neto T, Lima FP, Azevedo IM, Alves SG. The basic fibroblast growth factor enhances the healing of duodenal anastomosis in rats. *Acta Cir Bras [online]* 2003 vol 18 suppl 1. Available in www.scielo.br/acb.

ABSTRACT: Objective: Analysis of histopatological alterations, and pressure resistance in duodenal anastomosis treated with basic fibroblast growth factor (FGF-b). **Methods:** Twenty Wistar rats were submitted to a transversal duodenal section and subsequent anastomosis. They were randomly separated into four groups of five rats each: A1 and A2 (experimentals), in which FCFb was applied over the anastomosis; in B1 and B2 (controls), saline was used at the anastomosis site. The rodents were killed with an anesthetic overdose, according to the following protocol: A1, B1 on 5th postoperative day and A2, B2 on the 7th one. A pressure resistance test of the anastomosis was done. The digitalized system Image ProPlus was used in order to analyse the mean density of the histopatological elements of healing duodenal tissues. **Results:** All the rats survived without complications. In the group A1 the intraluminal pressure was 52±14,4 mmHg and in group A2 it was 140±34,8 mmHg. In the group B1 the pressure reached 33,6±15,2 mmHg and in B2 it reached 105±30,3. In group A1 the mean density of histopatological elements was 93±9,3 and in A2 it was 181,8±27,6. In the control groups B1 and B2 the mean densities were 67,6±16,7 and 101±12,9 respectively. The statistical analysis detected a significant difference between the data of the experimental and control groups (p<0,05). **Conclusion:** the topical use of FGFb was able to enhance the resistance of duodenal anastomosis in rats observed and evaluated after five and seven postoperative days. The FCFb enhanced the neovascularization and the mean density of collagen, fibroblasts and inflammatory cells in the healing tissues.

KEYWORDS: Fibroblast growth factor. Healing. Anastomosis. Duodenum. Resistance. Collagen.

Correspondência:

Aldo da Cunha Medeiros

Av. Miguel Alcides Araújo 1889 – 59078-270 Natal-RN