

**Rodrigo Severo de Camargo Pereira**

**CICATRIZAÇÃO INTESTINAL EM RATOS  
SUBMETIDOS À INGESTÃO DE ETANOL**

Tese apresentada ao Programa  
de Pós Graduação em Bases  
Gerais da Cirurgia da Faculdade  
de Medicina de Botucatu-  
UNESP, para a obtenção do  
título de Doutor em Cirurgia

Orientador: **Prof. Dr. José Guilherme Minossi**

Botucatu-SP

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
*Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus*

Pereira, Rodrigo Severo de Camargo.

Cicatrização intestinal em ratos submetidos à ingestão de etanol / Rodrigo Severo de Camargo Pereira. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: José Guilherme Minossi

Assunto CAPES: 40602001

1. Alcoolismo - Estudos experimentais 2. Intestino - Cirurgia 3. Saúde pública

CDD 616.861

CDD 614

Palavras chave: Alcoolismo; Cicatrização de feridas; Etanol; Hidroxiprolina; Intestino grosso; Ratos Wistar; Ruptura

# **DEDICATÓRIA**



À minha mãe, Marylene, que com sua força, compreensão, carinho e amor transformou meu sonho em seu e ajudou a tornar tudo isso possível.

Ao meu pai José Severo (*in memoriam*), que apesar de não estar mais presente plantou e ajudou a cultivar a semente da pesquisa em seu filho, tornando seus ensinamentos, palavras e exemplo eternos.

À minha esposa, Daniele por toda compreensão, amor, ternura e felicidade infinita da vida a dois; sem seu exemplo e estímulo esta obra talvez não tivesse início.

# **AGRADECIMENTOS**

## **AGRADECIMENTOS**

- Aos meus pais por tudo que sou.
- À minha esposa, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniele Cristina Cataneo pela grande colaboração na confecção desse trabalho, além de seu infindável carinho e paciência nas horas difíceis, sem seu apoio esta obra com certeza não seria possível.
- Ao meu sogro, Professor Dr. Antonio José Maria Cataneo, Titular do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, pela inestimável ajuda na redação da tese e úteis conselhos.
- À minha sogra, Marlene Lucas Cataneo pela tranqüilidade e paz nos momentos que mais precisei.
- Ao meu orientador, Prof. Dr. José Guilherme Minossi, Assistente do Departamento de Cirurgia e Ortopedia pela tranqüilidade e ajuda na redação, além do enorme tempo dispensado nas correções.
- Ao Prof. Dr. Shoiti Kobayasi, Titular do Departamento de Cirurgia e Ortopedia pela idéia inicial do trabalho.
- Aos animais que cederam sua vida em prol da pesquisa científica.
- Aos coordenadores do curso de Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.
- À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lídia Raquel de Carvalho, Assistente do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências, pela orientação estatística e disposição em solucionar qualquer dúvida.
- À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Marchesan Rodrigues, Professora Titular do Departamento de Patologia, pela grande ajuda no estudo histopatológico.
- À funcionária Maria Cecília S. Mercadante, do Laboratório de Cirurgia Experimental pela grande ajuda nos procedimentos cirúrgicos.
- Ao funcionário Luiz Carlos E. Bardella do Laboratório de Cirurgia Experimental pela colaboração na realização da força de ruptura.
- À funcionária Luzia Ferrari Gouveia do Laboratório de Cirurgia Experimental pela ajuda na preparação das lâminas.

- Aos funcionários Danilo Chaguri, Danilo Cesar Borsatto, Arlindo Gabriel e Ednelson Bianchi, do Laboratório de Cirurgia Experimental pela ajuda na pesagem, preparação e administração do álcool aos animais.
- Às funcionárias Elenize Jamas Pereira e Fernanda Fontes do Laboratório Experimental de Clínica Médica pela inestimável ajuda na dosagem da hidroxiprolina.
- À bibliotecária Enilze de Souza Nogueira Volpato, Diretora Técnica da Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação, pelo auxílio na revisão das referências bibliográficas.
- Aos funcionários Marcos Eduardo B. Aloise, Carlos Luis Miguel, Solange Aparecida A. Clara do Departamento de Cirurgia e Ortopedia pela ajuda na diagramação.
- Aos funcionários Douglas J.J. Pinto, Marinede Ribeiro Jorge, Simone B.C. Camargo e Luis Carlos Lucas Jr., pela ajuda e resolução de dúvidas na redação da tese.
- A todos que de alguma forma contribuíram em minha formação.

**ΕΠΙΓΡΑΦΕ**

"Sempre que você pensa  
Que não consegue ir adiante,  
De onde menos espera  
Surge uma luz no caminho.

Essa luz tão pequenina  
Vem renovar suas forças  
E trazer-lhe energia  
Para dar um passo a mais."

\*Autor desconhecido.  
Retirado do livro "Roda da Vida" -  
Elizabeth Kubler-Ross, M.D.

**RESUMO**

## **RESUMO**

Pereira, RSC. Cicatrização intestinal em ratos submetidos à ingestão de etanol. [Tese de Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia] Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP-Universidade Estadual Paulista; 2009.

**Introdução:** O consumo abusivo de álcool é considerado um grave problema de saúde pública mundial. O uso excessivo e indiscriminado de bebidas alcoólicas é responsável por mais de 60 agravos a saúde, como câncer de esôfago, estômago e fígado, doenças cardiovasculares, cirrose hepática, pancreatite crônica, úlcera péptica e em muitas dessas patologias pode-se necessitar de intervenções no trato digestivo. Na problemática exposta sobre o alcoolismo há uma série de alterações que podem repercutir nas anastomoses do trato gastrointestinal, como: desnutrição, lesões hepáticas, além do efeito tóxico direto do etanol sobre a mucosa gastrointestinal.

**Objetivo:** Estudar o efeito do alcoolismo no processo de cicatrização intestinal e a evolução no pós-operatório de ratos submetidos à ingestão de etanol.

**Método:** Foram utilizados 160 ratos da linhagem Wistar. Esses animais foram divididos em dois grupos, controle e tratado, sendo que o controle recebeu água e ração em livre demanda e o tratado solução etílica a 30% e ração livre demanda. Após 180 dias foi realizada colotomia cinco centímetros acima da deflexão peritoneal e anastomose em todos os animais. Após o procedimento os grupos foram divididos em quatro subgrupos de 20 ratos para estudo nos seguintes momentos: 4<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> pós-operatórios. Os parâmetros analisados foram: força de ruptura longitudinal, dosagem de hidroxiprolina tecidual, complicações pós-operatórias e estudo histopatológico.

**Resultados:** O ganho de peso foi superior no grupo controle quando comparado com o grupo tratado ( $p < 0,05$ ). Agrupados todos os subgrupos, a força de ruptura foi significativamente maior no grupo controle que no grupo tratado ( $p < 0,05$ ). A dosagem de hidroxiprolina não apresentou diferença entre os grupos em cada momento estudado. A análise histopatológica não demonstrou alterações significativas entre os grupos. Houve cinco infecções de sítio cirúrgico no grupo tratado, enquanto o controle apresentou apenas duas ( $p > 0,05$ ). No grupo tratado ocorreu nove fístulas, enquanto no controle apenas duas ( $p < 0,05$ ). Houve três óbitos no controle, enquanto nos tratados sete ( $p > 0,05$ ).

**Conclusão:** Os ratos submetidos à ingestão crônica de álcool sofrem um processo de subnutrição revelado pelo significativo ganho de peso menor que o grupo controle. Apresentam a cicatrização intestinal prejudicada revelada pela força de ruptura longitudinal significativamente menor no grupo tratado. As complicações pós-operatórias foram maiores nos ratos tratados.

**PALAVRAS CHAVE:** cicatrização de feridas, intestino grosso, alcoolismo, etanol, ratos Wistar, ruptura, hidroxiprolina.



# **ABSTRACT**

## **ABSTRACT**

Pereira, RSC. Intestinal cicatrization in rats submitted to ethanol ingestion. [Doctoral Dissertation in General Bases of Surgery] Botucatu: School of Medicine, UNESP-São Paulo State University; 2009.

**Introduction:** Alcohol abuse is considered to be a serious public-health problem worldwide. The excessive and indiscriminate use of alcoholic beverages is responsible for more than 60 health medical problems, such as esophageal, stomach and liver cancer, cardiovascular diseases, hepatic cirrhosis, chronic pancreatitis and peptic ulcers. Many of these pathologies may require interventions in the digestive tract. The problems stemming from alcoholism include a number of alterations that may lead to anastomosis of the gastrointestinal tract, such as malnutrition and hepatic lesions, in addition to the direct toxic effect of ethanol on the gastrointestinal mucosa.

**Objective:** To study the effect of alcoholism on the process of intestinal healing and the post-operative development of rats submitted to ethanol ingestion.

**Method:** One hundred and sixty Wistar rats were used. These animals were divided into two groups, namely control and treated. The control group received water and animal feed *ad libitum*, and the treated group was given 30% ethyl alcohol solution and feed *ad libitum*. One hundred and eighty days later, colotomy 5 cm above peritoneal deflection and anastomosis were performed in all animals. After the procedure, the groups were divided into 4 sub-groups of 20 rats for study at the following post-operative moments: 4<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> days. The parameters analyzed were rupture strength, tissue hydroxyproline dosage, post-operative complications and histopathology.

**Results:** Weight gain was greater in the control group as compared to that in the treated group ( $p < 0.05$ ). By grouping all the sub-groups, it was observed that rupture strength was significantly greater in the control group than in the treated group ( $p < 0,05$ ). Hydroxyproline dosage did not show any differences between the groups at each studied moment. Histopathological analysis did not show significant alterations between the groups. There were five surgical-site infections in the treated group whereas the control group showed only two ( $p > 0,05$ ). In the treated group, nine fistulas were observed whilst only two were noted for the control group ( $p < 0,05$ ). Three deaths occurred in the control group, and seven occurred in the treated group ( $p > 0,05$ ).

**Conclusion:** The rats submitted to chronic ethanol ingestion suffered a malnutrition process revealed by the significantly smaller weight gain as compared to that in the control group. They also exhibited impaired intestinal healing as shown by significantly weaker longitudinal rupture strength as compared to that in the control group. Post-operative complications were more frequent in the treated rats.

**KEY WORDS:** wound healing, large intestine, alcoholism, ethanol, Wistar rats, rupture, hydroxyproline.

# **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Incisão mediana de 5 cm.....	35
<b>Figura 2.</b> Identificação do cólon esquerdo.....	36
<b>Figura 3.</b> Colotomia 5 cm acima da deflexão peritoneal.....	36
<b>Figura 4.</b> Aspecto final da sutura anterior.....	37
<b>Figura 5.</b> Eversão da sutura da parede anterior.....	37
<b>Figura 6.</b> Aspecto final da anastomose.....	38
<b>Figura 7.</b> Rafia do peritoneo, musculatura e aponeurose com pontos separados.....	39
<b>Figura 8.</b> Rafia da pele com pontos separados.....	39
<b>Figura 9.</b> Sacrifício. Anastomose <i>in situ</i> (entre as pinças) com aderência de delgado.....	40
<b>Figura 10.</b> Anastomose após ressecção.....	41
<b>Figura 11.</b> Aparelho utilizado para medida da força de ruptura...	42
<b>Figura 12.</b> Anastomose durante ensaio da força de ruptura.....	43
<b>Figura 13.</b> Local ressecado para dosagem de hidroxiprolina.....	44
<b>Figura 14.</b> Média e desvio padrão das forças de ruptura em cada momento ( $p>0,05$ ), e média geral em cada grupo em gramas força ( $p=0,03$ ).....	50
<b>Figura 15.</b> Dosagem de hidroxiprolina: Média e desvio padrão em cada momento.....	51
<b>Figura 16A e B.</b> 4 <sup>o</sup> PO. Regeneração incipiente da mucosa e reação inflamatória discreta no assoalho da ferida (Masson 400x).....	53
<b>Figura 17A e B.</b> 7 <sup>o</sup> PO. Regeneração parcial da mucosa com abundante tecido de granulação e proliferação de fibras colágenas (Hematoxilina-eosina 400x).....	54
<b>Figura 18A e B.</b> 14 <sup>o</sup> PO. Regeneração parcial da mucosa com maior densidade de fibras colágenas (Masson 400x).....	55
<b>Figura 19A e B.</b> 21 <sup>o</sup> PO. Regeneração complexa da mucosa com criptas bem definidas e maior densidade de fibras colágenas no assoalho da ferida (Masson 400x).....	56

# **LISTA DE TABELAS**

### *LISTA DE TABELAS*

<b>Tabela 1</b> – Peso mínimo, máximo, média e desvio padrão, em gramas, dos animais no momento da admissão.....	48
<b>Tabela 2</b> – Peso mínimo, máximo, média e desvio padrão, em gramas, dos animais no dia da cirurgia.....	48
<b>Tabela 3</b> - Média e desvio padrão dos pesos dos animais em cada grupo e em cada momento, média geral de cada grupo em todos os momentos no dia da cirurgia e a interpretação estatística.....	49
<b>Tabela 4</b> – Distribuição de frequências das complicações segundo o grupo e estatística.....	57

# **LISTA DE ABREVIATURAS**

## LISTA DE ABREVIATURAS

**°C**- graus Celsius

**µg**- microgramas

**µl**- microlitros

**dl**-decilitro

**DP**- desvio padrão

**GC**- grupo controle

**gf**- gramas força

**GT**- grupo tratado

**HCl**- ácido clorídrico

**kg**- quilograma

**KN**- quilo Newton

**l**-litros

**mg**- miligramas

**min**- minutos

**ml**- mililitros

**mm**- milímetros

**N**- Newton



# SUMÁRIO

## SUMÁRIO

**Resumo**

**Abstract**

**Lista de ilustrações**

**Lista de tabelas**

**Lista de abreviaturas**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>31</b>
<b>3. MÉTODO.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1. Animais Utilizados.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2 Ambiente de Experimentação.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3 Delineamento Experimental.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4 Momentos de Avaliação.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5 Sequência das Etapas Experimentais.....</b>	<b>34</b>
3.5.1 <b>Estudo dos pesos animais.....</b>	<b>34</b>
3.5.2 <b>Preparo da solução de etanol.....</b>	<b>34</b>
3.5.3 <b>Procedimento cirúrgico.....</b>	<b>35</b>
3.5.4 <b>Processamento do material.....</b>	<b>40</b>
3.5.5 <b>Estudo da força de ruptura.....</b>	<b>41</b>
3.5.6 <b>Estudo histopatológico.....</b>	<b>43</b>
3.5.6.1 <b>Regeneração da mucosa.....</b>	<b>44</b>
3.5.6.2 <b>Reação inflamatória.....</b>	<b>44</b>
3.5.6.3 <b>Tecido de granulação.....</b>	<b>44</b>
3.5.6.4 <b>Colagenogênese.....</b>	<b>44</b>
3.5.7 <b>Dosagens bioquímicas.....</b>	<b>44</b>
3.5.8 <b>Estudo das complicações pós-operatórias.....</b>	<b>45</b>
<b>3.6 Análise estatística.....</b>	<b>46</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1 Peso dos Animais.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2 Força de Ruptura.....</b>	<b>49</b>
<b>4.3 Dosagem de Hidroxiprolina.....</b>	<b>50</b>
<b>4.4 Análise Histopatológica.....</b>	<b>51</b>

<b>4.5 Complicações Pós-Operatórias.....</b>	<b>57</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>5.1 Método.....</b>	<b>59</b>
<b>5.2 Peso dos Animais e Déficit Nutricional.....</b>	<b>61</b>
<b>5.3 Força de Ruptura e Cicatrização Intestinal.....</b>	<b>62</b>
<b>5.4 Dosagem de Hidroxiprolina e Cicatrização Intestinal....</b>	<b>63</b>
<b>5.5 Histopatológico.....</b>	<b>65</b>
<b>5.6 Complicações pós-operatórias.....</b>	<b>65</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>8. APÊNDICE.....</b>	<b>89</b>

# **INTRODUÇÃO**

## **1. INTRODUÇÃO**

O consumo abusivo de álcool é considerado um grave problema de saúde pública. Um levantamento realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) concluiu que o álcool é responsável por 3,2% da mortalidade mundial (MELONI & LARANJEIRA, 2004). Nos Estados Unidos, o alcoolismo é a terceira principal causa de mortalidade evitável (FRANK e col, 2004). Na Espanha, um estudo constatou que aproximadamente 10% das internações de um hospital terciário são em decorrência de complicações orgânicas devido ao consumo exagerado de bebidas alcoólicas (LÓPEZ e col, 2001). No Brasil, país emergente, o cenário parece ser ainda pior, uma vez que o consumo abusivo de álcool está relacionado a mais de 10% dos problemas de saúde (MELONI & LARANJEIRA, 2004). Pesquisa multicêntrica brasileira englobando 107 cidades com mais de 200 mil habitantes constatou prevalência de alcoolismo em 11,2% da população estudada (CARLINI e col, 2002). Outro estudo nacional realizado na zona urbana, cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, incluindo 2177 indivíduos adultos constatou prevalência de 14,3% de consumo alcoólico abusivo com relação inversamente proporcional à classe social (COSTA e col, 2004).

Um levantamento britânico sobre o custo social gerado pelo hábito de beber em excesso apresentou gasto indireto de 18 milhões de libras ao ano com os custos sociais e de saúde, além da perda de produtividade e aumento da criminalidade (LEONTARDI, 2003).

O consumo de bebidas alcoólicas vem se alastrando muito rapidamente facilitado pelo seu baixo custo e fácil acesso a todas as classes sociais (MORAES e col, 2006). No Brasil, em levantamento realizado entre os anos de 1970 e 1996, estimou-se um acréscimo de aproximadamente 75% neste consumo (CARLINI-MARLATT, 2001) resultando em um custo de R\$310 milhões, entre os anos de 1995 e 1997, decorrentes de internações por consumo de álcool ou outras

drogas (SENAD, 2003). Um estudo realizado pela Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP) apontou o alcoolismo, quando comparado a outros problemas de saúde, como responsável por gerar três vezes mais licenças médicas, aumentar cinco e oito vezes as chances de acidentes de trabalho e a utilização de diárias hospitalares, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Devido a seu fácil acesso, o consumo de álcool na adolescência vem aumentando progressivamente. Pesquisas nacionais e internacionais apontam que 60 a 90% dos estudantes ao final do segundo grau já ingeriram algum tipo de bebida alcoólica (CARLINI-COTRIM e col, 2000; SCHMID e col, 2003; GALDUROZ e col, 2004; HIBELL e col, 2004), sendo que a data da primeira ingestão ocorre entre 14 e 15 anos (COLEMAN & CATER, 2004). DEWIT e col (2000) analisaram 5856 indivíduos com antecedentes de uso de álcool e constataram uma taxa de aproximadamente 14% de dependência em indivíduos que iniciaram o consumo com menos de 14 anos de idade e somente 2% em pessoas cuja primeira ingestão ocorreu acima dos 19 anos, fato este em linha com estudo nacional conduzido por VIEIRA e col (2007).

Uma pesquisa nacional dosou a alcoolemia em vítimas fatais por causas externas e constatou positividade em 48,3% das amostras colhidas (CARLINI-COTRIM & CHASIN, 2000). Outra pesquisa analisando a dosagem de alcoolemia em vítimas de causas externas admitidas em um pronto socorro de referência na cidade de São Paulo constatou positividade de 28,9% sendo 24,4% com concentrações superiores a 1,0g/l (GAZAL-CARVALHO e col, 2002). Um estudo austríaco constatou que o álcool é a droga mais comum relacionada aos traumas automobilísticos e o risco de acidentes é mais alto com concentrações sanguíneas acima de 0,8g/l (KURZTHALER e col, 2003). Nos Estados Unidos, entre todos os acidentes automobilísticos associados ao consumo de álcool, 4% resultaram em óbito e 42% em algum tipo de lesão, enquanto nas

colisões não relacionadas à ingestão dessa bebida 0,6% resultaram em morte e 31% em algum tipo de ferimento (HINGSON & WINTER, 2003). O consumo excessivo de álcool é o responsável por 50% dos acidentes fatais de trânsito, 50% dos homicídios, 30% dos estupros, 25% dos suicídios e 62% dos casos de abuso de menores (FORTES & CARDO, 1991).

Além dos malefícios causados pela ingestão etílica em grandes proporções, o consumo de álcool tem relação direta com o tabagismo, aumentando ainda mais sua morbidade (GRANT, 1998; GLANZ e col, 2002).

O uso abusivo e indiscriminado de bebidas alcoólicas é responsável por mais de 60 agravos à saúde como: câncer de esôfago, estômago e fígado, doenças cardiovasculares, cirrose hepática, pancreatite crônica, úlcera péptica, além de traumas de todas as espécies (SINGLE e col, 1999; GUTJAHR e col, 2001; RIDOLFO & STEVENSON, 2001) e em muitas dessas patologias pode haver a necessidade de intervenções no trato digestivo.

Estudo prospectivo desenhado por MURRAY e col constatou que o consumo desmedido de álcool aumenta a chance de doença isquêmica do coração (2002). Metanálise confeccionada por BAGNARDI e col, em 2001, demonstrou que a ingestão média de 25g de álcool ao dia, independente do tipo de bebida, está relacionada ao aumento significativo de câncer nos seguintes sítios: cavidade oral, laringe, faringe, esôfago, estômago, cólon e reto, fígado e mama (BAGNARDI e col, 2001a; BAGNARDI e col, 2001b) e há uma projeção de redução da expectativa de vida em cinco anos devido ao consumo excessivo de bebidas alcoólicas (MATHERS e col, 2001).

O alcoolismo pode ser causa tanto de desnutrição primária pelo fato do etilista usar as calorias provenientes do etanol para seu metabolismo basal, como secundária, devido à má absorção de nutrientes desencadeada, tanto pela agressão direta às células intestinais quanto pela pancreatite crônica. A deficiência de ingestão

associada à má absorção pode resultar em anemia crônica, deficiência de micronutrientes, hipovitaminoses e imunossupressão (MAIO e col, 2000). Segundo FORTES & CARDO (1991), 29 a 50% dos alcoolistas têm algum tipo de carência nutricional.

O trato gastrointestinal é o primeiro segmento corpóreo a entrar em contato com o etanol sendo exposto a concentrações muitas vezes maiores que os outros tecidos (BRONCHAL e col, 2008). A ingestão crônica de etanol altera a histologia intestinal, com diminuição dos vilos, aumento da permeabilidade microvascular (ESTRADA e col, 1996) e dos processos de regeneração celular com possibilidade de carcinogênese (PRONKO e col, 2002).

Nosso grupo de pesquisa vem estudando a cicatrização intestinal em condições clínicas tidas como deletérias na sua evolução tais como: desnutrição, infecção peritoneal, uso de anti-inflamatórios não hormonais e diabetes (NARESSE, 1990; LEITE, 1991; VERDERESE, 1993; LOPES, 1995; MINOSSI, 1995, ORTOLAN e col, 2008). Os estudos anteriores demonstraram um retardo na cicatrização com aumento do risco de deiscência no pós-operatório. SALVI, em 1999, estudou as alterações biomecânicas, sem anastomose, na parede intestinal em ratos submetidos à ingestão de etanol concluindo que há uma diminuição significativa da resistência mecânica da parede do cólon distal e ílio terminal, ocorrendo também promoção de infiltrado linfoplasmocitário com dilatação dos vasos linfáticos na lâmina própria, além de uma diminuição na altura das vilosidades do íleo terminal.

Apesar dos recentes avanços das técnicas cirúrgicas, cuidados de terapia intensiva e antibioticoterapia, as fístulas anastomóticas continuam a preocupar cirurgiões e pacientes. Nos Estados Unidos, em 2003, ocorreram aproximadamente cinco milhões de cirurgias do aparelho digestivo (NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS, 2003), com estimativa de 10 a 20% de fístulas anastomóticas (VIGNALI e col, 1997; ROBSON e col, 2001).



A cicatrização intestinal é uma série de eventos consecutivos cuidadosamente regulados a fim de se restabelecer a barreira imune e reparar o tecido lesado. Este processo é dividido didaticamente em três fases distintas e sobrepostas: inflamatória, proliferativa e de remodelação (THOMPSON e col, 2006). A falência ou atraso em uma ou mais dessas etapas pode levar à deiscência da anastomose.

A fase inflamatória é essencial ao processo de reparação tecidual e é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia celular e liberação local de citocinas e fatores de crescimento (WITTE & BARBUL, 1997). Nesta fase, ocorre sangramento causado pelo trauma com a formação de um coágulo, seguido por um afluxo de células inflamatórias. Os neutrófilos são as primeiras células a migrar para o tecido lesado, sendo responsáveis pela fagocitose dos debrís e bactérias, síntese e liberação de diversos fatores de crescimento teciduais. Após dois a três dias, há um predomínio de macrófagos e sua ativação é fundamental para o debridamento da lesão, síntese de matriz e angiogênese (WITTE & BARBUL, 1997). Os macrófagos sintetizam diversos fatores de crescimento tecidual e são absolutamente críticos ao processo de cicatrização tecidual (THOMPSON e col, 2006). A presença do tecido de granulação marca o início da fase inflamatória (THOMPSON e col, 2006). A redução na resposta inflamatória do indivíduo afeta todo o processo de cicatrização e isto pode ocorrer pelo efeito direto do alcoolismo como também pela subnutrição que o mesmo provoca.

A fase proliferativa tem início com a chegada dos fibroblastos. Essas células migram para o sítio da lesão a partir dos tecidos adjacentes e junto com as células musculares lisas, são responsáveis pela produção do colágeno que é a estrutura fundamental para o processo de cicatrização. A angiogênese ocorre nesse período para permitir uma boa oxigenação e o suprimento de nutrientes. Distúrbios na produção de colágeno levam a uma redução

na força da anastomose podendo contribuir para um aumento do índice de fístulas (MARTENS & HENDRIKS, 1991). Estudo realizado comparando as diferenças entre a produção de colágeno entre o íleo terminal e cólon distal, durante o processo de reparação, constatou que sua produção é mais precoce e intensa no íleo terminal (MARTENS & HENDRIKS, 1991).

Na fase de remodelamento, ocorre a reestruturação desses novos tecidos com redução no número de macrófagos e fibroblastos, aumento da espessura das fibras colágenas, além da redução do colágeno tipo III.

Diversos fatores podem retardar o processo de cicatrização intestinal e favorecer a deiscência de anastomoses como: técnica cirúrgica inadequada, fios de sutura utilizados, desnutrição, anemia, diabetes, irradiação, choque hipovolêmico, imunossupressão, infecção e transfusões sanguíneas. A deiscência de anastomose aumenta os custos hospitalares e a morbimortalidade cirúrgica.

Os prováveis mecanismos envolvidos no retardo da cicatrização estariam relacionados à diminuição da síntese e ao aumento da lise colagênica, além de uma regeneração celular retardada. Essas alterações levam a diminuição da resistência mecânica da anastomose. O colágeno é responsável pela resistência de todos os tecidos e pela força e integridade dos locais em regeneração. A cicatrização depende do tipo e da quantidade das fibras colágenas (PEREZ e col, 2005). O colágeno existente na parede intestinal sofre constantes alterações por mecanismo de síntese e lise, sendo que a integridade da camada submucosa é mantida pelo equilíbrio entre esses processos (JIBORN e col, 1980).

A parede do intestino grosso, à semelhança do restante do trato gastrointestinal, com exceção do esôfago, é constituída basicamente pelas camadas: serosa, muscular, submucosa e mucosa. A submucosa, constituída de fibras elásticas e colágenas, é a camada de maior resistência mecânica da parede intestinal e a responsável

pela manutenção da integridade da sutura no pós-operatório precoce (HALSTED, 1887).

No caso específico da desnutrição, comum nos alcoolistas, a falta de nutrientes necessários para a síntese colagênica é o principal fator para a diminuição do colágeno tecidual e pela baixa resistência mecânica das anastomoses (MINOSSI, 1995). Apesar dessa situação, a cicatrização ocorre pela mobilização de proteínas de outros órgãos, já que esta é "considerada" prioritária para a sobrevivência do animal (LEITE, 1991).

Na problemática exposta sobre o alcoolismo há uma série de alterações que podem repercutir nas anastomoses do trato gastrointestinal como: desnutrição, lesões hepáticas, além do efeito tóxico direto do etanol sobre a mucosa gastrointestinal. Por essas razões, a presente pesquisa pretende analisar o comportamento da cicatrização intestinal em ratos submetidos à ingestão de etanol.

# **OBJETIVO**

## **2. OBJETIVO**

Estudar o efeito do alcoolismo no processo de cicatrização intestinal e a evolução no pós-operatório de ratos submetidos à ingestão de etanol.

## **MÉTODOS**

### **3. MÉTODO**

#### **3.1 Animais Utilizados**

Foram utilizados 160 ratos da linhagem Wistar, adultos de peso aproximado entre 180 e 200 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista-UNESP.

#### **3.2 Ambiente de Experimentação**

Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, em sala fechada, com temperatura de 22<sup>o</sup> C controlada por ar condicionado e luz artificial por períodos de 12 horas. Os animais foram alojados em gaiolas de poliuretano com cinco ratos em cada, recebendo ração comercial e livre acesso à água. A alimentação foi suspensa 12 horas antes do procedimento cirúrgico.

#### **3.3 Delineamento Experimental**

Participaram do experimento 160 ratos que após um período de adaptação de sete dias no Biotério de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, foram distribuídos por sorteio, segundo a tabela dos números casuais (DIXON & MASSEY JUNIOR, 1969) em dois grupos como se segue:

**GRUPO CONTROLE (GC):** constituído de 80 animais que receberam ração comercial e água (livre demanda) por 180 dias, submetidos após esse período à anastomose do cólon distal. Este grupo foi dividido em quatro subgrupos de 20 ratos cada, com necropsia em 4, 7, 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico.

**GRUPO TRATADO (GT):** constituído de 80 animais que receberam etanol a 30% e ração por 180 dias, submetidos após esse período à anastomose de cólon distal. Este grupo foi dividido em

quatro subgrupos de 20 ratos cada, com necropsia em 4, 7, 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico.

Vinte animais de cada grupo, cinco de cada subgrupo, foram alocados para estudo histopatológico e os outros 60 foram alocados para os estudos das variáveis força de ruptura, dosagem de hidroxiprolina, complicações pós-operatórias e peso, sendo que esses parâmetros foram analisados em 15 animais em cada momento. Os óbitos pré-operatórios foram repostos.

### **3.4 Momentos de Avaliação**

Em cada grupo, os parâmetros foram analisados em quatro momentos de avaliação, de acordo com o dia de sacrifício:

- M1:** parâmetros obtidos no 4<sup>o</sup> dia de pós-operatório;
- M2:** parâmetros obtidos no 7<sup>o</sup> dia de pós-operatório;
- M3:** parâmetros obtidos no 14<sup>o</sup> dia de pós-operatório;
- M4:** parâmetros obtidos no 21<sup>o</sup> dia de pós-operatório.

### **3.5 Sequência das Etapas Experimentais**

#### **3.5.1 Estudo do peso dos animais**

Os animais foram pesados em balança modelo Mark 8000, capacidade 8000 gramas (Bel Brasil) na admissão no biotério e imediatamente antes do procedimento cirúrgico.

#### **3.5.2 Preparo da solução de etanol**

Na primeira semana foi oferecido etanol diluído a 10% com água destilada; na segunda semana a diluição do etanol passou para 20% e a partir da terceira semana, o etanol foi diluído a 30% e administrado até completar 180 dias. O etanol foi diluído utilizando-se alcoômetro de Gay-Lusac.



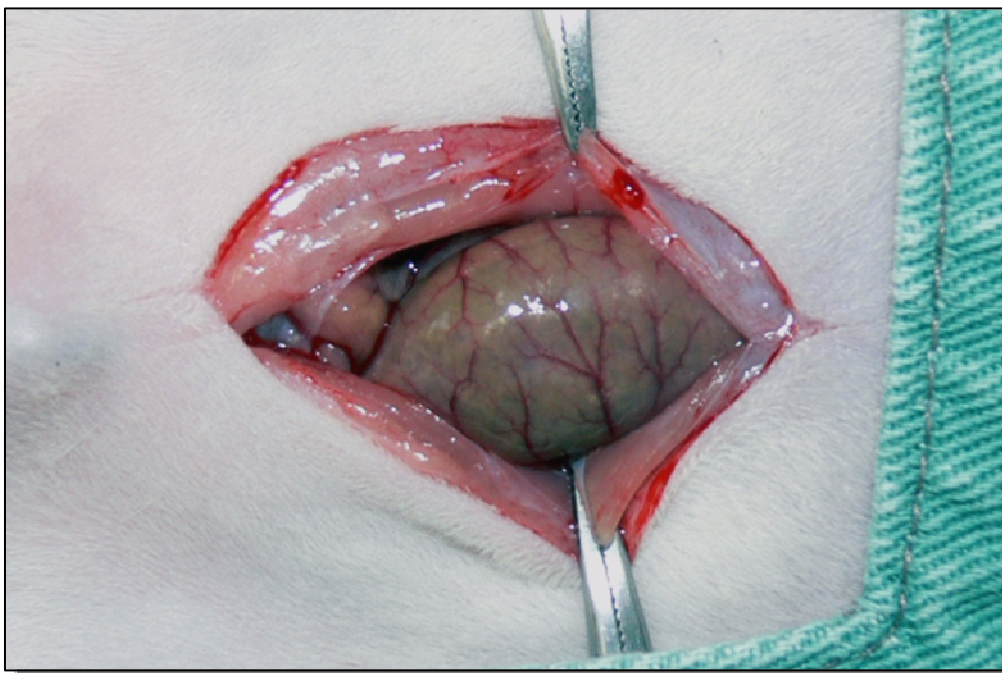
No grupo tratado, durante todo período foi oferecido etanol nas diluições supracitadas e ração comercial. A água foi suspensa desde o início da introdução do etanol.

No grupo controle foi oferecido água e ração comercial durante todo o período de 180 dias.

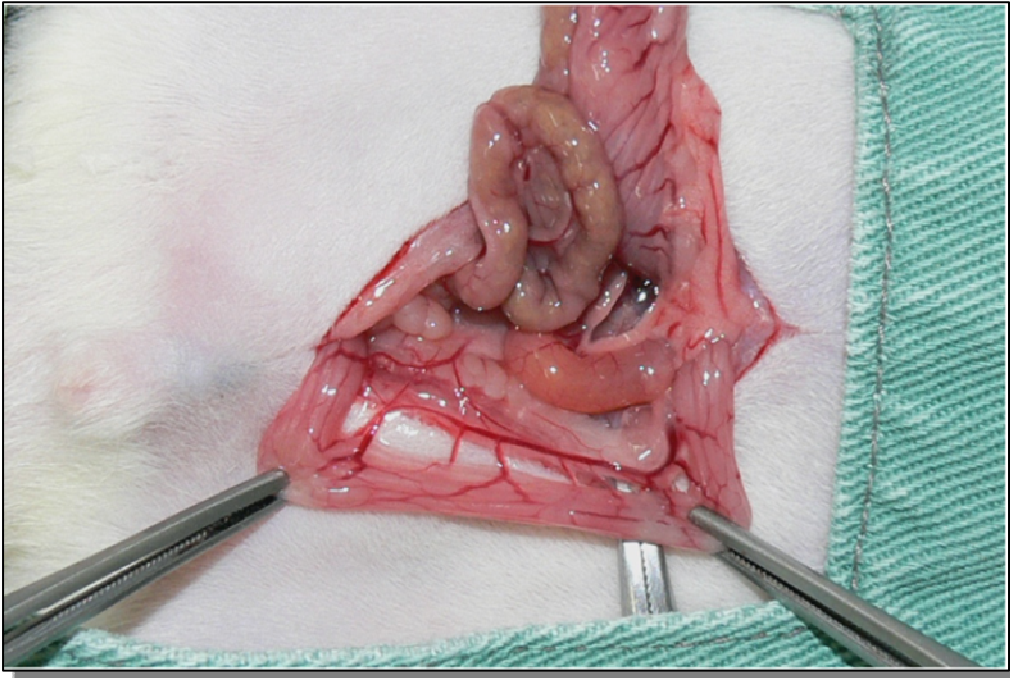
### 3.5.3 Procedimento cirúrgico

Após jejum de 12 horas, os ratos foram anestesiados com Pentobarbital sódico 30mg/kg por via intraperitoneal sendo que o grau de anestesia foi determinado pela observação dos reflexos respiratórios e do tônus muscular. Os ratos foram considerados anestesiados quando apresentavam respiração regular e superficial, associada à flacidez da musculatura esquelética e desaparecimento dos reflexos.

Após a anestesia os animais foram pesados, seguido de tricotomia abdominal, antissepsia com álcool iodado 2% e incisão mediana em abdome inferior de cinco centímetros (**Figuras 1 e 2**).

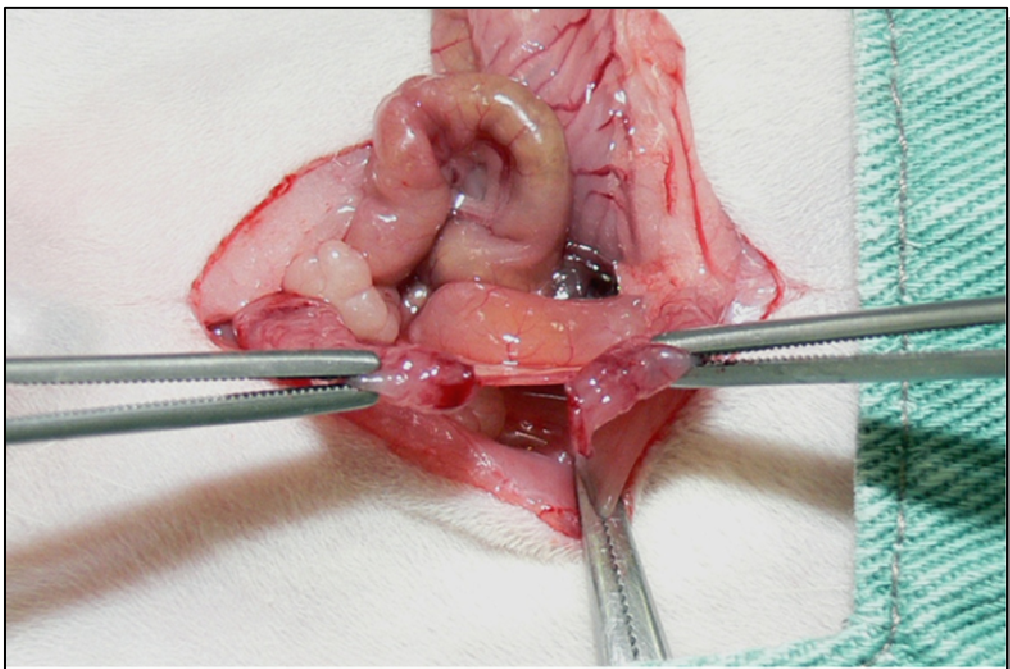


**Figura 1.** Incisão mediana de 5 cm.



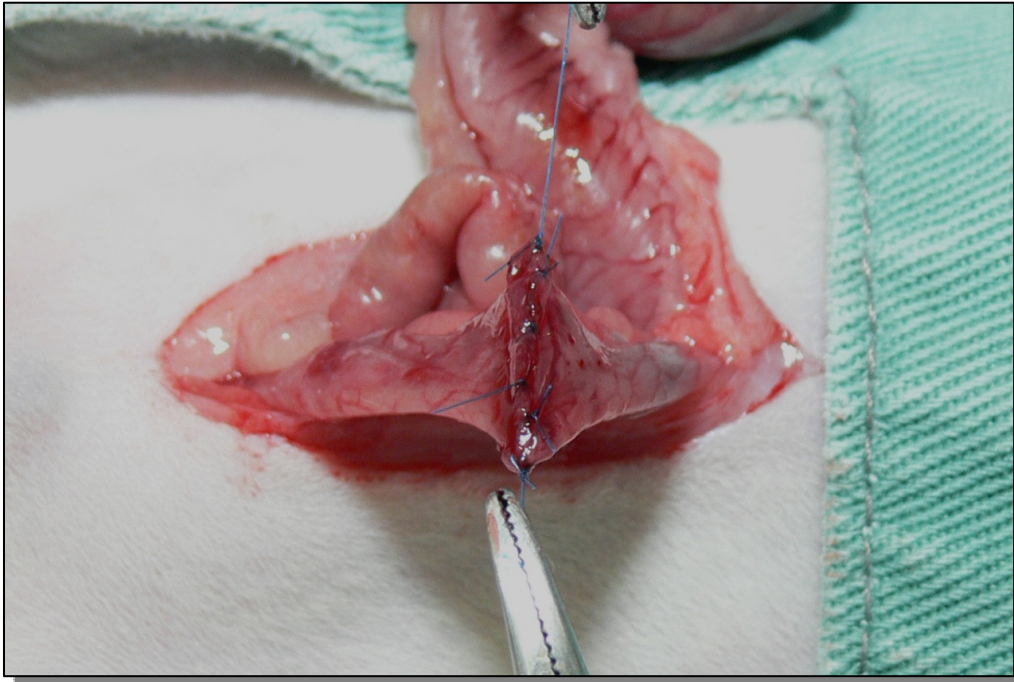
**Figura 2.** Identificação do cólon esquerdo.

A seguir foi realizada colotomia total cinco centímetros acima da deflexão peritoneal (**Figura 3**).

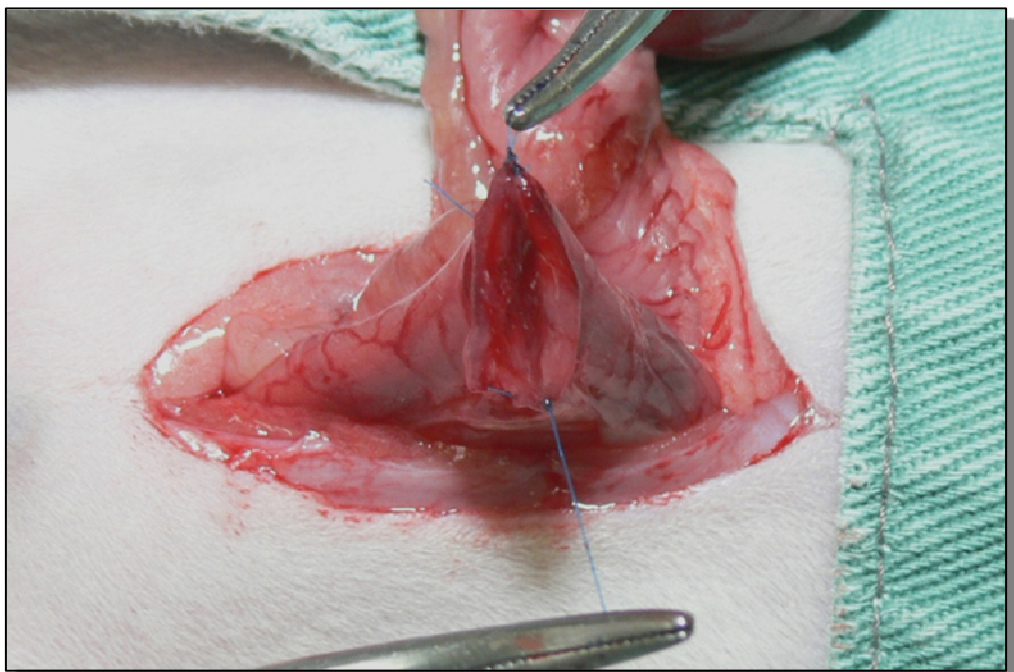


**Figura 3.** Colotomia 5 cm acima da deflexão peritoneal.

Após a colotomia, foi confeccionada anastomose cólon-colônica término-terminal em plano único, pontos separados totais, com fio de Polipropileno 6-0 (**Figuras 4, 5 e 6**).

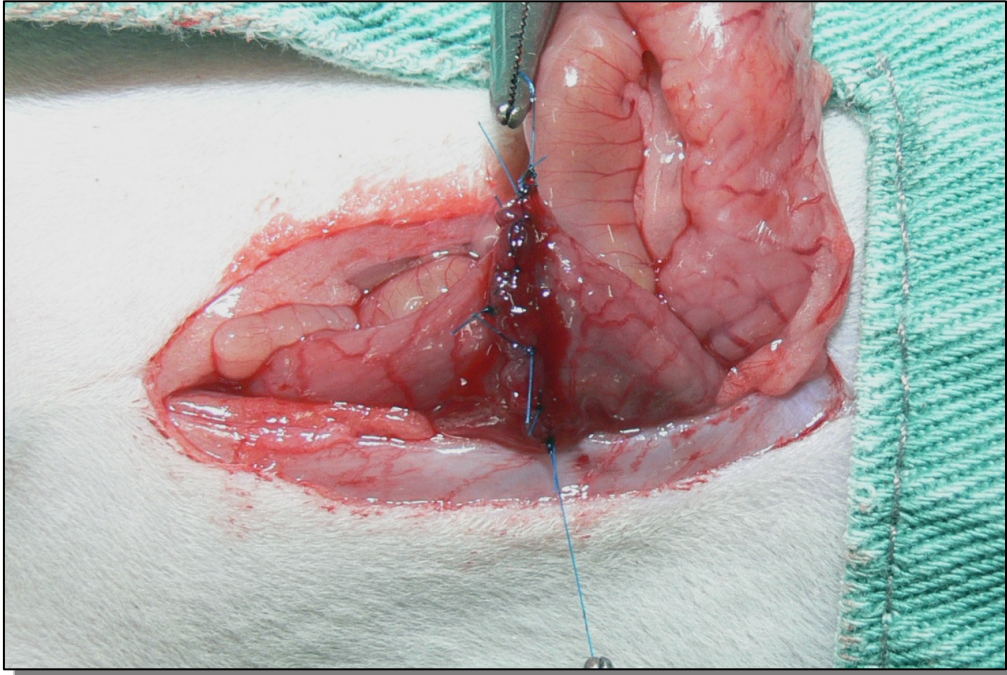


**Figura 4.** Aspecto final da sutura anterior.



**Figura 5.** Eversão da sutura da parede anterior.





**Figura 6.** Aspecto final da anastomose.

O fechamento da parede foi realizado pela síntese do peritônio, musculatura e aponeurose, com sutura única, pontos separados com Nylon 4-0 (**Figura 7**). A pele foi suturada com fio de Nylon 4-0, pontos separados (**Figura 8**). Após o procedimento, os ratos foram sorteados para os momentos segundo a tabela dos números casuais (DIXON & MASSEY JUNIOR, 1969).



**Figura 7.** Rafia do peritoneo, musculatura e aponeurose com pontos separados.

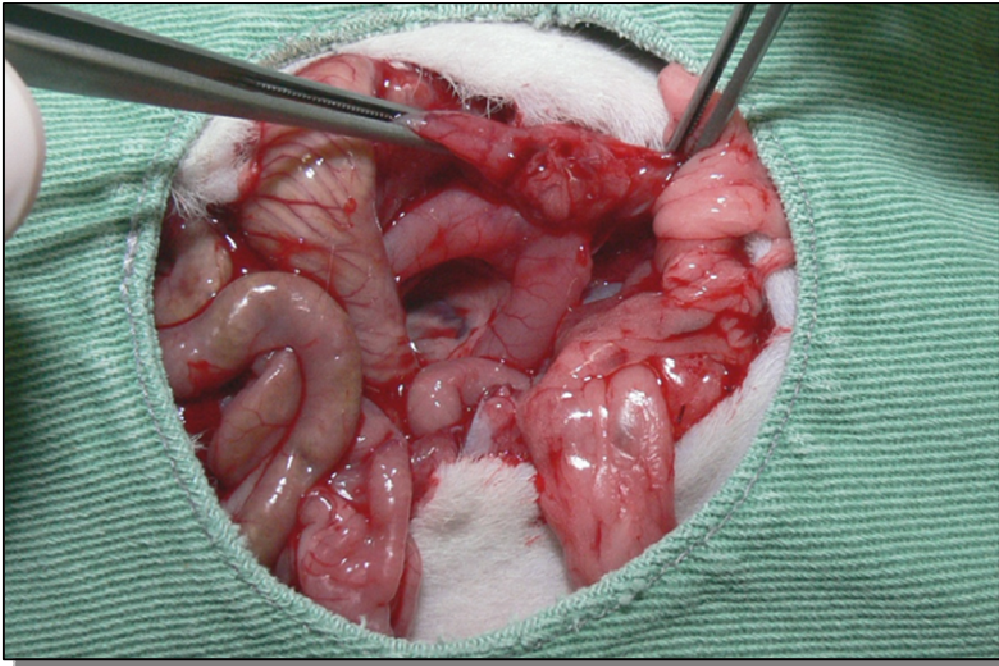


**Figura 8.** Rafia da pele com pontos separados.

#### 3.5.4 **Processamento do material**

Após o período padronizado, 15 ratos de cada momento foram novamente anestesiados e submetidos à nova laparotomia para a retirada de um segmento colônico de três centímetros contendo a anastomose (**Figuras 9 e 10**). Os fragmentos foram mergulhados em solução de soro fisiológico e cloridrato de papaverina (250 mg/l) por 30 minutos a 37<sup>0</sup>C. Os segmentos foram em seguida, submetidos ao estudo da força de ruptura. Os ratos foram sacrificados a seguir por hiperdosagem anestésica, com Pentobarbital sódico por via intramuscular.





**Figura 9.** Sacrifício. Anastomose *in situ* (entre as pinças) com aderência de delgado.



**Figura 10.** Anastomose após ressecção.

### 3.5.5 Estudo da força de ruptura

Para o estudo da força de ruptura longitudinal foi utilizado Máquina Universal de Ensaio Mecânico EMIC DL10-000 (*Equipments and Testing Systems, Ltd. Curitiba, PR, Brasil*), que tem sistema com precisão em torno de  $0,018+F/3700$  KN (**Figura 11**). O aparelho opera em conjunto com um microcomputador sob o sistema operacional Windows 98<sup>®</sup>, utilizando o programa Mtest 1.00.



**Figura 11.** Aparelho utilizado para medida da força de ruptura.

Antecedendo as medidas de força de ruptura dos segmentos intestinais, o aparelho foi submetido a teste de fidedignidade com avaliação de sua precisão estatisticamente. O programa fornece ao final do ensaio valores das propriedades mecânicas escolhidas pelo usuário, além do *Diagrama de Carga x Deformação*. Estes diagramas possibilitam a obtenção dos seguintes parâmetros: Limite de elasticidade (N), Coeficiente de rigidez (N/mm) e Força de ruptura (N). As extremidades de cada segmento estudado foram fixadas às presilhas da máquina, constituídas por placas de metal liso não-cortante, para o estiramento longitudinal do segmento a ser estudado

(**Figura 12**). A velocidade adotada para a aplicação da tração foi de 30mm/min. A força de ruptura consiste na maior carga suportada pelo material até a ruptura, ou seja, o limite de resistência.



**Figura 12.** Anastomose durante ensaio da força de ruptura.

### 3.5.6. **Estudo histopatológico**

A análise morfológica foi realizada no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu. Após o período padronizado, cinco ratos restantes de cada momento foram novamente anestesiados para a retirada de um segmento colônico de três centímetros com a anastomose em seu centro. Foram realizados três cortes em cada segmento perpendiculares à zona de anastomose e obtidas duas lâminas coradas respectivamente, com Hematoxilina-eosina e Tricrômio de Masson.

Os critérios adotados para o estudo histopatológico do processo de cicatrização foram:



3.5.6.1 Regeneração da mucosa: parcial ou completa, compreendendo epitélio glandular ou cúbico.

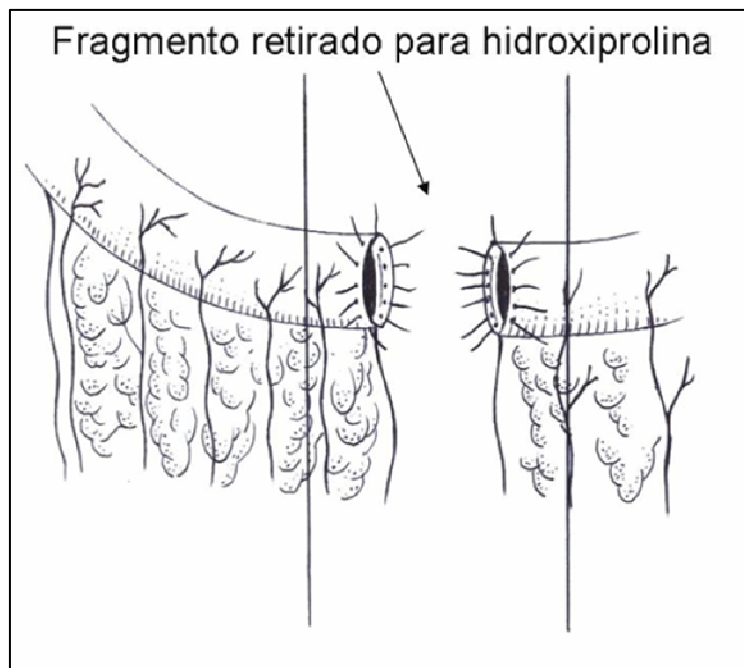
3.5.6.2 Reação inflamatória: intensidade, localização e características do infiltrado inflamatório.

3.5.6.3 Tecido de granulação: característica e intensidade da proliferação de pequenos vasos, fibroblastos e macrófagos.

3.5.6.4 Colagenogênese: intensidade e características da proliferação das fibras colágenas, se do tipo fibrilar frouxo ou denso, avaliadas pelo Tricrômio de Masson.

### 3.5.7 **Dosagens bioquímicas**

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório Experimental de Clínica Médica. Após realização da força de ruptura, os tecidos foram cortados retirando-se os segmentos constituídos por ambas as bordas anastomóticas (**Figura 13**).



**Figura 13.** Local ressecado para dosagem de hidroxiprolina.

Esses fragmentos foram pesados em balança Modelo JS-110, capacidade 110 gramas (YMC Co Ltda) e em seguida, armazenados em super *freezer* a -80°C.

A hidroxiprolina tecidual foi dosada conforme o método descrito por SWITZER e col (1991).

O tecido retirado foi seco por um período de quatro horas no SpeedVac Concentrator SC 100, preso a um sifão condensador refrigerado TR 100 e a uma bomba a vácuo VP 100 (Savant Instruments, Farmingdale, NY). O tecido seco foi pesado e as amostras hidrolisadas durante a noite a 80°C com HCl 6N (1ml/10mg de tecido seco). Uma alíquota de 50µl do hidrolisado foi transferida para um tubo de Eppendorf e seco novamente no Speed Vac Concentrator. Um mililitro de água deionizada foi adicionado à amostra. Após, foi acrescentado um mililitro de borato de potássio (pH 8,7) a fim de se manter o pH estável e ,então, a amostra foi oxidada com 0,3 ml de solução de cloramina T por 20 minutos. A oxidação foi interrompida pela adição de um mililitro de tiosulfato de sódio 3,6M. A solução foi saturada com 1,5 gramas de cloreto de potássio e deixada em banhomaria a 90°C por 20 minutos. A seguir, os tubos foram resfriados, seguidos de adição de 2,5 ml de tolueno. Os tubos, então, foram centrifugados a baixa velocidade e um mililitro dessa solução foi transferido a um tubo de ensaio, seguida de adição de 0,6 ml de solução de Ehrlich por 30 minutos. Realizada leitura por espectrofotômetro (Ultospec 3000, Pharmacia Modelo 802105-20) contra *blanck* para determinação da hidroxiprolina tecidual.

### **3.5.8 Estudo das complicações pós-operatórias**

Para estudar as complicações cirúrgicas, as variáveis analisadas foram: óbitos, deiscências de anastomoses e infecção de sítio cirúrgico.

### **3.6 Análise Estatística:**

As variáveis estudadas foram: força de ruptura da anastomose do cólon distal e a dosagem de hidroxiprolina tecidual nos seguintes momentos:

- **M1: 4º pós-operatório;**
- **M2: 7º pós-operatório;**
- **M3: 14º pós-operatório;**
- **M4: 21º pós-operatório.**

Em cada grupo e em cada momento foram utilizados 15 animais sendo calculadas as médias e os desvios padrão como indicadores, respectivamente, da tendência central e da variabilidade.

Para todas as variáveis, em questão foi realizada a análise de variância no delineamento inteiramente ao acaso no esquema fatorial, tendo como fatores os grupos e os dias. As comparações das médias foram feitas pelo método de Tukey. O nível de significância utilizado foi de 5%.

As complicações cirúrgicas, óbitos, infecções e fístulas foram analisadas pelo teste Z. O nível de significância utilizado foi de 5%.

O peso inicial, final e ganho do peso dos ratos foram analisados pelo teste do qui-quadrado. O nível de significância utilizado foi 5%.

# RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Peso dos Animais

A média e desvio padrão dos pesos dos animais submetidos à ingestão de etanol na admissão foram  $190,4 \pm 6,6$  gramas, e dos animais do grupo controle foram de  $190,4 \pm 6,4$  gramas conforme mostra a **Tabela 1**. Não houve diferença entre os grupos.

**Tabela 1** – Peso mínimo, máximo, média e desvio padrão, em gramas, dos animais no momento da admissão.

	Mínimo	Máximo	Média $\pm$ DP
Grupo Tratado	180,0	200,0	$190,4 \pm 6,6$
Grupo Controle	178,0	200,0	$190,4 \pm 6,4$
			$p > 0,05$

A média e desvio padrão dos pesos no dia da cirurgia foram de  $409,1 \pm 48,4$  gramas no grupo tratado, enquanto no grupo controle foi de  $493,6 \pm 57,8$  gramas. O peso no dia da cirurgia foi superior no grupo controle quando comparado com o grupo tratado ( $p < 0,05$ ) (**Tabela 2**).

**Tabela 2** – Peso mínimo, máximo, média e desvio padrão, em gramas, dos animais no dia da cirurgia.

	Mínimo	Máximo	Média $\pm$ DP
Grupo Tratado	300,0	515,0	$409,1 \pm 48,4$
Grupo Controle	399,0	708,0	$493,9 \pm 57,8$
			$p < 0,05$

O ganho de peso no grupo submetido à ingestão de etanol até a data da cirurgia variou entre 108,0 e 321,0 gramas, com média e desvio padrão de 218,7±49,4 gramas, enquanto que no grupo controle variou entre 211,0 e 513,0 gramas, com média e desvio padrão de 303,5±57,6 gramas. Houve diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). A média e desvio padrão do peso dos animais no dia da cirurgia em cada grupo e em cada momento, bem como a média geral de cada grupo, e a interpretação estatística encontra-se na **Tabela 3**.

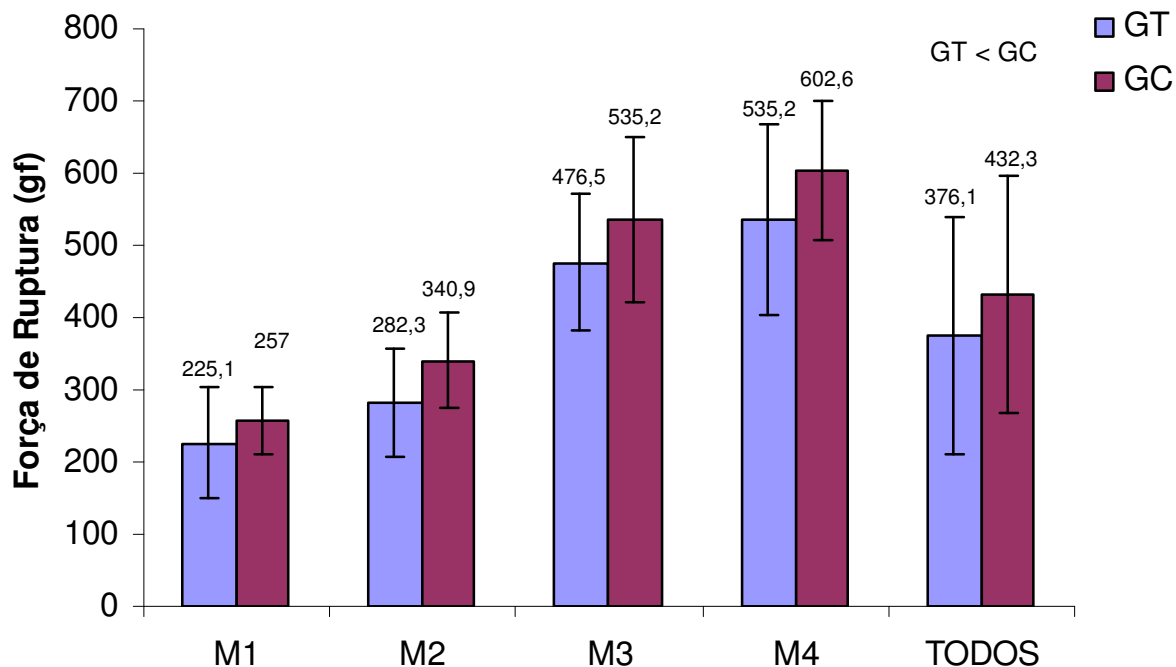
**Tabela 3** - Média e desvio padrão dos pesos dos animais em cada grupo e em cada momento, média geral de cada grupo em todos os momentos no dia da cirurgia e a interpretação estatística.

Grupo	Momentos				
	M1	M2	M3	M4	Todos
GT	428,2±50,2(B )	439,0±53,1(B )	403,8±49,7(B )	393,6±45,0(B )	409,1±48,4(B )
GC	547,7±65,5(A )	467,2±44,2(A )	484,2±44,1(A )	475,4±39,6(A )	493,6±57,8(A )
Interpretação	A > B	A > B	A > B	A > B	A > B

#### 4.2 Força de Ruptura

As médias e desvios padrões das forças de ruptura foram, respectivamente, de 225,1±76,8 gf no 4º dia de pós-operatório; 282,3±76,2 gf no 7º dia; 476,5±94,8 gf no 14º dia e 535,2±133,3 gf no 21º dia no grupo tratado. No grupo controle foram 257,0±46,7 gf no 4º dia de pós-operatório; 340,9±64,7 gf no 7º dia; 535,2±113,2 gf no 14º dia e 602,6±96,2 gf no 21º dia. Apesar das médias das forças de ruptura serem superiores no GC, não houve diferença estatística significativa entre os grupos em cada momento. Mas quando agrupados todos os momentos de cada grupo, a média e

desvio padrão no grupo submetido à ingestão de etanol foi de  $376,1 \pm 164,4$  gf e no grupo controle foi de  $432,3 \pm 162,8$  gf, significativamente maior que no grupo tratado (**Figura 14**).

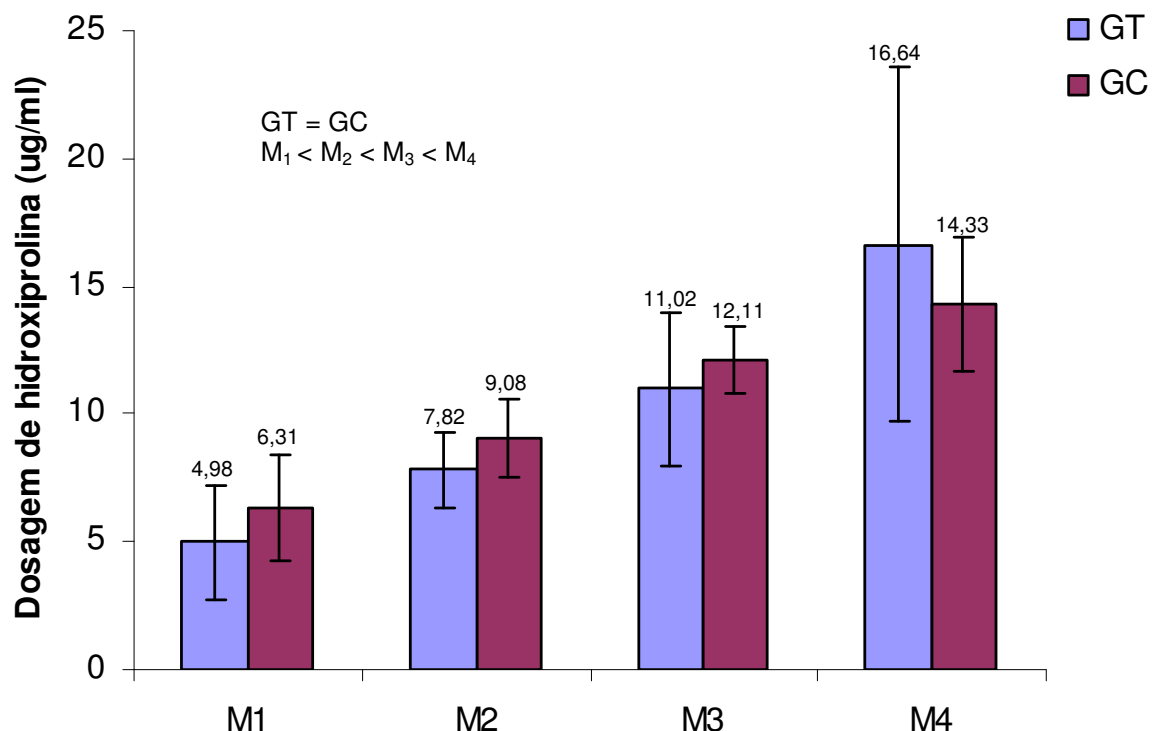


**Figura 14.** Média e desvio padrão das forças de ruptura em cada momento ( $p > 0,05$ ), e média geral em cada grupo em gramas força ( $p = 0,03$ ).

### 4.3 Dosagem de Hidroxiprolina

No grupo tratado, a média e o desvio padrão da dosagem de hidroxiprolina tecidual foi de  $4,98 \pm 2,20 \mu\text{g/ml}$  no 4º dia de pós-operatório;  $7,82 \pm 1,50 \mu\text{g/ml}$  no 7º dia de pós-operatório;  $11,02 \pm 3,00 \mu\text{g/ml}$  no 14º dia de pós-operatório e  $16,64 \pm 6,90 \mu\text{g/ml}$  no 21º dia de pós-operatório. No grupo controle, os valores foram, respectivamente,  $6,31 \pm 2,10 \mu\text{g/ml}$  no 4º dia de pós-operatório;  $9,08 \pm 1,50 \mu\text{g/ml}$  no 7º dia de pós-operatório;  $12,11 \pm 1,30 \mu\text{g/ml}$  no 14º dia de pós-operatório e  $14,33 \pm 2,60 \mu\text{g/ml}$  no 21º dia de pós-operatório. A dosagem de hidroxiprolina não apresentou diferença entre os grupos em cada momento estudado, só apresentando

diferença significativa entre os momentos, sendo o menor valor no momento  $M_1$  e, o maior, no momento  $M_4$  (**Figura 15**).



**Figura 15.** Dosagem de hidroxiprolina: Média e desvio padrão em cada momento.

#### 4.4 Análise Histopatológica

A análise histopatológica não demonstrou alterações significativas entre o grupo controle e tratado. Não ocorreu atraso nas fases da cicatrização intestinal no grupo submetido à ingestão de etanol em comparação com os animais do grupo controle.

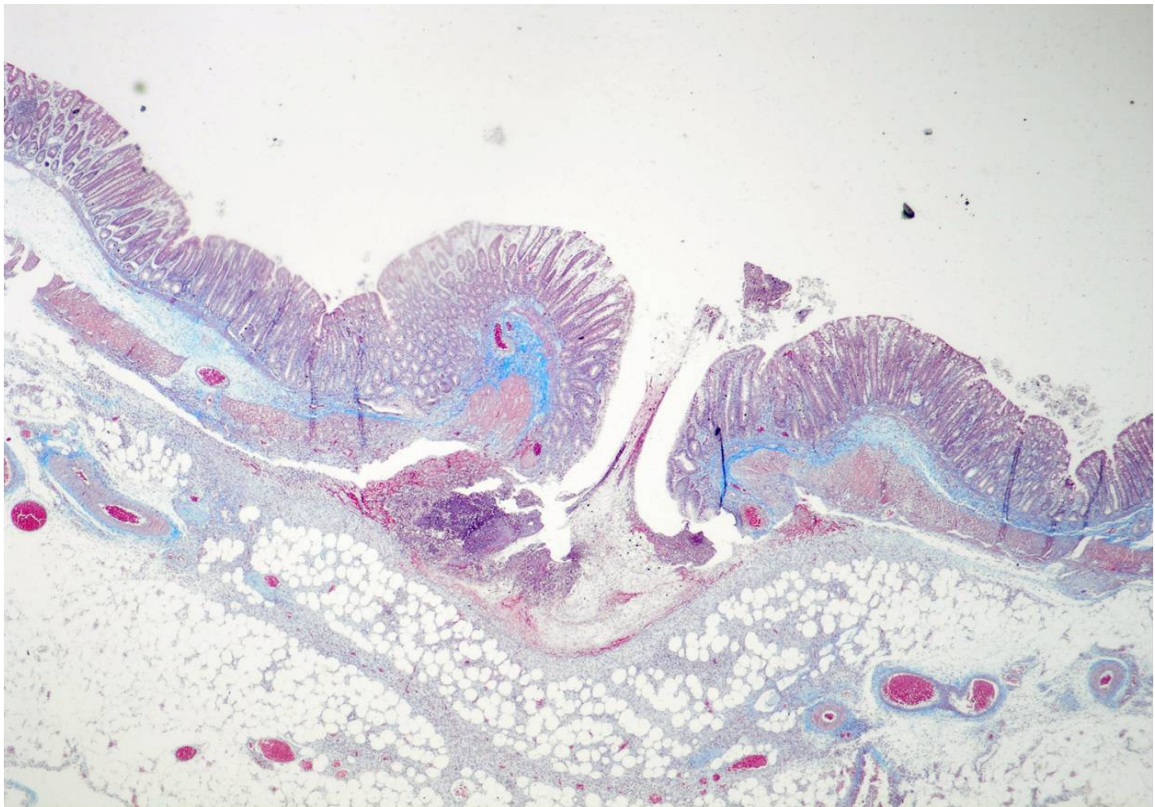
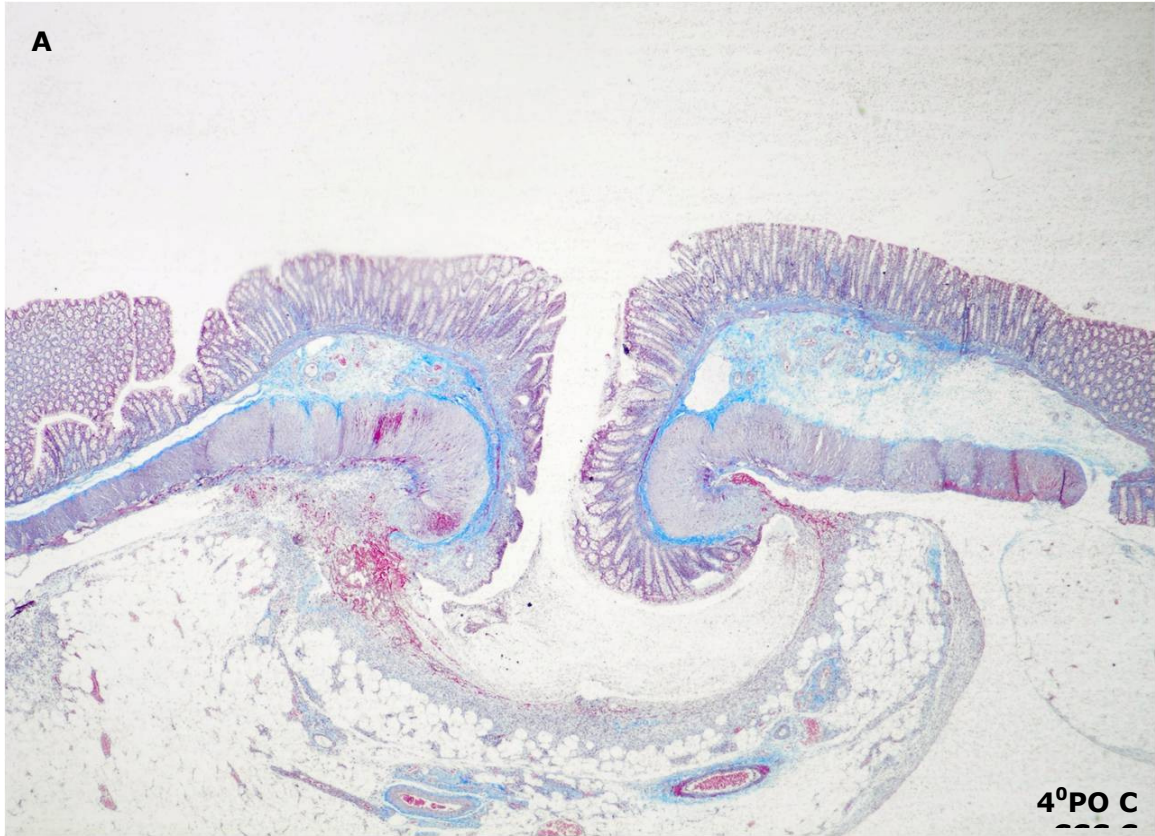
Nos primeiros dias de pós-operatório ocorreu regeneração parcial da mucosa com evolução para completa cicatrização em quatro de cinco amostras no 21º dia em ambos os grupos.

A reação inflamatória foi de início incipiente no 4º dia após o procedimento com discreto exsudato neutrofílico com aumento importante deste processo no 7º dia após o procedimento. No 21º dia praticamente não havia processo inflamatório em ambos os grupos.



Quanto à formação de tecido de granulação e à colagenogênese, no 4º dia evidenciou-se a presença de alguns poucos vasos neoformados dispostos perpendicularmente à anastomose, com pouca quantidade de fibroblastos e fibras colágenas. Com o passar do tempo ocorreu aumento da neoformação vascular com maior quantidade de fibroblastos e colágeno. A densidade do colágeno aumentou progressivamente ao longo do experimento. No 21º dia de pós-operatório observou-se fibras estruturalmente mais organizadas.

As **figuras 16 a 19** correspondem ao estudo histopatológico dos momentos analisados.



**Figura 16A e B.** 4º PO. Regeneração incipiente da mucosa e reação inflamatória discreta no assoalho da ferida (Masson 400x).

ERROR: stackunderflow  
OFFENDING COMMAND: ~

STACK:

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)