Erika Veruska Paiva Ortolan

ESTUDO DA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES REALIZADAS NO ÍLEO TERMINAL E CÓLON DISTAL DE RATOS NORMAIS E DIABÉTICOS. Análise morfométrica e ultraestrutural do colágeno.

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

Orientador: Prof. Adjunto César Tadeu Spadella

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
-2006-

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ***ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE***

Ortolan, Erika Veruska Paiva.
Estudo da cicatrização de anastomoses realizadas no íleo terminal e cólon distal de ratos normais e diabéticos : análise morfométrica e ultraestrutural do colágeno / Erika Veruska Paiva Ortolan. – 2006.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2006.
Orientador: Prof. Adjunto César Tadeu Spadella
Assunto CAPES: 40102009

1. Cirurgia. 2. Diabetes. 3. Colágeno. 4. Intestinos.

CDD 617.554

Palavras-chave: Anastomoses; Cicatrização; Diabetes experimental; Intestino delgado; Intestino grosso.

Dedico esta tese ao meu amor ***Umberto***, e aos presentes que Deus nos confiou, ***André*** e ***Rafael***.

HOMENAGEM

"Se vi mais longe, é porque me apoiei nos ombros de gigantes."

(Isaac Newton)

Ao *Professor Adj. César Tadeu Spadella* pelo prazer e privilégio de tê-lo novamente como meu orientador.

Ao *Professor Dr. Carlos Caramori* pelo carinho e paciência com que me acolheu e me introduziu no infindável campo da dimensão fractal.

A dedicação e o amor com que esses professores conduzem os seus projetos, nos mais variados campos, me faz ter muito orgulho de fazer parte desta Faculdade de Medicina.

AGRADECIMENTOS

Minha profunda gratidão a todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na elaboração deste trabalho. Em especial:

à minha *mãe* por traduzir em todos os seus atos o mais completo sentido da palavra "mãe";

ao meu irmão *Ivan* e minha cunhada *Daniele* por não permitirem que a distância física diminuísse o apoio aos meus projetos;

ao meu *pai*, cuja passagem pela minha vida sempre será inesquecível;

à minha nova família que me acolheu após o casamento, pelo carinho constante, em especial à minha sogra *Adelaide* e à "*Tia Rosa*" por serem a mão amiga em todos os momentos;

à Sra. *Ângela da Silva Lima*, "anjo da guarda" dos meus filhos, por me garantir tranqüilidade nos meus momentos de ausência;

ao amigo e sempre professor *Bonifácio Katsunori Takegawa*, pelo senso crítico e apoio constante em todos os meus projetos.

ao amigo *Prof. Dr. José Lúcio Martins Machado* por ter me introduzido nesta linha de pesquisa e me apoiado nos momentos difíceis de conclusão deste trabalho;

aos *Prof. Titular Shoiti Kobayasi, Prof Adj. Luiz Eduardo Naresse, Prof. Adj. Celso Vieira Leite* e *Prof. Dr. José Guilherme Minossi*, do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu, por transmitir os conhecimentos do Grupo de Cicatrização ao nosso Grupo de Estudos do Diabetes Experimental;

à *Profa. Dra. Kunie I. C. Rabello* do Departamento de Patologia pela orientação na análise dos estudos histopatológicos;

ao *Prof. Dr. Deílson E. de Oliveíra* do Departamento de Patologia pelo auxílio nas análises histomorfométricas;

à *Profa. Titular Elisa Aparecida Gregório*, Chefe do Serviço de Microscopia Eletrônica, pelo auxílio na realização dos estudos das anastomoses na microscopia eletrônica de varredura;

ao *Professor Adj. José Eduardo Corrente*, pela eficiência na análise estatística dos resultados;

ao *Professor Titular Ivan Guerríni,* do Instituro de Biociências, pelo auxílio nas análises da dimensão fractal.

às biólogas *Sônia María Capelettí* e *María Cecília Salgado Mercadante*, pela contribuição no cumprimento rigoroso do cronograma experimental, organização de protocolos e execução da coleta dos materiais para as dosagens realizadas neste trabalho;

aos funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu, em particular à Sra. *Irene Spago*, pelo relevante serviço no seguimento dos animais e nos procedimentos experimentais e ao Sr. *Danílo Sagurí* por realizar as dosagens de glicemia;

Aos funcionários do Instituto de Biociências, Sr. *Nívalde Antônio Bassos* e *María Helena Moreno,* pela paciência e dedicação na preparação do material e auxílio na utilização do microscópio eletrônico de varredura;

aos funcionários do Laboratório de Patologia, pela preparação do material para o estudo histopatológico;

ao Sr. *Carlos Eduardo Borgatto* pelo carinho e paciência na elaboração da arte final deste texto e na editoração do material destinado à apresentação oral deste trabalho;

aos funcionários da *Seção de Pós-Graduação* da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela amizade e paciência nas orientações dadas para a realização desta tese;

à Sra. *Símone Barroso Corvíno Camargo*, funcionária da Pós-Graduação da Cirurgia, pela atenção e carinho dispensados aos pós-graduandos;

às bibliotecárias *Rosemeire Aparecida Vicente* pela elaboração da ficha catalográfica e *Rosemary Cristina da Silva* pela adequação das referências bibliográficas, segundo as normas da ABNT;

ao Sr. *Edson Matsubayashi,* amigo de todas as horas, por fornecer vasto material sobre caos e fractais;

aos amigos cujo apoio sempre foram meu ânimo nos momentos de dificuldade de conclusão deste trabalho, em especial à *Daniela, Eduardo e Thaís.*

à *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),* cujo financiamento tornou possível a realização deste trabalho (processo número 02/06700-0);

Às pessoas não citadas explicitamente, cujo carinho e afeto jamais me faltaram, o meu sincero pedido de desculpas e a certeza de que a omissão se restringe apenas a estas páginas.

De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos apenas começando;
A certeza de que é preciso continuar;
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar;
Fazer da interrupção um caminho novo;
Da queda um passo novo de dança;
Do medo, uma escada;
Do sonho, uma ponte;
Da procura, um encontro.

Fernando Pessoa

A mente que se abre para uma nova idéia, jamais volta ao seu tamanho natural.

Albert Einstein

ÍNDICE

INTRODUÇÃO..... 01
O diabetes: uma doença antiga..... 02
O diabetes: um problema de saúde pública mundial..... 03
O diabetes e a cicatrização das feridas biológicas..... 04
O uso da dimensão fractal na biomedicina..... 05
OBJETIVO..... 09
MATERIAL E MÉTODO..... 11
1. Animais utilizados e grupos experimentais..... 12
2. Parâmetros analisados..... 12
2.1. Parâmetros relacionados ao diabetes..... 12
2.2. Parâmetros relacionados à cicatrização..... 13
3. Delineamento experimental..... 13
3.1. Adaptação, indução do diabetes, seleção e sorteio dos grupos..... 13
3.2. Período de diabetes e seleção dos procedimentos cirúrgicos..... 14
3.3. Momentos de avaliação e sacrifício..... 15
4. Técnicas utilizadas..... 16
4.1. Anestesia..... 16
4.2. Indução do diabetes experimental..... 16
4.3. Pré-operatório..... 17
4.4. Cirurgia..... 17
4.5. Pós-operatório..... 18
4.6. Metodologia empregada na coleta de dados metabólicos..... 18
4.7. Exames laboratoriais..... 19
4.7.1. Dosagens de glicose plasmática e urinária..... 19
4.8. Estudo histopatológico e análise morfométrica da anastomose à microscopia óptica..... 19
4.8.1. Preparo das amostras..... 19
4.8.2. Análise histopatológica à microscopia óptica..... 20
4.8.3. Método morfométrico..... 20
4.9. Análise ultraestrutural das fibras de colágeno e cálculo da dimensão fractal do arranjo estrutural do colágeno presente na cicatriz..... 21
4.9.1. Análise ultraestrutural das fibras de colágeno à microscopia eletrônica de varredura..... 21
4.9.2. Processamento das imagens e obtenção do cálculo da dimensão fractal do arranjo estrutural do colágeno..... 22
5. Análise estatística..... 26
RESULTADOS..... 27
1. Método de indução do diabetes..... 28
2. Evolução clínica..... 28
2.1. Grupo controle normal..... 28
2.2. Grupo de animais diabéticos..... 29
3. Exames laboratoriais..... 35
3.1. Grupos de animais não-diabéticos (G1 e G2)..... 35
3.2. Grupos de animais diabéticos (G3 e G4)..... 35
4. Análise histopatológica à microscopia óptica..... 37
5. Análise morfométrica da área ocupada pelo colágeno na cicatriz..... 46
6. Análise ultraestrutural das fibras de colágeno..... 49

7. Cálculo da dimensão fractal do arranjo estrutural do colágeno da anastomose..... 58
DISCUSSÃO..... 61
1. Quanto aos animais utilizados..... 62
2. Quanto ao tempo de diabetes e observação dos animais..... 62
3. Quanto às técnicas utilizadas..... 63
3.1. Anestesia..... 63
3.2. Indução do diabetes experimental..... 63
4. Quanto à evolução clínica..... 66
5. Quanto aos exames laboratoriais..... 67
6. Quanto ao estudo histopatológico à microscopia óptica..... 68
7. Quanto à análise ultraestrutural das fibras de colágeno..... 69
8. Quanto à dimensão fractal..... 72
CONCLUSÕES..... 74
RESUMO..... 76
SUMMARY..... 79
BIBLIOGRAFIA..... 81
APÊNDICE..... 94

Introdução

O diabetes: uma doença antiga

Os primeiros relatos sobre o diabetes datam de 1500 antes de Cristo. Neste período, o papiro egípcio de Ebers já descrevia uma doença que causava a passagem de muita urina através dos rins (CAHILL, 1985).

Apesar de Celsus, entre 30 e 50 D.C., também ter reconhecido a doença, foi somente em 250 D.C. que o médico grego Aretaeus da Cappadócia, deu o nome diabetes à doença, que significa sifão, referência à eliminação exagerada de água pelos rins (CAHILL,1985).

Em 1674, o médico inglês Thomas Willis constatou que os indivíduos com os sintomas descritos por Aretaeus tinham a urina "como que misturada com mel e açúcar". Foi adotado, então, o nome *Diabetes mellitus,* embora apenas 100 anos após, Dobson em 1774 tivesse demonstrado que esta característica da urina devia-se realmente ao açúcar. Finalmente, em 1815, o médico Michel Chevreul comprovou que o açúcar em excesso nos diabéticos era a glicose (CAHILL, 1985).

Muitos séculos se passaram desde esses primeiros relatos históricos sobre o diabetes, sem que houvesse qualquer avanço nos conhecimentos sobre a doença, até que na metade do século XIX, começou a ser estabelecida a associação entre diabetes e distúrbios nas células beta pancreáticas. As ilhotas pancreáticas foram descritas pela primeira vez por Brockman, com estudos em peixes. Mas foi Langerhans, em 1869, que realizou a descrição completa destas células, em pâncreas de mamíferos, dando-lhes o nome de ilhotas de Langerhans. Em 1889, os alemães Mering & Minkowski descobriram que a remoção cirúrgica do pâncreas produzia diabetes em cães, e em 1901, o americano Opie fez os primeiros relatos de que as células beta, contidas nas ilhotas pancreáticas, encontravam-se danificadas em pacientes que morriam da doença (MERING e MINKOWSKI, 1889; CAHILL, 1985).

Em 1921, um grande avanço acerca do diabetes foi alcançado pelo cirurgião canadense Frederick Banting e seu assistente Charles Best, até então um estudante de medicina, quando descobriram que extratos ativos, preparados a partir do tecido pancreático, eram capazes de diminuir os elevados níveis de glicemia quando administrados em cães diabéticos. Mais tarde, extratos de tecido

pancreático foram purificados por Collip, recebendo o nome de insulina, palavra de origem latina, que significa ilha, como referência às ilhotas pancreáticas (BANTING e BEST, 1922; CAHILL, 1985).

O diabetes: um problema de saúde pública mundial

Com a descoberta da insulina criou-se uma enorme expectativa na cura do diabetes. No entanto, logo se constatou que o uso da insulina não diminuía a mortalidade associada à doença (TOKUHATA et al., 1975; FULLER et al., 1983; MELTON et al., 1983; KRÓLEWSKI e WARRAM, 1985), e também não era capaz de evitar a morbidade decorrente das lesões crônicas do diabetes sobre vasos, rins, retina e nervos (CAHILL, 1976; KNATTERUD et al., 1978; TCHOBROUTSKY, 1978; KOLATA, 1979; SIPERSTEIN, 1983).

Por conta disto, o diabetes ainda é hoje um problema de saúde pública mundial. Dados da Organização Mundial de Saúde registravam em 2000, 171 milhões de diabéticos no mundo. Estimativas desta mesma organização indicam que em 2030 serão 366 milhões de casos, responsáveis por 10% das despesas de saúde do planeta. No Brasil, a prevalência do diabetes é de 7,6%, o que corresponde a mais de 13 milhões de pessoas, das quais 10% são diabéticas do tipo I, e 50% desconhecem serem portadores desta patologia; sendo provavelmente identificados, no futuro, através de alguma complicação da doença. Segundo o último Consenso Brasileiro sobre Diabetes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2002), o diabetes é a sexta causa mais freqüente de internação hospitalar no Brasil, contribuindo em 30 a 50% para outras causas de internação, como: cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial; é responsável por 30% das internações com dor precordial, em unidades coronarianas; é a principal causa de amputação dos membros inferiores e de cegueira adquirida, sendo que 26% dos pacientes que iniciam diálise são diabéticos.

Frente a essa dura realidade, torna-se imprescindível a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do diabetes e de suas complicações, à procura de um tratamento capaz de controlar as alterações endócrino-metabólicas causadas pela doença, bem como as lesões crônicas sobre os diferentes órgãos. Neste sentido, os estudos sobre o diabetes,

realizados através dos diferentes modelos-animais existentes, têm prestado relevante trabalho na elucidação das muitas dúvidas sobre a doença, sendo por isso, considerados extremamente necessários.

O diabetes e a cicatrização das feridas biológicas

Apesar do mito arraigado na cultura médica e popular de que os "diabéticos cicatrizam mal suas feridas", são poucos os estudos que comprovam, de maneira clara, os reais efeitos da doença sobre o processo biológico de reparação das feridas. Sabe-se, porém, que metade dos pacientes diabéticos necessitará de um procedimento cirúrgico durante suas vidas, e que aproximadamente 25% deles terão sua doença identificada neste momento (ROSENBERG, 1990).

Sabe-se que o diabetes retarda o fechamento e a contração da ferida cirúrgica, atua negativamente sobre os granulócitos, sobre a quimiotaxia dos leucócitos e macrófagos, interfere no metabolismo do colágeno, nas células vermelhas do sangue, e nas características biomecânicas da ferida cirúrgica (ROSENBERG,1990; EKMEKTZOGLOU e ZOGRAFOS, 2006).

Por outro lado, apesar da existência de múltiplos protocolos de estudos sobre as alterações da cicatrização no diabetes, os resultados destas pesquisas ainda são muito variáveis ou até mesmo conflitantes. Por isso, a partir de 1999, na busca de respostas para muitas dúvidas ainda não elucidadas, houve em nossa universidade a fusão de dois grupos de pesquisa experimental, o de diabetes e o de cicatrização.

Nossa primeira dúvida era saber se o diabetes seria capaz de provocar uma alteração primária nos tecidos, levando a um retardo na cicatrização. A outra, se este eventual retardo na cicatrização seria conseqüência de uma colagenogênese imperfeita, após a agressão cirúrgica. Tentando resolver estas questões, nós estudamos os efeitos do diabetes sobre o intestino delgado e intestino grosso de ratos diabéticos aloxânicos, sem agressão cirúrgica, e não se observou alterações significativas entre os grupos de animais controles e diabéticos, em relação às dosagens quantitativas de hidroxiprolina e proteína tecidual total, bem como, nos estudos biomecânicos da parede intestinal (PAIVA, 2001). Logo, se o diabetes por si só, não era capaz de provocar alterações nos

parâmetros de cicatrização antes da agressão cirúrgica, o próximo passo foi estudar quais alterações seriam provocadas pela doença após o ato cirúrgico. Este trabalho foi realizado por Machado em 2002, que estudou os mesmos parâmetros acima descritos, em ratos diabéticos aloxânicos, submetidos a anastomoses no íleo terminal e no cólon distal, e relatou que apesar da grande diferença observada nos estudos biomecânicos (força de ruptura e coeficiente de rigidez), entre animais diabéticos e controles, estas diferenças não foram acompanhadas por alterações significativas nas dosagens quantitativas de hidroxiprolina e proteína tecidual total. Estes fatos apontaram para prováveis alterações qualitativas das fibras colágenas neoformadas, em animais diabéticos, em relação a animais normais, submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos.

Assim, baseados nas premissas de que o diabetes não altera, primariamente o tecido intestinal normal de ratos de laboratório, e nem tampouco modifica a quantidade de colágeno tecidual presente nas cicatrizes intestinais, achamos oportuna a realização de um estudo que pudesse explicar, por que, então, a força de ruptura se mostrou significativamente diminuída em animais diabéticos operados, quando confrontada com animais controles normais.

Em busca desta resposta, utilizamos uma metodologia de investigação nunca antes usada em estudos de anastomoses intestinais realizadas em ratos diabéticos, qual seja a avaliação de anastomoses do íleo terminal e do cólon distal, à microscopia eletrônica de varredura, após um processo de digestão das organelas citoplasmáticas, com preservação apenas da estrutura do colágeno. As imagens obtidas foram submetidas ao cálculo da dimensão fractal do arranjo estrutural do colágeno da cicatriz, na tentativa de tornar objetiva a avaliação das possíveis variações qualitativas desta estrutura. Com este mesmo objetivo, foi realizado um estudo morfométrico com a medida da área ocupada pelo colágeno, na anastomose, em lâminas coradas pelo método de picrosírius, o qual permite boa coloração das fibras colágenas.

O uso da dimensão fractal na biomedicina

Um dos grandes debates ocorridos na Física, durante o século XX, diz respeito, de um lado, às concepções determinísticas e reducionistas sobre o

universo, e de outro, daquelas incertas e probabilísticas. No auge desse debate, nas décadas de 60 e 70, surgiram a Teoria do Caos e a Geometria Fractal, fazendo emergir os conceitos de caos, fractais e complexidade, propostos pelo matemático polonês Benoit Mandelbrot, e também por outros que o seguiram, em complementação à tradicional Geometria Euclidiana e aos sistemas ideais da ciência ortodoxa. Mandelbrot baseou-se no fato de que muitos padrões da natureza são tão irregulares e fragmentados, que comparados à matemática Euclidiana, estes fenômenos exibem um grau de complexidade não somente maior, mas também completamente diferente. A existência destes padrões desafiou Mandelbrot e seus seguidores a estudar as formas que a matemática Euclidiana deixou de lado, aquelas conceituadas como “sem forma”, propondo-se, assim, a definir a morfologia do “amorfo” (MANDELBROT, 1983).

O ensino e a pesquisa da Física Aplicada e da Biofísica têm sofrido alterações surpreendentes, desde então, incorporando os novos conceitos surgidos e forçando uma mudança de paradigma na ciência, em função da nova epistemologia emergente.

O termo fractal, batizado por Mandelbrot, veio do latim *fractus*, que significa fracionado, irregular, e aplica-se a objetos no espaço, ou a flutuações no tempo, os quais possuem uma forma de auto-similaridade que não podem ser descritas em uma única escala absoluta de medida (MANDELBROT, 1983; KLONOWSKI, 2000).

Na visão da nova ciência, a natureza é um sistema dinâmico, complexo e adaptativo (SDCA) e, como tal, extremamente sensível às condições externas (BERGÉ et al., 1995; BAR-YAM, 1997). Um sistema adaptativo complexo se caracteriza por ser constituído de um conjunto de agentes individuais, com liberdade para agir, de modo nem sempre totalmente previsível, cujas ações são interconectadas de tal forma, que a ação de um agente altera o contexto de outros agentes (WILSON e HOLT, 2001). O americano Edward Lorenz fez essa descoberta na década de 60, quando estudava os sistemas meteorológicos, dando o nome de Efeito Borboleta (EB) à extrema sensibilidade dos diversos agentes, às condições iniciais ou externas, que ocorrem em sistemas desse tipo. Lorenz percebeu que, geralmente, o algoritmo linear produz um padrão mais simples, enquanto que o não-linear produz um padrão complexo, que significa “aquilo que é tecido em rede”. Um procedimento simples e repetitivo, que usa

uma equação não-linear, pode produzir, entretanto, um padrão ou sistema complexo, o que serve de base para a compreensão dos fractais - padrões que apresentam auto-similaridade nas diferentes escalas -, e dimensão fracionada igual, em qualquer uma delas (LORENZ, 1963). Nos anos seguintes, para desespero dos reducionistas, descobriu-se, que qualquer sistema natural, e mesmo alguns artificiais, são complexos, ou seja, tecidos em rede e formando padrões caóticos, sujeitos aos EB. Para compreendê-los melhor, indica-se conhecer o procedimento simples e repetitivo que lhes formou e calcular sua dimensão fracionada (LIEBOVITCH, 1998).

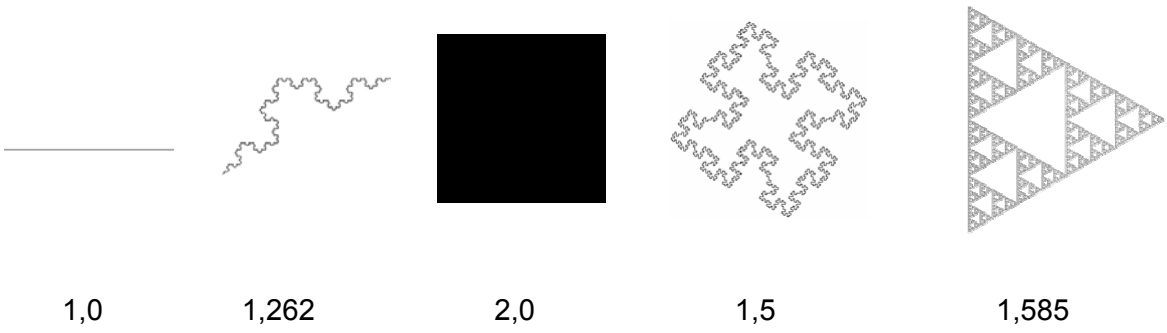
É somente quando os graus de liberdade dos SDCA se reduzem, fixando-se as variáveis em jogo, que eles tendem a se simplificar, reduzir e a formar os Sistemas Simples (SS) - os assumidos pela ciência clássica. Em geral, um sistema será tão mais fechado quanto mais perto estiver das condições de um SS e tão mais aberto quanto mais próximo de um SDCA. Os SS vivem próximos ao equilíbrio, têm pouca flexibilidade e criatividade, sendo pouco sensíveis às condições externas, enquanto que os SDCA vivem longe do equilíbrio e apresentam grande liberdade, flexibilidade, criatividade e, conseqüentemente, mais vida, sendo muito sensíveis aos EB de vários tipos (PRIGOGINE, 1996; GUERRINI, 2003).

Interessa ao pesquisador do século XXI conhecer os padrões complexos formados pelos SDCA, no tempo e no espaço, sabendo que quanto mais aberto o sistema, mais difícil de serem previstas suas formações futuras. Esses padrões, geralmente são identificados com as estruturas já mencionadas, chamadas de fractais ou os padrões do caos, também chamados de atratores caóticos, dinâmicos ou estranhos. Há, portanto, no estudo de um sistema natural, e dos padrões por ele formados, uma necessidade de se conhecer os vários tipos de fractal e suas características, usando metodologias adequadas para se medir sua dimensão, a qual está, quase sempre, ligada às propriedades do sistema que o produz (WALDROP, 1992; MAINZER, 1994).

Os fractais são imagens do caos, isto é, são padrões que ocorrem nos fenômenos naturais tais como infiltração de fluido em meios porosos não saturados, fluxo de carros, batimentos cardíacos, linhas costeiras, formas irregulares e outros muitos exemplos. Os contornos simples têm uma dimensão fractal teórica de 1,0. Os círculos e as linhas anguladas, embora sejam formas

teóricas simples, são formas aproximadas em imagens digitais e na realidade têm dimensão com maior complexidade. Figuras com maior complexidade de contorno têm resultados acima de 1,0 (Figura 1).

No presente estudo, supõe-se que haja alteração do padrão de arranjo das fibras colágenas, nas áreas correspondentes às anastomoses intestinais de maneira diferente entre ratos diabéticos e não diabéticos, sendo, portanto, pela sua complexidade, passível de avaliação pela dimensão fractal.



1,0 1,262 2,0 1,5 1,585

Figura 1. Exemplos de fractais e suas respectivas dimensões de complexidade.

Objetivo

Este trabalho teve como objetivo avaliar se o diabetes pode alterar:

- qualitativamente, o arranjo estrutural do colágeno presente no processo de reparação de anastomoses intestinais realizadas no íleo terminal e no cólon distal de ratos diabéticos aloxânicos, à microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura;

- quantitativamente o colágeno presente nas anastomoses através da análise morfométrica da área preenchida pelo colágeno na cicatriz a partir das imagens obtidas na microscopia óptica, e do cálculo da dimensão fractal do arranjo do colágeno a partir das imagens obtidas na microscopia eletrônica de varredura.

Material e Método

1. Animais utilizados e grupos experimentais

No presente estudo foram efetivamente utilizados 192 ratos alogênicos, da raça Wistar, machos, adultos, sadios ao exame clínico, pesando entre 200 e 300 gramas, com aproximadamente três meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu – Unesp.

Os animais foram distribuídos por sorteio em quatro grupos experimentais: 48 animais compuseram o grupo normal submetido à anastomose no íleo (**G1, não diabético, operado no íleo**), 48 animais constituíram o grupo normal submetido à anastomose no cólon (**G2, não diabético, operado no cólon**); 96 animais compuseram os grupos com diabetes, obtidos através da injeção endovenosa de aloxana (5,6 dioxiuracil monohidrato)[1], onde 48 formaram o grupo submetido à anastomose no íleo (**G3, diabético, operado no íleo**) e 48 constituíram o grupo submetido à anastomose no cólon (**G4, diabético, operado no cólon**).

Cada um dos quatro grupos experimentais foram ainda subdivididos em quatro subgrupos de animais, com 12 animais cada um, para serem avaliados e sacrificados conforme descrito no item 3.3.

2. Parâmetros analisados

Na presente investigação foram analisados parâmetros relacionados ao diabetes e à cicatrização.

2.1. Parâmetros relacionados ao diabetes

- Evolução clínica: aspecto geral, peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese
- Exames bioquímicos: glicemia de jejum e glicosúria

[1] Alloxan – Sigma Chemical Co – St. Louis – USA.

2.2. Parâmetros relacionados à cicatrização

▪ Estudo histopatológico:

- análise qualitativa das anastomoses à microscopia óptica

- análise morfométrica à microscopia óptica da densidade das fibras de colágeno, com cálculo da área ocupada pelo colágeno na cicatriz.

- análise ultraestrutural das fibras de colágeno à microscopia eletrônica de varredura, com subseqüente digitalização e tratamento das imagens para cálculo da dimensão fractal do arranjo do colágeno presente na cicatriz.

3. Delineamento experimental

3.1. Adaptação, indução do diabetes, seleção e sorteio dos grupos

Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, sob protocolo número 359/2003.

Oriundos do Biotério Central da Unesp, os animais foram inicialmente acomodados no Laboratório de Cirurgia Experimental em caixas de poliuretano, em grupos de 4 animais por caixa, sendo oferecidas ração e água *ad libitum*.

Permaneceram nestas condições por um período de adaptação de 7 dias, quando foram tratados profilaticamente, por três dias, de verminoses, com mebendazol (25mg/kg de peso/dia), adicionado à água de beber.

Terminado o período de adaptação, os animais foram inicialmente sorteados em dois grupos experimentais (1º sorteio): o primeiro, destinado aos animais que permaneceram como controles (grupo normal não diabético), e o segundo, destinado aos animais que foram submetidos à indução do diabetes experimental com aloxana (grupo diabético). Após a indução do diabetes, os animais foram acompanhados por 14 dias, quando foram colocados em gaiolas metabólicas no 7º e 14º dias após a injeção de aloxana, visando à seleção dos animais diabéticos graves, conforme critérios clínicos e laboratoriais previamente estabelecidos (item 4.2). A seqüência dos procedimentos desta etapa está ilustrada na figura 2.

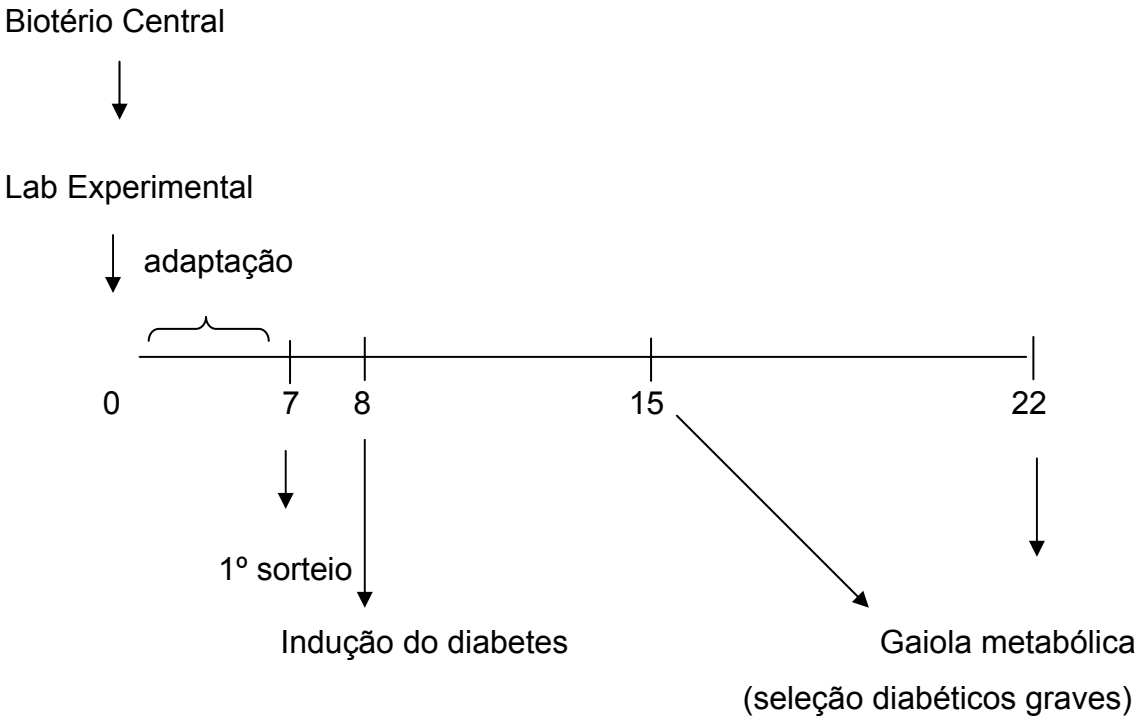


Figura 2. Seqüência inicial dos procedimentos executados com os animais.

3.2. Período de diabetes e seleção dos procedimentos cirúrgicos

Após o 14º dia da indução do diabetes, tanto os animais controles não diabéticos, como aqueles aprovados nos critérios estabelecidos para o diagnóstico de diabetes grave, foram acompanhados durante 3 meses. Durante este período, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas ao término do 1º e 3º mês de seguimento.

Completados os 3 meses, os animais foram novamente sorteados (2º sorteio) para a seleção dos animais a serem submetidos à anastomoses intestinais no íleo (G1 e G3, grupos controle normal e diabético, respectivamente) e à anastomoses intestinais no cólon (G2 e G4, grupos controle normal e diabético, respectivamente)

3.3. Momentos de avaliação e sacrifício

Definidos os grupos e os procedimentos cirúrgicos, foi realizado um 3º sorteio para a definição dos quatro períodos ou momentos de investigação, a saber (figura 3):

- M1: 3 meses e 4 dias após a indução do diabetes ou de seguimento (4º dia de pós- operatório);
- M2: 3 meses e 14 dias após a indução do diabetes ou de seguimento (14º dia de pós- operatório);
- M3: 3 meses e 21 dias após a indução do diabetes ou de seguimento (21º dia de pós- operatório);
- M4: 4 meses após a indução do diabetes ou de seguimento (30º dia de pós-operatório).

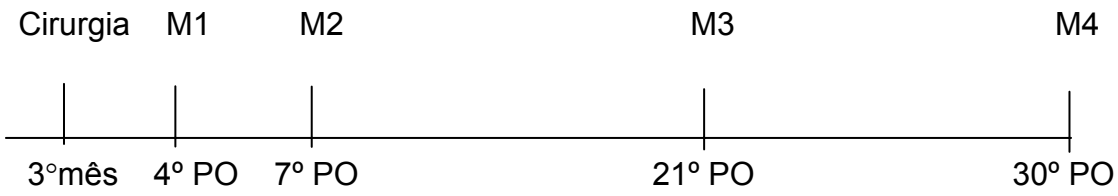


Figura 3. Síntese das etapas cumpridas nesta fase, nos quatro grupos experimentais.

Em cada um destes momentos de avaliação, 12 animais de cada grupo experimental foram submetidos à avaliação de parâmetros clínicos e laboratoriais, sendo sacrificados a seguir. Destes 12 animais sacrificados em cada momento, 6 foram sorteados para o estudo histopatológico à microscopia óptica e análise morfométrica da área ocupada pelas fibras colágenas na cicatriz, e 6 foram sorteados para o estudo da anastomose à microscopia eletrônica de varredura e posterior cálculo da dimensão fractal do arranjo estrutural do colágeno.

4. Técnicas utilizadas

4.1. Anestesia

Os procedimentos cirúrgicos, incluindo os utilizados para o sacrifício dos animais, foram realizados com o uso do pentobarbital sódico[2], administrado na dose de 30mg/kg de peso corporal por via intraperitoneal.

4.2. Indução do diabetes experimental

O diabetes experimental foi induzido pela administração de uma solução de aloxana a 2% por via endovenosa, na dose única de 42mg/kg de peso corporal, utilizando-se uma das veias da cauda do animal.

Após jejum alimentar de 12 horas, com fornecimento de água *ad libitum*, cada rato foi colocado em uma caixa aquecida com lâmpada elétrica por um período de aproximadamente 10 minutos (tempo necessário à dilatação das veias da cauda). A seguir, o animal foi contido em uma pequena caixa individual, ficando com sua cauda exposta. A droga foi inoculada por punção de uma das veias da cauda, utilizando uma agulha de calibre 13,0 x 4,5 mm. Decorridos 30 minutos, os animais foram realimentados normalmente.

Neste estudo foram considerados diabéticos graves apenas os animais que apresentaram glicemia de jejum acima de 200mg/dl e glicose urinária maior que 3+, em duas dosagens sucessivas (7 e 14 dias após a indução). Também foram avaliados parâmetros clínicos, como: perda de peso, aumento relevante da ingestão hídrica e diurese. Animais que não preencheram os critérios laboratoriais acima citados foram descartados do estudo, com ou sem parâmetros clínicos de diabetes.

---

[2] Cristália Produtos Químicos Farm. Ltda – Itapira - SP

4.3. Pré-operatório

Na véspera dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais foram submetidos a jejum de 12 horas com fornecimento de água *ad libitum*.

No dia da cirurgia foi realizada tricotomia ampla do abdômen e procedida anti-sepsia com álcool iodado a 2%. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições limpas, porém não estéreis.

4.4. Cirurgia

Todos os animais foram submetidos à incisão abdominal mediana de 5 cm de extensão, interessando inicialmente pele e subcutâneo, e posteriormente, o plano músculo-aponeurótico. A síntese destes planos foi realizada na ordem inversa da abertura, com sutura em pontos separados, distantes 3 mm um do outro, utilizando fio monofilamentar de nylon 5-0[3], com agulha triangular de 1,0cm.

Para a realização das anastomoses no intestino delgado, o íleo terminal foi seccionado transversalmente a 5 cm da válvula ileocecal. Para as anastomoses realizadas no intestino grosso, o cólon distal foi seccionado a 5 cm da deflexão peritoneal. Em ambos os casos, quando houve presença de fezes nos segmentos isolados, estas foram retiradas manualmente. As anastomoses foram realizadas em situação término-terminal, com fio de nylon 6-0[3], com agulhas cilíndricas de 1,3cm, em sutura contínua, plano único total.

Antibioticoterapia profilática foi utilizada em todos os animais diabéticos, durante todo o período de seguimento, pré e pós-cirúrgico, através da adição de tetraciclina[4] na água de beber, na dose de 50mg/kg de peso corporal por dia.

---

3 Ethicon – Johnson & Johnson Co. USA

4 EMS – Hortolândia – SP

4.5. Pós-operatório

Após o término do procedimento cirúrgico, os ratos foram alojados em caixas plásticas individuais, com assoalho forrado com palha, e colocados em ambiente aquecido, até a completa recuperação anestésica. Aproximadamente 6 horas após, foram oferecidas água e dieta livre.

Nos períodos determinados para a avaliação de parâmetros clínicos e laboratoriais e posterior sacrifício, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas, conforme descrito a seguir.

4.6. Metodologia empregada na coleta de dados metabólicos

Para a coleta de dados metabólicos, cada animal foi submetido a um esquema padronizado de avaliação, onde foi seguida a seguinte metodologia.

a) Colocação dos animais em gaiolas metabólicas individuais durante 24 horas.
b) Fornecimento de volume conhecido de água durante todo o período de 24 horas
c) Fornecimento de quantidade conhecida da ração NUVILAB-CR1[5] durante período noturno de 12 horas, seguido por um jejum alimentar de 12 horas.
d) Determinação, ao final do período, do peso do animal em gramas, do volume de água ingerida em 24 horas (ingestão hídrica de 24 horas em mililitros), da quantidade de alimento consumido em 12 horas (ingestão alimentar de 12 horas em gramas) e do volume de diurese de 24 horas em mililitros.
e) Coleta de amostra da urina coletada em 24 horas para a dosagem da glicose urinária, por imersão de fita, em cruzes.
f) Coleta de uma amostra de 1,5 ml de sangue para a dosagem da glicose plasmática, em miligramas por decilitro, após jejum de 12 horas, através da secção da ponta da cauda. Após a retirada do volume de sangue necessário para os exames laboratoriais, a cauda foi amarrada com fio de algodão 2-0 com finalidade hemostática.

[5] Nuvital – Nutrientes Produtos Veterinários ltda. – Curitiba - PR

g) Os animais foram mantidos em caixas individuais recebendo água e ração *ad libitum*.
h) Todas as amostras de sangue obtidas durante o sacrifício dos animais foram colhidas por punção cardíaca, com o tórax aberto.

4.7. Exames laboratoriais

4.7.1. Dosagens de glicose plasmática e urinária

As dosagens de glicemia foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, empregando-se o método por dosagem enzimática (glicose-E)[6].

As dosagens de glicosúria foram feitas pela imersão da fita na amostra de urina com o resultado em cruzes[7].

4.8. Estudo histopatológico e análise morfométrica da anastomose à microscopia óptica

4.8.1. Preparo das amostras

Um fragmento longitudinal de 0,5 cm de comprimento, contendo a anastomose foi fixado em solução de formol salina a 10%, por 48 horas, e a seguir, imerso em álcool 70%, por 24 horas, e incluído em parafina. Dos blocos obtidos foram cortados secções de 0,4 a 0,5μm de espessura, coradas pelo método pricrosírius. Três secções de cada animal foram avaliadas, pelo mesmo observador, de forma qualitativa, e a seguir, aplicado o método morfométrico nas imagens digitalizadas obtidas à microscopia óptica.

---

[6] CELM - Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos (Barueri – SP)

[7] GLUKOTEST – Roche (São Paulo – SP)

4.8.2. Análise histopatológica à microscopia óptica

As anastomoses foram avaliadas observando-se a distribuição e o arranjo das fibras colágenas, utilizando um aumento de 40x (lupa).

4.8.3. Método morfométrico

A área ocupada pelo colágeno, na região da anastomose de cada animal, foi determinada em equipamento do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu. As seguintes etapas foram seguidas para este procedimento:

- Captura das imagens: cada lâmina corada pelo método pricrosírius foi visualizada em microscópio óptico Nikon Microphot-FXA ligado ao equipamento de análise de imagem (microcomputador compatível com padrão IBM-PC e software KS300).

- Em aumento de 40x (lupa), obteve-se imagem panorâmica de toda a lâmina que continha a anastomose.

- Foi definida como cicatriz (local para a medição da área), a região onde havia a perda da continuidade entre as camadas musculares (figura 4). Esta região foi considerada “área de interesse” e selecionada do restante da imagem.

- Toda a análise foi realizada com imagens de 640x480 pixels, equivalente ao campo visualizado no microscópio e exibida pelo software KS300, gravada no formato TIFF.

- Depois de selecionada a área de interesse (cicatriz), foram geradas “máscaras”, que auxiliaram o software a executar a análise. Neste processo foi considerada apenas a região desejada nas imagens capturadas, tendo sido utilizado na avaliação a ferramenta *Threshold RGB*, que consiste num processo de segmentação das cores (vermelha, verde e azul) correspondentes às áreas de interesse nos histogramas de cores da imagem. Este procedimento permitiu a seleção, dentro da imagem, da região da anastomose rica em colágeno, reconhecida pela cor avermelhada. Através da seleção manual da faixa do histograma correspondente ao tom de vermelho desejado, dentro da cicatriz, foi possível ao software selecionar outras regiões da imagem com tonalidades semelhantes àquela indicada. A fim de estender ou restringir a seleção

automática, foram realizados ajustes nos canais das cores vermelho, verde ou azul do histograma, a fim de que o mínimo de área de interesse fosse negligenciada. Ao final, a "máscara" obtida consistiu em uma nova imagem da qual foram suprimidas as regiões que não atenderam aos critérios de seleção descritos anteriormente.

- Análise da imagem: a ferramenta *Automatic measurement* foi empregada para determinar a área da região selecionada em mm².

Figura 4. Anastomose intestinal à microscopia óptica, corada pelo picrosírius, em aumento de 40x. A área de interesse onde se realizou a medida da área ocupada pelo colágeno está demarcada por setas.

4.9. Análise ultraestrutural das fibras de colágeno e cálculo da dimensão fractal do arranjo estrutural do colágeno presente na cicatriz

4.9.1. Análise ultraestrutural das fibras de colágeno à microscopia eletrônica de varredura

As áreas de anastomoses intestinais de seis animais sorteados de cada grupo experimental, em cada momento, foram analisadas na microscopia

eletrônica de varredura, seguindo a seguinte padronização de preparo das amostras:

- Amostras de íleo e cólon 1x1cm contendo a anastomose foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato, pH 7,3, por um período de 7 a 15 dias.
- Digestão em NaOH 10% por 48 horas. Este período foi estabelelcido após plano piloto, pois, apesar de já existir padronização do laboratório, o melhor tempo de digestão para análise do colágeno nunca havia sido estabelecido.
- Lavagem em água destilada (10 vezes de 10 minutos cada).
- Pós fixação em tetróxido de ósmio 0,5% em água destilada por 30 minutos.
- Desidratação em série crescente de etanol (7,5% a 100%)
- Secagem das peças em aparelho de ponto crítico Balzers CPD-020, utilizando o dióxido de carbono líquido.
- Montagem das amostras em suportes apropriados.
- Cobertura das amostras com 10nm de ouro em metalizador MED-010 da Balzers.
- Análise das amostras em microscópio eletrônico de varredura QUANTA 200 da Fei Company, sob tensão de 15 kv, em aumentos de 90 a 3000 vezes, cujas imagens foram digitalizadas por computador (processador Pentium-Pró, sistema Windows NT).

4.9.2. Processamento das imagens e cálculo da dimensão fractal do arranjo estrutural do colágeno

Foram utilizadas as imagens obtidas no microscópio eletrônico de varredura citado anteriormente, em aumento de 700x. O aplicativo utilizado para o processamento e análise das imagens foi o ImageJ 1.34p (NIH-USA-Java 1.5.0-03 – última versão de 9/6/2005), um processador de imagens em Java, de domínio público, desenvolvido por Wayne Rasband (wayne@codon.nih.gov) do Research Services Branch - National Institute of Mental Health - National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Bethesda, Maryland, USA

(http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html). Encontra-se também disponível na internet no sítio da Wright Cell Imaging Facility (http://www.uhnresearch.ca/wcif).

Para a obtenção da dimensão fractal as imagens foram inicialmente processadas para imagens binárias e, em seguida, esqueletizadas, pois o aplicativo utilizado detecta somente pixels negros em fundo branco ou vice-versa.

As imagens das anastomoses obtidas no microscópio eletrônico por varredura foram processadas de forma a compor imagens binárias pelo método *Thresholding* ou Detecção de Limiares. Este método é uma técnica de segmentação que agrupa os diferentes objetos e regiões de toda a imagem, conforme a similaridade de tonalidades (nível de intensidade luminosa) entre os mesmos. No processo de limiarização, o *software* define automaticamente um valor médio *T* de limiar para o nível de intensidade luminosa e procede ao ponto de corte (binarização) da imagem. No caso de nossas imagens, em 256 tons de cinza, abaixo do ponto de corte *T*, todas as tonalidades tornam-se informações de fundo da imagem (valor 0 binário, ou cor preta). Os demais valores além desse limiar tornam-se informações correspondentes aos objetos da imagem (valor 1 binário, ou cor branca). O método mostra-se válido quando as figuras apresentam uma boa definição de contraste entre as regiões, como no nosso caso.

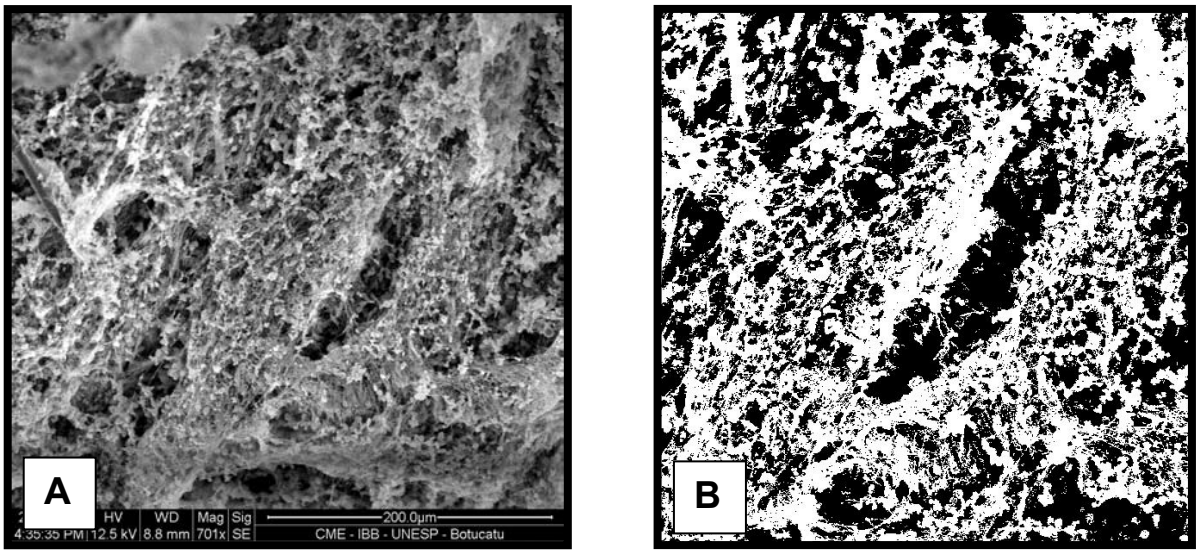


Figura 5. Imagem do arranjo colágeno da anastomose intestinal à microscopia eletrônica de varredura, em aumento de 700x (A), a partir da qual foi realizado processo de binarização/ detecção de limiares ou *Tresholding* (B).

Após isso, procedeu-se ao tratamento da imagem binarizada utilizando o filtro de esqueletização. O procedimento deste filtro remove repetidamente os pixels dos contornos das imagens binárias até a redução dos contornos a um único pixel de largura, configurando assim, um esqueleto da imagem desejada para análise fractal (figura 6).

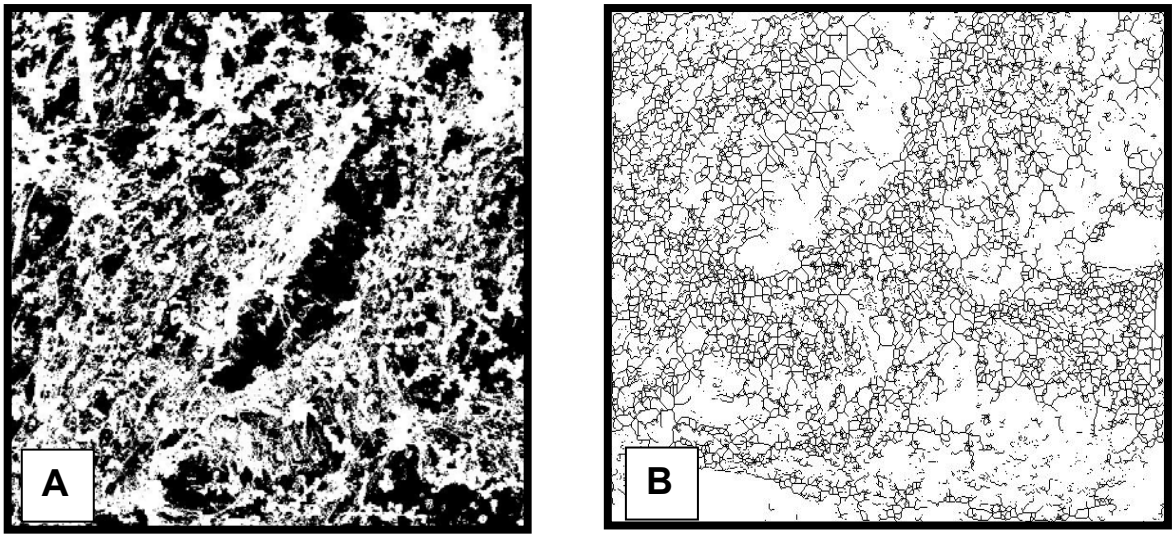


Figura 6. Imagem binarizada de anastomose intestinal à microscopia eletrônica de varredura (A), a partir da qual foi aplicado processo de esqueletização (B).

A realização da análise fractal consiste em determinar as dimensões fractais que identificam ou dão boas informações sobre o comportamento dos sistemas naturais: Dimensão *Box-Counting*, Dimensão Espectral, Dimensão de Lyapunov, Dimensão *Pointwise*. Desses métodos, o mais utilizado é o *Box-Counting*. Este tipo de dimensão fractal (DF) é o mais utilizado pela ciência cotidiana e se aplica a objetos que variam de 0 a 2 dimensões. A dimensão *Box-Counting* consiste em analisar a variação da densidade de um objeto. Para isso, o espaço Euclidiano contendo a imagem fractal que se deseja medir é dividido por uma grade de caixas com lado de tamanho '*r*' (fator escala) e o número de caixas que são preenchidas pela imagem (*N)* é contado. A relação do fator de escala (*r*) e o número de caixas (*N*) é de ordem exponencial, regida por uma equação do tipo $N = (1/r)^{D} = r^{-D}$ onde *D* corresponde à dimensão da imagem analisada, naquela escala.

Colocando D em evidência, tem-se: $D = \frac{logN}{log\frac{1}{r}}$.

O fator escala *'r'* é então progressivamente reduzido e o valor de *N* é determinado para cada um dos menores valores de '*r*'. Conforme a relação exposta acima, os valores são plotados em gráfico e a Dimensão fractal (DF) ou Dimensão pelo *Box-counting* é obtida pelo gradiente de declinação da reta obtida. Estes passos são realizados pelo aplicativo utilizado. A figura 7 mostra o processo do *Box-Counting*.

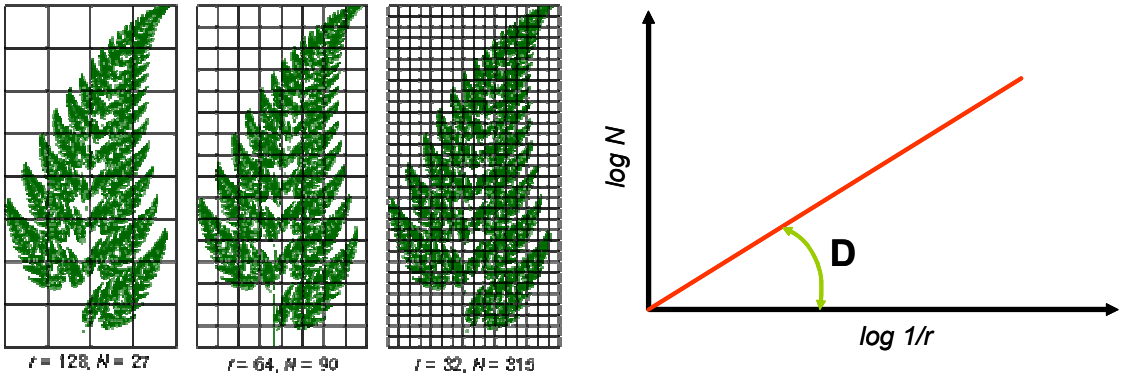


Figura 7. Esquematização de obtenção da Dimensão Fractal (D) pelo método *Box-counting*.

Para este cálculo, utilizou-se o dispositivo FracLac V2.3 (FracLac-.java) versão 2005, desenvolvido por A. Karperian da Charles Sturt University – Austrália, um *plugin* do ImageJ, anteriormente citado. O dispositivo analisa imagens binárias mediante sua varredura com múltiplas "grades" de vários pixels de dimensão, fornecendo os resultados pelo método "*Box counting*".

Esta análise mediu o grau de complexidade do arranjo do colágeno presente na anastomose. O resultado foi apresentado na forma gráfica descrita anteriormente com o valor da dimensão fractal média corrigida mediante remoção das lacunas horizontais entre os pontos plotados (*horizontal slope removed*) e erro padrão da média de todos os pontos analisados (figura 8).

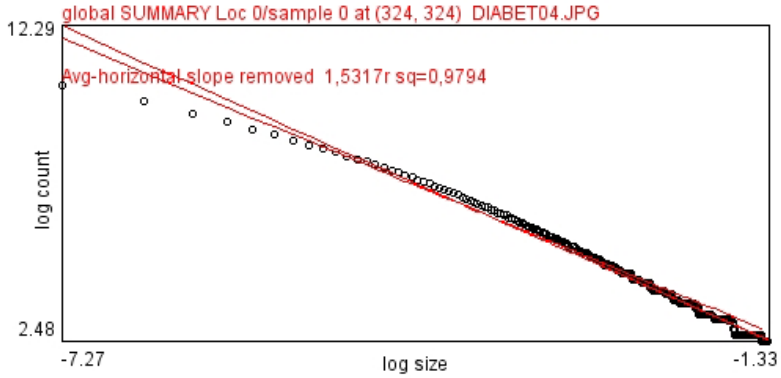


Figura 8. Demonstração gráfica do cálculo da dimensão fractal pelo dispositivo utilizado, com remoção das lacunas horizontais (*horizontal slope removed)* e erro padrão da média da amostra analisada.

5. Análise estatística

Os estudos de todas as variáveis deste trabalho, nos quatro grupos experimentais e quatro momentos de sacrifício foram realizados através da análise de variância paramétrica, pois os dados mostraram aderência à distribuição normal de probabilidade. O teste foi complementado com o procedimento de comparações múltiplas para indicar as significâncias ($p<0,05$) entre grupos, fixado momento, e momentos, dentro do grupo (NORMAN, 1998).

Para indicação dos resultados do teste de comparações múltiplas, foram utilizadas letras minúsculas na comparação dos momentos dentro do grupo e maiúsculas para comparação entre grupos, fixado o momento. A interpretação das letras pode ser feita da seguinte maneira:

1. duas médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula, não diferem entre si no nível de 5% de significância. Isto é, os momentos de sacrifício respondem igualmente para a variável em comparação dentro do grupo considerado.

2. duas médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula, não diferem entre si no nível de 5% de significância. Isto é, os grupos

correspondentes às médias, respondem para a variável em observação com a mesma intensidade, dentro do momento fixado.

Resultados

1. Método de indução do diabetes

A indução do diabetes através da injeção de aloxana endovenosa foi realizada sem dificuldades, devido à colocação prévia dos mesmos em uma caixa aquecida, provocando vasodilatação das veias da cauda do animal.

Foram considerados diabéticos graves os animais que apresentaram no período pós-indução, valores de glicemia acima de 200mg/dl e de glicosúria maior ou igual a 3+, presentes no 7^{o} e no 14^{o} dias após a indução com aloxana, além dos parâmetros clínicos como perda progressiva de peso, aumento significativo da ingestão hídrica, da ingestão alimentar e da diurese.

Do total de 689 animais utilizados neste estudo, 586 animais foram submetidos à injeção de aloxana endovenosa. Destes, 126 (21,5%) não ficaram diabéticos, ou o fizeram de forma leve ou moderada, e por isso foram excluídos deste estudo. Dos 460 animais restantes que se tornaram diabéticos graves, 198 (33,8%) foram a óbito após a injeção de aloxana; 124 (21,1%) morreram durante o experimento, em decorrência de complicações do diabetes e 138 foram submetidos à cirurgia. Desses, 96 permaneceram vivos nos seus respectivos grupos até o momento do sacrifício.

2. Evolução clínica

2.1. Grupo controle normal

Os animais dos grupos G1 (grupo controle normal operado no íleo) e G2 (grupo controle normal operado no cólon) apresentaram evolução clínica semelhante em todo o experimento, sendo sacrificados em bom estado geral (figura 9B), sem alterações dos parâmetros clínicos representados pelo peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, que se mantiveram dentro de valores esperados para ratos sadios de mesma idade. Os valores encontrados estão representados nas tabelas 1, 2, 3 e 4, e nas figuras 10, 11, 12 e 13 , com as análises estatísticas e comentários.

Nos grupos controles normais, foram submetidos à cirurgia 96 animais, dos quais 7 foram a óbito após a cirurgia, antes do momento de sacrifício, sendo 5 animais do grupo de anastomoses no cólon, e 2 do grupo de anastomoses no

íleo, por deiscência da anastomose e subseqüente peritonite, sendo necessária a reposição do animal, com uma mortalidade pós-operatória de 7,3%.

2.2. Grupos de animais diabéticos

Os animais dos grupos G3 (grupo de animais diabéticos operados no íleo) e G4 (grupo diabético operado no cólon) apresentaram comportamento clínico semelhante entre si durante todo o acompanhamento e bastante distinto dos grupos de animais não diabéticos. Estes animais evoluíram com parâmetros clínicos e laboratoriais compatíveis com diabetes grave e apresentaram, ao longo do seguimento, progressiva queda do estado geral, perda inicial de peso após a indução e ganho significativamente menor de peso em relação aos grupos de animais não diabéticos (figura 9A). Também foram observadas alterações na pelagem, distensão abdominal, catarata bilateral e episódios freqüentes de pneumonia e piodermite. Estas últimas alterações foram controladas com higiene local das feridas com gaze embebida em solução fisiológica 0,9%.

Figura 9. Ratos com três meses de seguimento, demonstrando a debilidade e caquexia do animal diabético (A), quando comparado a um animal normal de mesma idade (B).

A ingestão hídrica e a diurese dos animais diabéticos apresentaram valores significativamente elevados quando comparados aos observados em ratos não diabéticos de mesma idade de sacrifício. Entre os momentos de avaliação, os animais operados no íleo, apresentaram aumento progressivo da

diurese de M1 até o momento M4. Não houve variação entre os momentos dos animais diabéticos operados no cólon.

Ao final de 12 horas, a medida da ingestão alimentar, obtida pela subtração entre a pesagem do alimento oferecido e o alimento restante na gaiola, tanto nos animais operados no íleo como no cólon, foi maior nos animais dos grupos diabéticos, com exceção do momento M2.

Os dados, gráficos e análises estatísticas destes grupos encontram-se representados juntamente com os grupos de animais não diabéticos, nas tabelas 1, 2, 3 e 4 e nas figuras 10, 11, 12 e 13, já mencionadas.

Foram submetidos à cirurgia 138 animais diabéticos, dos quais 42 foram a óbito durante ou após o ato cirúrgico, antes do momento do sacrifício (mortalidade pós-operatória de 30,43%), sendo 18 durante a anestesia, e o restante por peritonite decorrente da deiscência da anastomose, sendo 15 ratos do grupo de anastomose no cólon, e 9 do grupo de anastomose no íleo.

Tabela 1. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação do peso corporal, em gramas, nos grupos e momentos de avaliação.

	ÍLEO		CÓLON	
Momentos de avaliação	G1 –Normal operado íleo	G3 – Diabético operado íleo	G2 – Normal operado cólon	G4 - Diabético operado cólon
3m 4 dias (M1)	399,5±43,95 a A	253,42±34,22 a B	416,08±33,6 a A	265,58±35,91 a B
3m14 dias (M2)	425,58±41,75 a A	285,17±41,3 a B	422,25±50,19 a A	245,83±44,97 a B
3m 21 dias (M3)	407,0±27,8 a A	263,67±38,73 a B	399,55±28,1 a A	240,17±31,03 a B
4 meses (M4)	434,91±23,89 a A	276,33±37,31 a B	415,17±32,52 a A	265,58±35,91 a B

Comentários: A comparação entre os grupos mostrou que os animais diabéticos, tanto operados no íleo como no cólon (G3 e G4), em todos os momentos, tiveram média de peso significativamente inferior aos grupos controles normais (G1 e G2).

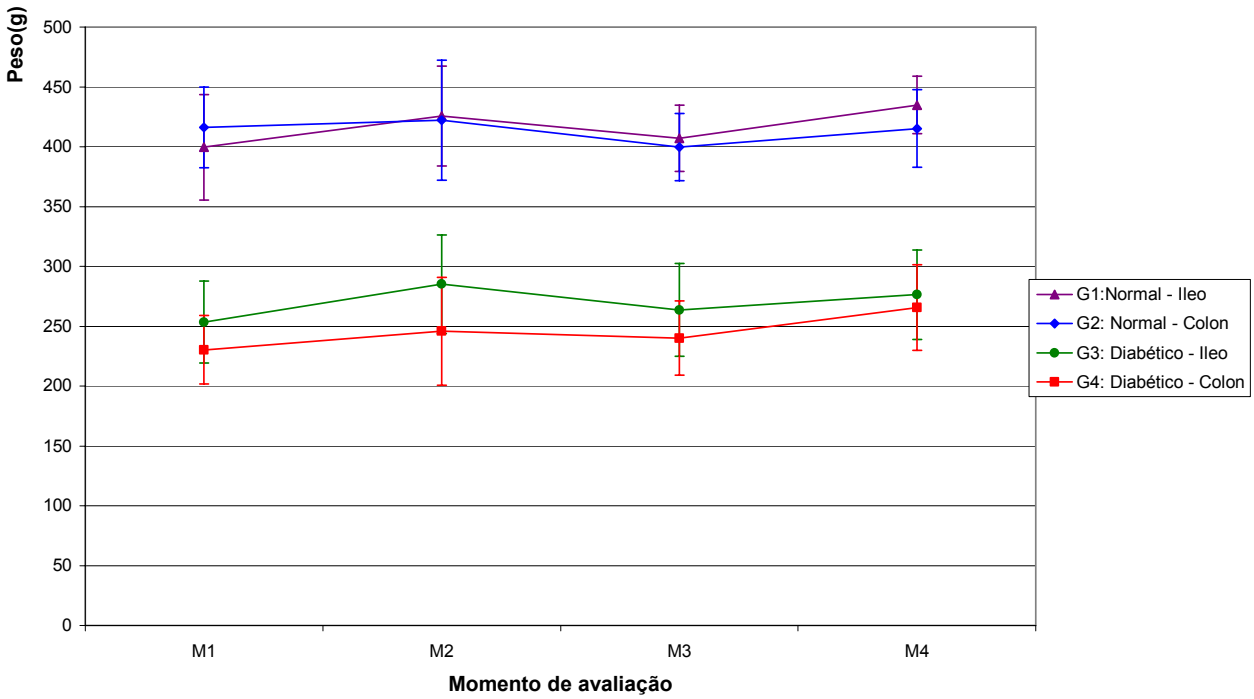


Figura 10. Médias e desvios-padrão do peso, em gramas, nos quatro grupos experimentais, nos respectivos momentos de avaliação.

Tabela 2. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da ingestão hídrica, em ml/24 horas, nos grupos e momentos de avaliação.

	ÍLEO		CÓLON	
Momentos de avaliação	G1 –Normal operado íleo	G3 – Diabético operado íleo	G2 – Normal operado cólon	G4 - Diabético operado cólon
3m 4 dias (M1)	30,92±2,94 a A	177,5±44,6 a B	31,25±5,31 a A	178,83±49,63 a B
3m14 dias (M2)	40,08±10,10 a A	160,42±38,33 a B	40,5±11,76 a A	169,5±35,53 a B
3m 21 dias (M3)	43,17±10,8 a A	206,0±27,06 a B	45,73±12,61 a A	181,67±37,9 a B
4 meses (M4)	34,36±7,95 a A	203,08±26,27 a B	34,92±7,3 a A	189,92±46,63 a B

Comentários: Os grupos diabéticos, tanto operados no íleo como no cólon (G3 e G4), em todos os momentos, apresentaram valores da ingestão hídrica significativamente elevados, quando comparados aos apresentados pelos grupos controles.

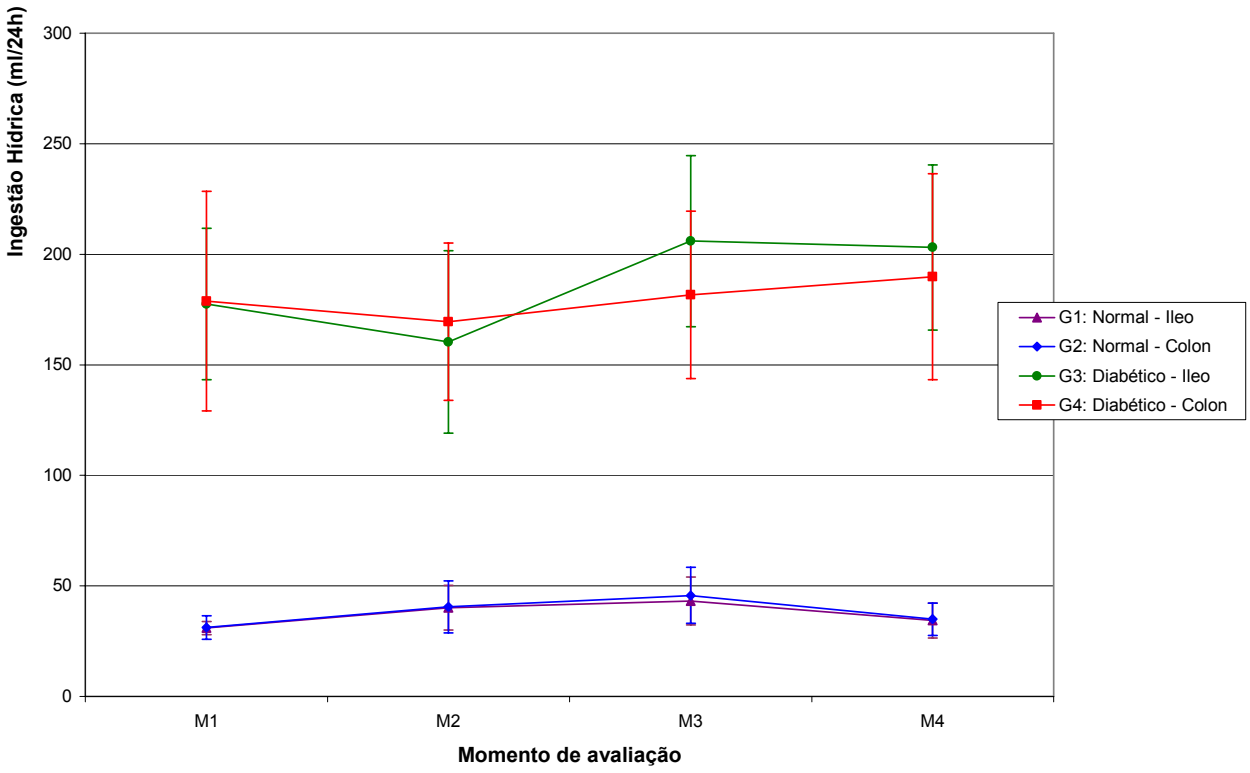


Figura 11. Médias e desvios-padrão da ingestão hídrica, em ml/24 horas, nos quatro grupos experimentais, nos respectivos momentos de avaliação.

Tabela 3. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da ingestão alimentar, em g/12 horas, nos grupos e momentos de avaliação.

	ÍLEO		CÓLON	
Momentos de avaliação	G1 –Normal operado íleo	G3 – Diabético operado íleo	G2 – Normal operado cólon	G4 - Diabético operado cólon
3m 4 dias (M1)	20,58±3,68 a A	27,0±6,48 a B	22,92±4,52 a A	27,67±6,3 a B
3m14 dias (M2)	24,08±2,5 a A	27,42±5,99 a A	24,83±2,33 a A	27,33±4,38 a A
3m 21 dias (M3)	22,33±4,66 a A	31,92±5,99 a B	24,0±5,59 a A	30,92±4,46 a B
4 meses (M4)	26,09±4,21 a A	31,92±5,5 a B	23,5±5,93 a A	30,5±6,17 a B

Comentários: A ingestão média de alimentos, tanto nos animais operados no íleo como no cólon, em geral, foi significativamente maior nos animais diabéticos, à exceção do momento M2, onde as médias não diferiram estatisticamente.

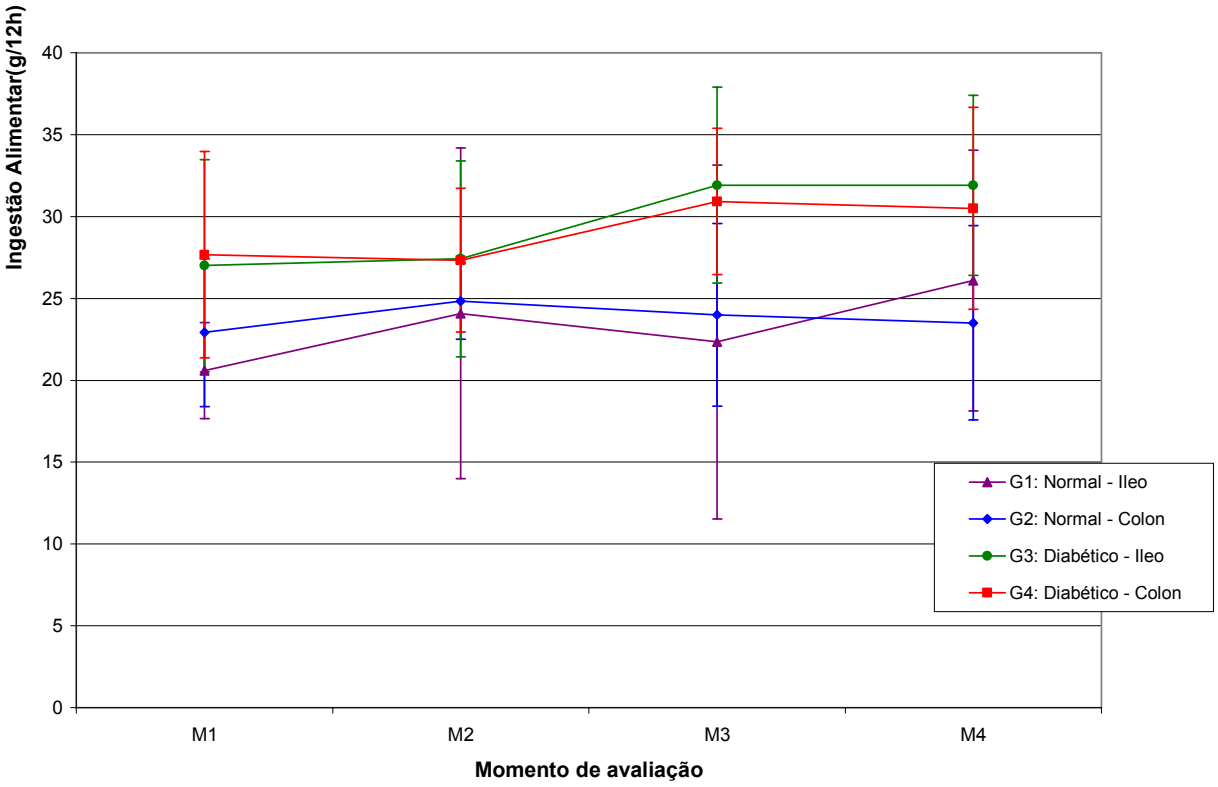


Figura 12. Médias e desvios-padrão da ingestão alimentar em g/12 horas, nos quatro grupos experimentais, nos respectivos momentos de avaliação.

Tabela 4. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da diurese, em ml/24 horas nos grupos e momentos de avaliação.

Momentos de avaliação	G1 –Normal operado íleo	G2 – Normal operado cólon	G3 – Diabético operado íleo	G4 - Diabético operado cólon
3m 4 dias (M1)	3,58±1,08 a A	3,58±2,02 a B	111,0±39,15 a A	109,92±44,11 a B
3m14 dias (M2)	7,33±3,26 a A	5,17±3,07 a B	87,67±29,12 a A	106,25±27,36 a B
3m 21 dias (M3)	6,83±3,51 a A	6,91±3,36 a B	124,67±25,46 b A	109,67±32,68 a B
4 meses (M4)	5,55±2,3 a A	6,0±3,3 a B	130,08±17,3 c A	122,25±32,69 a B

Comentários: A diurese foi significativamente maior nos animais diabéticos em relação aos grupos não diabéticos em todos os momentos de avaliação, tanto nos animais operados no íleo, como no cólon.

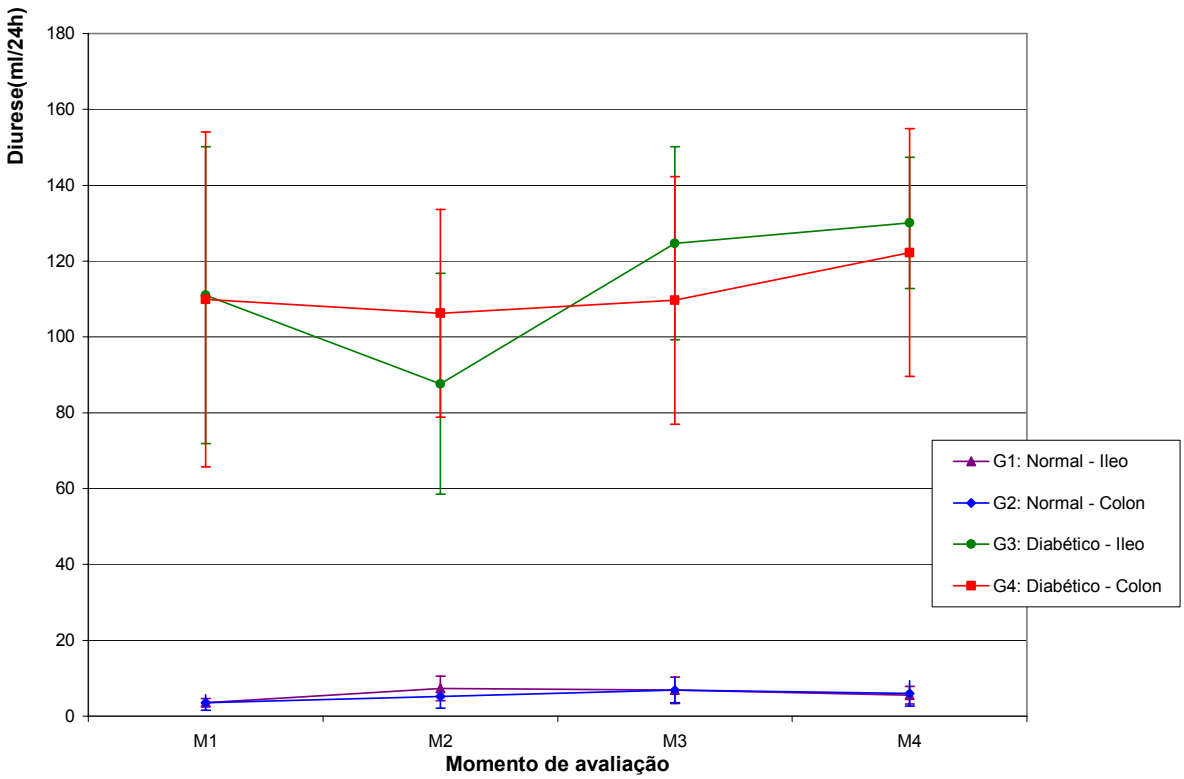


Figura 13. Médias e desvios-padrão da diurese, em ml/24 horas, nos quatro grupos experimentais, nos respectivos momentos de avaliação.

3. Exames laboratoriais

3.1 Grupos de animais não-diabéticos (G1 e G2)

Os animais pertencentes a este grupo não apresentaram quaisquer alterações nas dosagens laboratoriais realizadas durante todo o experimento, mantendo os valores de glicemia e medida da glicose urinária em fitas reagentes compatíveis com os apresentados por ratos sadios de mesma espécie e idade.

Os dados relativos às dosagens da glicemia de jejum estão representados na tabela 5 e na figura 14, juntamente com seus respectivos comentários.

3.2 Grupos de animais diabéticos (G3 e G4)

Todos os animais acompanhados nestes grupos apresentaram alterações laboratoriais compatíveis com diabetes grave, representadas por glicemia de jejum acima de 200mg/dl e glicosúria de 3+. As diferenças observadas ao longo do experimento foram estatisticamente significativas quando comparadas aos grupos de animais não diabéticos (G1 e G2).

Os dados referentes a estes achados, seu gráfico e comentários encontram-se na tabelas 5 e figura 14, juntamente com os dados do grupo controle normal.

Tabela 5. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da glicemia de jejum, em mg/dl, nos grupos e momentos de avaliação.

	ÍLEO		CÓLON	
Momentos de avaliação	G1 –Normal operado íleo	G3 – Diabético operado íleo	G2 – Normal operado cólon	G4 - Diabético operado cólon
3m 4 dias (M1)	84,83±24,86 a A	372,67±53,32 a B	72,33±11,63 a A	390,92±42,82 a B
3m14 dias (M2)	111,92±13,93 a A	369,42±45,01 a B	108,58±11,92 b A	355,17±48,5 b B
3m 21 dias (M3)	104,42±23,56 a A	387,33±66,57 a B	104,64±19,87 b A	414,25±62,54 c B
4 meses (M4)	107,18±13,97 a A	416,33±28,95 a B	110,25±10,52 b A	412,75±43,41 c B

Comentários: Nos grupos controles não-diabéticos (G1 e G2), os níveis glicêmicos mantiveram-se dentro dos padrões da normalidade para a espécie. Os grupos diabéticos (G3 e G4) apresentaram valores glicêmicos significativamente superiores aos grupos controles, em todos os momentos de avaliação.

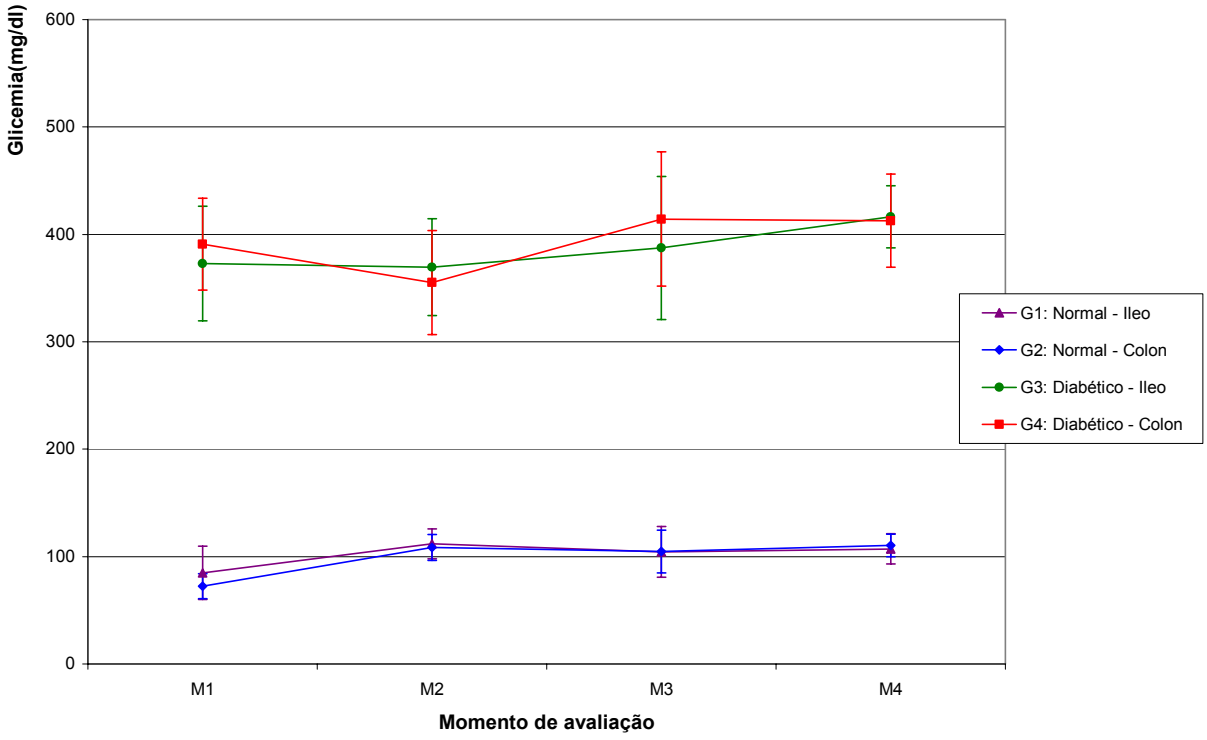


Figura 14. Médias e desvios-padrão da glicemia de jejum, em mg/dl, nos quatro grupos experimentais, nos respectivos momentos de avaliação.

4. Análise histopatológica à microscopia óptica

As figuras numeradas de 15 a 22 ilustram os achados histopatológicos observados à microscopia óptica, ao nível das anastomoses realizadas no íleo e no cólon, de animais oriundos dos quatro grupos experimentais, nos vários momentos de avaliação, pela coloração do pricrosírius. Observa-se que os animais dos grupos diabéticos sempre apresentaram anastomoses mais alargadas, com o colágeno distribuído em maior espaço, de forma irregular, e com maior quantidade de espaços vazios, não corados pelo pricrosírius. Animais destes grupos apresentaram, ainda, atraso na retração da cicatriz, até o 30º dia de pós-operatório, em relação aos grupos controles normais, tanto no íleo como no cólon; sendo esta característica ainda mais intensa nos animais diabéticos submetidos à anastomose no cólon.

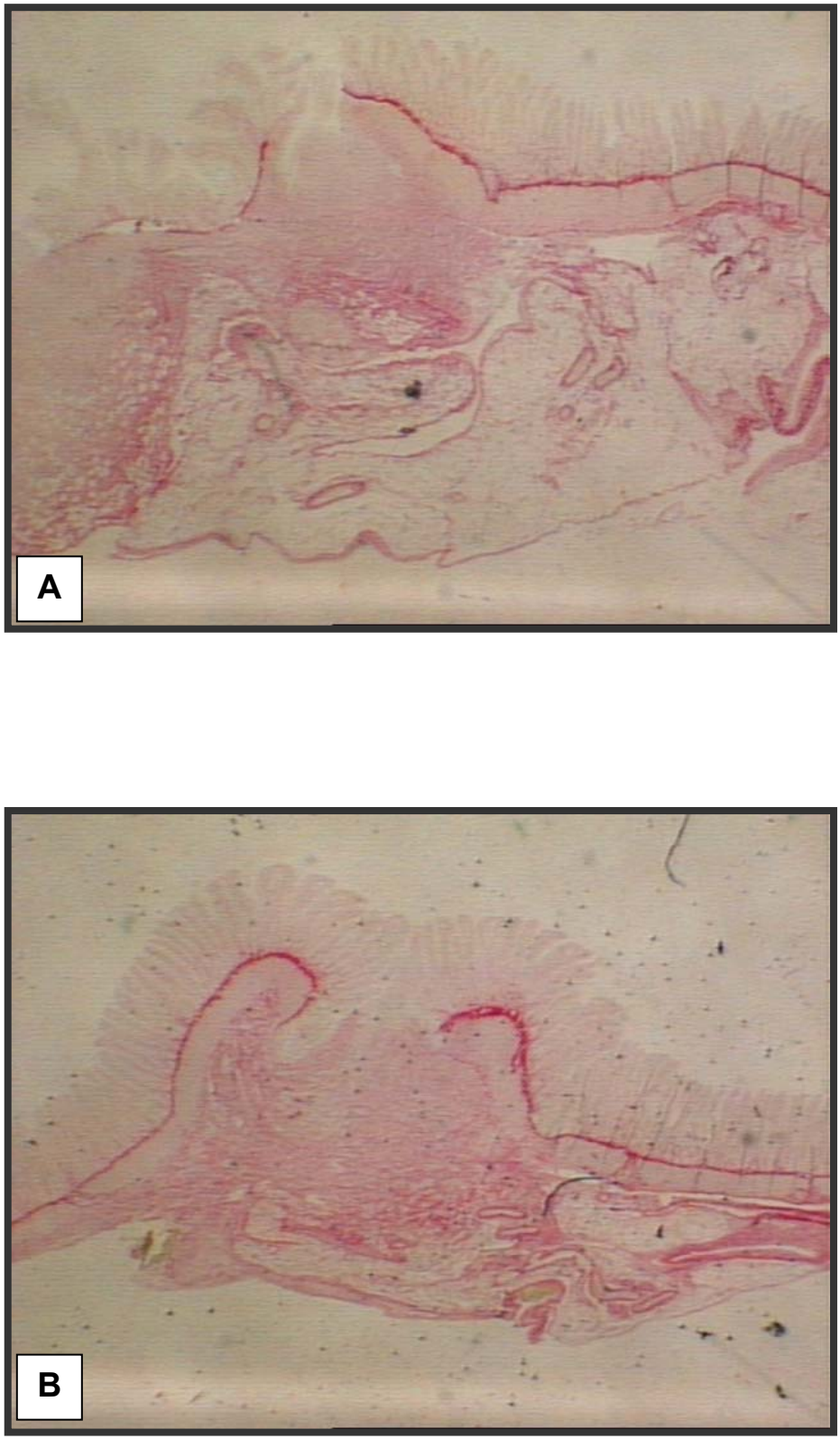


Figura 15: Anastomose de íleo, em ratos do grupo controle normal (A) e grupo diabético (B), no 4º dia de pós-operatório, onde nota-se alargamento da cicatriz no animal diabético, com o colágeno ocupando maior espaço, quando comparado ao animal controle (aumento 40x).

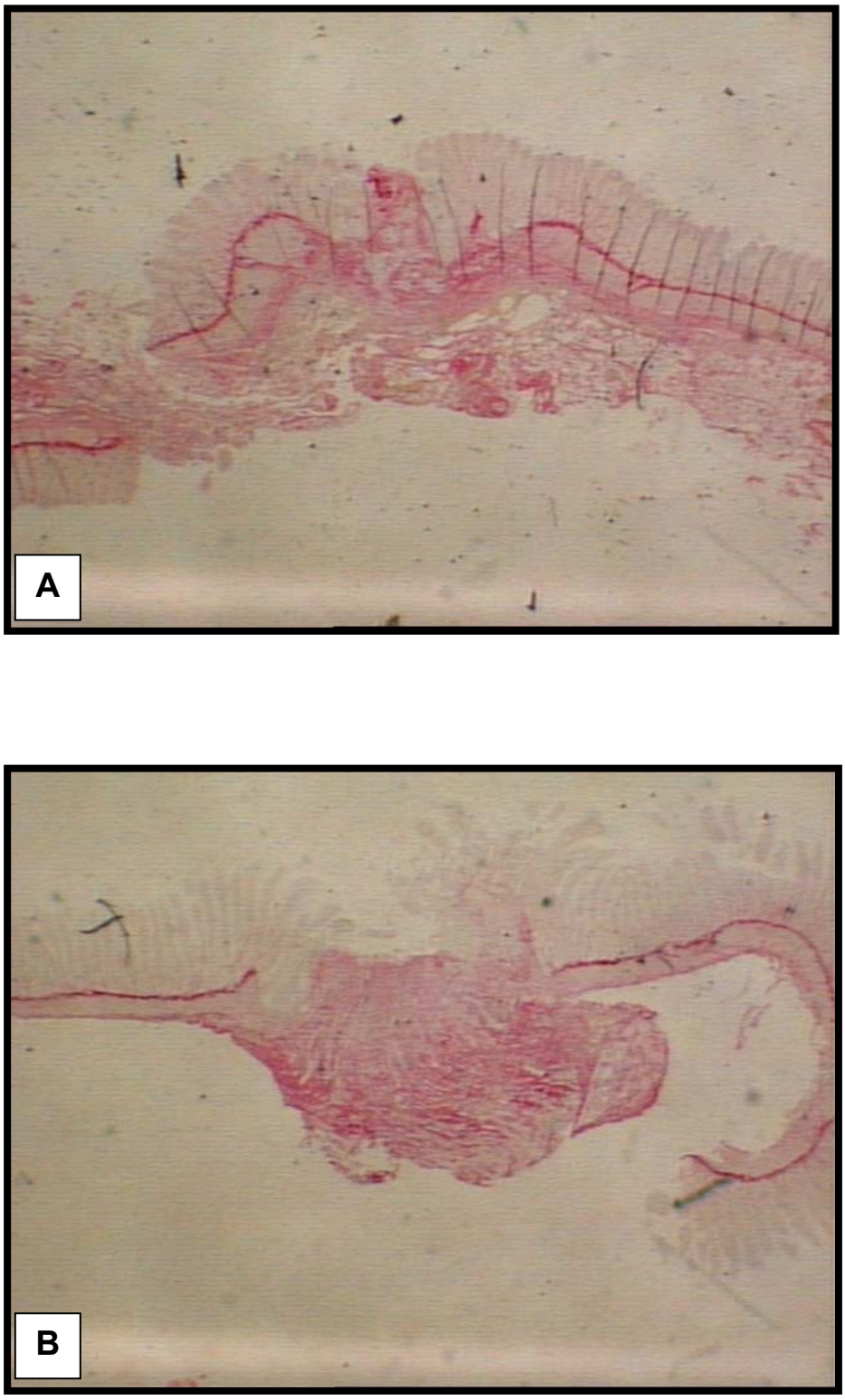


Figura 16: Anastomose de íleo em ratos do grupo controle normal (A) e grupo diabético (B), no 14º dia de pós-operatório, onde se nota retração cicatricial no animal do grupo controle quando comparado com o animal do grupo diabético (aumento 40x).

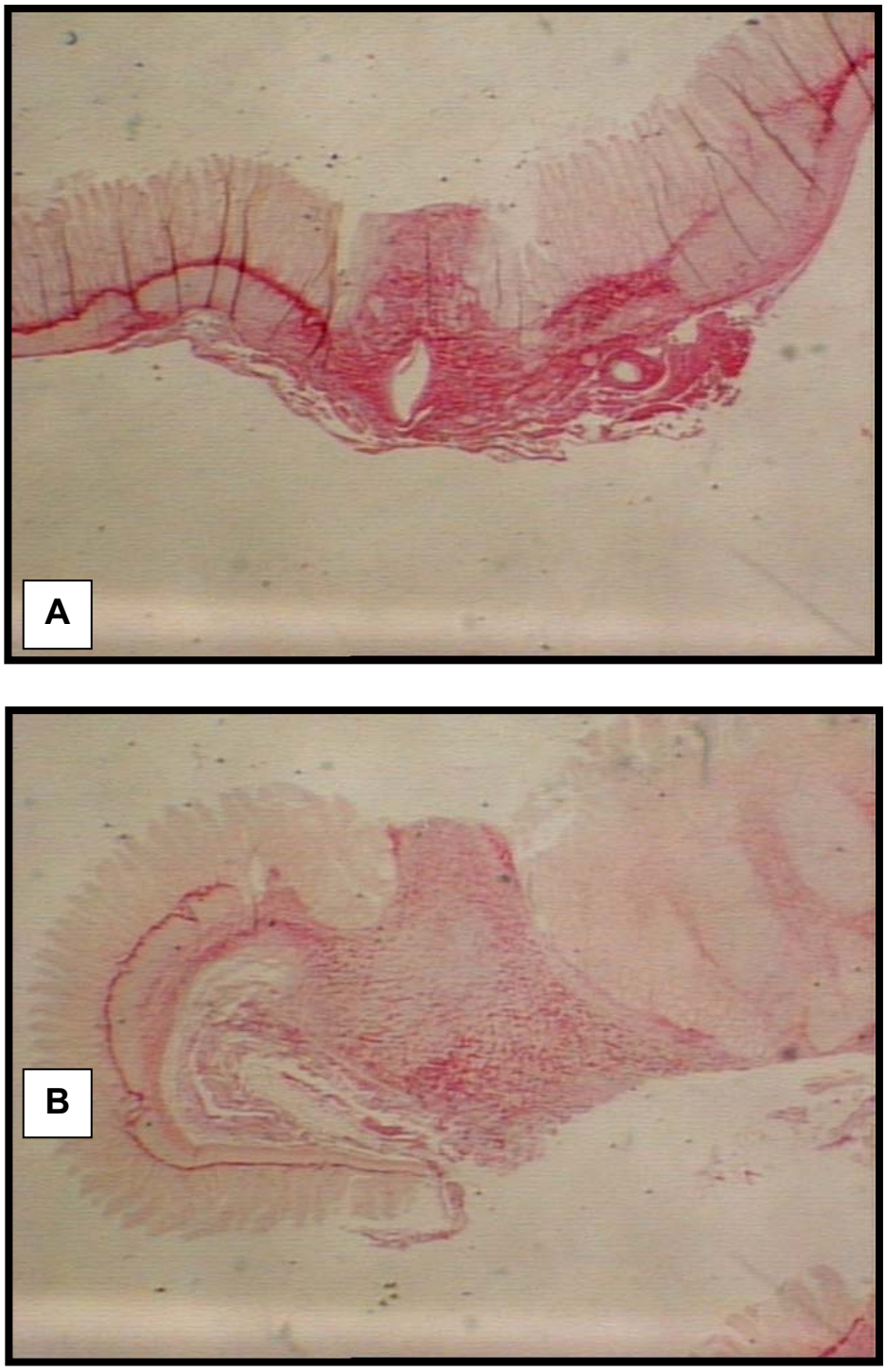


Figura 17: Anastomose de íleo em rato normal e diabético, no 21º dia de pós-operatório. No animal do grupo controle (A), há maior concentração das fibras colágenas coradas em rosa, em comparação com o animal do grupo diabético (B), onde as fibras colágenas apresentaram arranjo irregular, ocupando maior espaço, com menor retração da cicatriz (aumento 40x).

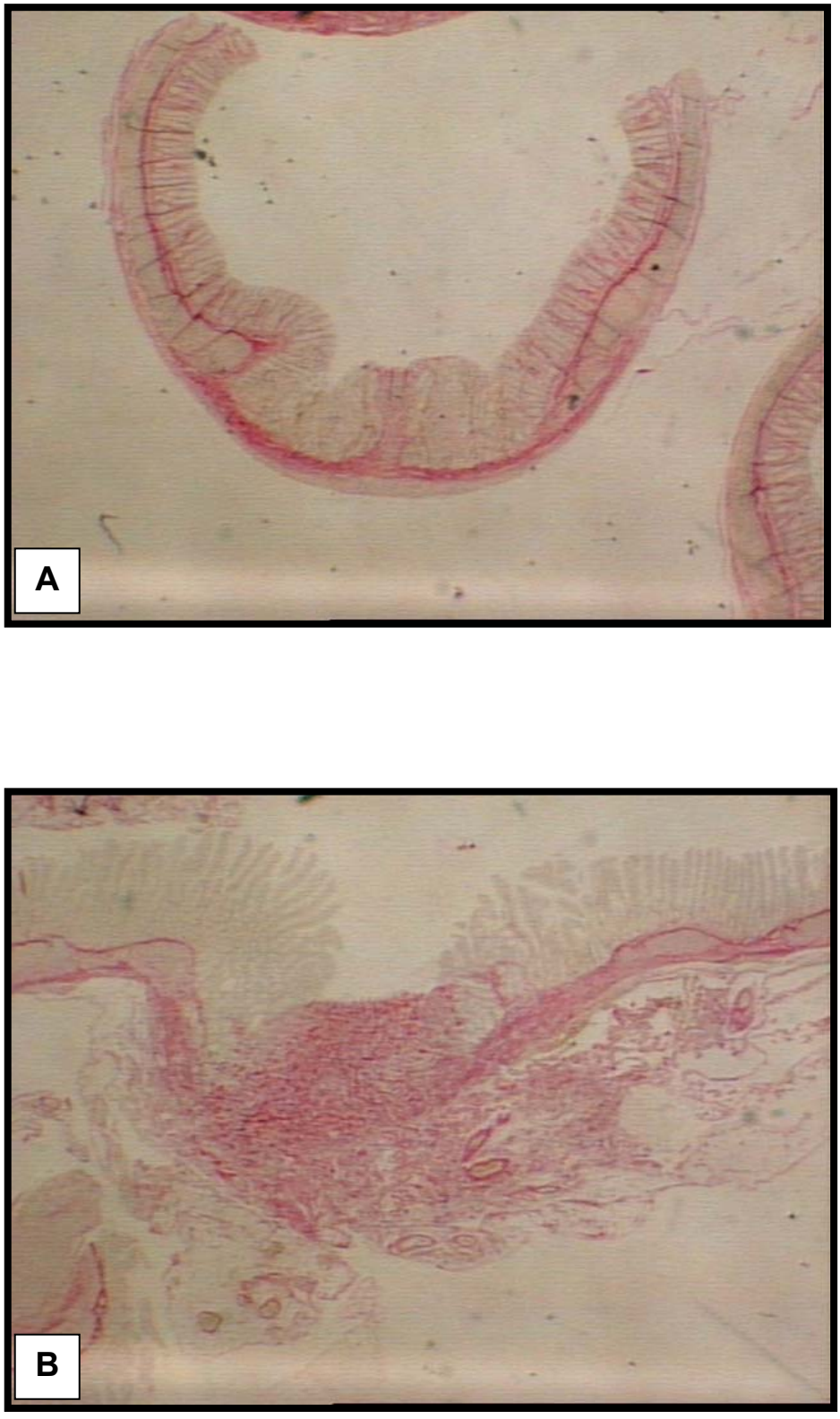


Figura 18: Anastomose de íleo em rato normal e diabético, no 30º dia de pós-operatório, onde se observa total retração da cicatriz no animal do grupo controle normal (A), em comparação ao desarranjo das fibras colágenas e o retardo na retração da cicatriz no animal diabético (B) (aumento 40x).

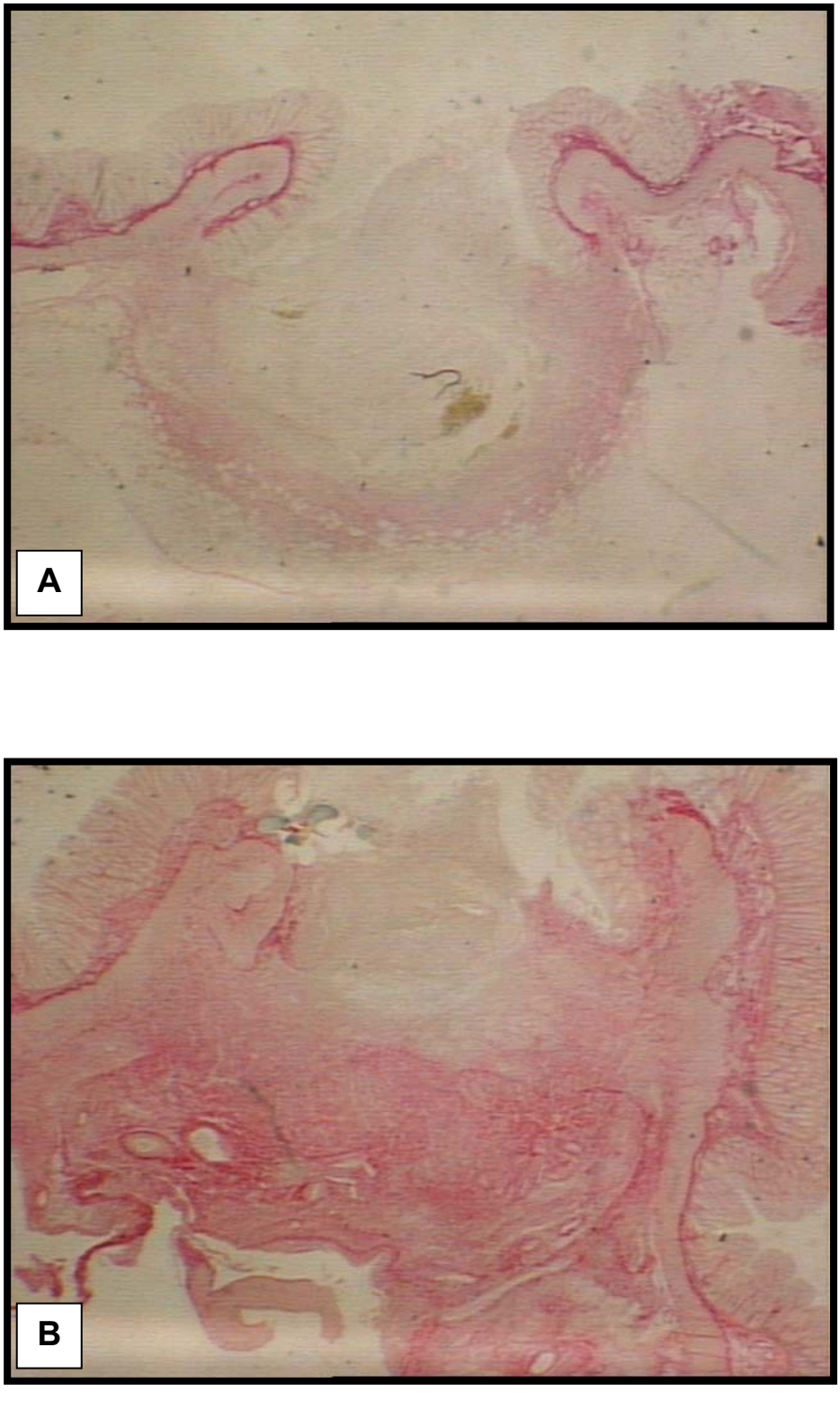


Figura 19: Anastomose de cólon em rato normal e diabético, no 4º dia de pós-operatório, onde se nota maior desarranjo da cicatriz no animal do grupo diabético (B), em relação ao grupo normal (A) (aumento 40x).

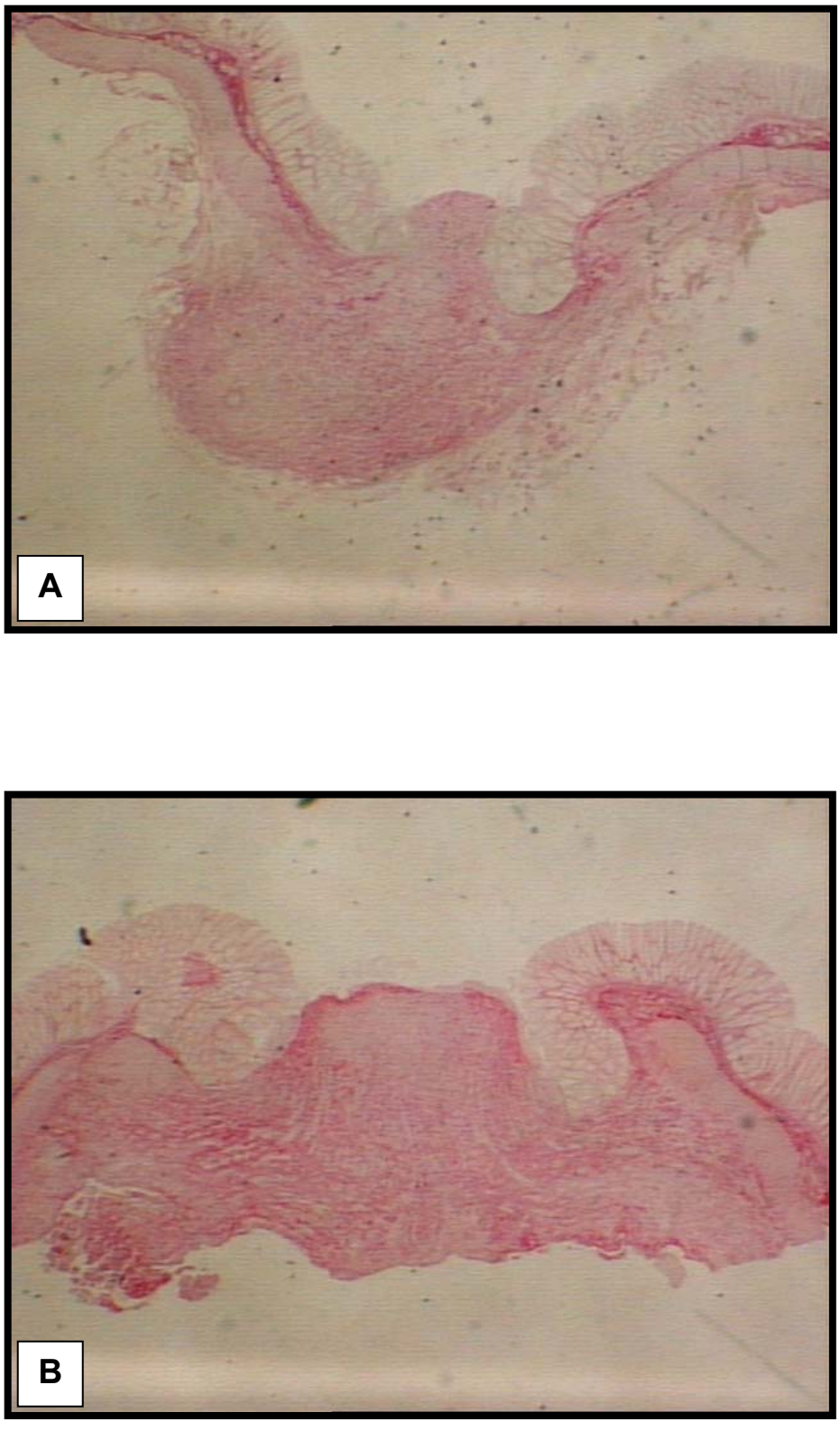


Figura 20: Anastomose de cólon em rato normal e diabético, no 14º dia de pós-operatório onde se nota maior retração da cicatriz no animal normal (A) em relação ao animal do grupo diabético (B) (aumento 40x).

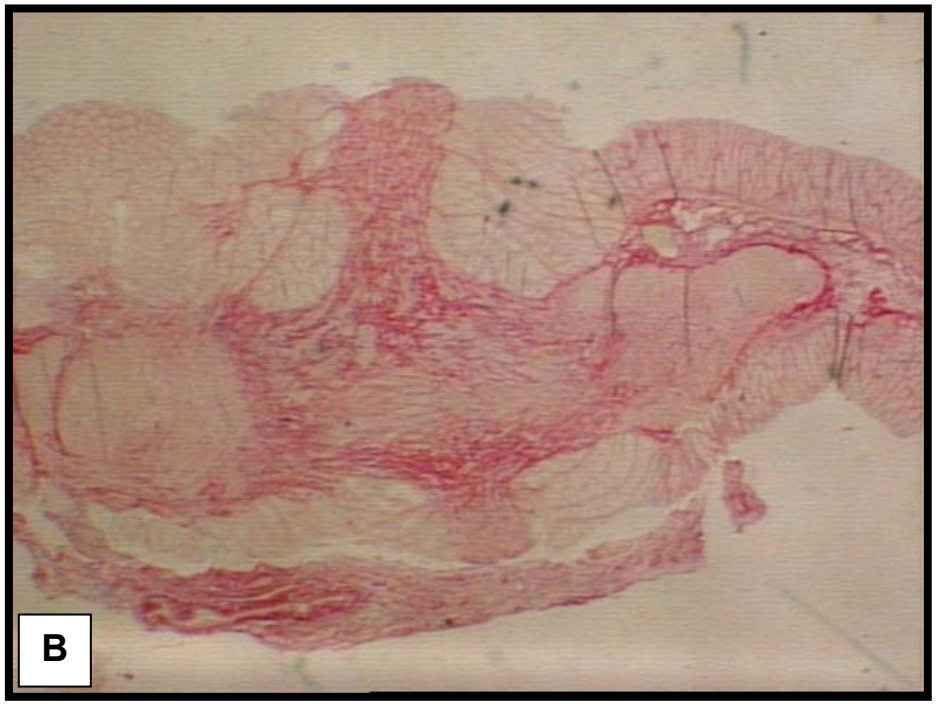


Figura 21: Anastomose de cólon em rato normal e diabético, no 21º dia de pós-operatório, onde se nota desarranjo das fibras colágenas, que ocupam maior espaço no animal diabético (B), em relação ao animal controle (A) (aumento 40x).

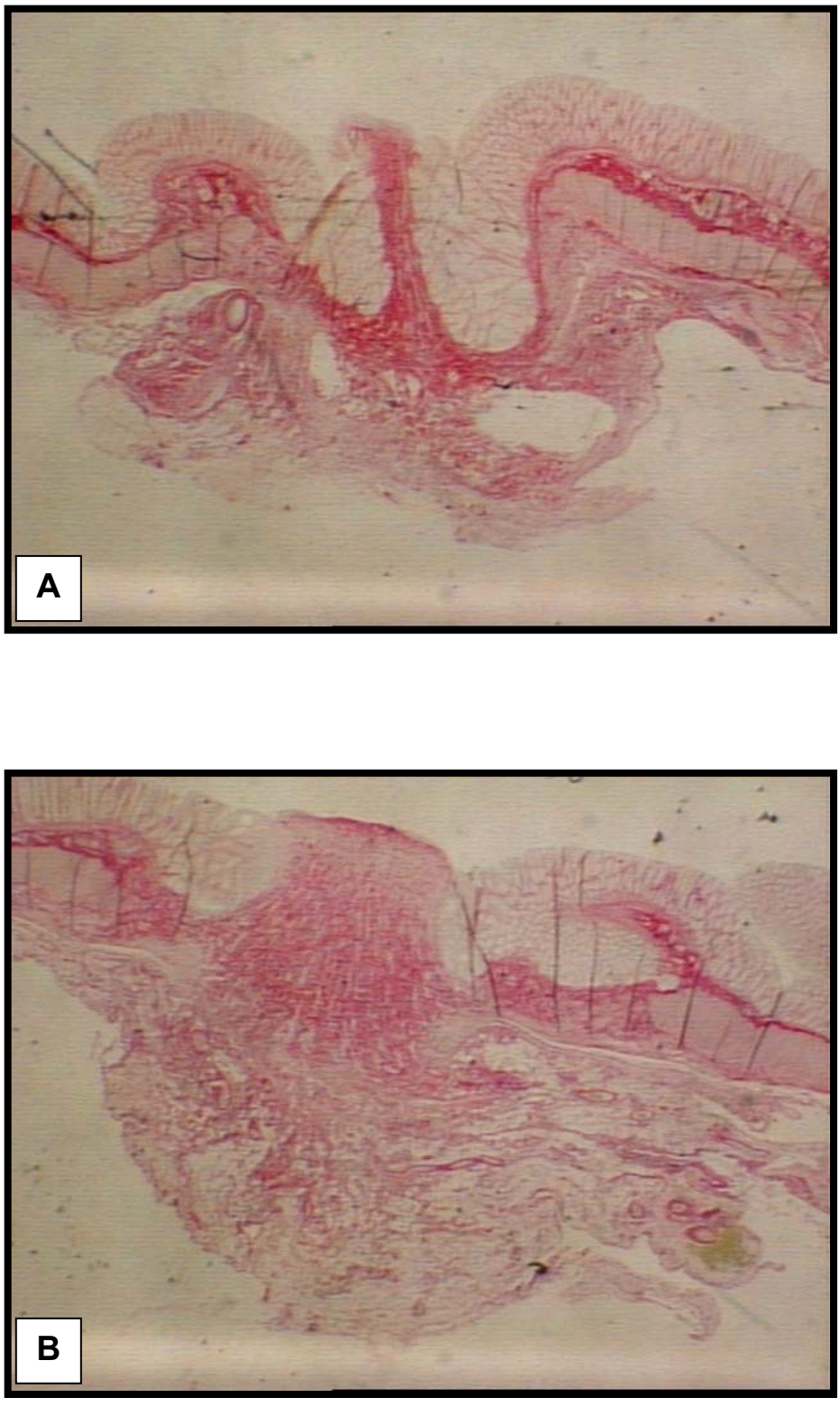


Figura 22: Anastomose de cólon em rato normal e diabético, no 30º dia de pós-operatório, onde se observa total retração da cicatriz no animal controle (A), em comparação com o animal do grupo diabético (B) (aumento 40x).

5. Análise morfométrica da área ocupada pelo colágeno na cicatriz

A medida da área ocupada pelo colágeno nas cicatrizes de animais operados no íleo mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e diabético, com valores mais elevados nos animais diabéticos, apenas no momento M2 (14º dia de pós-operatório), enquanto que nas cicatrizes dos animais operados no cólon, as diferenças ocorreram nos momentos M1 e M4 (4º e 30º dia de pós-operatórios).

Os resultados das análises morfométricas das anastomoses de íleo e cólon, estão representados nas tabelas 6 e 7 e figuras 23 e 24, juntamente com os testes estatísticos e comentários.

Tabela 6. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da área (mm²) ocupada pelo colágeno na cicatriz de anastomoses realizadas no íleo, segundo grupos e momentos de avaliação.

Momentos de avaliação	G1 –Normal operado íleo	G3 – Diabético operado íleo
3m 4 dias (M1)	1458,54±688,67 a A	1575,06±724,13 a A
3m14 dias (M2)	716,87±412,26 b A	1324,33±291,03 a B
3m 21 dias (M3)	900,05±376,59 b A	1020,29±323,72 a A
4 meses (M4)	886,1±484,21 b A	1020,65±309,2 a A

Comentários: Não houve diferenças estatisticamente significativas na medida da área ocupada pelo colágeno na cicatriz, entre os grupos normal e diabético, à exceção do momento M2, onde o grupo diabético mostrou valores mais elevados que o grupo normal.

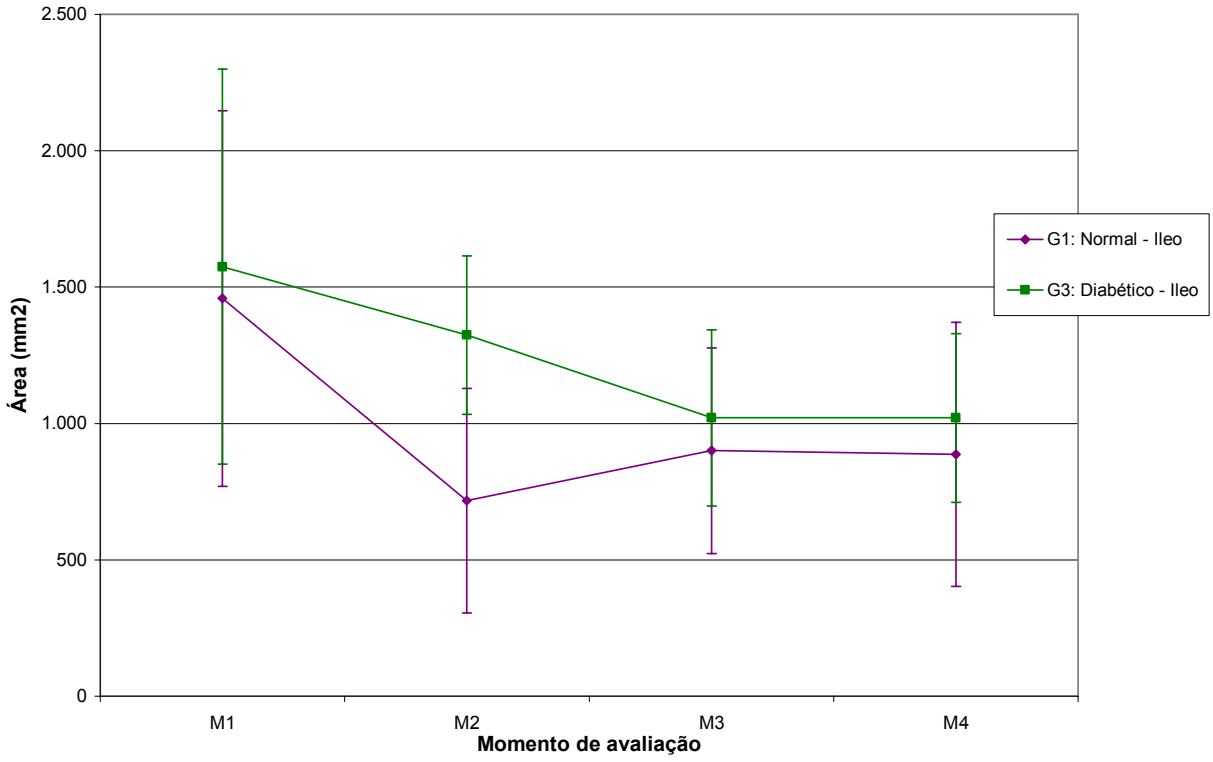


Figura 23. Médias e desvios-padrão da área ocupada pelo colágeno nas cicatrizes de íleo, nos dois grupos experimentais, nos respectivos momentos de avaliação.

Tabela 7. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação da área (mm²) ocupada pelo colágeno na cicatriz de anastomoses realizadas no cólon, segundo grupos e momentos de avaliação.

Momentos de avaliação	G1 –Normal operado cólon	G3 – Diabético operado cólon
3m 4 dias (M1)	1435,47±805,81 a A	2562,21±980,39 a B
3m14 dias (M2)	1420,87±596,92 a A	1572,54±609,9 b A
3m 21 dias (M3)	717,66±329,15 a A	1234,14±761,09 b A
4 meses (M4)	554,04±259,66 a A	1818,77±758,82 b B

Comentários: A medida da área ocupada pelo colágeno na cicatriz mostrou-se significativamente maior no grupo diabético, quando comparada ao grupo normal, nos momentos M1 e M4, não diferindo nos momentos M2 e M3.

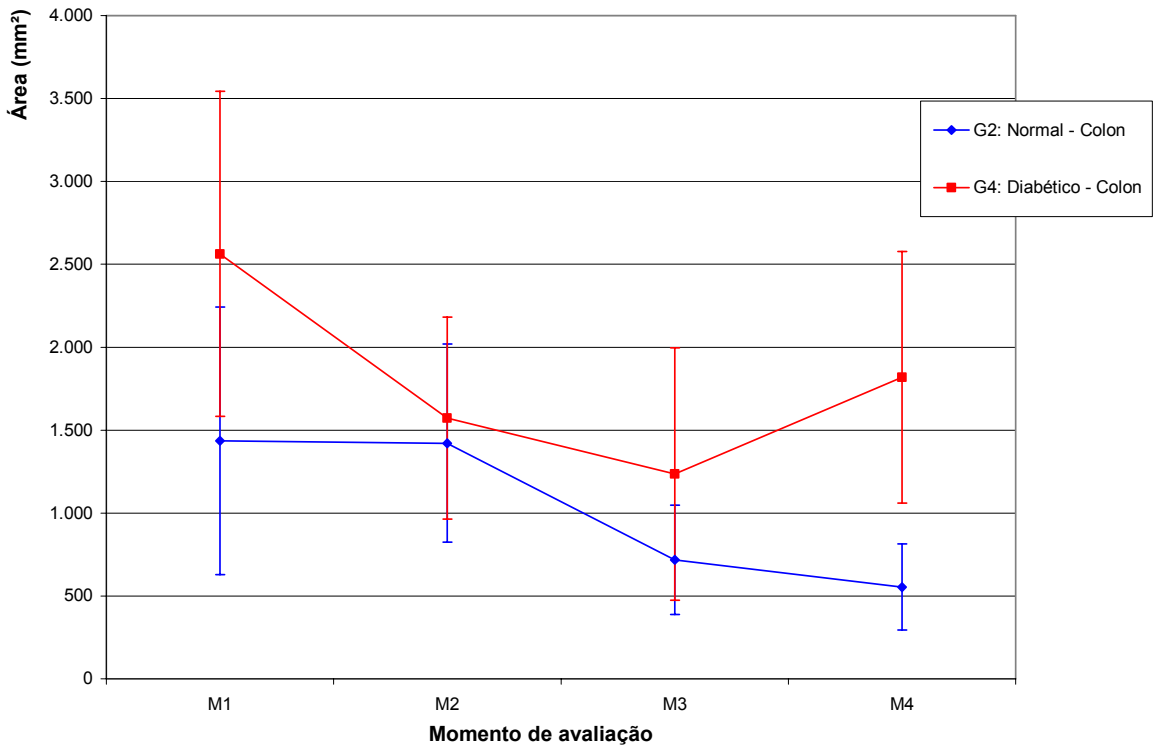


Figura 24. Médias e desvios-padrão da área ocupada pelo colágeno nas cicatrizes do cólon (mm²), nos dois grupos experimentais, nos respectivos momentos de avaliação.

6. Análise ultraestrutural das fibras de colágeno

A análise qualitativa (descritiva) das anastomoses realizadas em animais oriundos de cada momento de sacrifício do estudo, em cada grupo experimental, mostrou resultados semelhantes, tanto no íleo, como no cólon, quando comparados animais dos grupos controles com os animais diabéticos.

Observou-se que no momento M1 (4 dias de pós-operatório), animais diabéticos possuíam quantidade muito maior de proteoglicanas na anastomose, não sendo possível a visualização de fibrilas colágenas. Já os animais não diabéticos mostraram menor quantidade de proteoglicanas, sendo possível notar a presença de finas fibrilas de colágeno, com arranjo irregular, que ainda não se agrupavam em feixes (figuras 25 e 26).

No 14º dia de pós-operatório (momento M2), observou-se que nos grupos não-diabéticos, as fibrilas já se agrupavam formando feixes de colágeno, que tendiam a terminar uns nos outros, formando uma trama fechada, unida por fibras mais finas. Nestes animais havia a presença de pequena quantidade de proteoglicanas. Nos grupos diabéticos, no entanto, observou-se menor número de fibrilas agrupadas em feixes, que por sua vez não demonstravam orientação. Ainda havia a presença de espaços vazios não preenchidos e de proteoglicanas em grande quantidade (Figuras 27 e 28).

No momento M3 (21º dia de pós-operatório), os animais não-diabéticos mantiveram as fibras colágenas com maior organização, enquanto que nos grupos diabéticos ainda havia a presença de proteoglicanas em grande quantidade; mantendo-se o desarranjo na orientação das fibras colágenas (figura 29 e 30).

Finalmente, no 30º dia de pós-operatório (momento M4), os grupos normais mostraram fibras colágenas agrupadas, com arranjo estabelecido e denso, seguindo a mesma direção, enquanto que nos grupos diabéticos notavam-se a presença de fibras colágenas mais finas, sem arranjo estabelecido (figuras 31 e 32). A figura 32 A, em menor aumento, de animal do grupo normal com anastomose realizada no cólon (G2), mostra a completa retração da cicatriz, já sendo possível a visualização de tecido intestinal normal na periferia, o que ainda não ocorre no animal diabético (figura 32 B).

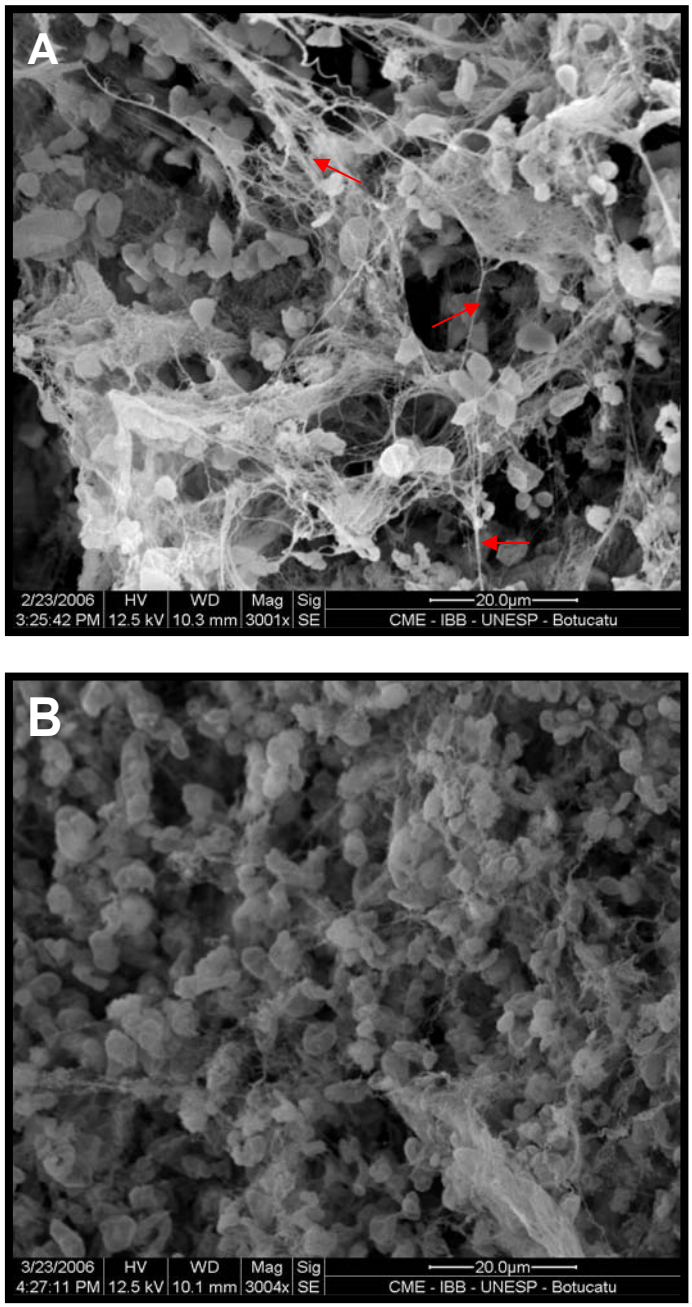


Figura 25. Micrografias de anastomoses realizadas no íleo, no 4º dia de pós-operatório, na microscopia eletrônica de varredura (aumento 3000x), mostrando em A, animal do grupo controle (G1) com a presença de fibrilas colágenas (setas), enquanto que no animal diabético (G3), em B, ainda não se notam fibrilas; percebe-se, ainda, a presença de grande quantidade de proteoglicanas (estruturas esféricas).

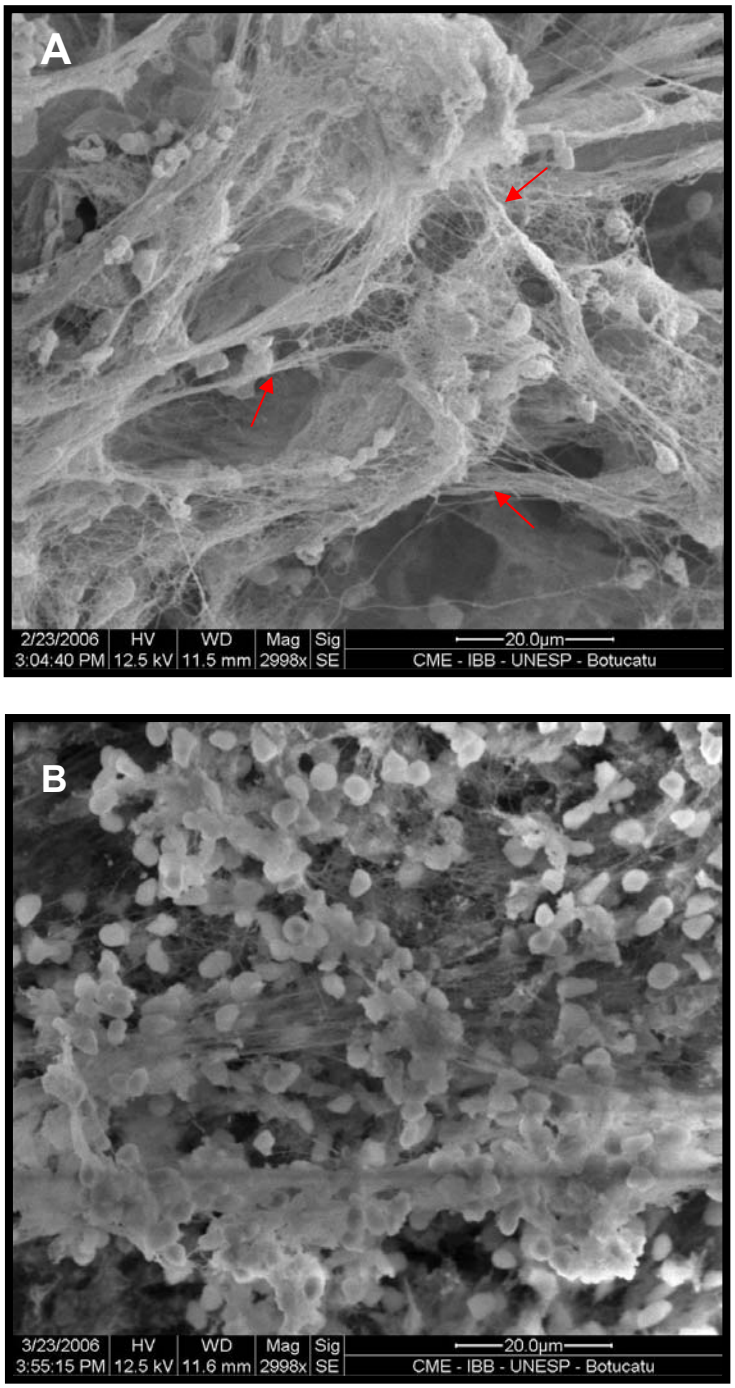


Figura 26. Micrografias de anastomoses realizadas no cólon, no 4º dia de pós-operatório, na microscopia eletrônica de varredura (aumento 3000x), notando-se em A, animal do grupo controle normal, com a presença de fibrilas colágenas (setas) e pequena quantidade de proteoglicanas (estruturas esféricas), quando comparado a animal diabético (B).

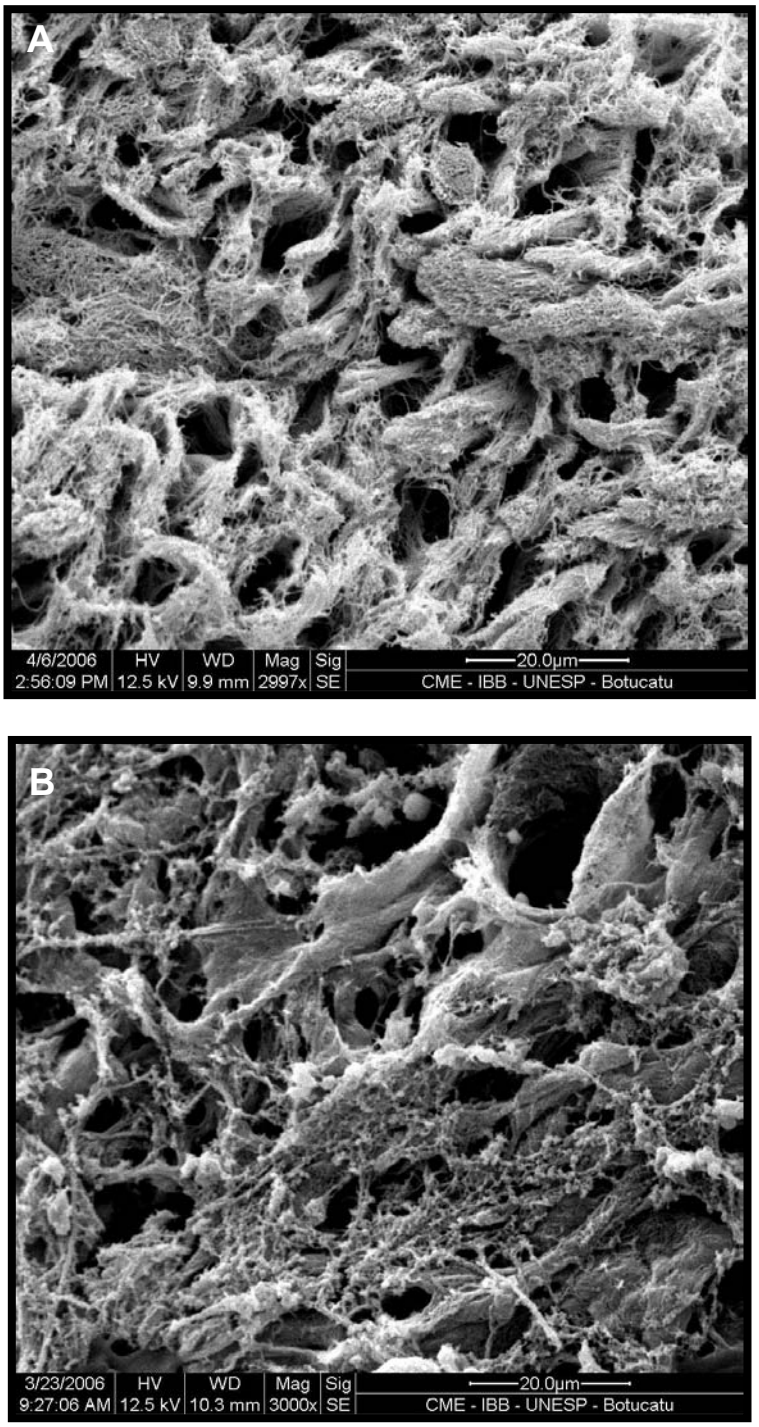


Figura 27. Micrografia de anastomoses realizadas no íleo, no 4º dia de pós-operatório, na microscopia eletrônica de varredura (aumento 3000x), mostrando em A, animal do grupo controle com fibrilas colágenas agrupando-se em feixes, formando fibras, que já começam a ter orientação definida, enquanto em B, animal diabético com fibras colágenas sem orientação e com muitos espaços vazios.

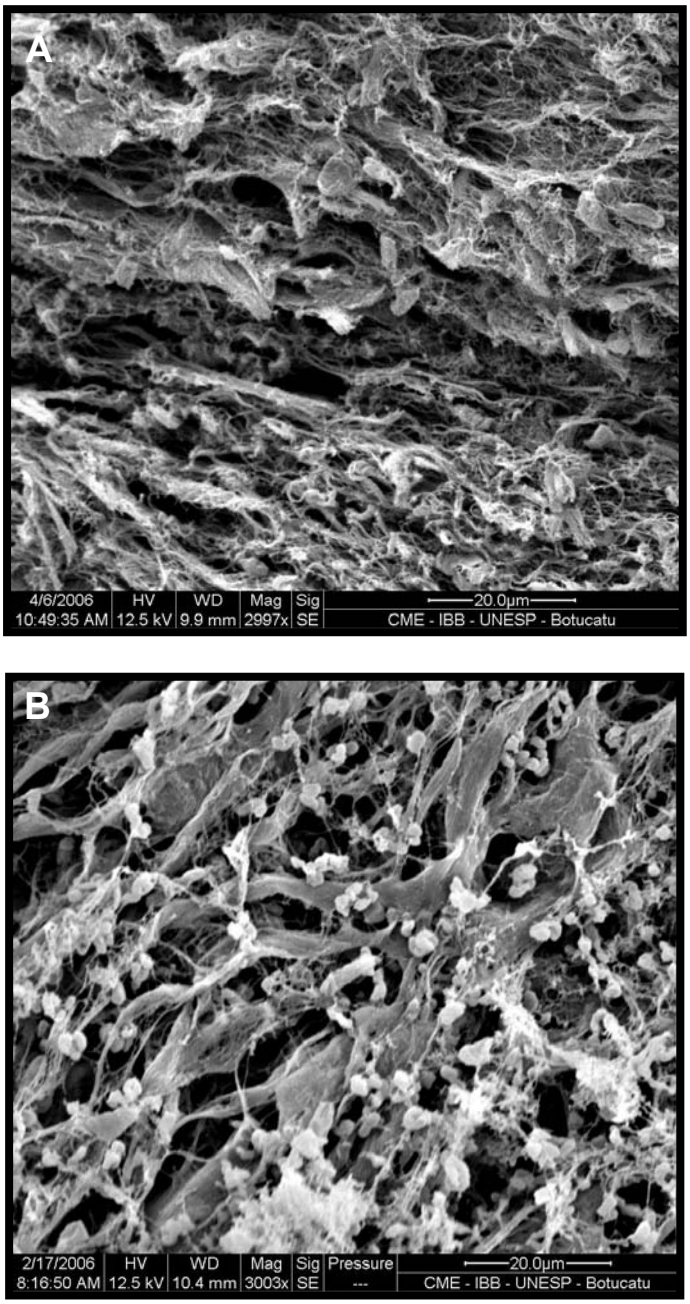


Figura 28. Micrografias de anastomoses realizadas no cólon, no 14º dia de pós-operatório, na microscopia eletrônica de varredura (aumento 3000x), mostrando, em A, fibras colágenas com orientação, em animal controle, enquanto que, em B, animal diabético com presença de fibras colágenas sem orientação, com espaços vazios e a presença de grande quantidade de proteoglicanas (estruturas esféricas).

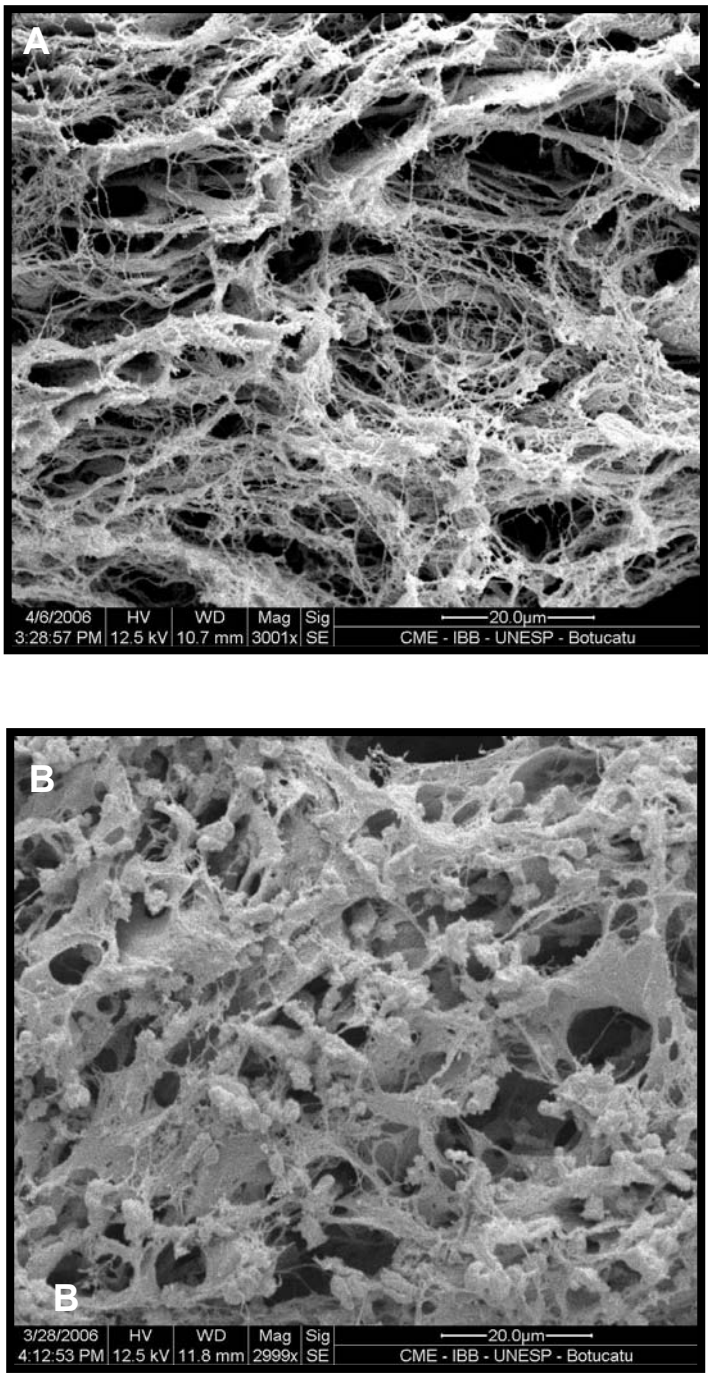


Figura 29. Micrografias de anastomoses realizadas no íleo, no 21º dia de pós-operatório, na microscopia eletrônica de varredura (aumento 3000x), mostrando, em A, animal controle com fibras mais finas, unindo as fibras mais grossas e em B, animal diabético com grande quantidade de proteoglicanas e menor quantidade de fibras finas, unindo as fibras colágenas mais grossas, que também estão em menor quantidade.

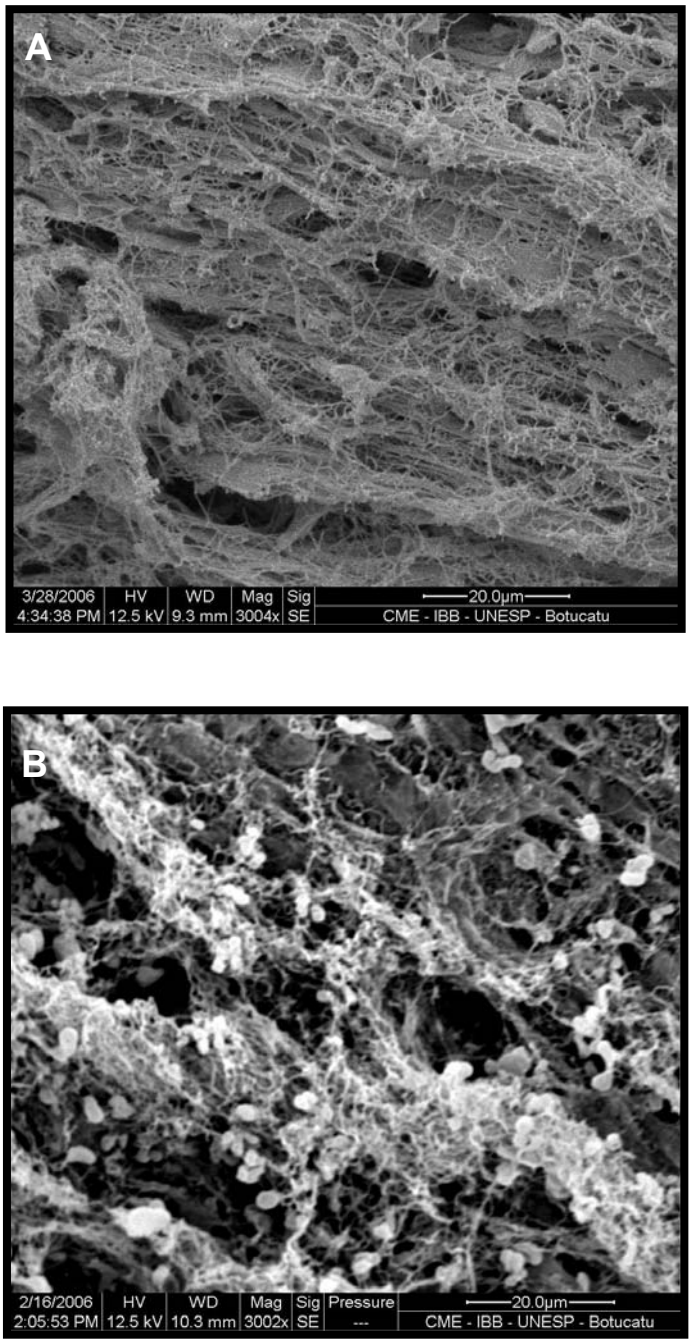
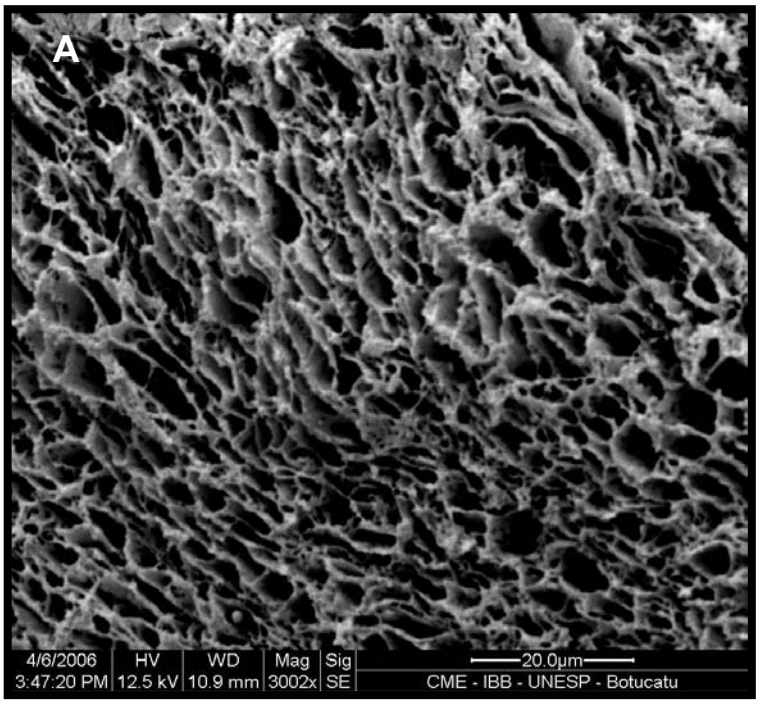


Figura 30. Micrografias de anastomoses realizadas no cólon, no 21º dia de pós-operatório, na microscopia eletrônica de varredura (aumento 3000x), mostrando em A, animal controle com trama colágena fechada, com fibras mais finas unindo as fibras mais grossas, enquanto que no animal diabético, em B, presença de espaços vazios, e na maior parte do campo, fibras mais finas, que não se interligam as fibras mais grossas, que estão em pequena quantidade; há ainda a presença de proteoglicanas.



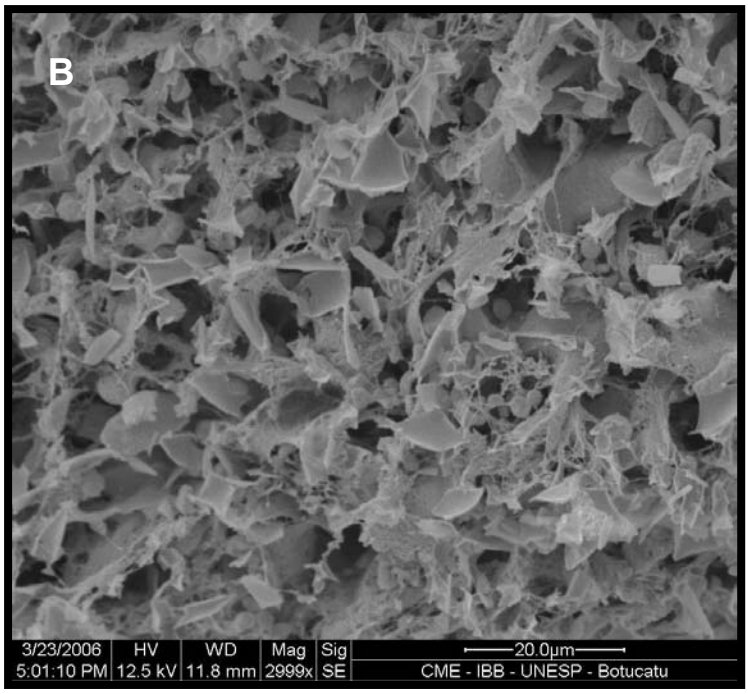


Figura 31. Micrografias de anastomoses realizadas no íleo, no 30º dia de pós-operatório, na microscopia eletrônica de varredura (aumento 3000x), mostrando em A, animal controle, com trama fechada das fibras colágenas e orientação definida. Em B, animal diabético, com fibras sem orientação definida.

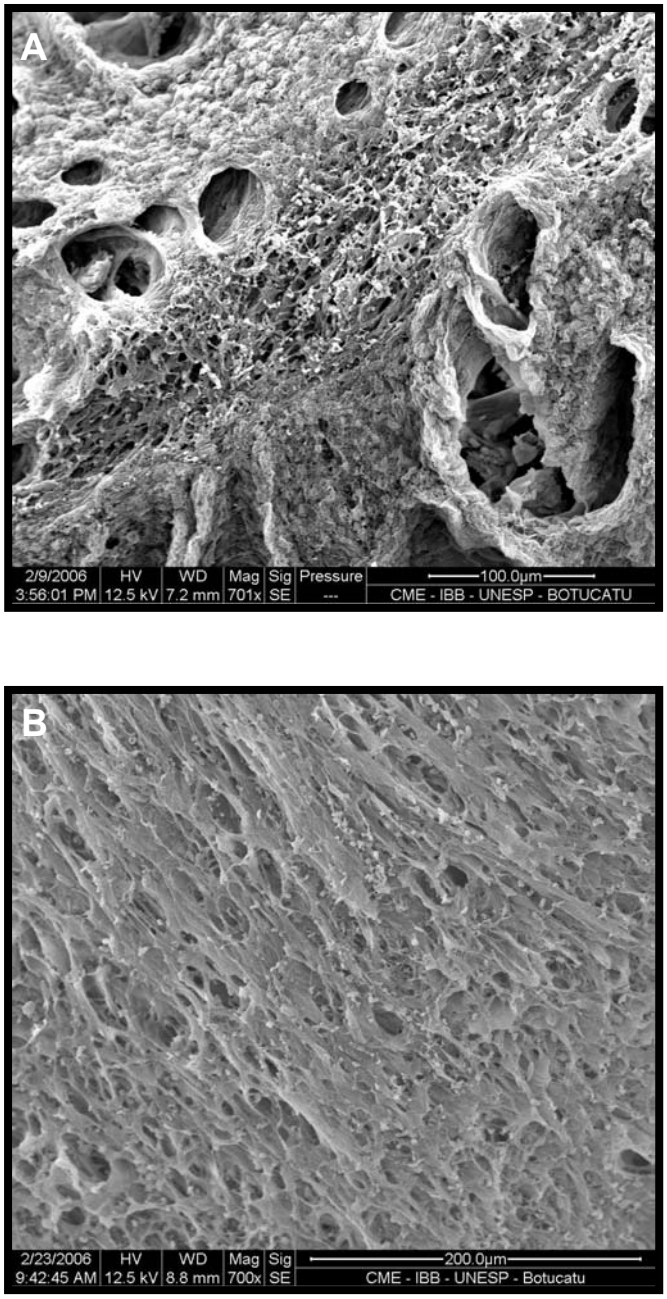


Figura 32. Micrografias de anastomoses realizadas no cólon, no 30º dia de pós-operatório, na microscopia eletrônica de varredura (aumento 700x), mostrando, em A, animal controle com retração da anastomose, mostrando áreas normais de tecido intestinal em sua periferia. Em B, animal diabético, onde ainda não é possível observar qualquer retração da cicatriz ou áreas de tecido intestinal normal.

7. Cálculo da dimensão fractal do arranjo estrutural do colágeno da anastomose

O cálculo da dimensão fractal do arranjo do colágeno presente nas cicatrizes de animais normais e diabéticos, submetidos a anastomoses no íleo e no cólon através da microscopia eletrônica, está representado nas tabelas 8 e 9 e figuras 33 e 34.

Os resultados mostraram que os valores da dimensão fractal do arranjo estrutural do colágeno foram significativamente maiores nos animais diabéticos, nos momentos M2 e M3, nos grupos onde foram realizadas anastomoses no íleo. Por outro lado, nas anastomoses realizadas no cólon, os valores foram estatisticamente maiores nos animais diabéticos nos momentos M1 e M4.

Tabela 8. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação do cálculo da dimensão fractal do arranjo do colágeno presente nas cicatrizes de íleo, segundo grupos e momentos de avaliação.

Momentos de avaliação	G1 –Normal operado íleo	G3 – Diabético operado íleo
3m 4 dias (M1)	1,72±0,06 a A	1,73±0,07 a A
3m14 dias (M2)	1,72±0,04 a A	1,82±0,03 a B
3m 21 dias (M3)	1,71±0,1 a A	1,78±0,06 a B
4 meses (M4)	1,72±0,01 a A	1,76±0,05 a A

Comentários: A análise da dimensão fractal mostrou valores significativamente maiores no grupo diabético, em relação ao grupo normal, nos momentos M2 e M3, não diferindo estatisticamente nos demais momentos (M1 e M4).

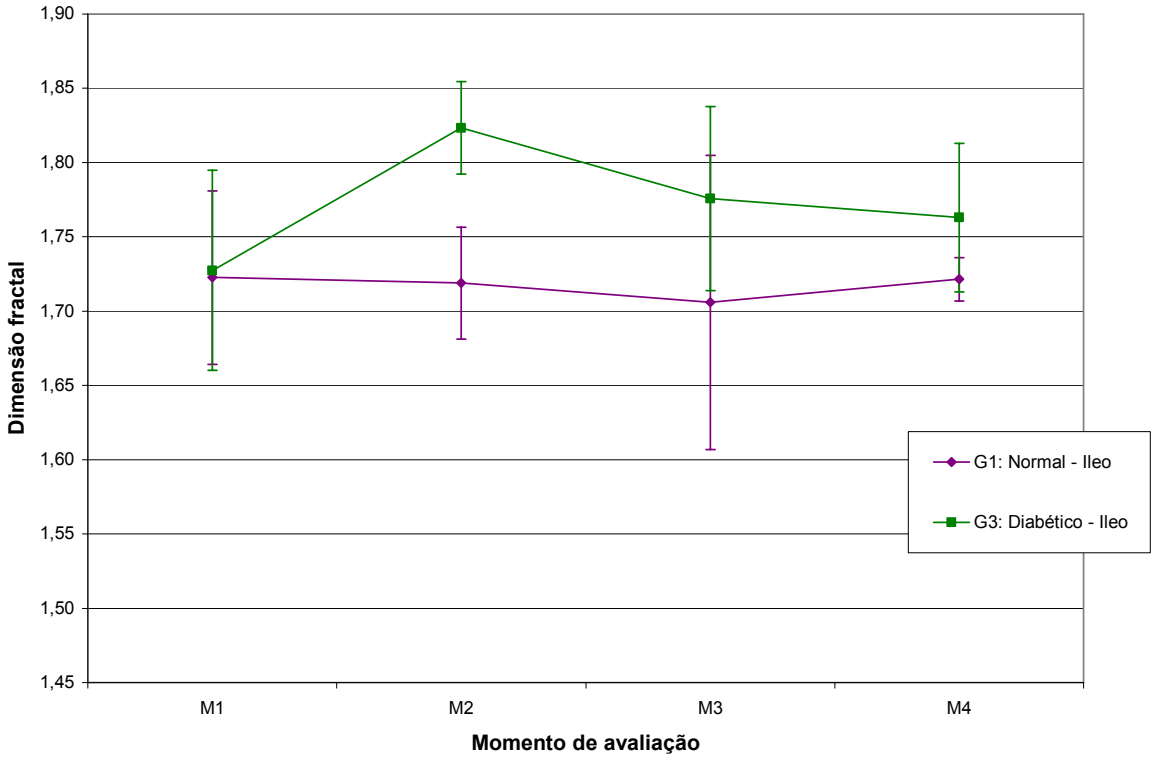


Figura 33. Médias e desvios-padrão do cálculo da dimensão fractal do arranjo do colágeno presente nas cicatrizes de íleo, nos dois grupos experimentais, nos respectivos momentos de avaliação.

Tabela 9. Médias, desvios-padrão e resultados do teste estatístico da comparação do cálculo da dimensão fractal do arranjo do colágeno presente nas cicatrizes de cólon, segundo grupos e momentos de avaliação.

Momentos de avaliação	G1 –Normal operado cólon	G3 – Diabético operado cólon
3m 4 dias (M1)	1,72±0,03 a A	1,76±0,04 a B
3m14 dias (M2)	1,7±0,06 a A	1,74±0,06 a A
3m 21 dias (M3)	1,74±0,06 a A	1,76±0,05 a A
4 meses (M4)	1,71±0,09 a A	1,77±0,03 a B

Comentários: A análise dos valores da dimensão fractal não diferiu estatisticamente entre os grupos normal e diabético, nos momentos M2 e M3, sendo significativamente maiores no grupo diabético nos momentos M1 e M4.

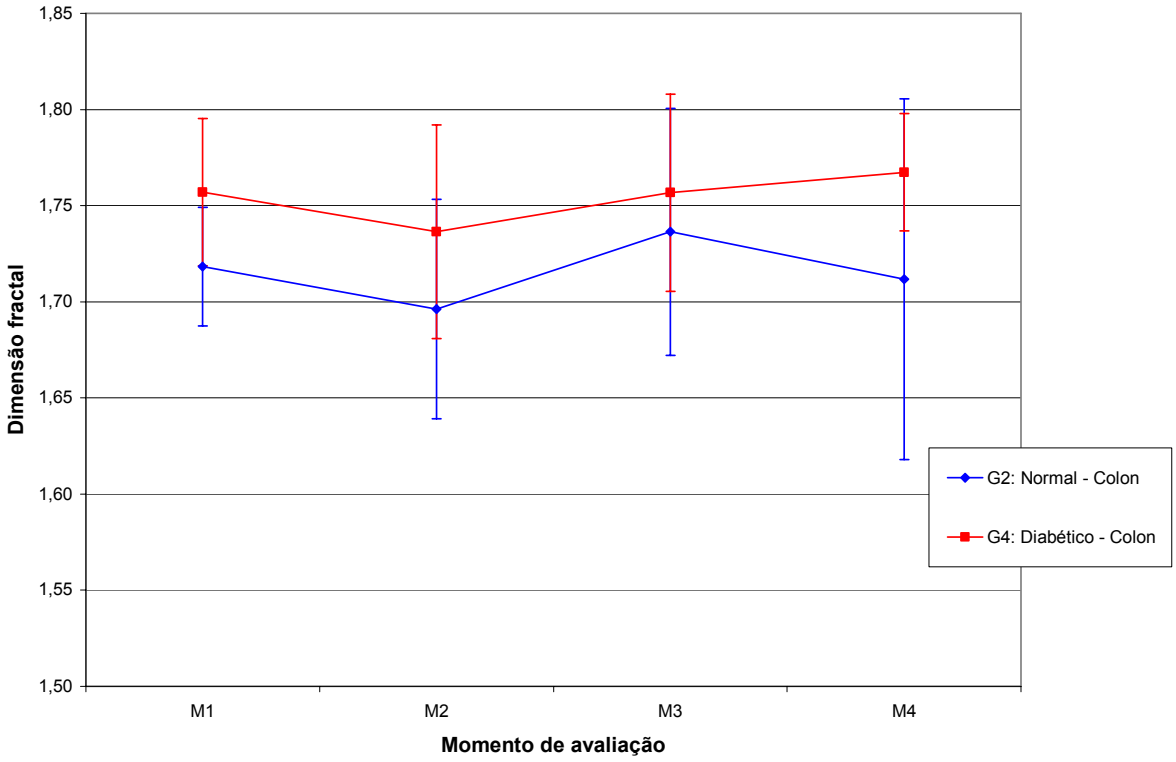


Figura 34. Médias e desvios-padrão do cálculo da dimensão fractal do arranjo do colágeno presente nas cicatrizes de cólon, nos dois grupos experimentais, nos respectivos momentos de avaliação.

Discussão

1. Quanto aos animais utilizados

O rato (*Rattus novergicus)* tem sido o animal comumente utilizado em estudos sobre o diabetes experimental em nosso laboratório (SPADELLA, 1989; LERCO, 2000; PAIVA, 2001; MACHADO, 2002) e por pesquisadores de todo o mundo (JUNOD et al., 1967; ORLOFF et al., 1975; SCHELLINI, 1992) por ser um animal de fácil manuseio, acomodação e alimentação; com resistência às infecções, se comparados a outros animais de experimentação, e por permitir estudos em gaiolas metabólicas com padronização de inúmeras variáveis tais como idade, peso, ingestão alimentar, diurese, etc.

2. Quanto ao tempo de diabetes e observação dos animais

Os ratos da raça Wistar vivem, em média, dois anos. Ao iniciar o experimento os ratos tinham em média três meses de idade, e ao término, cerca de sete meses, dos quais, um período de 3 a 4 meses sob o regime de diabetes grave; o equivalente a 1/6 da vida média destes animais.

Confrontando o tempo de diabetes desse estudo com os demais trabalhos da literatura, observa-se que a grande maioria dos estudos sobre cicatrização intestinal utiliza pequenos períodos de tempo de diabetes, que variam de alguns dias a semanas (PRAKASH et al., 1973; GOTTRUP e ANDREASSEN, 1981; VERHOFSTAD et al., 2002). Porém, a exemplo do nosso estudo, mesmo nos trabalhos de curta duração, as alterações decorrentes do diabetes em animais operados já estão presentes precocemente (MADDEN e PEACOCK, 1968; PRAKASH et al., 1973; SPANHEIMER et al., 1988; BLACK et al., 1989).

No presente estudo, desde o período de pós-indução do diabetes experimental, observou-se várias alterações clínicas e laboratoriais compatíveis com diabetes grave, acompanhadas de complicações crônicas e progressivas do diabetes, tais como: emagrecimento, catarata e megacólon, mais evidentes com três meses de doença. Estes fatos justificaram plenamente a realização deste experimento após três meses de diabetes.

3. Quanto às técnicas utilizadas

3.1. Anestesia

O pentobarbital sódico foi o agente anestésico utilizado no presente estudo, por proporcionar maior facilidade na indução anestésica e manutenção duradoura do plano anestésico, durante todo o procedimento cirúrgico. Acresce-se a isto, a sua fácil disponibilidade, baixo custo, além da larga experiência com esta droga, por parte do nosso laboratório experimental, tendo sido o anestésico de escolha em vários estudos (BREIM, 1990; SCHELLINI, 1992; LERCO, 2000; MACHADO, 2002).

3.2. Indução do diabetes experimental

O diabetes experimental pode ser provocado por estresse, infecções, toxinas, pancreatectomia (MERING e MINKOWSKI, 1889), lesões do sistema nervoso central (HETHERINGTON e RANSON, 1940), uso de hormônios anti-insulínicos (MORDES e ROSSINI, 1985), exposição à hidrocortisona ou ACTH (CAVALLERO e MOSCA, 1953; LAZARUS e BENCOSME, 1955), indução por vírus (YOON, 1979) e o uso de agentes químicos beta-citotóxicos (DUNN et al., 1943; RAKIETEN et al., 1963).

No presente estudo optou-se por um método químico de supressão endócrina do pâncreas, o qual exibe todos os eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabetogênico (MORDES, 1985). Embora acompanhado de um elevado índice de mortalidade relativa, o método químico apresenta como vantagem a fácil execução, a possibilidade de se utilizar grande número de animais e o fato de estar perfeitamente padronizado no nosso laboratório experimental. Particularmente, também, o método cito-químico é seletivo, destruindo principalmente a porção endócrina do pâncreas.

Dentre os agentes químicos mais utilizados na literatura para indução do diabetes experimental, destacam-se a aloxana e a estreptozotocina. Estas drogas causam diabetes por efeito tóxico sobre as células beta-pancreáticas (BELL e HYE, 1983), causando insuficiência insulínica primária do pâncreas,

caracterizada por uma resposta trifásica sobre os níveis glicêmicos, durante as primeiras horas de administração, seguida do estabelecimento do diabetes permanente nas 24 horas subseqüentes (JUNOD et al., 1967; MORDES e ROSSINI, 1985).

Neste trabalho a droga utilizada foi a aloxana por via endovenosa, cuja atividade diabetogênica foi inicialmente descrita por Dunn et al., em 1943. Apesar da maior especificidade da estreptozotocina sobre as células beta e sua menor toxicidade geral, a opção pela aloxana foi mantida por duas razões: a primeira de ordem econômica, dado o alto custo da estreptozotocina quando comparado com a aloxana, e a segunda, pelo uso amplamente difundido da aloxana, na indução do diabetes experimental, por inúmeros laboratórios de larga experiência no assunto (ORLOFF et al., 1975, 1988), incluindo o nosso laboratório (MACEDO et al., 1981, 1985, 1986; CALDERON, 1988; SPADELLA 1989; BREIM, 1990; SCHELLINI, 1992; MACHADO 1993, 2002; LERCO, 2000; PAIVA, 2001).

A aloxana administrada por via endovenosa, na dose de 42mg/kg de peso corporal (LAZAROW e PALAY, 1946; LUKENS, 1948), produziu em nossos animais, diabetes franco, com o desenvolvimento de alterações clínicas, laboratoriais, funcionais e histopatológicas bem definidas.

Neste estudo, dos 586 animais submetidos à injeção endovenosa de aloxana, 126 ratos (21,5%) não ficaram diabéticos ou apresentaram a doença de forma leve a moderada, sendo desprezados. Os 460 animais restantes desenvolveram diabetes grave, com 322 óbitos (54,9%) durante os três meses de seguimento, principalmente nas primeiras 72 horas após a indução, e 42 óbitos durante ou após a cirurgia, em decorrência do ato anestésico ou peritonite por deiscência da anastomose, sendo 96 animais efetivamente utilizados neste experimento. Estes resultados são concordantes com os dois últimos estudos realizados nesta linha de pesquisa em nosso laboratório experimental. Paiva, em 2001, ao estudar o efeito do diabetes sobre o intestino sem a agressão cirúrgica obteve 27,6% de animais que não ficaram diabéticos e 42,3% de mortalidade durante os três meses de seguimento. Machado, em 2002, estudando o efeito do diabetes nas anastomoses intestinais, observou que 22,5% dos animais não ficaram diabéticos e obteve mortalidade de 50,3% durante o seguimento de três meses. Estudo realizado por Calderon (1988) em nossa instituição, com ratas diabéticas induzidas pela aloxana não-tratadas, mostrou resultados pouco

discordantes destes trabalhos. A autora obteve 50% de animais diabéticos, 32,5% de animais resistentes à droga e uma taxa de mortalidade de 17,5%, até o 15º dia após a indução. Este índice diabetogênico elevado, explica-se, no entanto, pelos critérios de classificação do diabetes estabelecido pela autora, que considerou diabéticos os animais com glicemia maior ou igual a 120mg/dl. Se considerarmos apenas os ratos com valores glicêmicos superiores a 200mg/dl, observa-se que o seu percentual de animais diabéticos cai para 37,5%, valor próximo ao obtido no presente estudo. Com relação à taxa de mortalidade, Lukens (1948), em extensa revisão da literatura a respeito da ação da aloxana sobre animais de várias espécies, incluindo o rato, o cão, o coelho, o macaco, o gato, mostrou índices muito variáveis de mortalidade, oscilando entre 33 a 100% na mesma espécie. Esta ampla variação tem etiologia multifatorial, envolvendo desde o estado de hidratação da droga, a velocidade de infusão, a via de administração, a dieta, o tempo de jejum, o peso do animal e até a interação com outras drogas capazes de influenciar seus mecanismos de ação, como os barbitúricos e o ácido nicotínico.

Os ratos, animais utilizados neste estudo, são mais sensíveis a uma dose constante de aloxana após terem sido alimentados previamente com uma dieta de alto teor de gordura. Nestes casos, as taxas de mortalidade chegam a 90%. Por outro lado, dietas pobres em gordura, com altas concentrações de proteínas e carboidratos, são capazes de diminuir estes índices para 33 a 40% (LUKENS, 1948).

O jejum exerce importante papel na resposta do animal à aloxana. Dos ratos tratados com aloxana, que foram submetidos previamente a jejum de 48 a 60 horas, 95% tornaram-se diabéticos. Com a injeção de mesma dose de aloxana em animais onde não foi respeitado o jejum, a resposta diabetogênica à droga caiu para 25% (LUKENS, 1948).

Outro aspecto a considerar é a via de administração da droga. A via endovenosa tem sido a escolha na maioria das espécies animais, onde os efeitos da aloxana são mais evidentes (LAZAROW e PALAY, 1946). A velocidade de infusão endovenosa também é importante, pois doses efetivas de aloxana não produzem diabetes se as mesmas forem injetadas muito lentamente. As vias subcutânea e intraperitoneal também são satisfatórias no rato, enquanto que no coelho, devem ser administradas doses muito elevadas por estas vias para que

se atinja o mesmo efeito diabetogênico. Por fim, a via oral é usualmente insatisfatória para a ação da aloxana, muito embora o diabetes possa ser produzido em ratos, coelhos e gatos se a droga for rapidamente ingerida com comida, após jejum prévio prolongado (LUKENS, 1948).

Gitter e Pietro (1946) relataram, segundo Lukens (1948), a importância do peso em relação à susceptibilidade do animal aos efeitos tóxicos da aloxana. Em um estudo detalhado em ratos, estes pesquisadores revelaram que a toxicidade da aloxana altera-se numa relação linear com o peso do animal, estabelecendo assim, a dose letal de aloxana para cada rato.

Finalmente, algumas drogas exercem efeito direto ou indireto sobre os mecanismos de ação da aloxana. Os barbitúricos tornam os animais mais sensíveis aos efeitos da droga. Outras substâncias, como o ácido nicotínico, podem proteger o animal dos efeitos da aloxana, se administrados concomitantemente com a mesma (LUKENS, 1948).

4. Quanto à evolução clínica

Os parâmetros utilizados na avaliação clínica dos animais foram: estado geral, peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese.

Os animais não diabéticos (grupos G1 e G2) apresentaram-se ao longo do experimento em bom estado geral e ativos. Estes animais apresentaram ainda manutenção do peso corporal, da ingestão hídrica, da ingestão alimentar e da diurese, dentro dos padrões de normalidade para a espécie, de acordo com outros trabalhos da literatura (ORLOFF et al., 1975; BREKKE et al., 1980, 1981). Já os grupos diabéticos, G3 e G4, apresentaram apatia, alterações da pelagem, odor forte da urina, comprometimento do estado geral e episódios freqüentes de pneumonia e piodermite, o que também foi descrito por outros autores (LEE et al., 1971, 1972; PRAKASH et al., 1973; ORLOFF et al., 1975; UEDA et al., 1979; BREKKE et al.,1980,1981; MACEDO et al., 1981; CALDERON, 1988; SPADELLA, 1989; BREIM, 1990; LERCO, 2000; PAIVA, 2001; MACHADO, 2002).

A evolução do peso corporal entre os grupos experimentais (tabela 1 e figura 10) mostrou que os ratos dos grupos diabéticos (G3 e G4) apresentaram pesos inferiores aos dos grupos não-diabéticos (G1 e G2). A perda de peso nos animais diabéticos, resultante do aumento do catabolismo, já foi amplamente

relatada na literatura (LEE et al., 1971; ORLOFF et al., 1975; BREIM, 1990; MACHADO, 2002).

A poliúria, uma das características do estado hiperglicêmico, ocorreu em todos os momentos, nos animais dos grupos diabéticos (G3 e G4), que apresentaram diurese significativamente mais elevada que os grupos controles G1 e G2. Este fato é explicado pelo aumento elevado da concentração de glicose no filtrado glomerular, excedendo a capacidade das células tubulares em reabsorvê-la, dando origem à diurese osmótica (BONDY, 1973).

A polidipsia observada nos animais diabéticos deve-se provavelmente a hiperosmolaridade sanguínea em razão dos altos níveis de glicose circulante, que faz a água passar do meio intracelular para o extracelular, a fim de manter o equilíbrio osmótico. A desidratação intracelular é percebida pelos receptores cerebrais, causando sede intensa (COTRAN et al., 1989).

A medida da ingestão alimentar, do modo como foi delineado este trabalho, não se mostrou um método sensível o suficiente para demonstrar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, como descrito na literatura (PRAKASH et al., 1973; PAIVA, 2001), devido a possíveis fatores envolvidos: grande perda de alimento fora da gaiola sem ingestão, grande variabilidade de medidas entre animais e no mesmo animal, e poucos momentos avaliados para demonstrar diferenças.

5. Quanto aos exames laboratoriais

O estudo dos parâmetros laboratoriais nos quatro grupos experimentais refletiu de um modo geral, o comportamento observado na evolução clínica.

Durante todo o seguimento, os grupos de animais não diabéticos (G1 e G2), mantiveram-se com os valores de glicemia de jejum dentro dos padrões da normalidade, o que está de acordo com vários trabalhos experimentais anteriores que utilizaram o rato (PRAKASH et al., 1974; ORLOFF et al., 1975; GOODSON e HUNT, 1977; UEDA et al., 1979; GOTTRUP e ANDREASSEN, 1981; MACEDO et al., 1986; SPADELLA, 1989).

Os animais dos grupos diabéticos (G3 e G4), apresentaram aumento na concentração de glicose plasmática e glicosúria, compatíveis com diabetes grave, o que está em conformidade com os resultados de outros autores em estudos

com ratos diabéticos (LEE et al., 1971, 1972; PRAKASH et al., 1974; MACEDO et al., 1981, 1986; SPADELLA, 1989).

Glicemia elevada, acompanhada de altas taxas de glicose urinária são os eventos frequentemente observados após a administração de aloxana (DUNN et al., 1943), cuja ação trifásica é caracterizada por hiperglicemia, seguida de hipoglicemia e posteriormente, a instalação da fase hiperglicêmica definitiva (LUKENS, 1948).

6. Quanto ao estudo histopatológico à microscopia óptica

As alterações histopatológicas da cicatrização de anastomoses intestinais no diabetes experimental têm sido estudadas por diversos autores (FAHEY III et al., 1991, VERHOFSTAD et al., 1994, 1996, 2001; PAIVA, 2001; MACHADO, 2002). Machado (2002) em estudo com o mesmo delineamento realizado no presente trabalho, demonstrou haver diminuição da resposta inflamatória, ao nível da cicatriz, no 4º dia de pós-operatório, com prolongamento da intensidade do infiltrado inflamatório nos momentos de avaliação subseqüentes, e retardo na regeneração da mucosa do cólon e do íleo.

O presente estudo analisou a histopatologia das anastomoses de íleo e cólon, em aumento de 40x, permitindo uma visão panorâmica das anastomoses. Nestas, observamos retardo na contração da cicatriz em animais diabéticos, com a progressão dos momentos de avaliação. Este achado vai de encontro aos resultados obtidos por outros autores que estudaram as anastomoses realizadas em intestinos de ratos diabéticos à microscopia óptica (PRAKASH et al., 1973; VERHOFSTAD et al., 2001; MACHADO, 2002). Este efeito foi ainda mais pronunciado no grupo de animais diabéticos submetidos à anastomose no cólon, o que poderia explicar o maior número de óbitos decorrentes de deiscência da anastomose e peritonite. Estes resultados também estão de acordo com os obtidos por outros autores, que estudaram as diferenças na cicatrização de anastomoses intestinais de íleo e cólon em animais normais. Hesp et al. (1984) e Martens e Hendriks (1991) relataram que o íleo responde mais rápida e intensamente à agressão cirúrgica que o cólon, quando dosaram o colágeno na anastomose, no intervalo de 12 horas a 28 dias de pós-operatório.

A morfometria tem sido outro método utilizado para estudar os efeitos do diabetes experimental na cicatrização de ossos (ALKAN et al., 2002; FOLLAK et al., 2004), pele (MELLIN et al., 1995), meso (FRANZÉN e ROBERG, 1995) e anastomoses intestinais (VERHOFSTAD et al., 2001).

No nosso experimento, usamos a coloração de pricrosírius devido a sua seletividade para as fibras colágenas. Por conferir a cor rosa ao colágeno, a qual proporciona um grande contraste com o restante da lâmina, as medidas morfométricas deste componente da cicatriz ficaram bastante fáceis de serem executadas. Entretanto, por este método, a diferenciação entre os diferentes tipos de colágeno não pôde ser feita. Observamos, que apesar das fibras colágenas terem ocupado maior espaço nas anastomoses de animais diabéticos, à análise qualitativa, na maioria dos momentos avaliados, a área preenchida por colágeno não variou no íleo, apresentando valores mais elevados somente nos momentos M1 e M4, no cólon. Estes resultados vão de encontro com as nossas suspeitas iniciais de que a diminuição quantitativa do colágeno não pode ser a causa da diminuição da força tensil de anastomoses realizadas em animais diabéticos, e sim, as alterações no arranjo e distribuição destas fibras colágenas, como constatamos na análise qualitativa à microscopia óptica e à microscopia eletrônica de varredura.

7. Quanto à análise ultraestrutural das fibras de colágeno

Dentre as camadas da parede intestinal, a submucosa age como o esqueleto do intestino, integrando a mucosa interna e as camadas musculares externas, dando integridade estrutural à parede intestinal. A camada submucosa é composta por fibras colágenas, que têm função essencialmente de sustentação mecânica, em duas disposições diagonais. Esta orientação diagonal é essencial para a flexibilidade da submucosa, permitindo a deformação intestinal durante a peristalse e as variações de volume na luz (KOMURO e HASHIMOTO, 1990). Em estudo de microscopia eletrônica de varredura, com intestino de ratos e de suínos, sem a agressão cirúrgica, já foi demonstrado que o duplo arranjo das fibras colágenas não constitui duas camadas distintas, mas que elas integram-se formando um folheto único (KOMURO, 1988; PRADO, 2005). Klein et al. (1983), ao estudar as propriedades ultraestruturais das fibrilas colágenas, em intestinos

de ratos, descreveram a mesma disposição biaxial das fibras colágenas, relacionando-as à presença dos colágenos tipos I e III, nos tecidos submetidos à tensão biaxial. Estes autores sugerem que o diâmetro das fibrilas colágenas pode estar relacionado à concentração e ao tipo de proteoglicanas presentes, sendo que, quanto maior a quantidade de proteoglicanas, menor o diâmetro das fibrilas colágenas. Estas conclusões foram apoiadas nos estudos de Cetta et al.(1982), que mostraram que o diâmetro das fibrilas colágenas de tendões aumentou com a idade do rato, enquanto que a concentração de proteoglicanas diminuiu. Ruoslahti (1988), em extensa revisão de literatura sobre a estrutura das proteoglicanas, relatou que estas substâncias são proteínas com diferentes estruturas e funções, sendo uma das principais, o fato de as mesmas comporem a matriz extracelular e participarem dos fenômenos de adesão celular. Estas proteínas, apesar da diversidade de estruturas, são consideradas um grupo, graças às glicosaminoglicanas, que estão sempre ligadas às proteoglicanas, dando-lhes certa uniformidade e ligando-as a outras moléculas da matriz; fato que confere às proteoglicanas a capacidade de regular a espessura das fibrilas de colágeno.

A microscopia eletrônica de varredura já foi utilizada em estudos dos efeitos do diabetes na retina (HAMILTON et al., 1982), nos rins de ratos (MAKINO et al., 1993) e macacos (MARION e CARLSON,1989) e nos ossos (FOLLAK et al., 2003). Porém, não existem relatos na literatura de estudos da parede intestinal de animais diabéticos, com ou sem agressão cirúrgica.

A cicatrização, por sua vez, vem sendo estudada através da microscopia eletrônica de varredura, desde o artigo de revisão feito por Heughan e Hunt, em 1975, sobre o estudo do arranjo do colágeno na regeneração dos tecidos. No entanto, o estudo da cicatrização intestinal tem sido pouco estudado por este método.

Yew et al., em 1989, relataram os efeitos do laser na cicatrização de anastomoses de jejuno, observando tanto o número e a espessura das fibrilas colágenas, como a presença de espaços vazios entre as fibrilas. Christensen et al., em 1995, estudaram a organização ultraestrututral do colágeno em anastomoses de cólon, em ratos, e também, o efeito do hormônio de crescimento sobre a cicatrização, no 2º, 4º e 6º dias de pós-operatório. Estes autores relataram a presença de fibrilas colágenas no sítio da anastomose, a partir do quarto dia de pós-operatório, cobertas por estruturas esféricas, as proteoglicanas.

Não existem relatos na literatura sobre os efeitos do diabetes em anastomoses intestinais utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura. Este método é de grande valia no estudo das anastomoses, pois propicia a análise e descrição de amostras em tamanho maior, permitindo uma visão global do arranjo ultraestrutural do colágeno. No presente estudo, observou-se que animais diabéticos apresentaram um atraso na organização do arranjo das fibras colágenas, as quais se mantiveram mais finas e não confluentes, sem a formação de feixes e com grande quantidade de proteoglicanas, até o 30º dia de pós-operatório, quando comparadas às fibras colágenas dos animais não-diabéticos.

Com base em estudos citados anteriormente, pode-se sugerir que a presença maciça de proteoglicanas nas anastomoses tanto de íleo, como de cólon, em animais diabéticos, pode ser o mecanismo responsável pelo fato de as fibras colágenas serem mais finas e não se agruparem em feixes nestes animais. Orberg et al.(1982), em estudo realizado em intestino de ratos, sem agressão cirúrgica, sugerem que as fibras mais grossas sejam formadas por colágeno do tipo I, responsável pela força e sustentação da parede intestinal, e as mais finas, por colágeno do tipo III, responsável pela manutenção da união das fibras mais grossas, em diferentes camadas, o que distribui a tensão recebida no tecido, de uma fibra para outra. Por outro lado, a trama de fibras mais finas pode exercer importante papel no restabelecimento do padrão ondulado das fibras mais grossas, após terem sido deformadas.

Mais recentemente, Onodera et al. (2004) estudaram anastomoses colônicas de ratos diabéticos no 3º, 5º, 7º e 14º dias de pós-operatório. Os pesquisadores demonstraram que apesar de não ter encontrado diferenças nas dosagens de hidroxiprolina e colágeno tipo III, entre o grupo diabético e controle, a quantidade de colágeno do tipo I teve pequeno aumento nos animais diabéticos, estando sempre bem abaixo dos animais do grupo controle. Sugeriram que a menor força das anastomoses colônicas em animais diabéticos não é atribuída à quantidade total de colágeno, mas às deficiências no colágeno neoformado, principalmente o bloqueio da síntese do colágeno tipo I. Em nosso estudo, a presença maciça de fibras colágenas mais finas, que não se interligam as fibras mais grossas, as quais estão em número reduzido e sem arranjo definido, permite-nos levantar a hipótese de que a diminuição da força de ruptura de anastomoses realizadas em animais diabéticos, em estudos biomecânicos

realizados anteriormente no nosso laboratório experimental (MACHADO, 2002), e por autores de outros serviços (ANDREASSEN e OXLUND, 1987; VERHOFSTAD et al., 1994), seja o mecanismo diretamente envolvido na gênese desta alteração. Pesquisas adicionais são necessárias no sentido de classificar o colágeno nos seus subtipos, confirmando as hipóteses aqui levantadas.

8. Quanto à dimensão fractal

A dimensão fractal tem sido utilizada para o diagnóstico diferencial de nódulos de mama (POHLMAN et al., 1996; SHAHAR et al., 2002), nódulos pulmonares (KIDO et al., 2002 e 2003), pólipos de cólon (DE FELICE et al., 2003), e no diagnóstico e estadiamento do enfisema pulmonar (CHUNG e HUANG, 2000), da retinopatia diabética (DAXER, 1993; CHENG e HUANG, 2003) e da pressão arterial (WAGNER et al., 1996).

Neste estudo, a análise qualitativa das anastomoses intestinais de ratos normais e diabéticos, à microscopia eletrônica de varredura, foi complementada com o cálculo da dimensão fractal destas imagens digitalizadas, através do método *Box-counting*. Observou-se que nos animais operados no íleo, houve diferenças estatísticas nos momentos M2 e M3 (14º e 21º dias de pós-operatório), e nos animais operados no cólon, as diferenças ocorreram nos momentos M1 e M4 (4º e 30º dias de pós-operatório). Em ambos os grupos, quando houve diferenças, os animais diabéticos mostraram valores maiores da variável DF (dimensão fractal) que os grupos controles. Com base nestes resultados, podemos sugerir algumas hipóteses. Os animais diabéticos apresentaram valores sempre mais elevados que os grupos controles, com diferenças estatísticas nos momentos citados anteriormente. Estes valores traduzem uma maior complexidade das anastomoses dos animais diabéticos, com valores mais próximos de 2. Na análise qualitativa realizada à microscopia eletrônica de varredura, observou-se nos animais diabéticos, ausência de arranjo definido, presença de espaços vazios nas anastomoses e menor número de fibras colágenas grossas, com grande número de fibras colágenas mais finas. Relacionando estes resultados com a análise da dimensão fractal, pode-se sugerir que a ausência de arranjo definido e regular do colágeno, nas anastomoses, leva a uma tendência à maior complexidade aferida pela dimensão

fractal, e, portanto, menor força tensora nos estudos biomecânicos realizados anteriormente (MACHADO, 2002). Não existem, porém, relatos na literatura de estudos com o uso da dimensão fractal em anastomoses intestinais, relacionadas ou não ao diabetes. Outros estudos posteriores serão necessários para relacionar o cálculo da dimensão fractal às análises qualitativas, permitindo assim, avanços cada vez maiores neste novo campo de aplicação do conhecimento.

Conclusões

Baseados nos resultados obtidos e nas condições experimentais do presente estudo, concluímos que:

1. os animais diabéticos apresentam arranjo irregular das fibras colágenas e atraso na retração da ferida nas anastomoses intestinais analisadas à microscopia óptica, em relação aos grupos controles normais.

2. na maioria dos momentos não houve alterações significativas na análise morfométrica da quantidade de colágeno presente na anastomose dos animais diabéticos, tanto no íleo como no cólon, em relação aos animais controles.

3. a análise ultraestrutural do colágeno das anastomoses de íleo e cólon à microscopia eletrônica de varredura mostrou que nos animais diabéticos houve presença maciça de proteoglicanas até o último momento estudado, rarefação de fibras colágenas grossas, presença de fibras colágenas mais finas e desarranjo na distribuição destas fibras, em relação aos animais dos grupos controles não-diabéticos.

4. o cálculo da dimensão fractal do arranjo estrutural do colágeno presente na cicatriz, em alguns momentos dos grupos operados no íleo e no cólon mostraram valores maiores nos animais diabéticos, revelando maior complexidade destas anastomoses em relação aos animais não-diabéticos.

Neste trabalho experimental, parece válido afirmar que, em concordância com as nossas suspeitas iniciais, o diabetes provoca alterações na qualidade e no arranjo das fibras colágenas, explicando, provavelmente, a causa da menor força das anastomoses nos estudos biomecânicos realizados anteriormente.

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo investigar se o diabetes experimental aloxânico poderia provocar alterações qualitativas nas anastomoses intestinais realizadas em íleo terminal e cólon distal de ratos, em relação a ratos controles normais, submetidos à mesma abordagem cirúrgica.

Foram efetivamente avaliados 192 ratos da raça Wistar, machos, sadios ao exame clínico, pesando entre 200 e 300g, distribuídos em quatro grupos experimentais de 48 animais cada, sendo um grupo controle normal com anastomoses realizadas no íleo (G1), um grupo controle normal com anastomoses realizadas no cólon (G2), um grupo diabético com anastomoses realizadas no íleo (G3), e um grupo diabético com anastomoses realizadas no cólon (G4).

Após três meses de seguimento (G1 e G2), ou de diabetes (G3 e G4), os animais dos quatro grupos experimentais foram operados sendo realizadas anastomoses no íleo terminal (G1 e G3) ou no cólon distal (G2 e G4) e subsequentemente avaliados em quatro momentos de pós-operatório (4º, 14º, 21º e 30º dias), onde foram analisados os seguintes parâmetros: evolução clínica (peso corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese), exames laboratoriais (glicemia de jejum e glicosúria). Em cada um dos momentos mencionados os animais foram sacrificados, sendo retirados fragmentos de intestino delgado e de intestino grosso, envolvendo as anastomoses realizadas, sendo espécimes de 6 animais utilizados para análise ultraestrutural das fibras colágenas, à microscopia eletrônica de varredura, com posterior cálculo da dimensão fractal, e outros 6 para o estudo histopatológico à microscopia óptica pelo método de coloração do pricrosirius.

A indução do diabetes foi feita por meio da injeção endovenosa de aloxana a 2%, em dose única. Foram incluídos no experimento somente animais com diabetes grave caracterizado por queda progressiva de peso corporal, elevação da ingestão hídrica, ingestão alimentar e da diurese, com valores glicêmicos acima de 200mg/dl e glicosúria de 3+ em fitas reagentes.

A análise histopatológica à microscopia óptica de lâminas das anastomoses coradas pelo pricrosirius, em aumento de 40x (lupa) mostrou desarranjo na distribuição das fibras colágenas e retardo na retração da cicatriz, com maior intensidade nos grupos submetidos à anastomoses de cólon. O estudo

morfométrico mostrou diferenças entre a área ocupada pelo colágeno nas anastomoses realizadas no íleo, apenas no momento M2 (14º pós-operatório), enquanto que, no cólon, houve diferenças nos momentos M1 e M4 (4º e 30º dia de pós-operatório), com valores mais elevados nos animais diabéticos.

A análise ultraestrutural à microscopia eletrônica de varredura mostrou que tanto nas anastomoses realizadas no íleo, como nas de cólon, houve rarefação de fibras colágenas grossas, presença de fibras colágenas mais finas e desarranjo na distribuição destas fibras, em relação aos animais dos grupos controles não-diabéticos, em todos os momentos avaliados.

O cálculo da dimensão fractal do arranjo estrutural do colágeno presente na cicatriz, a partir das imagens obtidas à microscopia eletrônica mostrou tendência à maior complexidade das anastomoses realizadas em animais diabéticos, tanto no íleo, como no cólon.

Diante dos resultados pode-se concluir que o diabetes provocou alterações qualitativas das cicatrizes, bem como no arranjo estrutural das fibras colágenas; o que explicaria a pior cicatrização dos animais diabéticos.

Summary

The purpose of this study was to investigate if experimental aloxanic diabetes could cause qualitative changes in intestinal anastomoses of the terminal ileum and distal colon in rats, when compared to normal control rats submitted to the same surgical approach.

192 male Wistar rats were weighing between 200 and 300 g were split into four experimental groups of 48 animals each. One normal control group was submitted to ileum anastomoses (G1), one normal control group was submitted to colon anastomoses (G2), one diabetic group was submitted to anastomoses of the ileum (G3) and the fourth diabetic group was submitted to anastomoses of the colon (G4).

Normal (G1 and G2) and diabetic (G3 and G4) rats were followed up for three months and then submitted to anastomoses of the terminal ileum (G1 and G3) or of the distal colon (G2 and G4). Animals were evaluated on days 4, 14, 21 and 30 after surgery and the following parameters were assessed: clinical evolution (body weight, fluid intake, food ingestion and diuresis), laboratory tests (glycemia and glycosuria). Animals were sacrificed on each of these days and fragments of the small and large intestine where the anastomoses were performed were removed. Samples from 6 animals were submitted to ultrastructural analysis of the collagen fibers using a scanning electron microscope and using these images, the fractal dimension of the collagen structure was calculated. Samples from another 6 animals were submitted to histopathology at optical microscopy stained by picrosirius red and the area of the collagen in the anastomoses were calculated using these digitized images.

Diabetes was induced with a single intravenous injection of alloxan 2%. The study included only animals with severe diabetes characterized by progressive weight loss, increased fluid and food intake, diuresis, glycemic indices higher than 200mg/dl and 3+ glycosuria measured using reagent sticks.

Histopathological analysis of picrosirius stained anastomosis slides using an optical microscope at 40x magnification showed that the distribution of collagen fibers was disarranged and also revealed a delay in scar tissue retraction in the diabetic animals. These findings were more intense in the diabetic group submitted to anastomoses of the colon. The morphometric study revealed differences in the collagen filled area in the ileum anastomoses at M2 (14 days

post surgery) whereas, in the case of colon anastomoses, differences were observed at M1 and M4 (4 and 30 days post surgery), with higher values in the diabetic animals.

Ultrastructure analysis of the ileum and colon anastomoses using a scanning electron microscope revealed fewer wide collagen fibers, the presence of narrower fibers and a disarranged distribution of the collagen fibers, as compared to the findings in non diabetic control animals in all of the assessments.

Using electron microscopy to calculate the fractal dimension of the structural arrangement of the collagen fibers present in the scar tissue revealed enhanced complexity of the anastomoses conducted in the ileum and colon of diabetic animals.

We conclude that diabetes causes qualitative changes in scar tissue as well as in the structural arrangement of collagen fibers, what could explain the reduced wound strength in the anastomoses of diabetic animals.

Bibliografia

ALKAN, A.; ERDEM, E.; GUNHAN, O.; KARASU, Ç. Histomorphometric evaluation of the effect of doxycyline on the healing of boné defects in experimental diabetes mellitus: a pilot study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 60, p. 898-904, 2002.

ANDREASSEN, T.T.; OXLUND, H. The influence of experimental diabetes and insulin treatments on the biomechanical properties of rat skin incisional wounds. **Acta Chir. Scand.**, v. 153, p.405-409, 1987.

BANTING, F.G.; BEST,CH. The internal secretion of the pancreas. **J. Lab. Clin. Med.,** v.7,p.251-256, 1922.

BAR-YAM,Y. **Dynamics of complex systems**. Reading (MA): Addison-Wesley, 1997.

BELL JR, R.H.; HYE, R.J. Animal models of diabetes mellitus: Physiology and Pathology. **J. Surg. Res.**, v.35, p.433-460, 1983.

BERGÉ, P.; POMEAU, Y.; DUBOIS-GANGE, M. **Dos ritmos ao caos**. São Paulo: Editora Unesp, 1995.

BLACK, C.T.; HENNESSEY, P.J.; FORD,E.G.; ANDRASSY, R.J. Protein glycosylation and collagen metabolism in normal and diabetic rats. **J. Surg. Res.**, v.47, p.200-205, 1989.

BONDY, P.K. Distúrbios do metabolismo dos hidratos de carbono. In: BEESON, PB; McDEMOTT,W. **Tratado de Medicina.**13.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.2, p.1627-1643, 1973.

BREIM, L.C. **Estudo comparativo entre o transplante total de pâncreas, transplante de ilhotas de Langerhans, e o tratamento convencional com insulina no controle das manifestações clínicas do diabetes aloxânico no**

rato. 1990. 127p. Dissertação (Mestrado) em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BREKKE, I.B.; GULLESEN, I.; REFSUM, S.B.; FLATMARK, A. Long-term endocrine function of duct-ligated pancreas isotransplants in rats. **Eur. Surg. Res.**, v.12, p.167-178, 1980.

BREKKE, I.B.; HOSTMARK, A.T.; FLATEN, O.; OYASAETER, O. Effect of pancreas transplantation on plasma lipids and plasma concentrations of pancreatic hormones in streptozotocin diabetic rats. **Eur. Surg. Res.**, V.13, P.361-370, 1981.

CAHILL, G.F.; ETZWILER, D.D.; FREINKEL, N. Control and diabetes. **N. Engl. J. Med.**, v.294, p.1004-1005, 1976.

CAHILL, G.F. Current concepts of diabetes. In: MARBLE, A.; KRALL,L.P.; BRADLEY, R.F.; CHRISTLIEB, A.R.; SOELDNER, J.S. (Eds.) **Joslin's diabetes mellitus.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1985. p.1-11.

CALDERON, I.M.P. **Modelo experimental em ratas para o estudo do binômio diabete e gravidez.**1988. 125p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CAVALLERO, C.; MOSCA, L. Mitotic activity in the pancreatic islets of the rat under pituitary growth hormone and adrenocorticotropic hormone treatment. **J. Pathol. Bacteriol.**, v.66, p.147-151, 1953.

CETTA, G.; TENNI, R.; ZANABONI, G.; IPPOLITO, E.; DE MARTINO, C. Biochemical and morphological modifications in rabbit Achilles tendon during maturation and ageing. **Biochem J.**, V.204, P.61-67,1982.

CHENG, S.C.; HUANG, Y.M. A novel approach to diagnose diabetes based on the fractal characteristics of retinal images. **Trans. Inf. Technol. Biomed.,** v.7, p.163-170, 2003.

CHRISTENSEN, H.; CHEMNITZ, J.; CHRISTENSEN, B.C.; OXLUND, H. Collagen structural organization of healing colonic anastomoses and the effect of growth hormone treatment. **Dis. Colon Rectum**, v.38, p.1200-1025, 1995.

CHUNG, H.; HUANG, Y. Fractal analysis of nuclear medicine images for the diagnosis of pulmonary emphysema: interpretations, implications and limitations. **Am. J. Roentgenol.**, v.174, p.1055-1059, 2000.

COTRAN, R.D.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Pathologic basis of disease. In:____. **Diabetes Mellitus.** 4. ed. Philadelphia: Saunders, 1989. p.99-110.

DAXER, A. Characterization of the neovascularization process in diabetic retinopathy by means of fractal geometry: diagnostic implications. **Graefes Arch. Clin. Exp. Ophtalmol.**, v.231, p.681-686, 1993.

DE FELICE, C.; LATINI, G.; BIANCIARDI, G.; PARRINI,S.; FADDA, G.M.; MARINI, M.;LAURINI, R.N.; KOPOTIC, R.J. Abnormal vascular network complexity: a new phenotypic marker in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. **Gut**, V.53, P.1764-1767, 2003.

DUNN, J.S.; SHEEHAN, H.L.; McLETCHIE, N.G.B. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. **Lancet**, v.1, p.484-487, 1943.

EKMEKTZOGLOU, K.A.; ZOGRAFOS, G.C. A concomitant review of the effects of diabetes mellitus and hypothyroidism in wound healing. **World J. Gastroenterol.**, v.12, p.2721-2729, 2006.

FAHEY III, T.J.; SADATY, A., JONES II, W.G.; BARBER, A.; SMOLLER, B.; SHIRES, G.T. Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. **J. Surg. Res.**, v.50, p.308-313, 1991.

FOLLAK, N. KLOTING, I.; GANZER, D. MERK, H. Scanning electron microscopic examinations on retarded bone defect healing in spontaneously diabetic BB/O(ttawa)K(arlsburg) rats. **Histol. Histopathol.**, v.18, p.111-120, 2003.

FOLLAK, N. KLOTING, I.; WOLF, E.; MERK, H. Histomorphometric evaluation of the influence of the diabetic metabolic state on bone defect healing depending on the defect size in spontaneously diabetic BB/OK rats. **Bone**, v.35, p.144-152, 2004.

FRANZÉN, L.E.; ROBERG, K. Impaired connective tissue repair in streptozotocin-induced diabetes shows ultrastructural signs of impaired contraction. **J. Surg. Res.**, v.58, p. 407-414, 1995.

FULLER, J.H.; ELFORD,J.; GOLDLATT,P.; ALDESTEIN,A.M. Diabetes mortality. New light on an underestimated public health problem. **Diabetologia**, v.24, p. 336-341, 1983.

GOODSON, W.H.; HUNT, T.K. Studies of wound healing in experimental diabetes mellitus. **J. Surg. Res.**, v.22, p.221-224, 1977.

GOTTRUP, F.; ANDREASSEN, T.T. Healing of incisional wounds in stomach and duodenum: the influence of experimental diabetes. **J. Surg. Res.**, v.31, p.61-68, 1981.

GUERRINI, I. A. A física de sistemas vivos. **Jornal da UNESP**, São Paulo, n. 177,p.2,2003. Disponível em: <http://www.unesp.br/aci/jornal/177/opiniao.htm>. Acesso em 15 maio 2006.

HAMILTON, C.W.; CHANDLER, D.B.S.; KLINTWORTH, G.K.; MACHEMER, R. A transmission and scanning electron microscopic study of surgically excised preretinal membrane proliferations in diabetes mellitus. **Am. J. Ophtalmol.**, v.94, p.473-488, 1982.

HESP, F.L.E.M.; HENDRIKS, T.; LUBBERS, E.C.; DEBOER, H.H.M. Wound healing in the intestinal wall. A comparison between experimental ileal and colonic anastomoses. **Dis. Col. Rect.**, v. 27, p.99-104, 1984.

HETHERINGTON, A.W.; RANSON, S.W. Hipothalamic lesions and adiposity in the rat. **Anat. Rec.**, v.78, p.149-153, 1940.

HEUGHAN, C.; HUNT, T.K. Some aspects of wound healing research: a review. **Can. J. Surg.**, v.18, p.118-126, 1975.

JUNOD, A.; LAMBERT, A.E.; ORCI, L.; PICTET, R.; GONET, A.E.; RENOLD, A.E. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, v.126, p.201-205, 1967.

KIDO, S.; KURIYAMA, K.; MASAHIKO, K.; KASUGAI, T.; KURODA, C. Fractal analysis of small peripheral pulmonary nodules in thin-section CT: evaluation of the lung-nodule interfaces. **J. Comp. Ass. Tomography**, v.26, p.573-578, 2002.

KIDO, S; KURIYAMA, K; HIGASHIYAMA, M; KASUGAI, T.; KURODA, C. Fractal analysis of internal and peripheral textures of small peripheral bronchogenic carcinomas in thin-section computed tomography: comparison of bronchioloalveolar cell carcinomas with nonbronchioloalveolar cell carcinomas. **J. Comp. Ass. Tomography.**, v.27, p. 56-61, 2003.

KLEIN, L; EICHELBERGER, H; MIRIAN, M; HILTNER, A. Ultrastructural properties of collagen fibrils in rat intestine. **Connect. Tissue Res.**, v.12, p.71-78,1983.

KLONOWSKI, W. Signal and image analysis using chaos theory and fractal geometry. **Mach. Graph. Vision**, v.9, p.403-431, 2000.

KNATTERUD, G.L.; KLIMT, C.R.; LEVIN, M.E.; JACOBSON, M.E.; GOLDNER, M.G. Effects of hypoglycemic agents on vascular complications in patients with

adult-onset. Mortality and selected nonfatal events with insulin treatment. **J. Am. Med. Assoc.**, v.240, p.37-42, 1978.

KOLATA, G.B. Controversy over study of diabetes drugs continues for nearly a decade. **Science**, v.230, p.986-990, 1979.

KOMURO, T. The lattice arrangement of the collagen fibres in the submucosa of the rat small intestine: scanning electron microscopy. **Cell Tissue Res.**, v.251, p.117-121,1988.

KOMURO, T.; HASHIMOTO, Y. Three-dimensional structure of the rat intestinal wall (mucosa and submucosa). **Arch. Histol. Cytol.**, v.53, p.1-21, 1990.

KRÓLEWSKI, A.S.; WARRAM, J.H. Epidemiology of diabetes mellitus. In: MARBLE,A.; KRALL, L.P.; BRADLEY, R.F.; CHRISTLIES, A.R.; SOELDNER, J.S. (Eds.) **Joslin's diabetes mellitus.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1985. p.12-42.

LAZAROW, A.; PALAY, S.L. Production and course of alloxan diabetes in rats. **J. Lab. Clin. Med.**, v.31, p.1004-1015, 1946.

LAZARUS, S.S.; BENCOSME, S.A. Alterations of pancreas during cortisone diabetes in rabbits. **Proc. Soc. Exp. Biol.**, v.89, p.114-119,1955.

LEE, S.; CHANDLER, J.G.; KRUBEL, R.; NAKAJI, N.T.; ROSEN, H.; ORLOFF, M.J. Relief of diabetes mellitus by heterotopic transplantation in the rat. **Surg. Forum**, v.22, p.75-77, 1971.

LEE, S; TUNG, KSK; KOOPMAN, H, et al. Pancreaticoduodenal transplantation in the rat. **Transplantation,** v.13, p.421-425, 1972.

LERCO, 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.** 2000. Dissertação (Mestrado em

Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina , Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LIEBOVITCH, L. S. **Fractals and chaos. Simplified for the life sciences**. New York:Oxford University Press, 1998.

LORENZ, E. Deterministic nonperiodic flow. **J. Atmos. Sci.,** v.20, p.130-141, 1963.

LUKENS, F.D.W. Alloxan diabetes. **Physiol. Rev.**, v.28, p. 304-330, 1948.

MACEDO, A.R.; SKIVOLOCKI, W.P.; THOMPSON, K.R.; BELL JR, R.H.; LEE, S.; ORLOFF, M.J. Morphometric electron microscopy study of the effect of whole pancreas transplantation on alloxan diabetic neuropathy. **Surg. Forum**, v.32, p.1379-1380, 1981.

MACEDO, A.R.; GREENLEAF, G.E.; SAYERS, H.J.; ORLOFF, M.J. Effect of whole pancreas transplantation on long-established kidney lesions of diabetes. **Surg. Forum**,v.36, p.346-348,1985.

MACEDO,A.R.;MACEDO,C.S.;MERCADANTE,M.C.S.;SPADELLA,C.T.; BREIM, L.C.; MACHADO, J.L.M.; CAPELLETI, S.M.; ROSO, S.L.O. Pancreaticoduodenal graft versus islet of Langerhans transplantation on controlo f diabetic stat in the rats. **Dig. Dis. Sci.**, v.31, p.3129-3131,1986.

MACHADO, J.L.M. **Neuropatia diabética experimental: estudo morfológico e morfométrico do nervo ciático de ratos diabéticos.**1993. Dissertação (Mestrado em Bases Gerias da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MACHADO, J.L.M. **Cicatrização de anastomoses intestinais e diabetes experimental. Estudo clínico, laboratorial, biomecânico e histopatológico de anastomoses realizadas no íleo terminal e cólon distal de ratos diabéticos.** 2002.151p. Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia

Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MADDEN, J.W.; PEACOCK, E.E. Studies on the biology of collagen during wound healing. **Surgery**, v.64, p.288-293, 1968.

MAINZER, K. **Thinking in complexity.The complex dynamics of matter, mind, and mankind**. New York: 1994. Springer-Verlag.

MAKINO, H.; YAMASAKI, Y.; HARAMOTO, T.;SHIKATA, K.; HIRONAKA, K.; OTA, Z.; KANWAR, Y.S. Ultrastructural changes of extracellular matrices in diabetic nephropathy revealed by high resolution scanning and immunoelectron microscopy. **Lab Invest.**, v.68, p. 45-55, 1993.

MANDELBROT, B.B. **The fractal geometry of nature.** 3.ed. New York: W.H.Freeman and Company, 1983.

MARION, M.S.; CARLSON, E.C. Ultrastructural analyses of acellular glomerular basement membranes and mesangial matrix in a spontaneously diabetic rhesus monkey. **Acta Anat.**, v.135, p.119-128, 1989.

MARTENS, M.F.W.C.; HENDRIKS, T.H. Postoperative changes in collagen synthesis in intestinal anastomoses of the rat: differences between small and large bowel. **Gut**, v.32, p.1482-1487, 1991.

MELLIN, T.N.; CASHEN, D.E.; RONAN, J.J.; MURPHY, B.S.; DI SALVO, J. THOMAS, K. Acidic fibroblast growth factor accelerates dermal wound healing in diabetic mice. **J. Inv. Dermatol.**, v.104, p.850-855, 1995.

MELTON,J.L.; PALUMBO, P.J.; CHU, C.P. Incidence of diabetes by clinical type. **Diabet. Care**, v.6, p.75-86, 1983.

MERING, J.V.; MINKOWSKI, O. Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation. **Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.,** v.26, p.371-387, 1889.

MORDES, J.P.; ROSSINI, A.A. Animal model of diabetes mellitus. In: MARBLE,A.; KRALL, L.P.; BRADLEY, R.F.; CHRISTLIES, A.R.; SOELDNER, J.S. (Eds.). **Joslin's diabetes mellitus.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1985. p.110-137.

NORMAN, G.R.; STREINER, D.L. **Biostatistics: The Bare Essential.** 1st ed, 1998. p.324.

ONODERA, H.; IKEUCHI, D.; NAGAYAMA, S.; IMAMURA, M. Weakness of anastomotic site in diabetic rats is caused by changes in the integrity of newly formed collagen. **Dig. Surg.** , v.21, p.146-151, 2004.

ORBERG, J.W.; KLEIN, L.; HILTNER, A.. Scanning electron microscopy of collagen fibers in intestine. **Connect. Tissue Res.**, v.182, p. 187-193, 1982.

ORLOFF, M.J.; LEE, S.; CHARTERS, A.C.; GRAMBORT, D.E.; STORCK, G. KNOX, D. Long-term studies of pancreas transplantation in experimental diabetes mellitus. **Ann. Surg.**, v.182, p.198-206, 1975.

ORLOFF, M.J.; MACEDO, A.R.; GREENLEAF, G.E. Effect of transplantation on diabetic neuropathy. **Surgery**, v.104, p.437-444, 1988.

PAIVA, E.V.O. **Avaliação de parâmetros de cicatrização em ratos normais e diabéticos. Estudo clínico, laboratorial, biomecânico e histopatológico do intestino delgado e intestino grosso.** 2001. 130p. Dissertação (Mestrado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

POHLMAN, S.; POWELL, K.A.; OBUCHOWSKI, N.A.; CHILCOTE, W.A.; GRUNDFEST-BRONIATOWSKI, S. Quantitative classification of breast tumors in digitized mammograms. **Med. Phys.,** v.23, p.1337-1345, 1996.

PRADO, I.M.M.; DI DIO L.J.A.; MIRANDA NETO, M.H.; MOLINARI, S.L.; MACCHIARELLI, G. Three-dimensional distribution of the collagen fibers in the

submucosa of the swine terminal ileum. **It. J. Anat. Embryol.**, v.110, p.77-86, 2005.

PRAKASH, A.; KAPU, M.; MAINI, B.S. Wound healing in experimental diabetes: histological, histochemical and biochemical studies. **Indian J. Med. Res.**, v.61, p. 1200-1206, 1973.

PRAKASH, M.S.; PANDIT, P.; SHARMA, L. Studies of wound healing in experimental diabetes. **Int. Surg.**, v.59, p.25-32,1974.

PRIGOGINE, I. **O fim das certezas**. São Paulo. Ed. UNESP, 1996.

RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M.L.; NADKARNI, M.V. Studies in the diabetogenic action of estreptozotocin. **Cancer Chemoter. Rep.**, v.29, p.91-94,1963.

ROSENBERG, C.S. Wound healing in the patient with diabetes mellitus. **Nurs. Clin. North. Am.**, v.25, p.247-253, 1990.

RUOSLAHTI, E. Structure and biology of proteoglicans. **Ann. Rev. Cell Biol.**, v. 4, p.229-255, 1988.

SCHELLINI, S.A. **Retinopatia diabética experimental: estudo estrutural, ultraestrutural e morfométrico da retina de ratos normais, diabéticos e diabéticos tratados.** 1992. Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SHAHAR, K.H.; SOLAIYAPPAN, M.; BLUEMKE, D.A. Quantitative differentiation of breast lesions based on three-dimensional morphology from magnetic resonance imaging. **J. Comp. Ass. Tomography.**, v.26, p.1047-1053, 2002.

SIPERSTEIN, M.D. Diabetic microangiopathy and the control of blood glucose. **N. Engl. J. Med.**, v.309, p.1577-1579, 1983.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diagnóstico e Classificação do Diabetes Mellitus e Tratamento do Diabetes Mellitus tipo II.** Recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo, 2002.

SPADELLA,C.T. **Avaliação funcional do transplante pancreato-duodenal no rato diabético: estudo clínico, laboratorial, anátomo-patológico e imunohistoquímico.** 1989. Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia e Cirurgia Experimental) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SPANHEIMER, R.G.; UMPIERREZ, G.E.; STUMPF, V. Decreased collagen production in diabetic rats. **Diabetes**, v.37, p.371-376, 1988.

TCHOBROUTSKY,G. Relation of diabetic control to development of microvascular complications. **Diabetologia.**, v.15, p.143-152,1978.

TOKUHATA, G.K.; MILLER,W.; DIGON,E.; HARTMAN, T. Diabetes mellitus, an underestimated public health problem. **J. Chron. Dis.**, v.28, p.23-55,1975.
UEDA, T.; LEE, S.; STORCK, G. Metabolic effect of alloxan diabetic rats before and after pancreas transplantation. **Proc. Anat. Microsurg. Soc.**, v.3, p.423-424, 1979.

VERHOFSTAD, M.H.J.; HENDRIKS, T. Diabetes impairs the development of early strength, but not the accumulation of collagen, during intestinal anastomotic healing in the rat. **Br. J. Surg.**, v.81, p.1040-1045, 1994.

VERHOFSTAD, M.H.J.; HENDRIKS, T. Complete prevention of impaired anastomotic healing in diabetic rats requires preoperative blood glucose control. **Br. J. Surg.**, v.83, p.1717-1721, 1996.

VERHOFSTAD, M.H.J.; LANGE, W.P.; VAN DER LAAK, J.A.W.M.; VERHOSTAD, A.A.J.; HENDRIKS, T. Microscopic analysis of anastomotic healing in the intestine of normal and diabetic rats. **Dis. Colon Rectum**, v.44, p.423-431, 2001.

VERHOFSTAD, M.H.J., LOMME, R.M.L.M., DE MAN, B.M.; HENDRIKS, T. Intestinal anastomoses from diabetic rats contain supranormal levels of gelatinase activity. **Dis. Colon Rectum**, v.45, p.554-561, 2002.

WAGNER, C.D.; NAFZ, B.; PERSSON, P.B. Chaos in blood pressure control. **Cardiovasc. Res.**, v.31, p.380-387, 1996

WALDROP, M. M. **Complexity:** the emerging science at the edge of order and chaos. Simon & Schuster, New York, 1992.

WILSON, T.; HOLT, T. Complexity and clinical care. **BMJ**, v.323, p.685-688, 2001.

YEW, D.T.; LI, W.W.Y.; PANG, K.M.;MOK, Y.C.; AU, C. Stimulation of collagen formation in the intestinal anastomosis by low dose He-Ne laser. **Scann. Microsc.**, v.3, p.379-386, 1989.

YOON, J.W.; AUSTIN, M.; ONODERA, T.; NOTKINS, A.L. Virus-induced diabetes mellitus. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. **N. Engl. J. Med.**, v.300, p.1173-1177,1979.

Apêndice

Nas tabelas incluídas neste tópico, apresentamos os resultados individuais das variáveis estudadas, em todos os animais.

Tabela 1. Grupo controle normal operado no íleo (G1) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M1 (4º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
36	386	27	20	3	119
520	365	33	17	3	74
540	396	26	15	3	110
548	376	28	23	3	111
551	430	28	25	4	111
554	473	33	26	4	111
587	330	33	21	3	64
612	346	33	21	3	55
613	446	31	23	6	65
675	430	31	23	4	61
680	440	33	18	5	67
687	376	35	15	2	70

Tabela 2. Grupo diabético, operado no íleo (G3) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M1 (4º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
35	213	130	18	61	282
45	310	223	37	149	306
336	220	177	25	125	410
367	223	183	22	95	305
503	225	147	27	85	382
517	228	140	20	65	408
94	253	230	22	159	418
90	280	227	37	156	407
203	243	250	33	163	459
720	293	130	32	82	348
724	253	130	28	70	372
728	300	163	23	122	375

Tabela 3. Grupo controle normal operado no íleo (G1) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M2 (14º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
231	457	57	25	8	119
234	473	47	22	11	127
236	430	60	27	3	132
338	432	45	23	7	115
352	427	30	27	5	115
444	417	50	25	13	121
215	443	32	23	6	116
217	413	47	25	12	111
224	490	43	25	6	104
482	420	37	20	6	103
485	337	30	20	3	99
558	368	33	27	8	80

Tabela 4. Grupo diabético, operado no íleo (G3) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M2 (14º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
129	255	187	27	106	333
138	347	147	28	57	274
143	263	250	32	145	373
555	297	100	17	63	395
631	217	203	23	122	406
634	335	140	27	45	333
178	280	160	32	105	358
186	253	150	25	95	362
313	353	134	37	62	406
353	283	160	30	90	358
362	262	137	18	86	384
453	277	157	33	76	451

Tabela 5. Grupo controle normal operado no íleo (G1) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M3 (21º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
100	430	47	27	5	129
117	397	67	28	13	125
291	423	47	23	5	108
309	373	47	28	3	97
421	447	37	25	8	129
446	403	42	17	14	118
102	407	40	23	8	124
122	367	57	27	6	118
643	410	37	18	7	81
647	367	37	18	5	90
694	413	32	17	3	74
699	447	28	17	5	60

Tabela 6. Grupo diabético, operado no íleo (G3) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M3 (21º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
98	233	220	27	150	301
114	340	213	38	140	386
294	230	207	35	115	370
320	197	213	37	111	443
400	303	223	35	117	496
404	253	215	32	140	516
158	263	250	37	169	321
164	262	227	35	145	331
189	270	173	30	114	356
447	250	187	35	122	394
707	310	147	20	75	374
709	253	197	22	98	360

Tabela 7. Grupo controle normal operado no íleo (G1) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M4 (30º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
209	437	37	25	2	109
211	430	27	22	3	126
246	410	33	27	6	87
251	437	32	32	6	102
363	363	30	13	5	114
389	427	40	24	9	131
225	483	27	20	3	122
227	460	43	25	8	93
228	460	30	22	6	97
253	413	52	33	8	101
255	417	30	27	6	109
256	410	27	30	4	102

Tabela 8. Grupo diabético, operado no íleo (G3) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M4 (30º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
147	260	220	35	150	415
153	313	217	42	147	379
239	300	170	38	102	377
250	220	190	25	127	414
332	317	170	30	124	389
378	305	177	30	144	454
58	280	250	32	134	404
60	218	210	23	124	408
88	317	240	37	145	444
249	260	210	32	146	403
498	233	183	32	100	458
501	293	200	27	118	451

Tabela 9. Grupo controle normal operado no cólon (G2) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M1 (4º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
39	410	36	23	2	102
500	401	36	30	2	70
505	416	30	30	2	88
515	380	33	18	2	67
518	391	30	21	4	72
527	476	43	30	6	75
594	400	23	20	7	65
614	446	30	21	6	68
616	480	28	20	5	70
617	383	30	22	4	67
678	410	25	22	2	61
681	400	31	18	1	63

Tabela 10. Grupo diabético, operado no cólon (G4) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M1 (4º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
75	220	227	28	140	370
81	193	230	33	152	357
89	200	213	33	163	424
360	227	193	25	115	337
372	267	230	25	167	454
521	250	117	22	78	404
32	247	213	35	127	310
42	197	213	37	140	395
595	240	210	27	137	388
556	233	120	18	59	415
633	207	110	28	51	439
645	283	160	30	68	371

Tabela 11. Grupo controle normal operado no cólon (G2) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M2 (14º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
232	473	62	25	9	98
233	498	50	27	9	111
235	510	48	28	11	123
295	363	53	22	5	102
334	427	30	23	4	110
348	397	30	23	5	104
218	430	30	25	3	117
219	423	33	23	3	122
220	413	35	23	6	125
477	393	30	28	2	107
480	347	32	23	1	99
656	393	53	28	4	85

Tabela 12. Grupo diabético, operado no cólon (G4) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M2 (14º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
132	183	150	23	90	341
134	213	203	30	134	366
144	217	140	23	80	287
483	260	87	25	42	366
492	217	133	22	84	361
541	278	193	27	125	442
126	222	190	33	117	354
137	350	200	30	128	306
358	257	170	22	124	299
373	235	180	27	117	320
431	293	203	33	129	424
432	225	185	33	105	396

Tabela 13. Grupo controle normal operado no cólon (G2) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M3 (21º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
95	377	52	28	4	110
104	413	47	27	7	121
300	353	37	23	3	90
303	407	42	25	10	107
391	393	27	14	7	123
442	440	47	25	10	112
105	383	67	33	12	115
113	393	40	27	4	111
124	373	47	22	5	103
445	430	50	23	10	107
448	437	62	27	11	108
671	403	27	15	3	51

Tabela 14. Grupo diabético, operado no cólon (G4) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M3 (21º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
103	243	217	30	139	318
110	273	220	37	147	344
306	227	197	38	125	398
397	223	150	28	110	501
401	297	183	25	101	505
407	240	220	30	149	505
435	247	120	35	66	369
440	210	160	33	94	427
454	253	233	32	136	436
633	273	197	30	125	392
636	203	143	23	60	386
639	193	140	30	64	390

Tabela 15. Grupo controle normal operado no cólon (G2) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M4 (30º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
200	417	27	18	5	130
207	433	33	22	1	111
257	373	32	23	6	100
260	397	47	37	5	103
356	417	43	20	9	105
409	453	43	18	13	111
216	397	35	22	2	115
226	418	32	22	8	122
229	350	25	18	5	117
247	453	37	32	5	106
252	417	40	28	4	90
259	457	25	22	9	113

Tabela 16. Grupo diabético, operado no cólon (G4) – parâmetros clínicos (peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese) e laboratorial (glicemia), no momento M4 (30º dia de pós-operatório).

Nº do rato	Peso (g)	Ingestão hídrica (ml/24h)	Ingestão alimentar (g/12h)	Diurese (ml/24h)	Glicemia (mg/dl)
55	260	250	33	150	413
150	267	243	45	167	386
242	277	207	32	143	403
284	211	203	27	139	483
339	323	187	32	132	371
355	282	160	33	100	363
61	253	243	30	144	440
263	247	157	33	91	367
416	327	213	30	140	454
419	283	180	20	123	456
528	237	143	28	80	455
535	220	93	23	58	362

Tabela 17. Grupo controle normal, operado no íleo (G1) – análise morfométrica (em mm^2), momento M1 (4^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	Área (mm^2)
36	683,83
520	2357,5
540	2153,59
548	886,63
551	1582,06
554	1087,62

Tabela 18. Grupo controle normal, operado no íleo (G1) – análise morfométrica (em mm^2), momento M2 (14^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	Área (mm^2)
231	464,57
234	237,33
236	1425,95
338	595,14
352	670,50
444	907,70

Tabela 19. Grupo controle normal, operado no íleo (G1) – análise morfométrica (em mm^2), momento M3 (21^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	Área (mm^2)
100	516,94
117	1525,69
291	866,0
309	793,48
421	1125,85
446	572,30

Tabela 20. Grupo controle normal, operado no íleo (G1) – análise morfométrica (em mm^2), momento M4 (30^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	**Área (mm^2)**
209	546,81
211	1458,51
246	-
251	1124,55
363	1054,91
389	246,37

Tabela 21. Grupo diabético, operado no íleo (G3) – análise morfométrica (em mm^2), momento M1 (4^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	**Área (mm^2)**
35	802,37
45	2140,7
336	954,59
367	1795,11
503	1141,58
517	2616,0

Tabela 22. Grupo diabético, operado no íleo (G3) – análise morfométrica (em mm^2), momento M2 (14^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	**Área (mm^2)**
178	1284,31
186	1320,19
313	1739,37
353	1307,01
362	1453,17
453	841,91

Tabela 23. Grupo diabético, operado no íleo (G3) – análise morfométrica (em mm^2), momento M3 (21^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	Área (mm^2)
98	730,38
114	786,41
294	1254,16
320	1468,32
400	862,15
404	-

Tabela 24. Grupo diabético, operado no íleo (G3) – análise morfométrica (em mm^2), momento M4 (30^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	Área (mm^2)
147	1285,18
153	458,08
239	1007,3
250	943,81
332	1143,64
378	1285,9

Tabela 25. Grupo controle normal, operado no cólon (G2) – análise morfométrica (em mm^2), momento M1 (4^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	Área (mm^2)
39	2454,36
500	570,28
505	915,34
515	758,13
518	2262,28
527	1652,42

Tabela 26. Grupo controle normal, operado no cólon (G2) – análise morfométrica (em mm^2), momento M2 (14^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	Área (mm^2)
232	1767,5
233	2402,37
235	1244,54
295	1112,19
334	670,46
348	1328,13

Tabela 27. Grupo controle normal, operado no cólon (G2) – análise morfométrica (em mm^2), momento M3 (21^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	Área (mm^2)
95	680,55
104	522,52
300	1206,12
303	470,73
391	394,69
442	1031,3

Tabela 28. Grupo controle normal, operado no cólon (G2) – análise morfométrica (em mm^2), momento M4 (30^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	Área (mm^2)
200	108,16
207	753,56
257	685,51
260	648,19
356	754,33
409	374,49

Tabela 29. Grupo diabético, operado no cólon (G4) – análise morfométrica (em mm^2), no momento M1 (4^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	Área (mm^2)
75	949,06
81	3984,14
89	2610,13
360	2584,07
372	2330,04
521	2915,81

Tabela 30. Grupo diabético, operado no cólon (G4) – análise morfométrica (em mm^2), no momento M2 (14^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	Área (mm^2)
126	1615,67
137	903,27
358	2558,87
373	1406,9
431	-
432	1378,0

Tabela 31. Grupo diabético, operado no cólon (G4) – análise morfométrica (em mm^2), no momento M3 (21^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	Área (mm^2)
103	355,26
110	1204,43
306	1740,09
397	2212,21
401	-
407	658,72

Tabela 32. Grupo diabético, operado no cólon (G4) – análise morfométrica (em mm^2), no momento M4 (30^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	Área (mm^2)
55	1887,64
150	2692,08
242	2392,03
284	889,42
339	1232,66
-	-

Tabela 33. Grupo controle normal, operado no íleo (G1) – dimensão fractal, no momento M1 (4^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
587	1,6798
612	1,6574
613	1,7815
675	1,6722
680	1,7751
687	1,7694

Tabela 34. Grupo controle normal, operado no íleo (G1) – dimensão fractal, no momento M2 (14^o dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
215	1,7226
217	1,7291
224	1,6937
482	1,7044
485	1,6781
558	1,7854

Tabela 35. Grupo controle normal, operado no íleo (G1) – dimensão fractal, no momento M3 (21º dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
102	1,7459
122	1,7996
643	1,7728
647	1,6521
694	1,9068
699	1,5594

Tabela 36. Grupo controle normal, operado no íleo (G1) – dimensão fractal, no momento M4 (30º dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
225	1,7474
228	1,7127
227	1,7284
253	1,7061
255	1,7159
256	1,7182

Tabela 37. Grupo diabético, operado no íleo (G3) – dimensão fractal, no momento M1 (4º dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
90	1,8043
94	1,6337
203	1,8023
720	1,7052
724	1,6845
728	1,7344

Tabela 38. Grupo diabético, operado no íleo (G3) – dimensão fractal, no momento M2 (14º dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
129	1,8805
138	1,8361
143	1,8064
555	1,8126
631	1,8101
634	1,7941

Tabela 39. Grupo diabético, operado no íleo (G3) – dimensão fractal, no momento M3 (21º dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
158	1,8222
164	1,7828
189	1,6983
447	1,7294
707	1,8168
709	1,8465

Tabela 40. Grupo diabético, operado no íleo (G3) – dimensão fractal, no momento M4 (30º dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
58	1,8087
60	1,727
88	1,8097
249	1,6792
498	1,697
501	1,7724

Tabela 41. Grupo controle normal, operado no cólon (G2) – dimensão fractal, no momento M1 (4º dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
594	1,7214
614	1,7591
616	1,7234
617	1,7094
669	1,7154
674	1,6726

Tabela 42. Grupo controle normal, operado no cólon (G2) – dimensão fractal, no momento M2 (14º dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
218	1,6411
219	1,6758
220	1,6397
477	1,7042
480	1,727
656	1,7891

Tabela 43. Grupo controle normal, operado no cólon (G2) – dimensão fractal, no momento M3 (21º dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
105	1,7818
113	1,8191
124	1,6674
445	1,6835
448	1,7302
671	1,7989

Tabela 44. Grupo controle normal, operado no cólon (G2) – dimensão fractal, no momento M4 (30º dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
216	1,7681
226	1,7169
229	1,5263
247	1,7397
252	1,737
259	1,7823

Tabela 45. Grupo diabético, operado no cólon (G4) – dimensão fractal, no momento M1 (4º dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
42	1,7779
556	1,7898
595	1,6995
633	1,775
645	1,7824
695	1,7175

Tabela 46. Grupo diabético, operado no cólon (G4) – dimensão fractal, no momento M2 (14º dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
132	1,6569
134	1,7324
144	1,7556
483	1,7681
492	1,805
541	1,7199

Tabela 47. Grupo diabético, operado no cólon (G4) – dimensão fractal, no momento M3 (21º dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
435	1,7186
440	1,6959
454	1,7884
633	1,8228
636	1,7209
639	1,7938

Tabela 48. Grupo diabético, operado no cólon (G4) – dimensão fractal, no momento M4 (30º dia de pós-operatório).

Nº do rato	DF
61	1,788
263	1,7259
416	1,7446
419	1,7533
528	1,7888
535	1,8039