

Avaliação de parâmetros de cicatrização no cólon de ratos diabéticos sem agressão cirúrgica¹

The evaluation of healing parameters in the colon of diabetic rats without surgical injury

Erika Veruska Paiva Ortolan², César Tadeu Spadella³, José Lúcio Martins Machado⁴, Shoití Kobayasi⁵

1. Trabalho realizado no Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.
2. Professora Assistente da Disciplina de Cirurgia Pediátrica, Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina de Botucatu.
3. Professor Adjunto da Disciplina de Gastrocirurgia, Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina de Botucatu.
4. Professor Doutor da Disciplina de Cirurgia Pediátrica, Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina de Botucatu.
5. Professor Titular do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina de Botucatu.

RESUMO

OBJETIVO: Existem poucos estudos na literatura utilizando parâmetros de cicatrização em animais diabéticos antes da agressão cirúrgica e nenhum estudo no colon. Este trabalho teve como objetivo verificar se o diabetes induzido pela aloxana poderia primariamente modificar parâmetros comumente usados para medir a cicatrização de anastomoses do colon de ratos, em animais sem injúria cirúrgica.

MÉTODOS: 180 ratos foram divididos em 2 grupos de animais, um controle e o outro de animais diabéticos. Os animais foram considerados diabéticos se apresentaram glicemia > 200mg/dl e glicose urinária > 3000mg/dl. Após 3 meses, os 2 grupos foram avaliados em 6 momentos de sacrifício quando foram analisados os parâmetros relacionados ao diabetes (glicemia, glicose urinária e insulina plasmática) e à cicatrização (força de ruptura, hidroxiprolina, proteína tecidual total e a relação HOP/PTT).

RESULTADOS: A aloxana 2% causou 42,3% de mortalidade e 72,4% de diabetes grave. Todos os animais no grupo diabético apresentaram glicemia > 300mg/dl, glicose urinária > 3000mg/dl e significativo decréscimo na insulina plasmática. Nem a força de ruptura, nem as dosagens de HOP e PTT mostraram alterações estatisticamente significativas entre os grupos.

CONCLUSÃO: Os achados do nosso estudo sugeriram que o diabetes não pode primariamente alterar parâmetros comumente usados para medir a cicatrização em colon de animais diabéticos antes da injúria cirúrgica.

Descritores: Diabetes mellitus. Experimental. Cicatrização. Cólon.

ABSTRACT

PURPOSE: There are few studies using healing parameters in diabetic animals before the wound, and no studies in the colon. The aim of this study was to verify if alloxan diabetes-induced could primarily change parameters commonly used to measure the small bowel healing in surgical wounded rats, although using animals without any surgical procedure.

METHODS: 180 rats were assigned to in two groups, of non-diabetic control animals, and diabetic animals. The animals were considered diabetics if blood glucose level >200mg/dl and urinary glucose level >3000mg/dl. After 3 months, both groups were evaluated in 6 moments of sacrifice, when were analyzed diabetes (blood and urinary glucose levels and plasmatic insulin) and healing in the colon (breaking strength, hydroxyproline, total tissue protein and the ratio OHP/TTP).

RESULTS: Alloxan 2% caused 42,3% of mortality and 72,4% of severe diabetes. All animals in the diabetic group (G2) presented with blood glucose >300mg/dl and urinary glucose >3000mg/dl and significant decrease in plasmatic insulin. Neither the breaking strength, nor the biochemical dosages (HOP, TTP) showed up any meaningful statistical variation between groups.

CONCLUSION: The findings of our study suggest that diabetes by itself is not able to change healing parameters, before the surgical injury in the colon of rats.

Key words: Experimental diabetes mellitus. Healing. Colon.

Introdução

Apesar de inúmeros avanços no entendimento da fisiopatologia e tratamento do diabetes, esta patologia é ainda hoje considerada um problema de saúde pública, devido à sua alta morbimortalidade. Estimativas prevêem que em 2010 haverá no mundo 239 milhões de diabéticos¹. No Brasil há uma prevalência de 7,6% de pacientes diabéticos, dos quais 50% desconhecem a sua condição de doente, e serão diagnosticados através de uma das complicações da doença¹.

Frente a esta dura realidade, vários estudos experimentais têm sido desenvolvidos na tentativa de melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos do diabetes e suas complicações. No campo cirúrgico, já é bem estabelecido que “os diabéticos cicatrizam mal suas feridas”, e que 50% destes pacientes necessitarão de algum procedimento cirúrgico durante suas vidas².

Apesar de haverem numerosos estudos sobre diabetes e cicatrização^{2,3,4,5,6}, existem poucos estudos usando os mesmos parâmetros de cicatrização antes da agressão cirúrgica, e nenhum trabalho enfocando as alterações em cólon de animais diabéticos antes da incisão e sutura, com o intuito de investigar se as alterações ocorridas nos animais diabéticos são decorrentes de defeito primário do tecido diabético, ou de problemas que ocorreriam após a injúria. O objetivo deste trabalho foi verificar se o diabetes induzido pela aloxana poderia primariamente alterar os parâmetros comumente usados no passado para medir a cicatrização das anastomoses de cólon de animais diabéticos, no período que antecede a agressão cirúrgica.

Métodos

Foram utilizados 180 ratos, Wistar, machos, com peso inicial médio de 250 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Unesp - Campus de Botucatu. Os animais foram divididos, por sorteio, em dois grupos equitativos, chamados de G1 de animais não diabéticos e G2 de animais com diabetes aloxânico não tratados. O diabetes foi induzido com injeção de aloxana 2% (Sigma Chemical Co. – St Louis – USA) usando uma veia da cauda, na dose única de 42mg/kg. Os animais foram considerados diabéticos se atingiam níveis de glicemia >200mg/dl e glicose urinária >3000mg/dl, medidos no primeiro e terceiro mês após a indução, excluindo-se do estudo os animais que não atingiram estes valores.

Após 6 meses de diabetes (G2) ou de controle (G1), ambos os grupos foram divididos em 6 momentos de avaliação e sacrifício com 15 animais em cada momento: 3m, 3m4d, 3m7d, 3m14d, 3m21d, e 4 meses. Em cada um destes 6 períodos foram analisados parâmetros relacionados ao diabetes (glicemia, glicose urinária e insulina plasmática) e à cicatrização (força de ruptura, dosagens de hidroxiprolina, proteína tecidual total e a relação hidroxiprolina/proteína tecidual total, em segmento de cólon, obtido no momento do sacrifício).

Para a coleta de dados metabólicos cada animal foi submetido a esquema padronizado de avaliação, sendo colocados em gaiolas metabólicas individuais durante 24 horas, sendo 12 horas recebendo ração e água ad libitum e 12 horas em jejum, e no final deste período coletados 10 ml de urina para a dosagem de glicose urinária e 1,5 ml de sangue colhidos de veia da cauda para as dosagens de glicemia em mg/dl e insulina plasmática em micro-unidades por ml. Para as dosagens de glicemia e glicose urinária foi usado o método por dosagem enzimática Glicose-E (CELM- Cia Equipadora de Laboratórios Modernos – Barueri – SP). Para as dosagens de insulina foi utilizado o método de radioimunoensaio em fase sólida COAT – A – COAT insulin (Diagnostic Products Corporation – LA – USA)

Os animais foram sacrificados sob anestesia com 30mg/kg de injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (Cristalia Chem Products Ltda – SP), sendo o sangue coletado para as dosagens por punção cardíaca. Antes do sacrifício, em 10 animais de cada momento, uma laparotomia foi feita e obtido um segmento de 3cm de colon distal (aproximadamente 5 cm da deflexão peritoneal) para as medidas da força de ruptura e dosagens de hidroxiprolina (HOP) e proteína tecidual total (PTT).

Para o estudo da força de ruptura, os segmento de colon distal foram imersos em soro fisiológico para retirada de conteúdo fecal e depois deixados por 30 minutos em banho-maria em solução de soro fisiológico com cloridrato de papaverina (250mg/ml). Utilizou-se a Máquina Universal de Ensaio Mecânicos (EMIC Ltda. – Curitiba – PR) que opera em conjunto com um microcomputador sendo utilizado o programa Mtest (mesmo fabricante) versão 1.0.

Após o estudo da força de ruptura, as amostras de tecido foram utilizadas para as dosagens de HOP e PTT. A HOP, um índice de deposição de colágeno tecidual⁸ foi determinada pelo método de Bergman & Loxley⁹, modificada por Angeleli et al¹⁰. A PTT foi quantificada pela metodologia de Lowry et al¹¹.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMB – UNESP

Para a análise dos resultados foi empregada a análise de variância paramétrica quando os dados mostraram aderência à distribuição normal de

probabilidades e não paramétrica quando este requisito não estava presente. Em ambas as situações a análise foi complementada com o teste de Streiner & Norman com nível de significância de 5%.

Resultados

Dos 300 animais injetados com aloxana durante o experimento, 83 (27,3%) não atingiram os parâmetros pré-estabelecidos para diabetes severa, e foram excluídos do estudo. Dos 217 restantes, 127 animais morreram (42,3%) durante os 3 meses de seguimento, e 90 animais permaneceram vivos até o sacrifício.

O grupo controle (G1) mostrou valores normais para espécie e idade de glicemia, glicose urinária e insulina plasmática durante todo o experimento. O grupo diabético (G2) níveis de glicemia e glicose urinária compatíveis com diabetes grave em todos os momentos de avaliação com glicemia >300mg/dl e glicose urinária >3000mg/dl. Este grupo apresentou ainda níveis de insulina plasmática significativamente reduzidos em relação ao G1.

Não houve alterações estatisticamente significativas entre os grupos controle e diabético nos valores das forças de ruptura do colon (Figura 1).

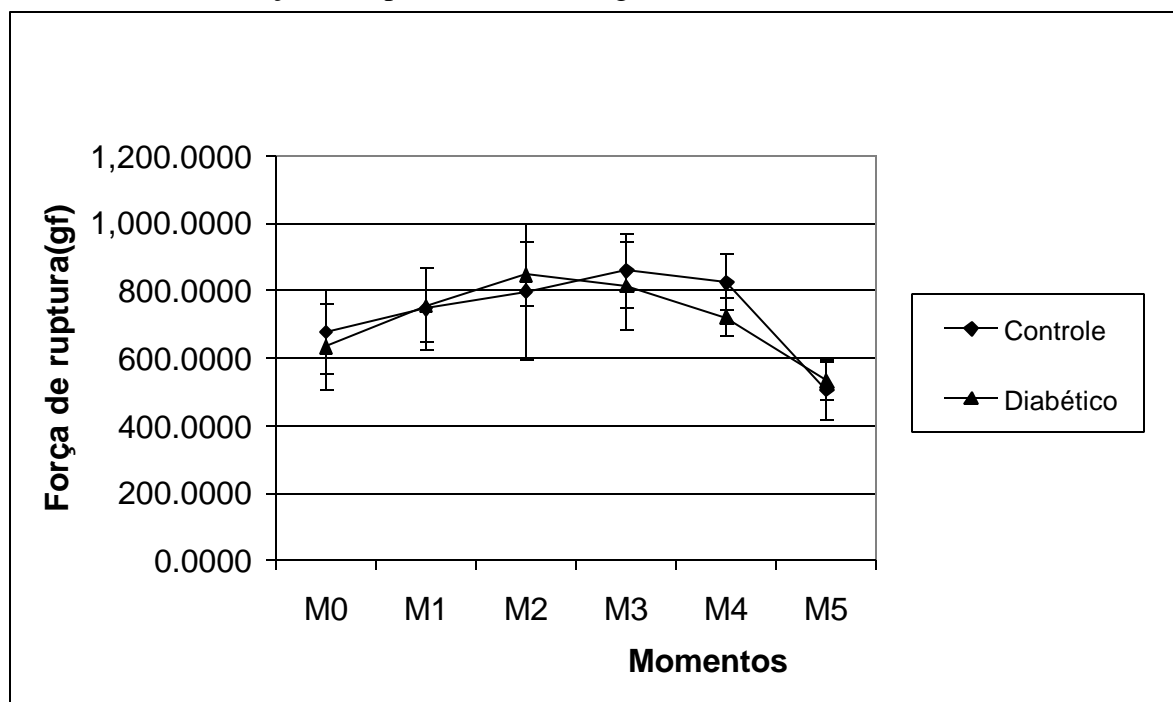


FIGURA 1 - Medianas e desvios-padrão da força de ruptura (gf) no colon nos dois grupos experimentais, nos momentos de avaliação.

À exceção dos momentos M2 e M4, onde os valores foram maiores no grupo normal, não foram registradas diferenças nas dosagens de hidroxiprolina nos demais momentos (Figura 2)

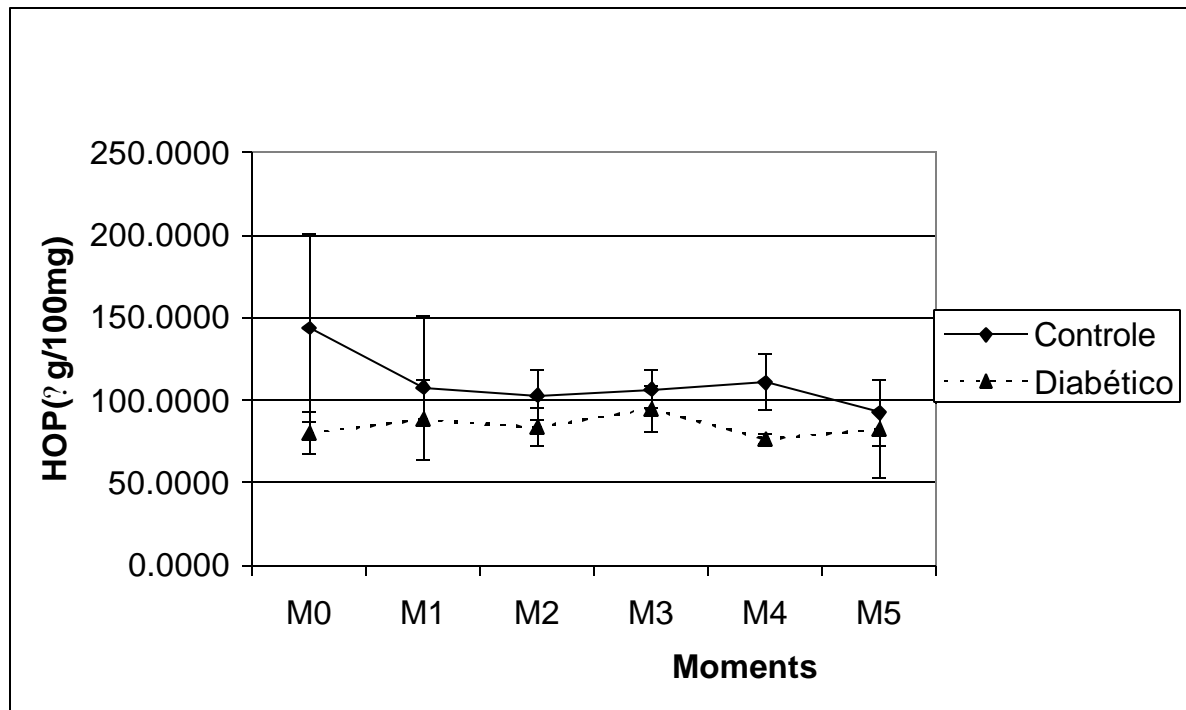


FIGURA 2 - Medianas e desvios-padrão da hidroxiprolina no colon, nos dois grupos experimentais nos momentos de avaliação.

Os valores da proteína tecidual total nos fragmentos de cólon foram significativamente maiores no grupo controle normal em M0, M1 e M2, não apresentando diferenças estatisticamente significativas em M3 e M4 (Figura 3). Contudo, estes valores foram maiores no grupo diabético em M5.

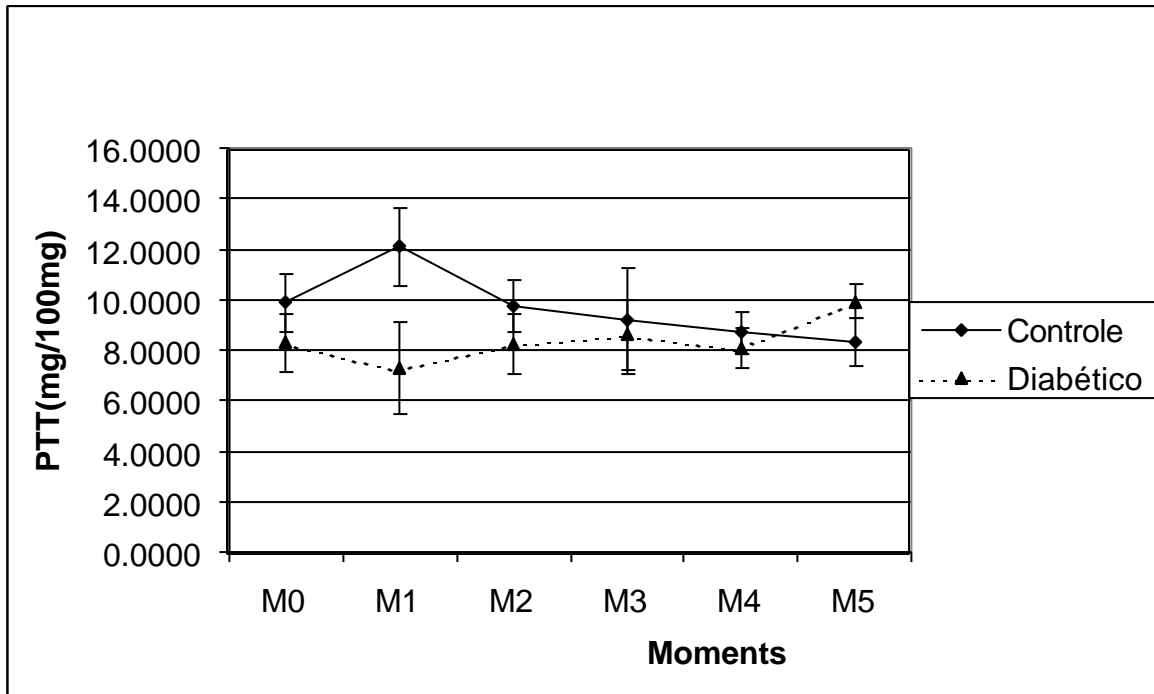


FIGURA 3 - Médias e desvios-padrão da proteína tecidual total no intestino grosso em mg/100mg de tecido fresco, nos dois grupos experimentais, nos momentos de avaliação.

A relação HOP/PTT não mostrou diferenças entre os grupos em nenhum momento de avaliação.

Discussão

Nossos resultados mostraram que o diabetes não é capaz de alterar parâmetros comumente utilizados para medir a cicatrização do cólon, se não há agressão cirúrgica.

O óbito ocorreu em 42,3% dos animais diabéticos, o que não é diferente dos resultados descritos por Lukens¹².

Os altos níveis de glicemia e glicose urinária no grupo diabético estão de acordo com os resultados de outros autores que estudaram ratos diabéticos^{3,13,14,15,16}.

Os níveis de insulina plasmática caíram significativamente após a injeção de aloxana, mantendo-se baixos durante todo o seguimento. Esses achados são compatíveis com a lesão celular beta causada pela aloxana^{3,16,17}.

A força de ruptura consiste na tração das extremidades opostas do segmento estudado, até seu rompimento. Permite-nos avaliar a resistência de uma anastomose intestinal^{18, 19, 20, 21}, ou toda uma extensão intestinal²². O presente trabalho mostrou que não ocorreram diferenças da força de ruptura do colôn entre os grupos controle e diabético. Infelizmente, para efeitos comparativos, não existem estudos mecânicos envolvendo o colôn de animais diabéticos sem agressão cirúrgica. Os trabalhos existentes em animais diabéticos envolvem incisões e suturas na pele^{3,23,24}, no estômago e duodeno²⁵ e em anastomoses intestinais²⁰. Nestes trabalhos, o que se observa é uma constante diminuição da força de ruptura, que guarda relação direta com os baixos níveis de hidroxiprolina. Em nosso estudo, como não houve agressão cirúrgica dos tecidos, a equivalência estatística

entre os grupos controle e diabético da força de ruptura poderia apoiar-se no fato de ter ocorrido pequena alteração nos valores de HOP e na relação HOP/PTT. Há de se considerar ainda que no tecido sem agressões cirúrgicas a taxa de deposição e metabolismo do colágeno é constante, mantendo-se um equilíbrio.

A hidroxiprolina é um aminoácido que no organismo humano é componente estrutural quase que exclusivo do colágeno, encontrando-se em baixas concentrações na elastina^{8,26}, motivo pelo qual a dosagem de HOP tem sido amplamente utilizada como método indireto para quantificar o colágeno tecidual^{3,4,5,25,27}. Não existem trabalhos que tenham estudado as dosagens de HOP em colon de animais diabéticos sem a agressão cirúrgica. A maioria dos trabalhos preocupou-se em estudar o colágeno em incisões na pele²⁷, em cilindros implantados no tecido subcutâneo^{4,6}, em anastomoses intestinais²⁰ e em incisões feitas em vísceras²⁵. Em todos estes estudos, os valores do colágeno dosados em ratos diabéticos foram mais baixos que os grupos controles utilizando diferentes métodos de dosagens.

No nosso estudo, as dosagens de HOP foram estatisticamente maiores no grupo controle nos momentos M2 e M4, mas biologicamente os valores do grupo diabético estiveram sempre abaixo do grupo controle nos demais momentos. Os valores de PTT foram maiores no grupo controle em M0, M1 e M2, sem diferenças em M3, M4 e M5. Isto mostra que pelo menos nos 3 primeiros momentos de avaliação o diabetes exerceu efeito negativo sobre a PTT do colon. No entanto, este efeito negativo, ainda que biologicamente presente, não se manteve nos momentos subseqüentes. Tal fato obriga-nos a levantar algumas hipóteses capazes de explicar estes resultados de HOP e PTT. Primeiramente o fato da quantidade de colágeno presente nos intestinos ser menor do que em outros tecidos estudados, como a cartilagem⁵, que é um tecido composto basicamente por colágeno, o que poderia explicar o fato de pequenas variações da HOP deste tecido pode ser detectada com importância estatística. Outra explicação é que não se pode comparar diferentes métodos de dosagens de HOP^{5, 9,10,24}. Por último, existe a possibilidade de que o método por nós utilizado não tenha sensibilidade suficiente para mensurar pequenas variações do colágeno em animais não operados, visto que até hoje só foi utilizado em experimentos com a presença de agressão cirúrgica, onde a quantidade de colágeno é sabidamente maior, independente da presença do diabetes^{28,29}. Esta última hipótese é reforçada pelo fato de que o tipo de colágeno do animal adulto, sem trauma é do tipo maduro, já presente no sítio do estudo (colon) quando da indução do diabetes com aloxana, diferente do que ocorre na agressão cirúrgica, onde há a exigência de colágeno neoformado.

A relação HOP/PTT permite-nos inferir indiretamente sobre o metabolismo do colágeno, baseado no encontro de frações menores ou maiores, quando comparados a valores obtidos de colon com anastomose, estudo a ser realizado em trabalho posterior. No presente trabalho não houve diferenças entre os grupos na relação HOP/PTT, provavelmente pelos mesmos motivos acima mencionados.

Conclusão

O diabetes, por si só, não foi capaz de provocar primariamente alterações nos parâmetros habitualmente utilizados para medir a cicatrização em fragmentos de colon de ratos.

Referências

1. Brazilian Society of Diabetes: Diagnóstico e Classificação do Diabetes Mellitus e Tratamento do Diabetes Mellitus tipo II. São Paulo, 2000.
2. Rosenberg CS: Wound healing in the patient with diabetes mellitus. *Nurse Clin. North Am.*1990; 25:247-53.
3. Prakash MS, Pandit P, Sharmal L: Studies of wound healing in experimental diabetes. *Indian J. Med. Res.*1973; 61:1200-08.
4. Goodson WH, Hunt TK: Wound healing and the diabetic patient. *Surg Gynecol Obstet*1979; 149:600-12.
5. Spanheimer RG, Umpierrez GE, Stumpf V: Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes* 1988; 37:371-6.
6. Black CT, Hennessey PJ, Ford EG, Andrassy RJ: Protein glycosylation and collagen metabolism in normal and diabetic rats. *J. Surg.Res.*1989; 47:200-06.
7. Witte MB, Kiyama T, Barbul A. Nitric oxid enhances experiemantal wound healing in diabetes.*Br J Surg* 2002; 89:1594-601.
8. Woessner JF Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arc Biochem Biophys* 1961;93:440-7.
9. Bergman I, Loxley R.The determination of hydroxyproline in urine hydrolysates. *Clin Chem. Acta* 1970; 27:347-53.
10. Angelei YO, Burini RC, Oliveira JED: Padronização da metodologia para determinação das frações de hidroxiprolina urinária. *Ver Brás. Patol. Clin.* 1982;18:124-32.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Fau AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951,193:265-8.
12. Lukens FDW: Alloxan diabetes. *Physiol. Rev.*1948; 28:304-30.
13. Lee S, Chandler JG, Krubel R, Nakaji NT, Rosen H, Orloff MJ: Relief of diabetes mellitus by heterotopic transplantation of the whole pancreas in inbred rats.*Surg. Forum* 1971; 22:75-7.
14. Macedo AR, Skivolocki WP, Thompson KR, Bell RHJ, Lee S, Orloff MJ: Morphometric electron microscopy study of the effect of whole pancreas transplantation on alloxan diabetic neuropathy. *Surg. Forum* 1981; 32:1379-80.
15. Macedo AR, Macedo CS, Mercadante MCS, Spadella CT, Breim LC, Machado JLM, Capelleti SM, Roso SLO: Pancreaticoduodenal grat versus islet transplantation on control of diabetic stat in the rats. *Diag. Dis. Sci.*1986; 31:3129-34.
16. Spadella CT: Avaliação funcional do transplante pancreato duodenal no rato diabético: estudo clínico, laboratorial, anatomo-patológico e imunohistoquímico. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Botucatu, 1989.
17. Lercó MM: Caracterização do modelo experimental de diabetes mellitus induzido pela aloxana: estudo clínico, laboratorial e histopatológico do rim, retina, coronária, aorta e artéria ilíaca do rato. Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2000.
18. Munday C, McGinn FP: A comparison of polyglycolic acid and catgut sutures in rat colonic anastomosis. *Br.J.Surg* 1976; 63:611-3.
19. Deveney KE, Way LW: Effect of different absorbable sutures on healing of gastrointestinal anastomosis. *Am. J. Surg* 1977; 133: 86-94.

20. Verhofstadt MHJ, Hendriks TH: Diabetes impairs the development of early strength, but not the accumulation of collagen during intestinal anastomotic healing in the rat. *Br J Surg* 1994; 81:1040-5.
21. Verhofstadt MHJ, Hendriks TH: Complete prevention of impaired anastomotic healing in diabetic rats requires preoperative blood glucose control. *Br J Surg* 1996; 83:1717-21.
22. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B: Healing of experimental colonic anastomosis. The effect of suture technic on collagen concentration in the colonic wall. *Am J Surg* 1978; 135: 333-40.
23. Rosenthal S, Lerner B, Dibiase F, Enquist F: Relation of strength to composition in diabetic wounds. *Surg Gynecol Obstet* 1962;115:437-42.
24. Andreassen TT, Oxlund H: The influence of experimental diabetes and insulin treatments on the biomechanical properties of rat skin incisional wounds. *Acta Chir Scand.* 1987; 53:405-09.
25. Gottrup F, Andreassen TT: Healing of incisional wounds in stomach and duodenum: the influence of experimental diabetes. *J. Surg. Res.* 1981; 31:61-8.
26. Reiser K, McCormick RJ, Rucker RB. Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *Faseb J* 1992; 6:2439-52.
27. Madden JW, Peacock EE. Studies on the biology of collagen during wound healing. *Surgery* 1968;64:288.
28. Naresse LE. Efeito da peritonite fecal na cicatrização do colon distal do rato: avaliação anatomopatológica, estudo da força de ruptura e da hidroxiprolina tecidual [Tese – Doutorado]. Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP; 1990.
29. Minossi JG. Peritonite fecal no rato. Alterações na parede do colon distal: avaliação anatomopatológica, estudo da força de ruptura e do colágeno tecidual [Dissertação – Mestrado]. Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP; 1990.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Irene Spago e Sonia Capeletti pela assistência no laboratório.

Correspondência:

Erika Paiva Ortolan
Faculdade de Medicina de Botucatu – Depto. Cirurgia
Rubiao Jr.
18618-970 Botucatu – SP
Tel: (14) 3812-6269 / 9621-2531
Fax: (14) 3815-7428
epaiva@fmb.unesp.br

Data do recebimento: 05/03/2004

Data da revisão: 23/03/2004

Data da aprovação: 12/04/2004

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: FAPESP

Como citar este artigo:

Ortolan EVP, Spadella CT, Machado JLM, Kobayasi S. Avaliação de parâmetros de cicatrização no colon de ratos diabéticos sem agressão cirúrgica. Acta Cir Bras [serial online] 2004 Maio-Jun;19(3). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>. [também em CD]