

Beatriz Deoti

ESTUDO MORFOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO DO PLEXO MIENTÉRICO  
DAS VÁLVULAS CONFECCIONADAS NO COLO DE RATOS SUBMETIDOS À  
AMPUTAÇÃO ABDOMINOPERINEAL E COLOSTOMIA PERINEAL

Faculdade de Medicina  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte – Minas Gerais  
2011

Beatriz Deoti

ESTUDO MORFOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO DO PLEXO MIENTÉRICO  
DAS VÁLVULAS CONFECCIONADAS NO COLO DE RATOS SUBMETIDOS À  
AMPUTAÇÃO ABDOMINOPERINEAL E COLOSTOMIA PERINEAL

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Medicina.

Linha de pesquisa: Motilidade Digestiva (0303)

Orientador: Alcino Lázaro da Silva

Co-orientadora: Rosa Maria Esteves Arantes

Faculdade de Medicina  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte – Minas Gerais  
2011

## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-reitor: Profa. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomes

Pró-reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima dos Santos

## FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Francisco José Pena

Vice-Diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Manuel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: Profa. Tereza Cristina de Abreu Ferrari

Chefe do Departamento de Cirurgia: Prof. Marcelo Eller Miranda

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

Prof. Marcelo Dias Sanchez

Profa. Ivana Duval de Araújo

Prof. Edson Samesima Tatsuo

Prof. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Prof. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Marco Aurélio Lana Peixoto

Lívia Garcia Ferreira – Representante Discente Titular

Marcella Lobato Dias Consoli – Representante Discente Suplente

Tese apresentada para defesa, perante a Banca examinadora, constituída pelos professores:

---

Alcino Lázaro da Silva – Orientador – UFMG

---

Rosa Maria Esteves Arantes – Co-orientadora – UFMG

---

Viviam Rezende – UFMG

---

Virgínio Cândido Tosta de Souza – UNIVAS

---

Paulo Roberto Corsi – FMSCSP

---

Alberto Schanaider – UFRJ

## HOMENAGEM

### **Aos Pacientes**

“Sujeitos do nosso trabalho”, que nos motiva, nos impulsiona, nos mobiliza, nos desafia..., pois confiando, com sua entrega de corpo e alma espera no tratamento proposto a continuidade da vida

“Nascemos para o encontro com o outro  
e não o seu domínio...”

*Hélio Pellegrini*

## DEDICATÓRIA

### **Ao Antônio,**

Meu esposo que, por amor, assumiu uma atitude de apoio, de forma plena, deixando fluir a felicidade que há em mim nascida de lutas, de conquistas e prazeres. O amor nasceu e juntos conseguimos ir mais longe. Dividiu comigo a sua história e me ajudou a construir a minha. Hoje mais do que nunca somos dois. “Só quem é livre é capaz de se comprometer.”

“O amor não tem nada a ver com o que esperas conseguir,  
apenas com o que esperas dar; quer dizer tudo.”

*Katherine Hepburn*

## AGRADECIMENTOS

### **À Professora Rosa Maria Esteves Arantes**

Como co-orientadora é exemplo estimável de acolhimento e ajuda, mostrou-me que ainda existe coração na adversidade do mundo. Minha eterna gratidão.

“Mais que escassez de meios,  
há a miséria de vontade.  
Para a obra científica,  
os meios são quase nada  
e o homem é quase tudo.”

*Ramón y Cajal*

**Ao Professor Alcino Lázaro da Silva**, meu pai, meu orientador e **Ana Maria Deotti e Silva**, minha mãe, a quem reverencio amo e admiro, porque há neles a presença de Deus: existe coragem, solidariedade, simplicidade e humildade não expressas por palavras, mas por exemplos.

“Orientar não é somente preocupação  
com a produção de uma boa tese,  
mas também com a transformação  
do orientando em pesquisador independente.”

*Saul Goldenberg*

“Preciso despir-me do que aprendi  
Preciso esquecer o modo de lembrar que me ensinaram  
E raspar a tinta com que me pintaram os sentidos  
Desencaixotar as minhas emoções verdadeiras  
Desembrulhar-me e ser eu.”

*Fernando A.N. Pessoa*

**À Carla Deotti Silva Barbosa**, minha irmã que de forma cúmplice se envolveu neste mundo do digitar sem fim, concretizando o sonho com uma refinada tecnologia

“A aliança do idealismo de Quixote  
ao bom senso de Sancho.”

*Ramón y Cajal*

**Ao Marcelo Deotti e Silva**, meu irmão que no seu silêncio ajudou-me no sentido real das interpretações

“Calar diante do mistério que não entendemos  
é sabedoria...”

*Autor Desconhecido*

**À Bárbara e André**, meus filhos, que no dia a dia, ensinam-me a transcender os limites impostos pelo meio, a superar os interditos e a projetar-me sempre num mais além, fazendo-me aceitar o desafio de aprender que: para mudar o futuro só depende de mudar a maneira como se pensa o presente.

"Filho é um ser que nos emprestaram  
para um curso intensivo  
de como amar alguém além  
de nós mesmos, de como mudar nossos  
piores defeitos para darmos  
os melhores exemplos.  
Ser pai ou mãe é o maior ato  
de coragem que alguém pode ter,  
porque é se expor a todo tipo de dor,  
principalmente da incerteza  
de estar agindo corretamente."

*José Saramago*

**Alessandra Deoti e Silva**  
**Ana Carolina Parussolo André**  
**Prof. Antônio Lacerda Filho**  
**Breno Cotta Coelho**  
**Câmara Departamental da Faculdade de Medicina – UFMG**  
**Camila Franyffe Campos**  
**Colegas do Hospital “Cristiano Machado”**  
**Colegas do Instituto Mário Penna – Unidade Luxemburgo**  
**Comitê de Ética em Pesquisa animal – CETEA**  
**Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas**  
**à Cirurgia e Oftalmologia**  
**Cristiane de Souza Bechara**  
**Darci Ribeiro**  
**Débora Hugo Pacheco**  
**Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina – UFMG**  
**Derlin Severiano de Paula**  
**Diogo de Oliveira Lopes Ferreira Santos**  
**Dr. Paulo Afonso de Miranda**  
**Eduardo Barbosa Coelho Neto**

**Elmo de Paula Campos Junior**  
**Elza Helena de Almeida Hugo**  
**Fernando Henrique Pereira**  
**Funcionários da Biblioteca da Faculdade de Medicina – UFMG**  
**Funcionários da Faculdade de Medicina – UFMG**  
**Funcionários da Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e**  
**Oftalmologia**  
**FUPEC**  
**Gil Patrus Mundim Pena**  
**Isabel Cristina Costa e Silva**  
**Johnny Hayck Córrea**  
**Prof. José Carlos Corrêa**  
**Prof. José Carlos Nogueira**  
**Kelly Cristine de Lacerda Rodrigues Buzzatti**  
**Magda Maria Profeta da Luz**  
**Marcelo Moreira de Jesus**  
**Prof. Andy Petroianu**  
**Profa. Elizabeth Ribeiro da Silva**  
**Profa. Marilles Porto Mattos**  
**Profa. Virginia Hora Rios Leite**  
**Prof. Rodrigo Gomes da Silva**  
**Prof. Sérgio Alexandre da Conceição**

## EPÍGRAFE

“É essencial convencer-nos da prioridade da ética sobre a técnica, do primado da pessoa sobre as coisas, da superioridade do espírito sobre a matéria. A causa do homem só será servida se o conhecimento estiver unido à consciência. Os homens da ciência só ajudarão realmente a humanidade se conservarem o sentido da transcendência do homem sobre o mundo e de Deus sobre o Homem.”

*Beato Papa João Paulo II*

## INDICE

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3	OBJETIVO.....	11
4	MÉTODO.....	13
4.1	Animais .....	14
4.2	Biotério.....	14
4.3	Delineamento Experimental.....	14
4.3.1	Amostra.....	14
4.3.2	Pré-operatório imediato.....	15
4.3.3	Ato Operatório e Anestesia .....	15
4.3.3.1	<i>Grupo Simulado (GS)</i> .....	15
4.3.3.2	<i>Grupo Amputado (GA)</i> .....	16
4.3.3.3	<i>Grupo Amputado com Válvula (GACV)</i> .....	17
4.3.4	Colheita do Material.....	23
4.3.4.1	<i>Fixação do Material</i> .....	25
4.3.4.2	<i>Processamento Histológico e Microtomia</i> .....	25
4.3.4.3	<i>Coloração</i> .....	27
a)	Hematoxilina e Eosina .....	27
b)	Tricrômico de Gomori .....	27
c)	Imuno-histoquímica Produto Gênico Proteico 9.5 .....	27
4.3.4.4	<i>Microscopia Descritiva e Análise Morfométrica</i> .....	28
a)	Medida da Espessura da Parede Intestinal .....	29
b)	Densidade de Elementos Nervosos Produto Gênico Proteico 9.5 positivo.....	30
c)	Área de Tecido Conjuntivo da Parede Intestinal corado por Tricrômico de Gomori .....	32
4.4	Análise Estatística .....	33
5	RESULTADO .....	34
5.1	Mortes .....	35
5.2	Número de Pontos por Válvula e Abertura da Mucosa.....	35
5.3	Microscopia.....	36
5.3.1	Aspectos Histopatológicos Descritivos .....	36
5.3.1.1	<i>Segmento Intestinal Caudal</i> .....	36
5.3.1.2	<i>Segmento Intestinal Cranial</i> .....	41
5.3.2	Aspectos Histopatológicos Quantitativos.....	43
5.3.2.1	<i>Espessura da Parede Intestinal</i> .....	43

5.3.2.2 <i>Densidade dos Elementos Nervosos Produto Gênico Proteico 9.5 Positivo</i> .....	43
5.3.2.3 <i>Área do Tecido Conjuntivo da Parede Intestinal (Coloração por Tricrômico de Gomori)</i> .....	46
6 DISCUSSÃO.....	47
6.1 Aspectos Gerais.....	48
6.1.1 Amostra.....	48
6.1.2 Operação .....	48
6.2 Papel Funcional da Válvula – Seromiectomia.....	49
6.2.1 Microscopia Descritiva .....	51
6.2.2 Espessura.....	53
6.2.3 Plexo Mientérico .....	57
6.3 Perspectivas.....	60
7 CONCLUSÃO .....	62
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
APÊNDICE A .....	71
APÊNDICE B .....	72
APÊNDICE C .....	74
APÊNDICE D .....	75
APÊNDICE E.....	76
9 APÊNDICE.....	80
9.1 Resultado Cirúrgico.....	80
9.1.1 Pré, trans e pós-operatório.....	80
9.1.2 Peso .....	81
9.1.3 Macroscopia .....	83

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Detalhe da sutura em bolsa com fio de seda .....	16
Figura 2A – Dissecção romba com o quinto dedo até a vértebra coccígea. ....	17
Figura 2B – Arcada mesocólica preservada. ....	18
Figura 3 – Detalhe da arcada mesocólica (seta fina). Colo descendente com replicação fecal (seta larga). ....	18
Figura 4 – Preparo do segmento intestinal para confecção das válvulas. ....	19
Figura 5 – Secção da seromuscular, com exposição da mucosa (seta fina), e preservação da arcada (seta grossa). ....	19
Figura 6 – Injeção de solução salina, via anal, para verificar a existência ou não de perfuração na área da seromiotomia (seta).....	20
Figura 7 – Passagem do fio nas bordas da seromiotomia (seta).....	20
Figura 8 – Fio passado na seromuscular seccionada com mucosa exposta (seta).....	21
Figura 9 – Três válvulas confeccionadas no colo descendente (setas).....	21
Figura 10 – Esquema ilustrativo das etapas do procedimento de confecção da seromiotomia que dá origem às válvulas. Visão do lúmen. A=seromiotomia; B=sutura; C=pontos nodados <sup>25</sup> . Proposta inicial. ....	22
Figura 11 – Visão da colostomia perineal, que fica exposta sob a pinça hemostática na região onde o intestino foi suturado junto a pele. ....	23
Figura 12 – Segmento de 9cm dividido em dois segmentos de 3cm denominado cranial (à esquerda) e 6cm denominado caudal (à direita) respectivamente, colocados sobre papel filtro, com a camada serosa para baixo. As setas identificam o sentido que o material foi enrolado – de caudal para cranial. ....	24
Figura 13 – Rolos dos segmentos de 6cm do intestino de ratos do Grupo Amputado com Válvula (acima) e Grupo Amputado (abaixo) após imersão no fixador de Bouin. Visão lateral do rolo (seta). ....	25
Figura 14 – Corte histológico do rocambole de intestino. As marcas em vermelho representam as válvulas, sendo a terceira a mais periférica. Barra = 3mm. ....	26
Figura 15A – Fotomicrografia da região correspondente a uma válvula no rato do Grupo Amputado com Válvula, mostrando o aumento localizado da espessura da parede (linha preta), e a interrupção das camadas musculares (seta). Aumento de 10x.....	29
Figura 15B – Fotomicrografia do segmento caudal de um rato do Grupo Simulado mostrando o método para fazer as medidas das espessuras das camadas muscular total (MT), camada muscular circular e externa (MI, ME), e serosa (SE). Aumento de 4x. ....	29

Figura 16 – Método de digitalização usado para medir automaticamente a área da camada muscular circular (cor de rosa) mensurada em $\mu\text{m}^2$ e delimitada pela máscara azul. A área produto gênico proteico positiva dos axônios após digitalização foi evidenciada pelos pontos em verde. Aumento de 10x.....	31
Figura 17 – Método usado para medir a área corada por Tricrômico de Gomori, indicativa da presença de tecido conjuntivo (áreas verdes) distribuídas em toda a espessura da parede. Aumento de 4x. ....	33
Figura 18 – Aspectos histopatológicos do segmento caudal da parede intestinal dos Grupo Simulado (A e B), de aspecto normal e Grupo Amputado (C, D), apresentando espessamento da serosa (C, seta fina) na região anatomicamente similar à região da confecção da válvula amostrada em E e F no Grupo Amputado com Válvula. Note o espessamento da parede seromuscular na área de confecção da válvula (E, seta grossa), bem como a interrupção de continuidade das camadas musculares na área seccionada (F, seta fina) acompanhada de reação inflamatória crônica da camada serosa (F, seta grossa). Mucosa preservada em todos os grupos. Aumento 4x. Coloração: A, C, E (HE); B, D, F (Tricrômico de Gomori). ....	37
Figura 19 – Aspectos histopatológicos das válvulas (A–D), aumento 10x, e área adjacente (E–F). Observa-se interrupção parcial das camadas musculares (A, área tracejada). Tecido conjuntivo e vascular exuberante, representando cicatriz fibrosa (B, C, e detalhe). Em B, observa-se tecido conjuntivo ao redor do espaço vazio (*) ocupado previamente por fio cirúrgico. A coloração pelo Tricrômico de Gomori evidencia o tecido conjuntivo e deposição de colágeno na cor verde-azulada (C, detalhe, seta). Infiltrado mononuclear rico em células gigantes do tipo corpo-estranho (B, C, D, setas). Áreas representativas dos intervalos entre as válvulas, da parede intestinal, mostram estrutura preservada e com pouca deposição de tecido conjuntivo (E e F). Aumento 4x. ....	39
Figura 20 – Expressão de Produto Gênico Proteico 9.5 na parede intestinal de animais representativos dos Grupo Simulado (A, B, C), Grupo Amputado (D, E, F) e Grupo Amputado com Válvula (G, H, I). Nota-se a presença do plexo mientérico de forma contínua no Grupo Simulado (A) e Grupo Amputado (D) enquanto há uma nítida interrupção da continuidade dos elementos Produto Gênico Protéico 9.5 – positivos do plexo no Grupo Amputado com Válvula (G), que se correlaciona com a área onde a válvula foi confeccionada (G, Detalhe em HE). Neste grupo observa-se também diminuição localizada da densidade de fibras nervosas intramusculares lisas da parede intestinal, principalmente na camada muscular circular (setas H,I). A, D, G (aumento 4x); B, E, H (aumento 10x), C, F, I (aumento 20x).....	40

Figura 21 – Aspectos histológicos do segmento intestinal cranial, proximal à região das válvulas no Grupo Simulado (A, B, C, J), Grupo Amputado (D, E, F, K), e Grupo Amputado com Válvula (G, H, I, L). Observa-se continuidade das camadas serosa, musculares e submucosa, que apresentam estrutura preservada nos três grupos. No Grupo Amputado com Válvula (G) observa-se presença de inflamação crônica com reação giganto-celular do tipo corpo estranho na serosa (seta). A coloração pelo Tricrômico de Gomori (B, E, H) evidencia o tecido conjuntivo e deposição de colágeno em proporções semelhantes entre os grupos. A expressão de Produto Gênico Proteico 9.5 (C, F, I, J–L) delinea os elementos do plexo nervoso de forma contínua e de distribuição semelhante nos três grupos. A–I (aumento 4x). J–L (aumento 10X). Colorações A, D, G (Hematoxilina Eosina); B, E, H (Tricrômico de Gomori); C, F, I, J, K, L (Produto Gênico Proteico 9.5). .....	42
Figura 22 – Hérnia incisional na abertura da cavidade abdominal (seta). Rato do Grupo Simulado. ....	83
Figura 23 – Cíbalos na luz intestinal (setas). Rato do Grupo Simulado.....	84
Figura 24 – Aspecto enrugado da mucosa, no sentido longitudinal.....	84
Figura 25 – Ânus borrado de fezes pastosas (seta). Rato do Grupo Amputado .....	85
Figura 26 – Colo fino e sem conteúdo fecal no seu interior. Rato do Grupo Amputado. ....	85
Figura 27 – Infecção da coxa esquerda – grau avançado – determinado pela exposição de estruturas nobres (seta). Rato do Grupo Amputado com Válvula. ....	86
Figura 28 – Animal anestesiado para coleta do material. Prolapso de maior grau da colostomia. Fezes formadas. Rato do Grupo Amputado com Válvula.....	86
Figura 29 – Aderências (seta) do aparelho reprodutor com o colo dilatado. Rato do Grupo Amputado com Válvula. ....	87
Figura 30 – Abscesso encapsulado (seta cheia). Fios cirúrgicos (seta fina). Rato do Grupo Amputado com Válvula. ....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Causas de morte nos ratos do GACV.....	35
Tabela 2 – Análise da densidade dos elementos nervosos PGP positivo no segmento intestinal caudal no GS, GA, GACV.....	44
Tabela 3 – Análise das proporções da densidade dos elementos nervosos PGP positivo no segmento intestinal caudal no GS, GA, GACV .....	45
Tabela 4 – Variáveis número de pontos por válvulae abertura da mucosa no GACV.....	71
Tabela 5 – Abertura da mucosa por válvula nos ratos do GACV .....	71
Tabela 6 – Influência das variáveis número de pontos por válvula e abertura da mucosa no óbito dos animais .....	71
Tabela 7 – Análise da espessura da camada muscular dos grupos GS, GA, GACV, do segmento intestinal caudal.....	72
Tabela 8 – Análise da espessura da camada muscular dos grupos GS, GA, GACV, do segmento intestinal cranial .....	73
Tabela 9 – Análise estatística comparativa entre grupos dois a dois das médias das medidas da camada serosa.....	73
Tabela 10 – Análise do PGP no segmento intestinal <b>cranial</b> nos grupos GS, GA, GACV .....	74
Tabela 11 – Análise do TG no segmento intestinal <b>caudal</b> nos grupos GS, GA, GACV .....	75
Tabela 12 – Complicações trans e pós-operatórias dos animais no GS, GA, GACV .....	80
Tabela 13 – Análise comparativa dos pesos dos ratos no pré-operatório no GS, GA, GACV .....	81
Tabela 14 – Análise comparativa dos pesos dos ratos no pré-operatório e pós-operatório dos três grupos.....	82
Tabela 15 – Comparação entre grupos 2 a 2 quanto ao ganho médio de peso pós-operatório no GS, GA, GACV.....	83

## LISTA DE GRÁFICO

Densidade dos elementos nervosos PGP positivo – seguimento intestinal distal.....	45
---	----

## RESUMO

Colostomia abdominal definitiva após amputação abdominoperineal é uma cirurgia estabelecida, mas não é isenta de morbidades. A proposta de substituição a ela é a técnica da colostomia perineal que preenche as exigências atuais do tratamento do câncer de reto, porque ela não interfere na radicalidade da cirurgia proposta, evita a colostomia abdominal definitiva, preenche o vazio pélvico e é contentiva. O estudo das válvulas cirúrgicas confeccionadas no segmento do intestino abaixado permitirá o conhecimento da natureza histológica das mesmas e o seu aprimoramento. O objetivo é estudar os aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos do plexo mientérico das válvulas confeccionadas e a adjacência da terceira válvula e a espessura das camadas musculares e de tecido conjuntivo da parede intestinal nas adjacências da terceira válvula. Propõe-se contribuir na elucidação dos mecanismos que promovem o retardo do conteúdo intestinal ou a continência parcial e a natureza deste tecido. Foram operados 36 ratos, distribuídos em 3 grupos. No Grupo simulado, 6 animais foram submetidos a laparotomia. No Grupo Amputado, 6 animais foram submetidos à amputação do conjunto esfinteriano e colostomia perineal. No Grupo Amputado com Válvula, 24 animais foram submetidos à confecção de três seromiotomias (seção das camadas serosa, musculares longitudinal e muscular circular) no colo abaixado, amputação do conjunto esfinteriano e colostomia perineal. No 40º dia pós-operatório o segmento intestinal foi submetido à estudo morfológico e imunohistoquímico da seguinte forma: estudo microscópico descritivo (Hematoxilina Eosina) no segmento operado, no local da seromiotomia e a montante e ajusante à terceira válvula; análise morfométrica e imuno-histoquímica (Produto Gênico Protéico 9.5 que evidencia os elementos do sistema nervoso entérico) no local da seromiotomia e a montante e ajusante à terceira válvula; Tricrômico de Gomori e a medida linear da espessura das camadas serosa, muscular longitudinal e muscular circular a montante e ajusante à terceira válvula. A microscopia descritiva (Hematoxilina Eosina) da parede intestinal na região da válvula revela uma inflamação crônica, com presença de células gigantes do tipo corpo estranho, e uma interrupção linear microscópica das camadas musculares, região que apresenta deposição de tecido conjuntivo vascular e colágeno, com ausência da inervação no local da seromiotomia. A observação sistemática das áreas adjacentes à válvula mostra aspecto estrutural preservado das camadas musculares longitudinal e circular. A coloração com Tricrômico de Gomori mostra deposição de colágeno principalmente na área próxima à intervenção cirúrgica, sem revelar diferenças quantitativas entre os grupos nas áreas adjacentes à terceira válvula. As espessuras das camadas musculares longitudinal e circular não variaram significativamente nas amostras estudadas. A imunoexpressão do Produto Gênico Protéico 9.5, mostra diminuição da densidade do plexo mientérico estatisticamente significativo no local da seromiotomia. A densidade dos elementos nervosos da camada muscular circular nos locais adjacentes a 3ª válvula não foi estatisticamente diferente. A conclusão do estudo morfológico e imunohistoquímico das válvulas confeccionadas no colo esquerdo de ratos submetidos à amputação abdominoperineal e colostomia perineal mostra uma desnervação no local da seromiotomia que contribui para o retardo do fluxo intestinal e uma preservação dos elementos musculares e de tecido conjuntivo da parede intestinal e dos elementos nervosos nos locais interválvulas.

**Palavras-chave:** Colostomia/métodos; Amputação/métodos; Plexo mientérico/anatomia e histologia; Neoplasias colorretais; Imunohistoquímica; Incontinência fecal/reabilitação; Ratos wistar.

## ABSTRACT

Definitive abdominal colostomy (DAC) following abdominoperineal amputation is an established surgical technique, but it is not free of morbidities. The technique proposed for avoiding DAC is abdominoperineal amputation with perineal colostomy, as it meets the current requirements for the treatment of rectal cancer because it does not interfere with the radicality of the proposed surgery, avoids the need for definitive abdominal colostomy, fills the pelvic hollow and is contentive. The valves constructed in the intestinal segment to make the perineal colostomy continent must be studied from a histological point of view. The goal is contribute towards the elucidation of the mechanisms that promote the retardation of the intestinal contents or partial continency. The aim is to study the morphological and immunohistochemical studies of the myenteric plexus of the valves manufactured and the third valve and the adjacent muscle layers and connective tissue of the intestinal wall adjacent to the third valve. A total of 36 rats were operated on, which were distributed into 3 groups. In the Simulated Group, 6 animals were subjected to a laparotomy. In the Amputated Group, 6 animals were subjected to the amputation of their sphincter structure and to perineal colostomy. In the Amputated Group with Valve, 24 animals underwent three seromyotomy procedures (section of the serous muscular, longitudinal, myenteric plexus and circular muscular layers) on the pulled-through colon, the amputation of the sphincter structure and perineal colostomy. On the 40<sup>th</sup> postoperative day the intestinal segment underwent morphological and immunohistochemical study in the following manner: descriptive microscopy (Hematoxylin and Eosin stain) on the segment operated on, at the site of the seromyotomy and upstream and downstream of the third valve; morphometric and immunohistochemical analyses (Protein Gene Product 9.5 which confirms the existence of the enteric nervous system elements) at the location of the seromyotomy and upstream and downstream of the third valve; Gomori trichrome stain and the linear measurement of the thickness of the serous, longitudinal muscular and circular muscular layers upstream and downstream of the third valve. The descriptive microscopy (Hematoxylin and Eosin stain) of the intestinal wall in the region of the valve reveals a chronic inflammation, cicatricial, with fibrous replacement tissue, restricted to the location, and a microscopic linear interruption of muscle layers, a region which presents deposits of collagenous and vascular conjunctive tissue, with an absence of enervation at the seromyotomy site. A systematic observation of the areas adjacent to the valve shows that the structural aspect of the longitudinal and circular muscular layers was preserved. Coloration with Gomori trichrome stain shows deposits of collagen mainly in the area near the surgical intervention, without revealing quantitative differences among the groups in the areas adjacent to the third valve. The thicknesses of the muscle layers, both longitudinal and circular, did not vary significantly in the samples studied. Immunoexpression of Protein Gene Product 9.5 demonstrates the total absence of nervous elements and of the myenteric plexus at the site of the valve. The density of the nervous elements of the circular muscular layer at sites adjacent to the 3<sup>rd</sup> valve was not statistically different. The conclusion of the morphological and immunohistochemical study of the valves constructed in the left colon of rats subjected to abdominoperineal amputation and perineal colostomy shows the denervation at the serotomy site, which contributes to the retardation of the intestinal flow and the preservation of the muscular elements, of the conjunctive tissue, of the nervous elements and of the myenteric plexus of the intestinal wall at the intervalvular sites.

**Key words:** Colostomy/methods; Amputation/methods; Myenteric plexus/anatomy and histology; Colorectal neoplasia; Immunohistochemistry; Fecal incontinence/rehabilitation; Wistar rats.

## 1 INTRODUÇÃO

---

*Primum non nocere*  
(Primeiro não prejudicar)

*Hipócrates (460-377 a.C.)*

Historicamente, após a primeira extirpação do reto bem sucedida feita por Lisfranc em 1826, por via perineal, surgiu o problema da conservação da função esfínteriana e por consequência a colostomia definitiva. Dieffenbach, Kocher, Kraske, Hochenegg, Burch, Maunsell, Bloch, Paul e Mikulicz, Weir, Ball e Aldrich-Blake apresentaram suas propostas de reconstituição do tubo digestivo, nem sempre conseguindo conciliar radicalidade do tratamento com reabilitação da função neoanal<sup>1</sup>.

Em 1908, Ernest Miles apresentou os fundamentos de sua amputação radical baseado nas vias de propagação linfática do câncer de reto e seus princípios e sua técnica se difundiram de tal forma que os problemas da conservação dos esfíncteres e da reconstituição do trânsito intestinal passaram a plano secundário. Houve a impressão geral de que a conservação dos esfíncteres comprometeria a radicalidade da operação com conseqüente diminuição da sobrevida. Apesar da grande influência e repercussão obtidas por Miles, houve bem cedo opiniões discordantes quanto ao emprego sistemático de sua técnica<sup>2</sup>.

Dentre os avanços no tratamento do câncer de reto, nas últimas duas décadas, três são fundamentais: (1) o aumento do número de operações de ressecção anterior baseado na evidência de que a cura para os tumores localizados no reto médio<sup>3,4</sup>, ou distal<sup>5</sup> não é afetada pela preservação esfínteriana; (2) a diminuição nas taxas de recidiva local após tratamento neoadjuvante<sup>6</sup> e (3) a ênfase na importância dos aspectos técnicos das operações oncológicas sobre o reto<sup>7</sup>. Ainda assim, há casos com indicação de amputação com colostomia definitiva.

As evidências anatomopatológicas que justificam a necessidade da realização da excisão total do mesorreto com o objetivo de reduzir a ocorrência de recidiva após tratamento cirúrgico do câncer no reto, principalmente na margem circunferencial, são inequívocas<sup>8,9,10</sup>.

É apreciável a redução nas taxas de recidiva local após o tratamento cirúrgico exclusivo com excisão total do mesorreto e o mesmo nível de evidência de anastomose após o emprego dessa técnica. No entanto, há questões que permanecem não respondidas como: (1) se a ocorrência de metástases linfonodais ou invasão vascular e linfática são apenas marcadores de doença avançada que é incurável por cirurgia; (2) se a técnica de excisão total do mesorreto conforme proposta para os tumores do reto médio e inferior nada acrescenta ao que muitos cirurgiões que realizam uma operação adequada para o câncer nestas localizações já a praticavam rotineiramente; (3) se com a realização da excisão total do mesorreto é necessário acrescentar tratamento adjuvante ou mesmo se a excisão total do mesorreto é, de fato, superior ao tratamento cirúrgico convencional associado a quimioirradiação ou irradiação adjuvante; (4) se as operações de ressecção anterior resultam em melhor controle local do tumor do que as operações de ressecção abominoperineal do reto realizadas com a

mesma técnica; (5) existe a forma ideal de seleção de pacientes em que a indicação da cirurgia será curativa?

Para esclarecer estas lacunas aguardam-se mais estudos e ao que parece, por hora, a amputação abdominoperineal do reto está longe de ser uma técnica operatória que está proscrita (“an endangered operation”)<sup>11</sup>.

O agravo mais frequente para a indicação da confecção do estoma é o câncer de reto. Esse dado é corroborado por outros autores, no que se refere às colostomias definitivas, as quais são geralmente realizadas em pacientes com diagnóstico de neoplasia de reto e ânus<sup>12,13,14</sup>.

Mesmo com todo o esforço que os cirurgiões têm feito para preservar um número crescente de esfínteres anais, subsidiado pelo avanço da tecnologia, com a realização de ressecções anteriores baixas, a amputação abdominoperineal pode ser necessária, e uma colostomia abdominal definitiva se impõe<sup>14</sup>.

A reação negativa ao estoma definitivo tem várias explicações: físicas, sociais, familiares, conjugais, profissionais, higiênicas, psíquicas, econômicas e pessoais. Sem falar na marginalização natural, pois o paciente fica, forçosamente, diferente da maioria. Para o paciente estomizado, a mutilação do corpo e o uso do dispositivo coletor levam-no a necessidade de reconstituir sua identidade corporal. A imagem corporal é interpretada como desfigurada ou em processo de reelaboração. Contraditoriamente, há pacientes colostomizados que não querem mais se desfazer do estoma, talvez, por dois motivos. Primeiro já se acomodaram, aceitando-a passivamente ou sublimando-se. Segundo, o caminho percorrido na adaptação conquistada foi tão longo e árduo que, racionalizando, é preferível ficar assim a correr o risco de novo insucesso e retorno à origem, após prováveis sofrimentos ou desgastes físicos e psíquicos<sup>14</sup>. Deve-se lembrar que um paciente que apresenta sintomas em uma sociedade na qual os tabus em relação à parte íntima do corpo são uma realidade, em geral preferem protelar a procura à assistência médica até o limite tolerável, recorrendo muitas vezes a tratamentos paliativos e a automedicação, com atraso no diagnóstico, e por consequência tratamentos mais mutilantes<sup>12</sup>.

Apesar da colostomia ser uma cirurgia salvadora, ela não é isenta de morbidades<sup>14</sup>. A perda resultante de continência fecal associada com uma colostomia permanente é uma condição séria para qualquer paciente<sup>14</sup>. Este foi o grande motivo que levou Lázaro da Silva a aplicar as observações dos seus estudos realizados no intestino delgado<sup>15</sup> no colo<sup>16</sup>.

Discordando com o fato de ter que amputar e colocar uma colostomia terminal no abdome dos pacientes, Lázaro da Silva<sup>14,15,16,17,18,19</sup>, entra para o grupo de autores que busca

alternativas para evitar realizar em seus pacientes uma opção de tratamento sem escolha, justificado pela gravidade da doença de base – o Câncer<sup>20,21,22,23</sup>. Ele propôs uma amputação abdominoperineal modificada, com objetivo de evitar a colostomia abdominal definitiva mantendo a radicalidade do tratamento. É realizada a amputação abdominoperineal mais confecção de válvulas, ou seja, confecção de três seromiotomias seguidas de sutura seromuscular mais colostomia perineal, para tratamento de lesões que justifiquem a ressecção do esfíncter anal. O autor comenta:

“sem tomar partido... há que se fazer de tudo para evitar uma colostomia...  
...quando se vive num mundo contemporâneo em que o culto ao físico é uma realidade. Realidade tão marcante que as mulheres estão se expondo fisicamente cada vez mais enquanto os homens voltam suas preocupações e atitudes para a beleza de seu físico exterior. São situações contemporâneas que não se lhes pode negar valores ou apoio, antes do que crítica<sup>14</sup>”.

A técnica da colostomia perineal atende os objetivos atuais do tratamento cirúrgico do câncer de reto: ressecção radical da neoplasia e reconstituição da função neoanal. O cirurgião tecnicamente preparado, que tem a oportunidade de acompanhar estes pacientes no pós-operatório, testemunha a grata satisfação dos mesmos, pois consegue oferecer, além da proposta de possível cura, uma reabilitação muito próxima à condição fisiológica do paciente antes do diagnóstico e tratamento da estigmatizante doença, o câncer.

As vantagens da técnica são: evitar a colostomia abdominal; preencher a pelve, não interferir na exérese em bloco dos tecidos pélvicos para uma operação mais oncológica; a reparação cicatricial se faz em torno de um quarto do tempo; a secreção da mucosa cólica é pequena na colostomia perineal ou não existe, porque há uma oclusão parcial e mínima exteriorização do colo na pele; sob o ponto de vista social, oferecer maiores condições de convívio do que com o uso da bolsa; a continência é relativa; o paciente pode programar a sua higiene de acordo com a sua conveniência; evitar uma anastomose; recompor a vagina nas suas paredes laterais e posterior quando ela for incluída na ressecção; a exoneração vesical é eficaz; a cicatrização perineal é mais rápida; evitar a hérnia colostômica abdominal e a hérnia perineal; economizar, porque dispensa o uso da bolsa de colostomia e o tratamento das dermatites; não predispor à vaginoses e nem a infecção do trato urinário; não requerer rotação de retalhos com aumento da morbidade cirúrgica e do tempo operatório com risco de perda do mesmo; poder ser realizada em pacientes que se submeteram a neoadjuvância e não atrasar a adjuvância se indicada. Na vivência diária, quando um cirurgião tecnicamente preparado,

oferece esta opção para os pacientes, os mesmos preferem esse método à colostomia definitiva na parede abdominal<sup>14,16,24,25,26,27</sup>.

A seromiectomia realizada para confeccionar as válvulas no colo abaixado consiste em secção total, mas local das camadas serosa, camada muscular longitudinal e muscular circular até a protrusão da mucosa seguida de sutura invaginante da seromuscular por meio de pontos separados seromusculares-seromusculares. Isto implica em secção dos plexos mientéricos, com preservação do plexo submucoso e mucoso. Estudos são necessários para que se estabeleça a importância do sistema nervoso entérico para funções intestinais<sup>28</sup>.

O estudo do Sistema Nervoso Entérico para funções gastrointestinais em saúde e doença é de extrema importância nas pesquisas atuais. O avanço nos conhecimentos do completo papel fisiopatológico e a modalidade de prevenção de muitas doenças gastrointestinais parecem estar entre os segredos do sistema nervoso entérico e o eixo intestino-cérebro no campo da farmacologia neurogastrointestinal. Pacientes com neuropatia entérica funcional, são agora alvos relevantes para experimentação futura e estudos clínicos<sup>28</sup>.

O encantamento com o Sistema Nervoso Entérico se dá porque é a única rede neuronal dos mamíferos que tem atividade reflexa coordenada e completamente independente do sistema nervoso central<sup>28,29, 30,31</sup>.

Nunca houve qualquer dúvida de que o sistema nervoso do intestino é especial em muitos aspectos. O controle nervoso da motilidade intestinal é primariamente governado pelo plexo mientérico e este pode ser estudado sem nenhuma influência dos axônios dos nervos extrínsecos<sup>30</sup>. A desnervação química<sup>32,33,34</sup> ou desnervação cirúrgica<sup>24,25,26,27</sup> tem sido extensamente utilizadas para estudar o papel dos plexos nervosos nas suas diferentes funções intestinal, na sua plasticidade neuronal<sup>35</sup>. Todos os estudos morfológicos durante quase um século, claramente apontavam para esta conclusão<sup>31,36</sup>. Se pudéssemos entender como os programas motores são iniciados, e como são substituídos por outro, haveria potencial para desenvolver terapias e tratar as dismotilidades<sup>37</sup>. Os papéis funcionais dos diferentes tipos de neurônios no circuito neural que regulam as funções gastrointestinais ainda precisam ser elucidados<sup>31</sup>.

A importância da integridade dos elementos musculares e nervosos que constituem a parede intestinal é o alvo dos estudos atuais em diversas doenças que afetam esta estrutura muscular e seus componentes nervosos entéricos, e a enorme complexidade desta organização ainda desafia o entendimento pormenorizado de mecanismos e fenômenos que regem o funcionamento normal do órgão e as condições que afetam a manutenção de sua integridade<sup>28</sup>.

A seromiectomia foi proposta e as alterações histológicas, na válvula confeccionada, no nível celular e nervoso, são desconhecidas. É uma técnica de reabilitação original que de fato promove o controle da exoneração do conteúdo intestinal e funciona proporcionando continência aos pacientes com muitas vezes sensação de um neo-ânus. É realizada em pacientes com sucesso e resultados promissores. No tratamento atual para o câncer de reto baixo, o aspecto da cura juntamente com a reabilitação da função, o mais próxima do normal, é inquestionável e inequívoco e esta técnica traz este tipo de proposta, em que o paciente fica reabilitado na sua função neoanal, sem alterações de vestimentas e de comportamento decorrente de um abdome livre e sem bolsa. O estudo experimental da inervação do colo submetido à seromiectomia, dentro de uma linha de pesquisa, é imprescindível para estudar se ocorre desnervação ou não, e quais alterações ocorrem no nível do sistema nervoso entérico, mais precisamente no plexo mientérico e também no segmento operado.

Dando sequência a linha de pesquisa estabelecida, propõe-se a continuidade dos estudos para esclarecer a natureza tecidual da válvula, e responder as seguintes dúvidas: ocorre desnervação no local das válvulas? Ocorre reinervação? Ocorre adaptação intestinal no segmento operado nos locais interválvulas? Qual adaptação?

A reprodução da técnica e seu estudo em nível experimental trarão esclarecimentos a respeito dos mecanismos de funcionamento e a natureza deste tecido que promove o retardo do conteúdo intestinal. O maior conhecimento da natureza da válvula poderá aumentar as possibilidades de aprimoramento da técnica em busca de uma técnica que não só ofereça retardo do conteúdo intestinal, mas que ofereça continência. É de suma importância estudar a organização neuronal do Sistema Nervoso Entérico, após a operação, no modelo experimental proposto.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

---

“A cada dia em que vivo me convenço  
de que o desperdício da vida está no amor que não damos,  
nas forças que não usamos,  
na prudência egoísta que nada arrisca  
e que, esquivando-nos do sofrimento,  
perdemos também a felicidade.”

*Carlos Drummond de Andrade*

A diarreia após ressecção intestinal alargada é uma condição clínica grave. Com o objetivo de obter retardo no trânsito intestinal foi proposto a criação de um esfíncter ileal, retirando-se um segmento das duas camadas musculares intestinais, circunferencialmente, medindo um e meio centímetro de largura. Com isso, Lázaro da Silva aplicou esta técnica em dois pacientes e obteve resultados satisfatórios. Um paciente foi operado de ressecção intestinal alargada por trombose mesentérica e o segundo para tratar síndrome de “Dumping” após ressecção a Billroth I<sup>15</sup>.

A amputação abdominoperineal (operação de Miles) é o método de tratamento do câncer anorretal, quando tem invasão de esfíncter, que oferece melhor sobrevida aos doentes, em relação a outras operações mais conservadoras. Mas impõe a colostomia abdominal definitiva que nem sempre é mais aceitável que a neoplasia em si, ou mesmo sua recidiva. Apesar de todos os avanços ainda o tratamento mais seguro é a cirurgia, sendo suplementares a radioterapia, a quimioterapia e a imunoterapia. Com isso, mantendo a radicalidade, com objetivo de evitar a colostomia abdominal, o autor propôs a amputação abdominoperineal do reto seguida de colostomia perineal, para tratamentos de lesões que justifiquem a ressecção do esfíncter anal. Após definir a indicação para ligadura da artéria e veia mesentéricas inferiores, mobilizou o cólon descendente e parte do transversal, sem ligadura da arcada marginal. Confeccionou três sermiotomias seguidas de suturas seromusculares, ainda com o cólon sem fixação, através da secção da serosa e a miotomia circunferencial da camada musculatura longitudinal e circular (360°), até a protrusão da mucosa, seguida de sutura seromuscular invaginante. Iniciou a confecção das válvulas a 10cm cranial a colostomia perineal para promover um represamento fecal. Dentro de muitas vantagens relatadas pelo autor destaca-se a primazia da técnica: evitou-se a colostomia abdominal a partir da confecção de uma colostomia perineal valvulada. Lázaro da Silva conclui, porém, que se trata de uma proposição nova, sendo necessário ainda estudar se as válvulas promoveriam uma continência, e se a oclusão, por si, seria um mecanismo parcial controlador da exoneração. Observou ainda, que os resultados, sob revisão, não autorizam conclusões definitivas e promissoras. Entretanto, os pacientes preferem esse método a colostomia definitiva na parede abdominal<sup>16</sup>.

Após esta publicação clínica nasceu uma linha de pesquisa que é citada a seguir.

Um estudo em modelo experimental desenvolvido no cólon esquerdo de 38 ratos, sendo oito para controle de peso e controle histológico. Os 30 ratos operados, 15 machos e 15 fêmeas foram separados em três grupos de 10 animais denominados 30 dias, 60 dias, 90 dias conforme o tempo previsto para relaparotomia. Foram confeccionadas duas sermiotomias

transversais, circunferenciais, extramucosas. Uma localizada a um centímetro e a outra a dois centímetros acima da reflexão peritoneal. Seguidas de sutura seromuscular, com pontos simples, separados, extramucosos. Os autores comprovaram que a atividade do processo inflamatório foi mais intensa no grupo 30 dias, reduzida nos grupos 60 dias e 90 dias, dando lugar a um processo inflamatório crônico fibroso (reparativo). Os resultados mostraram: reação do tipo corpo estranho; estenose parcial secundária, formando um anel fibroso, com elevação da mucosa em direção à luz, do tipo valvular; descontinuidade da musculatura longitudinal e circular. Concluíram que as mortes dos animais estiveram relacionadas com as suturas intestinais, direta ou indiretamente. A causa direta das obstruções baixas, parciais ou totais, foi a impacção de fezes<sup>24</sup>.

Um estudo experimental com ratos testou-se a eficácia da construção de válvulas colônicas após a ressecção anorretal, para se obter retardo do fluxo intestinal. O estudo foi uma análise clínica evolutiva, radiológica e anatomopatológica de 31 ratos, submetidos a duas sermiotomias, circunferenciais, transversais, no cólon esquerdo, com invaginação seromuscular e ressecção anorretal, seguida da confecção de colostomia perineal. Na discussão, os autores comentaram que a técnica operatória de construção de válvulas biológicas foi simples de ser realizada. De 31 ratos operados sete morreram, sendo que a necropsia revelou distensão abdominal e impacção fecal no nível das válvulas. Como intercorrências operatórias descreveram perfurações acidentais sem significado prognóstico. Na análise radiográfica, as válvulas nem sempre foram identificadas decorrente do enchimento excessivo do intestino com bário, provocando a distensão do mesmo. Quanto à análise microscópica, os locais das sermiotomias foram sempre identificados. A hipertrofia das camadas musculares do intestino grosso, evidenciadas pelo espessamento e pelo aumento das dimensões das células musculares, foi um achado constante. Essas observações foram identificadas em todo o segmento colônico estudado, das válvulas à colostomia no períneo. Isso revela o possível mecanismo frenador criado pelas válvulas, exigindo contrações mais fortes para a propulsão das fezes. Os autores concluíram que o achado de impacção fecal interpretado como sendo redução do fluxo intestinal, da ausência das válvulas em algumas peças, bem como da presença de secção muscular com fibrose nos locais das sermiotomias foram fatores responsáveis pela alteração do peristaltismo local. A secção da camada muscular, acompanhada de secção dos feixes do plexo de Auerbach, prejudicaram a propagação do impulso motor. A fibrose teria papel importante, impedindo ou diminuindo o restabelecimento dos feixes nervosos e conseqüentemente, impedindo a transmissão das ondas<sup>25</sup>.

Na continuidade dos estudos foi desenvolvido um modelo experimental da técnica de colostomia perineal exatamente como é feita no humano. Deoti fez estudo morfológico da distensão do colo e um histológico quanto à presença de fibrose no local da seromiectomia em 34 ratos. Confirmou a presença de distensão intestinal, em graus variados através de estudo radiológico e evidências histológicas de interrupção das camadas musculares no local da seromiectomia substituindo a reação inflamatória por tecido fibroso no local operado. Reafirmou que a estenose parcial obtida com as suturas e suas repercussões são as responsáveis pelo mecanismo frenador do conteúdo intraluminal<sup>26</sup>.

Outro estudo em modelo animal seguindo esta linha de pesquisa foi realizado em cães e estudaram os aspectos clínicos e histológicos de 10 dias, 20 dias e 30 dias após a confecção da seromiectomia confeccionada no colo de 65 cães. Confirmou a presença de fezes sólidas a montante das válvulas, evidenciando-se o eficiente mecanismo frenador das mesmas. A análise histológica das válvulas mostrou neoproliferação conjuntiva com fibrose em toda a área seccionada da serosa e das camadas musculares, separando-as. Evidenciou-se um anel fibroso com diminuição do lúmen intestinal, em resposta à cicatrização da serosa e camadas musculares invertidas pela sutura, levando a formação da “válvula artificial”. O processo inflamatório fibrosante reparativo ocorreu em todas as válvulas, associado a reações do tipo corpo estranho e à estenose parcial intraluminal. Concluíram que a seromiectomia circunferencial produz um anel fibroso que facilita a estase fecal no colo esquerdo de cães<sup>27</sup>.

### **3 OBJETIVO**

---

“No campo das observações os eventos favorecem somente àqueles que estiverem preparados.”

*Louis Pasteur*

Estudar os aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos do plexo mientérico das válvulas confeccionadas para ver se ocorre desnervação no local operado e nas adjacências da terceira válvula e alterações da espessura das camadas musculares e de tecido conjuntivo nas adjacências da terceira válvula.

Reproduzir experimentalmente a técnica de colostomia perianal fazendo uma seriomiotomia na parede intestinal do colo esquerdo de ratos para estudar os aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos das válvulas confeccionadas (densidade de elementos nervosos do plexo mientérico, camadas musculares e tecido conjuntivo), e as repercussões estruturais da espessura das camadas musculares e o tecido conjuntivo nas adjacências da terceira válvula.

## **4 MÉTODO**

---

“O médico é superior à medicina.  
Quando a medicina acaba,  
o médico tem que continuar”.

*Antônio Chagas Viegas*

## 4.1 Animais

O modelo experimental foi desenvolvido no colo esquerdo de ratos da raça *Rattus Norvegicus albinus*, linhagem Wistar, todos machos.

O peso variou entre 230g e 500g, com idade entre três meses e cinco meses.

Todos os procedimentos descritos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovados pela Câmara Departamental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina – UFMG (044/2008) (Apêndice E).

## 4.2 Biotério

A fase cirúrgica experimental da pesquisa foi executada no Biotério e Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte – Brasil.

A mesa operatória recebeu previamente cuidados de limpeza e desinfecção com álcool a 70%. Os animais operados foram colocados em gaiolas individuais de polipropileno, com maravalhas selecionadas, bebedouros para a água e cocho para ração. Os animais foram identificados com numeração sequencial para cada grupo, como GS1 a GS6 para o Grupo Simulado, GA1 a GA6 para o Grupo Amputado e GACV1 a GACV24 para o Grupo Amputado com Válvula. A ração foi oferecida na proporção média de 10g de ração/100g de peso corporal por dia e água *ad libitum*.

## 4.3 Delineamento Experimental

### 4.3.1 Amostra

Foram operados 36 ratos e distribuídos em três grupos.

Grupo Simulado (GS) – Seis ratos foram submetidos ao estresse cirúrgico mediante laparotomia com incisão mediana

Grupo Amputado (GA) – Seis ratos foram submetidos, por via perineal, à amputação do conjunto esfíncter anal seguido de colostomia perineal do colo abaixado, sem confecção das válvulas intestinais cirúrgicas

Grupo Amputado com Válvula (GACV)– Vinte e quatro ratos foram submetidos, por via perineal, à amputação do conjunto esfincteral anal e, por via abdominal, foram feitas três válvulas no colo abaixado seguido de colostomia perineal.

O cálculo amostral realizado foi por conveniência.

#### **4.3.2 Pré-operatório imediato**

Todos os animais foram mantidos em jejum de 6h a 8h para a ração, sem restrição hídrica. O Bioterista pesou os animais imediatamente antes do ato anestésico. Os animais foram repesados nas semanas subsequentes e no dia da relaparotomia para retirada do espécime cirúrgico. Neste dia foram submetidos à morte por exanguinação após secção da artéria aorta. Os animais estavam anestesiados.

#### **4.3.3 Ato Operatório e Anestesia**

Após a contenção, os ratos foram anestesiados, até a fase de anestesia cirúrgica com a mistura de Xilasina (1mL/kg de peso vivo) e Quetamina, (1mL/kg de peso vivo) em partes iguais, por via intramuscular, na face externa da coxa esquerda. A depilação abdominal foi feita imediatamente após a anestesia somente nos ratos do Grupo Simulado e do Grupo Amputado com Válvula.

A observação do plano anestésico foi obtida pela compressão do coxim plantar da pata traseira contra a mesa operatória e verificada a ausência de reflexos.

Em seguida os animais foram colocados sobre a mesa operatória e aquecidos com luz de foco durante todo o ato operatório. Os animais do Grupo Simulado e do Grupo Amputado com Válvula receberam gotejamento de solução salina na cavidade abdominal durante todo o ato operatório. Estes ratos depois de anestesiados foram submetidos à depilação abdominal e posicionados em decúbito dorsal sobre a mesa operatória. A antisepsia abdominal foi feita com gaze embebida em etanol a 70% e a perineal foi feita com detergente.

##### **4.3.3.1 Grupo Simulado (GS)**

O campo cirúrgico foi colocado sobre o abdome ficando a fenestra na área delimitada pela antisepsia. Procedeu-se aos seguintes tempos operatórios:

incisão mediana cerca de 5cm de extensão  
exploração da cavidade abdominal, para identificar o ceco e o colo esquerdo  
retirada do ceco e de todo o intestino delgado da cavidade abdominal  
injetados 5mL de solução salina a 0,9% na cavidade abdominal  
recolocação das alças intestinais na mesma  
fechamento da parede abdominal, usando-se sutura contínua com polydioxanone  
4.0 na aponeurose e pele, no sentido craniocaudal (xifoide-púbico).

#### 4.3.3.2 Grupo Amputado (GA)

Os ratos foram posicionados em decúbito dorsal sobre a mesa operatória. Foram realizados os seguintes tempos operatórios:

Fechamento anal com sutura em bolsa, usando fio de seda<sup>1</sup> e reparo longo deste fio (Figura 1).



Figura 1 – Detalhe da sutura em bolsa com fio de seda

Incisão circular em torno do ânus; dissecação romba do reto via perineal, com o quinto dedo, através do espaço retrorretal. O reto foi totalmente dissecado até atingir a vértebra coccígea, preservando-se a artéria mesentérica caudal. O mesocolo foi liberado até a descida suficiente do colo descendente. A arcada mesocólica foi preservada.

<sup>1</sup> Fio de sutura seda Silk<sup>R</sup>, 2.0, agulha vascular 3/8 da circunferência, 20cm – Brasutura

A seguir fez-se a ressecção do ânus com o conjunto esfíncter anal cerca de 1cm cranial à borda anal. Sutura do colo descendente à pele perineal com fio de catagute 5.0 cromado, a semelhança dos pontos cardeais. Foram feitos pontos extras entre os quatro pontos previamente realizados para fixação do segmento abaixado à pele confeccionando a colostomia perineal.

#### **4.3.3.3 Grupo Amputado com Válvula (GACV)**

Os ratos foram posicionados em decúbito dorsal sobre a mesa operatória. Foram submetidos primeiro ao tempo operatório perineal que consistiu de:

Fechamento anal com sutura em bolsa, usando fio de algodão e reparo longo deste fio (Figura 1).

Incisão circular em torno do ânus; dissecação romba do reto via perineal, com o quinto dedo, através do espaço retrorretal (Figura 2A). O reto foi totalmente dissecado até atingir a vértebra coccígea, preservando-se a artéria mesentérica caudal que tem a sua origem no nível desta vértebra. O mesocolo foi liberado até a descida suficiente do colo descendente. A arcada mesocólica foi preservada (Figura 2B).



Figura 2A – Dissecção romba com o quinto dedo até a vértebra coccígea.



Figura 2B – Arcada mesocólica preservada.

Uma gaze úmida em solução salina, cobrindo o períneo foi deixada sobre a área cruenta.

O campo cirúrgico fenestrado foi colocado no abdome. A seguir foi feita laparotomia mediana de 5cm de extensão.

Exploração da cavidade abdominal. O ceco e o colo esquerdo foram identificados. Feita a dissecação e liberação do colo esquerdo com preservação da arcada e da artéria mesentérica caudal (Figura 3).

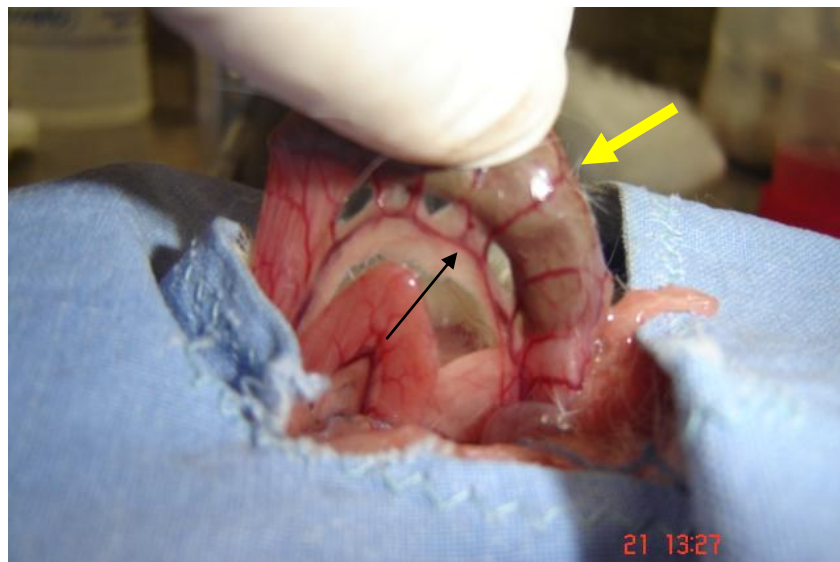


Figura 3 – Detalhe da arcada mesocólica (seta fina). Colo descendente com repleção fecal (seta larga).

Com auxílio de pinça hemostática prendeu-se o fio longo que suturou o ânus. Em seguida, fez-se a passagem dessa pinça pelo períneo através do espaço retrorretal até atingir a

cavidade abdominal, levando com ela o fio suturado no ânus dissecado. Retificação e exposição do segmento intestinal sobre o abdome do próprio animal (Figura 4).



Figura 4 – Preparo do segmento intestinal para confecção das válvulas.

Sermiotomia transversal, circunferencial (360°), extramucosa, sendo a primeira válvula confeccionada a 2cm da borda anal (Figura 5).

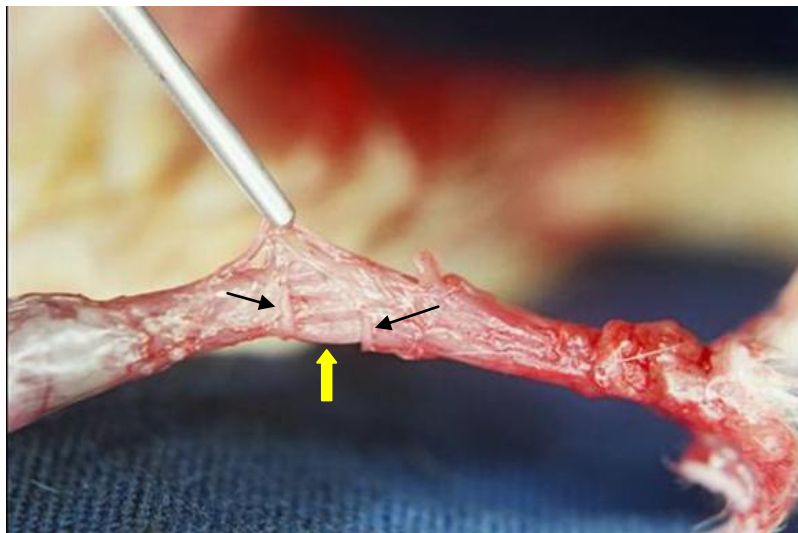


Figura 5 – Secção da seromuscular, com exposição da mucosa (seta fina), e preservação da arcada (seta grossa).

Para verificar se durante o procedimento cirúrgico executado houve a abertura da luz intestinal, injetou-se solução salina 0,9%, via anal. A perfuração da mucosa foi confirmada quando ocorria o extravasamento da solução na região da sermiotomia, (Figura 6). Nos casos

que se diagnosticou a perfuração a sutura invaginante, que é o próximo tempo operatório era o suficiente para ocluir a abertura puntiforme da mucosa.



Figura 6 – Injeção de solução salina, via anal, para verificar a existência ou não de perfuração na área da sermiotomia (seta)

Em seguida, a área cruenta da sermiotomia foi suturada com pontos simples, extramucosos, separados, com fio de polipropileno<sup>2</sup> para reaproximar as bordas seccionadas. A agulha transfixou a seromuscular, a mais ou menos 4mm a 5mm de distância da borda distal da sermiotomia. Procedimento cirúrgico semelhante foi realizado na borda proximal, iniciando-se na face mesentérica esquerda até atingir a face direita em sentido anti-horário (Figuras 7, 8).

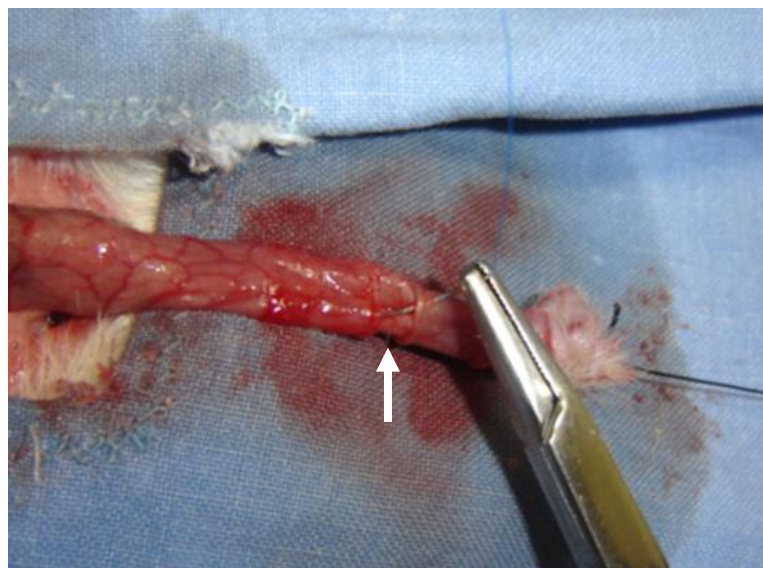


Figura 7 – Passagem do fio nas bordas da sermiotomia (seta).

<sup>2</sup> Fio de polipropileno 5.0, azul, agulha atraumática, ½ da circunferência – Medical Line



Figura 8 – Fio passado na seromuscular seccionada com mucosa exposta (seta).

Após a confecção de cada válvula fez-se a inspeção de toda a circunferência da área suturada para certificar se toda a mucosa estava invaginada. Em alguns ratos foi necessário fazer o ponto extra no local onde a mucosa apresentava-se protrusa. Em seguida, fez-se a segunda sermiotomia cerca de 1cm cranial à primeira e depois fez-se a terceira sermiotomia cerca de 1cm cranial à segunda, seguindo a mesma técnica cirúrgica usada para confeccionar a primeira válvula (Figura 9).

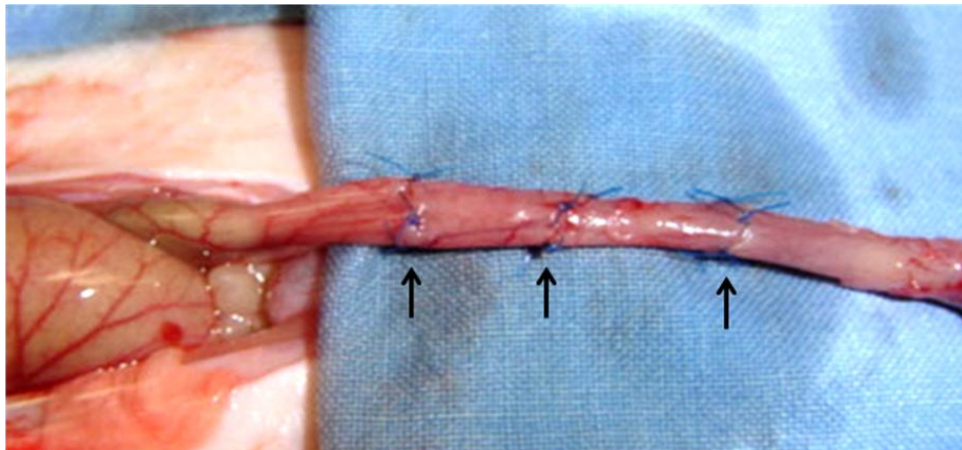


Figura 9 – Três válvulas confeccionadas no colo descendente (setas).

O esquema a seguir ilustra detalhadamente como se confeccionam as válvulas, realizando uma sermiotomia (Figura 10).

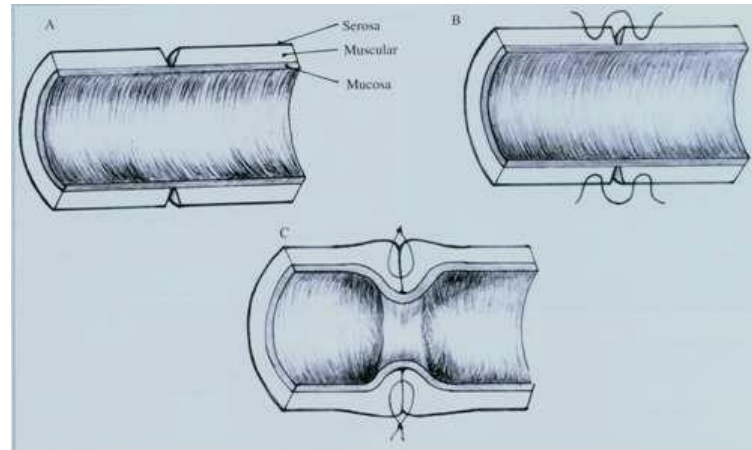


Figura 10 – Esquema ilustrativo das etapas do procedimento de confecção da seromiotomia que dá origem às válvulas. Visão do lúmen. A=seromiotomia; B=sutura; C=pontos nodados<sup>25</sup>. Proposta inicial.

Após a confecção das válvulas o segmento descendente foi recolocado no abdome com o fio de reparo que ocluía o ânus. Uma pinça hemostática curva foi passada, via períneo, até alcançar a cavidade abdominal com objetivo de pinçar o fio de reparo para fazer o abaixamento do segmento operado. Pelo acesso perineal fez-se a ressecção do ânus cerca de 1cm distal à primeira válvula. O mesocolo foi posicionado posteriormente.

Durante todo o ato operatório, no tempo abdominal, o segundo auxiliar gotejou solução salina estéril 0,9% na cavidade peritoneal, com finalidade de hidratação transoperatória.

A parede abdominal foi fechada com sutura contínua, com fio de polydioxanone<sup>3</sup> na aponeurose e pele, no sentido crâniocaudal.

Uma colostomia perineal foi confeccionada. O colo abaixado foi suturado, com pontos simples, à pele perineal, com fio de categut<sup>4</sup> e um ponto entre os quatro pontos principais quando necessário (Figura 11).

<sup>3</sup> Fio de polydioxanone PDS 4.0, agulha atraumática, ½ da circunferência, 26mm – Ethicon

<sup>4</sup> Fio de categut cromado, 5.0, agulha atraumática, absorvível, 60cm, 1,5 cm – Cirurmédica 85



Figura 11 – Visão da colostomia perineal, que fica exposta sob a pinça hemostática na região onde o intestino foi suturado junto a pele.

#### 4.3.4 Colheita do Material

Para os animais do Grupo Simulado e do Grupo Amputado a relaparotomia para retirada do material a ser estudado foi no 30º dia pós-operatório. Para os ratos do Grupo Amputado com Válvula ela foi realizada no 40º dia pós-operatório.

Nos animais do Grupo Amputado com Válvula o segmento intestinal operado foi retirado no quadragésimo dia pós-operatório.

Os animais ficaram em jejum de 8h para ração, foram pesados e anestesiados com a mesma técnica usada para realizar a operação. Realizado o fechamento do neoânus com seda 2.0 e dissecação do intestino da parte perineal até a vértebra coccígea. Feita a laparotomia ampla e exploração da cavidade. Ressecção de todo o colo até o ceco, com o animal vivo anestesiado. Os animais foram mortos por exanguinação após a secção da artéria aorta.

Após a colheita de material, as carcaças foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e descartadas, provisoriamente em um congelador (20°C) destinado especificamente para este fim. Foram recolhidos por funcionário treinado e autorizado pelo Setor de Biossegurança para transporte e descarte definitivo de material biológico conforme protocolo do Comitê de Ética e Experimentação Animal (CETEA).

Todo o material colhido foi processado para fazer o preparado histológico no laboratório de Neuroimunopatologia Experimental do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Em todos os três grupos foram ressecados um segmento de intestino medindo 9cm de extensão a partir da borda anal. O colo foi aberto longitudinalmente, na face antimesentérica. Foi feita limpeza mecânica com retirada do conteúdo intestinal. Lavagem do mesmo em solução de Tampão Fosfato Salino. A peça foi colocada sobre o papel filtro, com a serosa em contato com papel e imerso na solução fixadora de Bouin com 2% de ácido acético glacial (Figura 12).



Figura 12 – Segmento de 9cm dividido em dois segmentos de 3cm denominado cranial (à esquerda) e 6cm denominado caudal (à direita) respectivamente, colocados sobre papel filtro, com a camada serosa para baixo. As setas identificam o sentido que o material foi enrolado – de caudal para cranial.

Os segmentos intestinais foram mantidos submersos o tempo necessário para permitir uma pré-fixação adequada para enrolar a peça no formato de rocambole, sem comprimir o tecido, o que variou entre 20min e 30min.

O segmento de 9cm foi seccionado em dois fragmentos de 3cm e 6cm, cranial e caudal respectivamente. Os fragmentos foram retirados do fixador, colocados sobre uma superfície plana e enrolados da extremidade caudal em direção à cranial como rocambole, formando um rolo, com a mucosa voltada para dentro. Os rolos foram amarrados com linha preta<sup>5</sup> em dois pontos equidistantes do rolo, com pressão suave (Figura 13)<sup>38</sup>. No Grupo Simulado e Grupo Amputado, o segmento do intestino retirado foi o correspondente as áreas descritas acima para o Grupo Amputado com Válvula.

<sup>5</sup> Linha preta 100% algodão – Corrente<sup>R</sup>

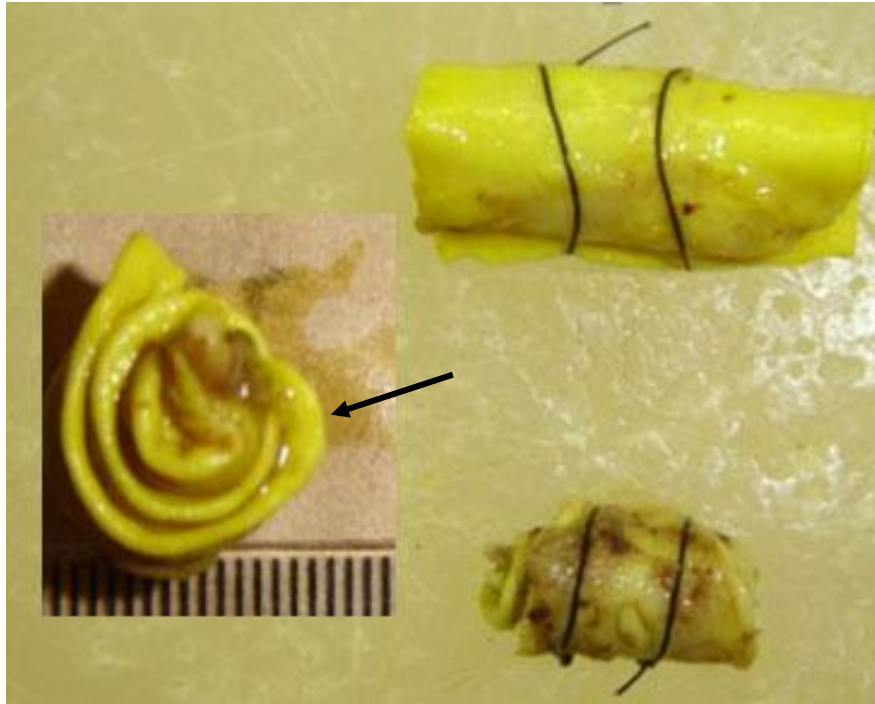


Figura 13 – Rolos dos segmentos de 6cm do intestino de ratos do Grupo Amputado com Válvula (acima) e Grupo Amputado (abaixo) após imersão no fixador de Bouin. Visão lateral do rolo (seta).

#### ***4.3.4.1 Fixação do Material***

A fixação foi realizada o mais rápido possível após a sua remoção para prevenir autólise. O pré-fixador utilizado foi o fixador de Bouin, uma solução em base de ácido pícrico, que penetra rapidamente nos tecidos, produzindo rápida coagulação de proteínas e promovendo o endurecimento dos mesmos. Tal propriedade é importante para evitar a compressão e achatamento das camadas intestinais durante a confecção dos rolos no formato de rocambole.

Após o tempo inicial de no máximo 30min os rolos eram transferidos para fixador da família dos aldeídos, usado rotineiramente sob a forma de uma solução de formol tamponada em Tampão Fosfato Salino, a 4%, em pH neutro. Os espécimes ficaram entre cinco dias e 20 dias no fixador antes de serem processados.

#### ***4.3.4.2 Processamento Histológico e Microtomia***

Após o tempo de fixação adequado que é maior que 8 dias, os rolos foram cortados ao meio e emblocados com o centro para baixo. O material foi processado para desidratação em etanol, diafanização em xilol, embebimento e inclusão em parafina histológica liquefeita à

temperatura controlada máxima de 60°C. Após a secagem e endurecimento dos blocos de parafina os mesmos foram cortados no micrótomo rotativo para obtenção de cortes na espessura de 5µm.

Os rolos foram seccionados em um plano paralelo ao seu diâmetro (corte transversal) e perpendicular à superfície da mucosa, resultando em uma espiral longitudinal que expôs toda a extensão do colo em sua continuidade, e na totalidade das três camadas histológicas (mucosa, musculares e serosa). Esse corte permitiu visualização das válvulas, sendo a primeira sempre no centro do rolo e a terceira na periferia (Figura 14).

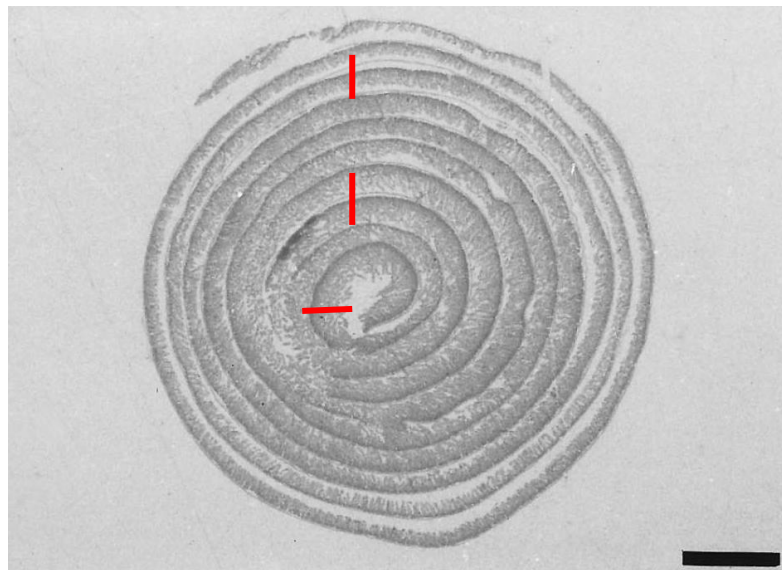


Figura 14 – Corte histológico do rocambole de intestino. As marcas em vermelho representam as válvulas, sendo a terceira a mais periférica. Barra = 3mm.

Os cortes histológicos foram corados inicialmente por Hematoxilina e Eosina e examinados ao microscópio. Cortes subsequentes, semi-seriados, foram obtidos para evidenciar tecido conjuntivo na cor verde-azulado, em coloração especial pelo Tricrômico de Gomori. a identificação dos elementos nervosos (filetes nervosos na camada muscular circular e plexo mientérico) após coloração imuno-histoquímica de um marcador genérico de tecido nervoso nomeado Produto Gênico Proteico 9.5 (PGP 9.5)<sup>30,39</sup> fez-se observando as estruturas coradas na cor marrom.

A análise histopatológica descritiva e as colorações Tricrômico de Gomori e Produto Gênico Proteico 9.5 foram feitas em todos os animais nos segmentos cranial e caudal. A análise morfométrica em colorações por Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Gomori e Produto Gênico Proteico 9.5 foi executada entre quatro animais e oito animais de cada grupo.

Os locais examinados no preparado histológico na coloração Hematoxilina Eosina foram no local da terceira válvula, a montante e ajusante da mesma; na coloração do Tricrômico de Gomori os locais examinados foram a montante e ajusante à terceira válvula; na coloração imuno-histoquímica Produto Gênico Proteico 9.5 os locais examinados foram no local da terceira válvula, a montante e ajusante a terceira válvula.

#### **4.3.4.3 Coloração**

##### **a) Hematoxilina e Eosina**

Cortes de 5µm de espessura do colo de cada animal foram desparafinizados em dois banhos de xilol, por 15min cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%) por 3min cada e lavados em água corrente por 5min. Em seguida, os cortes foram contracolorados pela Hematoxilina de Harris por 50seg e lavados em água corrente durante 20min, sendo, em seguida corados pela Eosina por 2min. Para finalizar, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool e diafanizadas em xilol. Os cortes histológicos foram montados com Entellan<sup>R</sup> (Merck) e lamínulas de vidro.

##### **b) Tricrômico de Gomori**

De forma semelhante à coloração pela Hematoxilina e Eosina, as lâminas foram desparafinizadas no xilol e hidratadas após passagens sucessivas em etanol com concentração decrescente e água corrente. Após a hidratação, foram imersas na Hematoxilina por 1min e 30seg e lavadas em água corrente. Posteriormente, permaneceram imersas no corante de Gomori (Merck<sup>R</sup>) por aproximadamente 15min. Novamente, as lâminas foram lavadas em água corrente rapidamente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, imersas em xilol e montadas utilizando-se Entellan<sup>R</sup> (Merck) para fixação das lamínulas.

##### **c) Imuno-histoquímica Produto Gênico Proteico 9.5**

O preparo das lâminas para imuno-histoquímica seguiu uma primeira fase igual à descrita acima, em que as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena em Tampão Fosfato Salino / Peróxido de hidrogênio (100mL de Tampão Fosfato Salino a 10% e 3,5mL de Peróxido de Hidrogênio a 30%) por 30min, à

temperatura ambiente, e posteriormente, ao bloqueio com leite desnatado em pó diluído em Tampão Fosfato Salino a 10% (06g de leite em 100mL de Tampão Fosfato Salino) por 30min à temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-produto gênico proteico 9.5 como um marcador específico de tecido nervoso (1:500), diluído em Tampão Fosfato Salino e albumina bovina a 2% (1870, Inlab, Diadema, Brasil), em câmara úmida à 4°C, toda a noite por no mínimo 15h, seguido de três banhos em Tampão Fosfato Salino de 5min cada.

O anticorpo secundário (imunoglobulina anticoelho e anticamundongo biotinizada pré-diluída), e terciário (estreptavidina-peroxidase pré-diluída), ambos do Kit LSAB (DAKO, Copenhagen, K0675) foram consecutivamente utilizados por 30min à temperatura ambiente. Entre cada etapa descrita, os cortes foram lavados em três banhos de Tampão Fosfato Salino.

A revelação da reação foi feita por incubação em solução de Diaminobenzidina (50mg de 3,3 – diaminobenzidina tetra-hidrocloro em 200mL de Tampão Fosfato Salino e 400µL de Peróxido de Hidrogênio 30%) durante 5min. Posteriormente foram contracorados com Hematoxilina de Harris diluída por 3seg, lavados em água corrente por 5min, desidratados, diafanizados em xilol e montados com Entellan<sup>R</sup> (Merck).

#### ***4.3.4.4 Microscopia Descritiva e Análise Morfométrica***

A microscopia de luz foi empregada para a análise histopatológica e documentação fotomicroscópica do material processado.

As lâminas selecionadas e coradas por Hematoxilina e Eosina foram analisadas nos aumentos de 4x, 10x e 20x, em toda a extensão do colo operado que foi amostrado nos dois segmentos de 3cm e 6cm, cranial e caudal respectivamente. A análise qualitativa compreendeu a avaliação da espessura das camadas musculares e serosa, seus aspectos estruturais, a continuidade das mesmas, e as alterações inflamatórias. Para a coloração do tecido conjuntivo e Produto Gênico Proteico 9.5 foram avaliados a distribuição e continuidade dos mesmos ao longo da parede intestinal nos três grupos.

A análise morfométrica foi planejada para o estudo comparativo dos segmentos caudal e cranial dos três grupos experimentais quanto aos seguintes parâmetros: a) as espessuras da parede intestinal, a Muscular Circular (MC), Muscular Longitudinal (ML) Muscular Total (MT = MC+ ML), e Serosa (SE); b) a densidade de elementos nervosos na parede muscular, marcados especificamente por Produto Gênico Proteico 9.5 obtida por quatro parâmetros; c) a área de tecido conjuntivo presente na espessura da parede intestinal.

Para escolha da amostragem destinada à análise morfométrica foram selecionados entre quatro a oito animais de cada grupo cujos preparados histológicos apresentavam perfeita orientação do plano de corte, em ambos os segmentos cranial (3cm) e caudal (6cm), e cujos resultados das colorações em Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Gomori e Produto Gêneo Proteico 9.5 foram considerados de boa qualidade e sem artefactos técnicos favorecendo a observação e documentação sistemática de todas as camadas intestinais de interesse.

As seguintes medidas foram obtidas por meio do programa KS300 que trabalhou em imagens capturadas pela câmera digital instalada em microscópio de luz direta (Olympus, Japão).

#### a) Medida da Espessura da Parede Intestinal

Com a finalidade de avaliar parâmetros morfométricos relativos à espessura da parede no segmento intestinal caudal, comparativamente entre o Grupo Simulado, o Grupo Amputado e Grupo Amputado com Válvula foram fotografadas cinco imagens de cada lâmina num aumento de 4x.

As imagens selecionadas de cada lâmina mostram toda a espessura da parede colônica e compreendem a região imediatamente adjacente, distalmente e cranialmente à terceira válvula do Grupo Amputado com Válvula e a região anatomicamente referenciada e correspondente para o Grupo Simulado, o Grupo Amputado (Figura 15A e B).

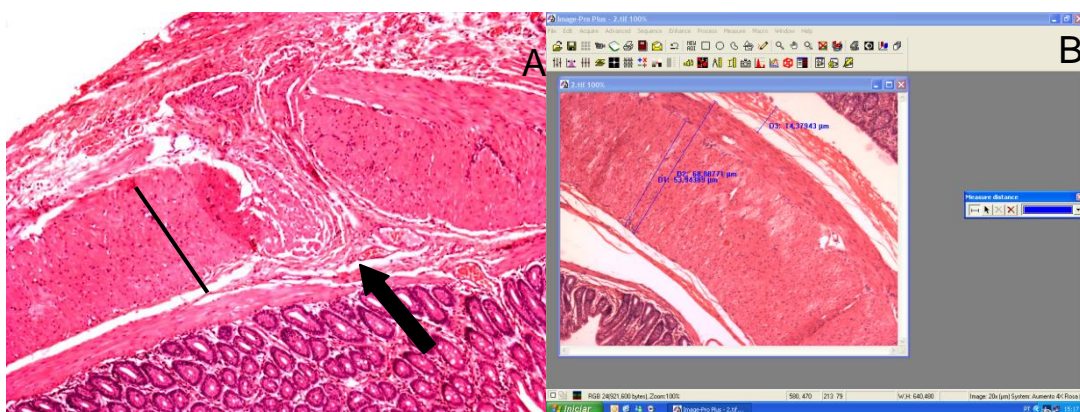


Figura 15A – Fotomicrografia da região correspondente a uma válvula no rato do Grupo Amputado com Válvula, mostrando o aumento localizado da espessura da parede (linha preta), e a interrupção das camadas musculares (seta). Aumento de 10x.

Figura 15B – Fotomicrografia do segmento caudal de um rato do Grupo Simulado mostrando o método para fazer as medidas das espessuras das camadas muscular total (MT), camada muscular circular e externa (MI, ME), e serosa (SE). Aumento de 4x.

De cada imagem foram obtidas cinco medidas das camadas musculares e da camada serosa. Quanto à serosa do segmento caudal, três animais de cada grupo não apresentaram condições técnicas para uma medida precisa em uma ou mais imagens decorrentes das dificuldades inerentes à preservação desta camada devido à aderência do segmento abaixado, ou artefatos de processamento. Nestas circunstâncias a medida da espessura total da parede foi a soma da camada muscular circular com a camada muscular longitudinal.

Os mesmos parâmetros foram avaliados no segmento intestinal cranial, entre cinco ratos e sete ratos, em que foram selecionadas cinco imagens de cada lâmina, e feitas cinco medidas das camadas musculares e da camada serosa para cada imagem, no aumento de 4x, que corresponde aos 3cm craniais à terceira válvula, nos três grupos (Figura 15B).

Depois da devida calibração do sistema, para a medida da espessura acionou-se os parâmetros distância entre dois pontos, determinada manualmente com a ajuda do cursor. Para a medida da área, acionou-se o parâmetro área sendo a mesma circundada com a ajuda do cursor. As medidas foram expressas como Muscular Circular (MC), Muscular Longitudinal (ML) Muscular Total ( $MT = MC + ML$ ), e Serosa (SE), em  $\mu\text{m}$ .

#### b) Densidade de Elementos Nervosos Produto Gênico Proteico 9.5 positivo

A coloração das lâminas por Produto Gênico Proteico 9.5 proporcionou uma marcação que evidenciou de forma bastante distinta os elementos do Sistema Nervoso Entérico (plexo mientérico e axônio dos neurônios entéricos) dos demais tecidos, o que permitiu automática seleção e mensuração dos mesmos. Utilizamos quatro parâmetros de análise que expressam a densidade dos elementos nervosos detectados pela coloração Produto Gênico Proteico 9.5. Foram selecionadas de quatro imagens a seis imagens de cada lâmina, correspondente a quatro ratos do Grupo Simulado; seis ratos do Grupo Amputado; sete ratos do Grupo Amputado com Válvula para o segmento intestinal caudal, e no mínimo cinco imagens obtidas de cinco ratos a seis ratos dependendo do grupo experimental, para o segmento cranial.

No programa KS300, após a calibração do sistema digitalizado, em objetiva de 10x, de cada imagem real selecionada nos grupos foi obtida uma imagem binária e feitas as medidas citadas abaixo.

Através das ferramentas do programa foram excluídas por máscara as áreas externas à camada muscular circular. Em seguida, acionou-se o parâmetro área sendo a mesma

circundada com a ajuda do cursor, obtendo-se assim a medida da área da camada muscular circular, em  $\mu\text{m}^2$  denominada **Área MI** (Figura 16).

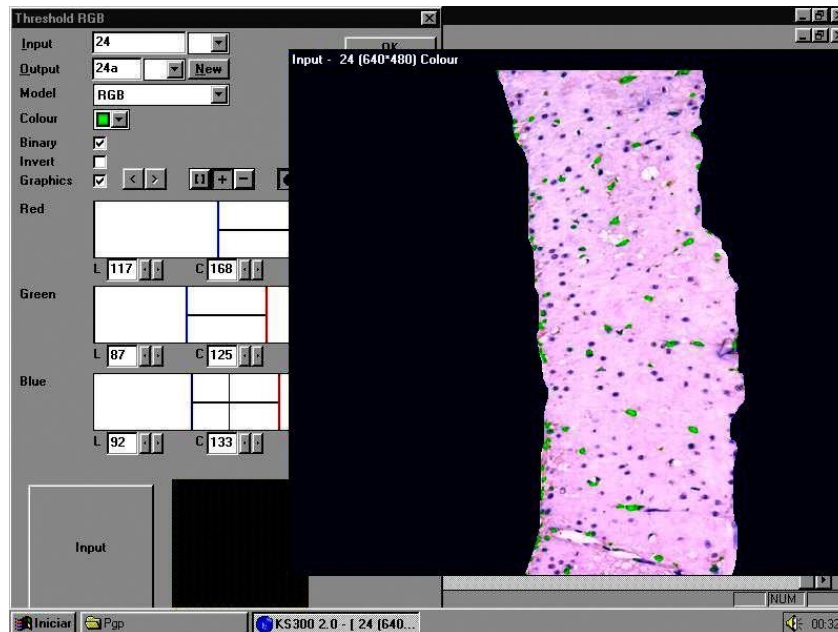


Figura 16 – Método de digitalização usado para medir automaticamente a área da camada muscular circular (cor de rosa) mensurada em  $\mu\text{m}^2$  e delimitada pela máscara azul. A área produto gênico proteico positiva dos axônios após digitalização foi evidenciada pelos pontos em verde. Aumento de 10x.

Da mesma imagem real foi digitalizada somente a área referente ao plexo mientérico marcada por Produto Gênico Proteico 9.5, circundada com a ajuda do cursor, que foi mensurada em  $\mu\text{m}^2$ , denominada **Área plexo mientérico**.

Da mesma imagem real obteve-se somente a área referente aos axônios intramusculares da camada muscular circular dos neurônios entéricos marcados pelo anticorpo Produto Gênico Proteico 9.5 cuja somatória foi obtida em  $\mu\text{m}^2$ , denominada **Área PGP positiva MI** (Figura 16).

Da mesma imagem real foi feita a digitalização das camadas musculares. A ferramenta adequada foi usada. Depois da devida calibração do sistema acionou-se o parâmetro distância entre dois pontos. Determinou-se o comprimento da parede intestinal, manualmente, com a ajuda do cursor. A distância entre dois pontos consistiu de uma linha traçada entre as camadas muscular circular e longitudinal, abrangendo o campo de visão da lâmina (aumento de 10x) de um extremo ao outro, mensurada em milímetros, denominada **Comprimento MI**.

A **Área total** foi obtida a partir da soma da Área MI mais a Área plexo mientérico.

Destas medidas foram feitas uma relação e três proporções dividindo<sup>40</sup>:

Área plexo mientérico ( $\mu\text{m}^2$ ) / comprimento ( $\mu\text{m}$ )

Área PGP positiva MI ( $\mu\text{m}^2$ ) / Área MI ( $\mu\text{m}^2$ )

Área PGP positiva MI ( $\mu\text{m}^2$ ) / Área total ( $\mu\text{m}^2$ )

Área PGP positiva MI ( $\mu\text{m}^2$ ) somada Área plexo mientérico ( $\mu\text{m}^2$ ) / Área total ( $\mu\text{m}^2$ )

Estes parâmetros foram analisados pela média das médias obtidas das imagens medidas.

c) Área de Tecido Conjuntivo da Parede Intestinal corado por Tricrômico de Gomori

Os segmentos caudal e cranial, corados por Tricrômico de Gomori, foram submetidos ao procedimento morfométrico. A coloração pelo Tricrômico de Gomori destaca-se em verde-azulado o tecido conjuntivo.

No segmento caudal cinco lâminas do Grupo Simulado, seis lâminas do Grupo Amputado e quatro lâminas do Grupo Amputado com Válvula foram selecionadas. De cada lâmina foram fotografadas de quatro imagens a oito imagens, no aumento de 4x.

No segmento cranial cinco lâminas do Grupo Simulado, cinco lâminas do Grupo Amputado e sete lâminas do Grupo Amputado com Válvula foram selecionadas e de cada lâmina foram fotografadas cinco imagens a seis imagens, no aumento referido acima. Trabalhou-se com a média das medidas obtidas por grupo. As áreas coradas foram discriminadas automaticamente, com posterior correção manual, em toda a espessura da parede, conforme o procedimento utilizado para medir a área corada pelo Produto Gênico Proteico 9.5, em marrom, descrito anteriormente.

Os resultados foram expressos fazendo-se uma proporção da área corada em verde-azulado, medida e expressa em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ) dividida pela área total da parede intestinal que compreendeu a área de todas as camadas (Figura 17).

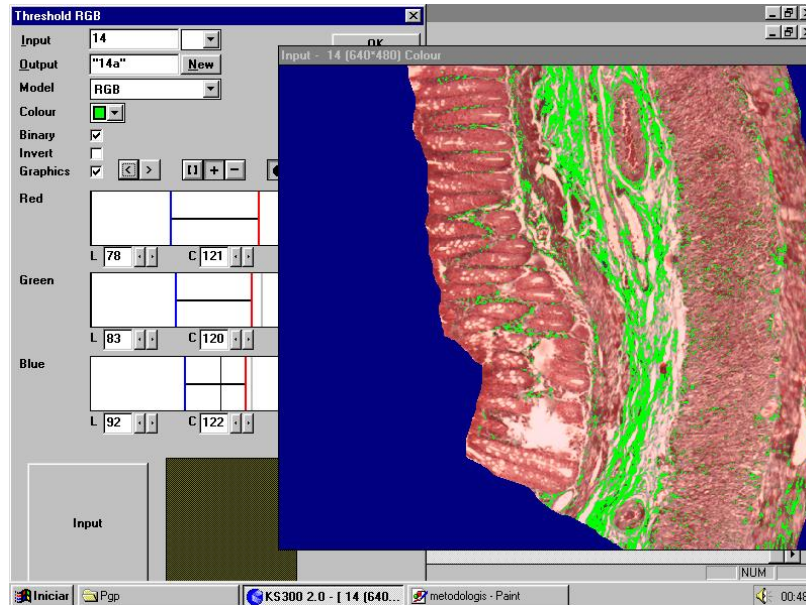


Figura 17 – Método usado para medir a área corada por Tricrômico de Gomori, indicativa da presença de tecido conjuntivo (áreas verdes) distribuídas em toda a espessura da parede. Aumento de 4x.

#### 4.4 Análise Estatística

As variáveis analisadas como o peso, o número de pontos por válvula, a espessura das camadas musculares, as quantificações da imunoposição de Produto Gênico Proteico 9.5 e da coloração para Tricrômico de Gomori foram submetidos à análise estatística descritiva dos dados.

Para analisar se o número de pontos confeccionados por válvula e a abertura da mucosa interferiram no óbito dos animais foi usado o método de Regressão logística. Em uma Análise Univariada as variáveis consideradas significativas foram baseadas no “p valor” menor ou igual a 0,20.

Para a comparação dos dados morfométricos nos três grupos, o teste aplicado foi o Teste de Kruskal Wallis (não paramétrico), em que todos os resultados foram considerados significativos com um “p valor” menor ou igual a 0,05. Para a comparação dos dados morfométricos dos grupos 2 a 2 aplicou-se o Teste Mann Witney com a correção de Bonferroni, com o nível de significância de  $\alpha^*$  menor ou igual à 0,05 dividido pelo número de grupos, no caso três grupos obtendo o valor de 0,0167. Para a comparação do mesmo grupo em momentos diferentes usou-se o teste de Wilcoxon com “p valor” menor ou igual a 0,05. Foi utilizado o programa do *Software SPSS 18* para montagem dos bancos de dados e análise estatística.

## **5 RESULTADO**

---

"Eu quase que nada sei,  
mas desconfio de muita coisa.  
Tudo, aliás,  
é a ponta de um mistério,  
inclusive os fatos.  
Ou a ausência deles.  
Duvida?  
Quando nada acontece  
há um milagre  
que não estamos vendo."

*J Guimarães Rosa*

## 5.1 Mortes

Quanto à sobrevivência dos 36 ratos operados, seis evoluíram para morte sendo todos do Grupo Amputado com Válvula. Dois morreram no 10º dia e 12º dia do pós-operatório, sendo necropsiados imediatamente para ressecção do espécime cirúrgico e identificação de impacção fecal até no ceco. Os outros quatro animais apresentaram-se em condições putrefativas para necropsia, não sendo possível a avaliação da causa de morte (Tabela 1).

**TABELA 1**

Causas de morte nos ratos do GACV

Rato	Dia PO	Causa
4	4º	D
5	2º	D
13	3º	D
14	4º	D
15	10º	D*
16	12º	D*

GACV = Grupo Amputado com Válvula; PO = Pós-operatório, D = sem hipótese diagnóstica; D\* = hipótese diagnóstica de impacção fecal

## 5.2 Número de Pontos por Válvula e Abertura da Mucosa

No Grupo Amputado com Válvula, dos 24 ratos operados, em oito ratos as três válvulas foram confeccionadas com quatro pontos. Nos demais, o número de pontos por válvula variou entre quatro e seis pontos, sendo que seis pontos foram necessários somente em três ratos para confeccionar a terceira válvula. Nos ratos 15 e 16 que morreram tardiamente apenas a terceira válvula do rato 16 foi confeccionada com cinco pontos.

O estudo estatístico pela Análise Univariada aplicado nas variáveis número de pontos confeccionados por válvula e abertura da mucosa teve um “p valor” maior do que o nível de significância definido como  $p=0,20$ , não sendo estatisticamente diferente (Apêndice A).

## **5.3 Microscopia**

### **5.3.1 Aspectos Histopatológicos Descritivos**

#### ***5.3.1.1 Segmento Intestinal Caudal***

No Grupo Simulado e Grupo Amputado, a parede intestinal apresentou continuidade das camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa, de aspecto estrutural normal (Figura 18A e 18B). O Grupo Amputado apresentou reação inflamatória inespecífica restrita à camada serosa (Figura 18C e 18D).

Os cortes histológicos dos rolos representativos da parede intestinal no segmento intestinal caudal no Grupo Amputado com Válvula apresentaram continuidade de todas as camadas, exceto na região em que é possível identificar a presença das válvulas, pelo espessamento localizado da serosa e muscular que apresentou sinais de inflamação crônica com formação de células gigantes que fagocitam parte de fios cirúrgicos, além de reparo por fibrose (neoformação conjuntivovascular com deposição de colágeno). A submucosa incluindo a muscular da mucosa encontravam-se preservadas (Figura 18E e 18F).

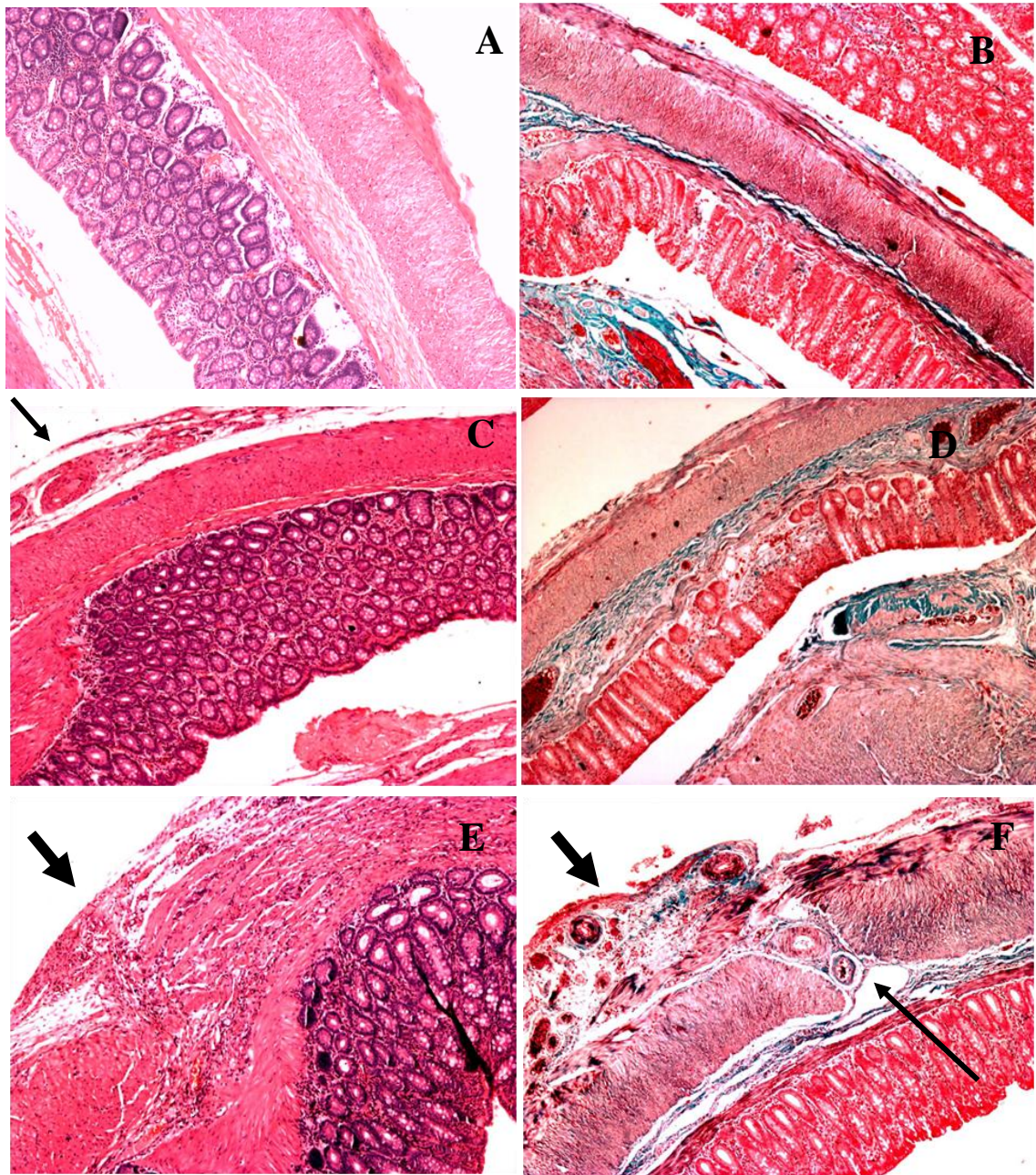


Figura 18 – Aspectos histopatológicos do segmento caudal da parede intestinal dos Grupo Simulado (A e B), de aspecto normal e Grupo Amputado (C, D), apresentando espessamento da serosa (C, seta fina) na região anatomicamente similar à região da confecção da válvula amostrada em E e F no Grupo Amputado com Válvula. Note o espessamento da parede seromuscular na área de confecção da válvula (E, seta grossa), bem como a interrupção de continuidade das camadas musculares na área seccionada (F, seta fina) acompanhada de reação inflamatória crônica da camada serosa (F, seta grossa). Mucosa preservada em todos os grupos. Aumento 4x. Coloração: A, C, E (HE); B, D, F (Tricrômico de Gomori).

Na região de cada uma das três válvulas observou-se interrupção linear das camadas musculares, região que se encontra substituída por tecido conjuntivo vascular exuberante, representando cicatriz fibrosa que atinge principalmente a serosa e musculares externa e interna (Figura 19 A–D). Este tecido conjuntivo arranjava-se muitas vezes ao redor do espaço vazio ocupado previamente pelo fio cirúrgico e substituiu prováveis áreas de destruição das camadas pela incisão e por passagem dos fios cirúrgicos durante a confecção da válvula (Figura 19B e 19C). A coloração para tecido conjuntivo evidenciou deposição localizada de colágeno na cor verde-azulada (Figura 19C, detalhe). Alguns dos resquícios do fio cirúrgico estavam permeados por infiltrado mononuclear ricos em células gigantes do tipo corpo estranho (Figura 19B, 19C, 19D).

A presença de células gigantes do tipo corpo estranho (multinucleadas) foi frequente (Figura 19B e 19D). Apesar das alterações descritas na região da válvula, a observação sistemática das áreas adjacentes mostrou aspecto estrutural preservado e com pouca deposição de tecido conjuntivo, o que não resultou em alterações estruturais da parede como pode ser observado nas figuras 19E e 19F, representativas dos intervalos de parede entre as válvulas.

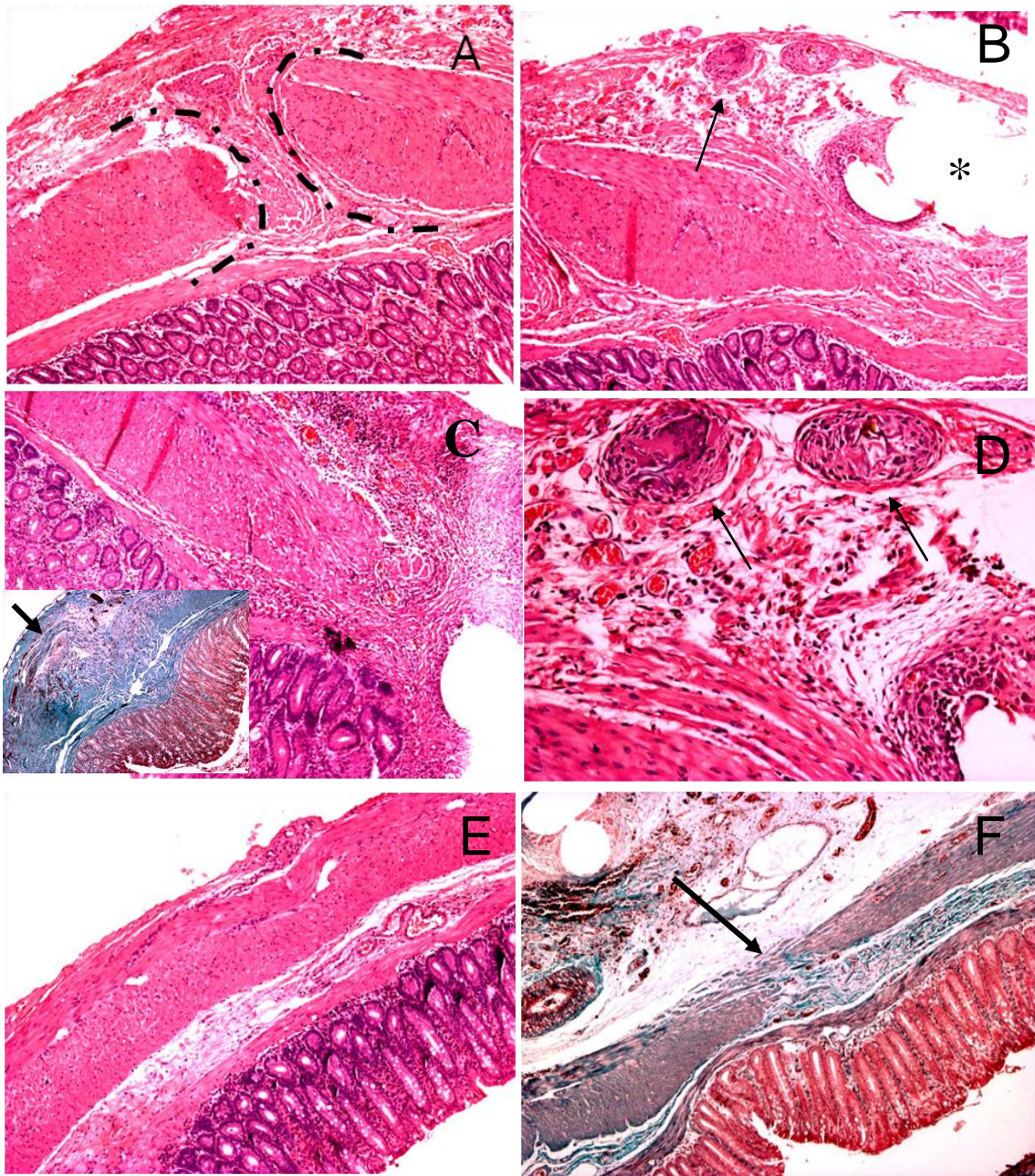
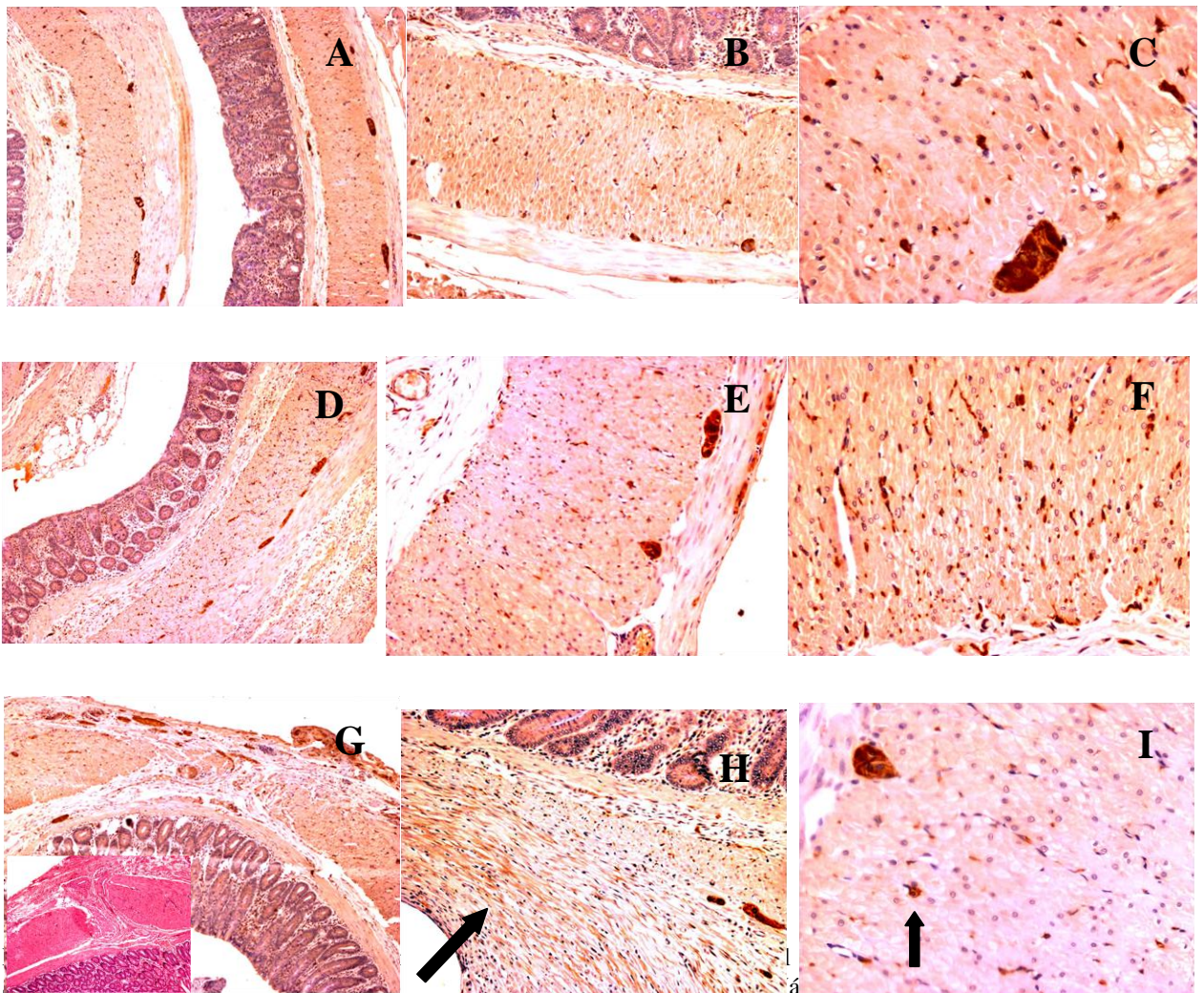


Figura 19 – Aspectos histopatológicos das válvulas (A–D), aumento 10x, e área adjacente (E–F). Observa-se interrupção parcial das camadas musculares (A, área tracejada). Tecido conjuntivo e vascular exuberante, representando cicatriz fibrosa (B, C, e detalhe). Em B, observa-se tecido conjuntivo ao redor do espaço vazio (\*) ocupado previamente por fio cirúrgico. A coloração pelo Tricrômico de Gomori evidencia o tecido conjuntivo e deposição de colágeno na cor verde-azulada (C, detalhe, seta). Infiltrado mononuclear rico em células gigantes do tipo corpo-estranho (B, C, D, setas). Áreas representativas dos intervalos entre as válvulas, da parede intestinal, mostram estrutura preservada e com pouca deposição de tecido conjuntivo (E e F). Aumento 4x.

A imunoposição do Produto Gênico Proteico 9.5 evidenciou os elementos do sistema nervoso entérico, a saber, o plexo mientérico (Figura 20). Ao se acompanhar a distribuição do plexo, ao longo da parede intestinal mostrada no rolo, observou-se que nas regiões entre as válvulas há preservação da estrutura e densidade dos elementos neurais. No entanto, nas regiões das válvulas, os plexos deixam de ser visíveis em pequenos segmentos microscópicos da parede, em associação com irregularidade na apresentação das camadas musculares que não são distintas entre si, e apresentam áreas de deposição de tecido conjuntivo (Figura 20G). Vê-se a rarefação destes filetes (Figuras 20H, 20I) na camada muscular circular na região imediatamente adjacente às válvulas. Tal diminuição da densidade não foi detectada nas áreas intervalvulares, onde a análise morfométrica foi realizada.



plexo mientérico de forma contínua no Grupo Simulado (A) e Grupo Amputado (D) enquanto há uma nítida interrupção da continuidade dos elementos Produto Gênico Protéico 9.5 – positivos do plexo no Grupo Amputado com Válvula (G), que se correlaciona com a área onde a válvula foi confeccionada (G, Detalhe em HE). Neste grupo observa-se também diminuição localizada da densidade de fibras nervosas intramusculares lisas da parede intestinal, principalmente na camada muscular circular (setas H,I). A, D, G (aumento 4x); B, E, H (aumento 10x), C, F, I (aumento 20x).

### *5.3.1.2 Segmento Intestinal Cranial*

Os rolos do segmento intestinal cranial mostraram aspecto preservado das camadas intestinais do ponto de vista estrutural conforme demonstrado na figura 21. As colorações em Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Gomori e imuno-histoquímica para Produto Gênico Proteico 9.5 mostraram aspectos semelhantes entre os grupos. Observou-se que a serosa dos animais representativos do Grupo Amputado com Válvula apresentou-se discretamente aumentada devido a processo inflamatório crônico, com reação gigantocelular (Figura 21G).

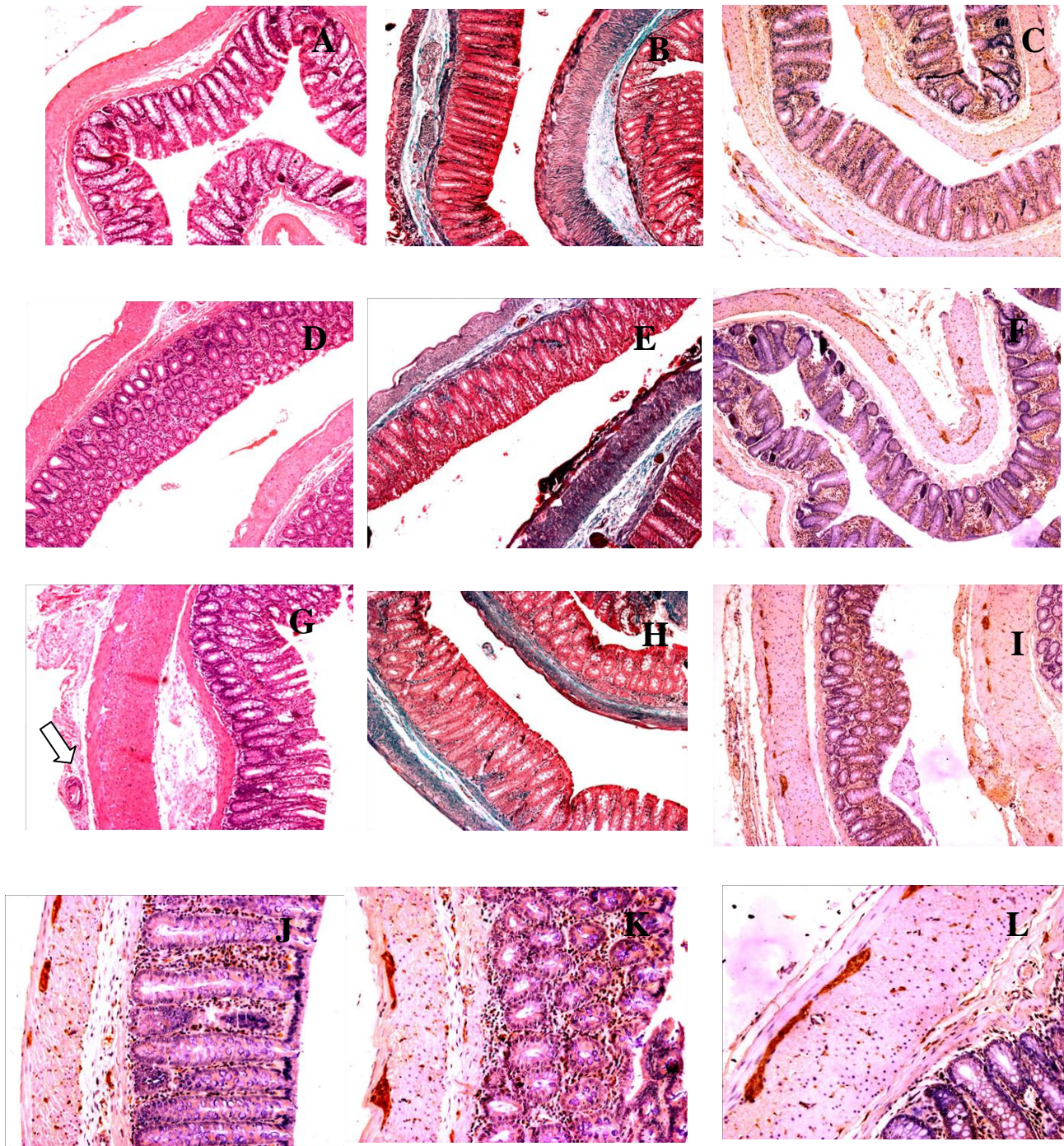


Figura 21 – Aspectos histológicos do segmento intestinal cranial, proximal à região das válvulas no Grupo Simulado (A, B, C, J), Grupo Amputado (D, E, F, K), e Grupo Amputado com Válvula (G, H, I, L). Observa-se continuidade das camadas serosa, musculares e submucosa, que apresentam estrutura preservada nos três grupos. No Grupo Amputado com Válvula (G) observa-se presença de inflamação crônica com reação gigante-celular do tipo corpo estranho na serosa (seta). A coloração pelo Tricrômico de Gomori (B, E, H) evidencia o tecido conjuntivo e deposição de colágeno em proporções semelhantes entre os grupos. A expressão de Produto Gênico Proteico 9.5 (C, F, I, J–L) delinea os elementos do plexo nervoso de forma contínua e de distribuição semelhante nos três grupos. A–I (aumento 4x). J–L (aumento 10X). Colorações A, D, G (Hematoxilina Eosina); B, E, H (Tricrômico de Gomori); C, F, I, J, K, L (Produto Gênico Proteico 9.5).

### 5.3.2 Aspectos Histopatológicos Quantitativos

Os parâmetros listados nos itens abaixo foram avaliados quantitativamente de forma comparativa entre o Grupo Simulado, Grupo Amputado e Grupo Amputado com Válvula por meio do método morfométrico aplicado aos cortes histológicos.

#### 5.3.2.1 Espessura da Parede Intestinal

A espessura das camadas muscular circular, muscular longitudinal, muscular total e serosa da parede intestinal no **segmento intestinal caudal** nos três grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ). (Apêndice B)

No **segmento intestinal cranial** as medidas da espessura das camadas muscular circular, muscular longitudinal e muscular total não apresentaram diferença estatisticamente significativas entre os três grupos, enquanto para a camada serosa foi significativamente diferente entre os grupos ( $p = 0,024$ ). (Apêndice B)

Uma vez que as medidas da camada serosa não são iguais nos três grupos foi feita a comparação múltipla dos grupos 2 a 2 pelo teste de Mann-Whitney para os três grupos que detectou que a camada serosa foi maior no Grupo Amputado com Válvula comparado com o Grupo Simulado. (Apêndice B)

#### 5.3.2.2 Densidade dos Elementos Nervosos Produto Gênico Proteico 9.5 Positivo

A avaliação dos parâmetros morfométricos (Teste de Kruskal-Wallis) comparativamente entre o Grupo Simulado, o Grupo Amputado e o Grupo Amputado com Válvula, quanto ao aspecto da densidade dos elementos nervosos da parede intestinal, no **segmento intestinal caudal** à terceira válvula demonstrou que o valor da relação para densidade não apresentou diferença significativa, mas os valores das três proporções foram estatisticamente significativos (Tabela 2).

**TABELA 2**

Análise da densidade dos elementos nervosos PGP positivo no segmento intestinal caudal no GS, GA, GACV

Variável	Grupo	N	I	M	$\bar{X} \pm s$	Mi	IC	EPM	p valor
Área Plexo/ Comprimento	GS	4	19	171	$3,74 \pm 1,19$	3,44	1,83 – 5,65	0,5996	0,255
	GA	6	30	270	$3,04 \pm 0,91$	2,9	2,08 – 3,99	0,3715	
	GACV	7	38	342	$2,66 \pm 1,34$	2,27	1,41 – 3,90	0,5080	
PGP pos MI / Area MI	GS	4	19	171	$0,020 \pm 0,008$	0,019	0,006 – 0,034	0,0043	<b>0,033</b>
	GA	6	30	270	$0,008 \pm 0,002$	0,008	0,006 – 0,011	0,0010	
	GACV	7	38	342	$0,011 \pm 0,003$	0,011	0,008 – 0,015	0,0013	
PGP pos MI / Area Total	GS	4	19	171	$0,019 \pm 0,008$	0,018	0,006 – 0,033	0,0042	<b>0,041</b>
	GA	6	30	270	$0,008 \pm 0,002$	0,008	0,005 – 0,011	0,0010	
	GACV	7	38	342	$0,010 \pm 0,003$	0,01	0,006 – 0,013	0,0014	
PGP pos MI + Area plexo / Area total	GS	4	19	171	$0,046 \pm 0,013$	0,042	0,025 – 0,068	0,0068	<b>0,010</b>
	GA	6	30	270	$0,027 \pm 0,005$	0,026	0,021 – 0,033	0,0023	
	GACV	7	38	342	$0,030 \pm 0,004$	0,032	0,026 – 0,034	0,0015	

Teste Estatístico: Kruskal-Wallis

p valor < ou = 0,05

Legenda: PGP = Produto Gênico Proteico; GS= Grupo Simulado; GA= Grupo Amputado; GACV= Grupo Amputado com Válvula; N = número de ratos; I= número de imagens; M = número de medidas;  $\bar{X}$  = média; s= desvio padrão; Mi = mediana; IC = intervalo de confiança; EPM= erro padrão da média; MI = camada muscular circular; pos = positivo

Na Tabela 3 e no Gráfico 1 nota-se que todos os parâmetros avaliados para as densidades de elementos Produto Gênico Proteico 9.5 positivos nesta região foram significativamente maiores no Grupo Simulado em comparação com o Grupo Amputado. Também houve diferença estatística entre o Grupo Simulado e o Grupo Amputado com Válvula para o parâmetro de densidade expresso como PGP pos MI + Area plexo / Area total, com maiores valores para o Grupo Simulado.

TABELA 3

Análise das proporções da densidade dos elementos nervosos PGP positivo no segmento intestinal caudal no GS, GA, GACV

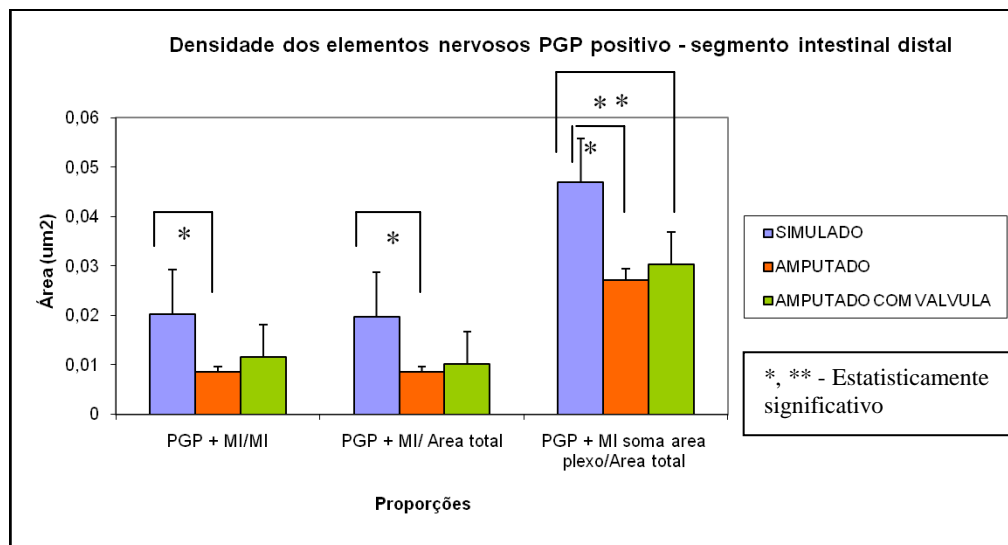
Grupos	p Valor		
	<u>PGPposMI</u> Area MI	<u>PGPposMI</u> AreaTotal	<u>Area PGPposMI + Area plexo</u> Area total
GS X GA	<b>0,011</b>	<b>0,011</b>	<b>0,011</b>
GS X GACV	0,131	0,058	<b>0,008</b>
GA X GACV	0,199	0,775	0,317

Teste de Mann-Whitney

Nível de significância = correção de Bonferroni =  $0,05/3 = 0,0167$

Legenda: PGP = Produto Gênico Proteico 9.5; GS = Grupo Simulado; GA = Grupo Amputado; GACV = Grupo Amputado com Válvula; pos = positivo; MI = camada muscular circular

GRÁFICO 1



A avaliação dos mesmos parâmetros morfométricos comparativamente entre os três grupos, quanto ao aspecto da densidade dos elementos nervosos da parede intestinal, no **segmento intestinal cranial** à terceira válvula, foi analisada da mesma forma citada acima para o **segmento intestinal caudal**. Aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis. Concluiu-se que nenhum dos valores da relação e das proporções para densidade dos elementos nervosos Produto Gênico Proteico 9.5 positivo foi estatisticamente diferente.

### ***5.3.2.3 Área do Tecido Conjuntivo da Parede Intestinal (Coloração por Tricrômico de Gomori)***

A avaliação dos parâmetros morfométricos comparativamente entre os três grupos, quanto ao tecido conjuntivo da parede intestinal, no **segmento intestinal caudal** e **cranial** à terceira válvula em cada lâmina foi aferida. Usou-se a média das medidas da área corada. O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado e concluiu-se que a área média do tecido conjuntivo nos locais medidos não apresenta diferença estatística no segmento intestinal caudal e nem no segmento intestinal cranial (Apêndice D).

## **6 DISCUSSÃO**

---

*Scibendis nullus finis*  
(O escrever não tem fim)

## 6.1 Aspectos Gerais

### 6.1.1 Amostra

Desde as primeiras descrições do plexo mientérico por Auerbach em 1862 e 1864 e do plexo submucoso por Meissner em 1857, muitos artigos têm sido publicados a respeito da organização morfológica e funcional de sistemas nervosos entéricos<sup>41,42</sup>, nos quais procura-se validar o uso de pequenos animais de laboratório como modelo de estudo do tubo gastrointestinal em humanos. Os roedores têm sido os animais mais utilizados pelos centros de pesquisa, sendo importantes para estudos científicos em diversas áreas, por possuírem características fisiológicas e genéticas semelhantes à dos humanos<sup>43,44</sup>. Ressaltando-se os cuidados e o refinamento na extrapolação dos achados no presente trabalho, optou-se pelo uso de ratos, animais dóceis de fácil criação e manejo.

Um número maior de animais no Grupo Amputado com Válvula foi adotado para se ter certeza de que a operação padrão não causa obstrução intestinal nos animais, que a mesma é exequível, para um controle pós-operatório consistente quanto a complicações e para um estudo mais seguro da evolução dos animais. A sermiotomia não obstrui os animais.

### 6.1.2 Operação

As variáveis número de pontos confeccionados por válvula e abertura da mucosa foram estudadas para verificar sua provável influência no óbito dos animais.

Foi uma preocupação durante o ato operatório identificar as **aberturas puntiformes da mucosa** porque esta abertura é uma solução de continuidade entre a luz intestinal e a cavidade abdominal. A abertura puntiforme da mucosa pode contaminar o peritônio, de maneira muito sutil ou até mesmo invisível configurando contaminação da cavidade abdominal. A evolução pode ser com infecção, sepse e morte. Nenhuma destas variáveis influenciou na morte dos animais.

Uma proposta para a reprodução do modelo é incluir no material cirúrgico uma lupa para a confecção da terceira válvula exatamente onde o colo é muito fino e as possibilidades de abertura da mucosa são maiores.

A tentativa de padronizar e fazer o mesmo **número de pontos em todas as válvulas** foi preocupação no momento da operação no sentido de uniformizar a confecção ds mesmas. A tentativa foi de manter a mesma quantidade de mucosa na luz intestinal (anel intraluminal

criado pela sutura das bordas cruentas da seromiotomia) para tornar mais homogêneo este fator que possivelmente altera a velocidade de passagem das fezes. O óbito dos animais não está relacionado com o número de pontos por válvula e nem com a abertura da mucosa.

**No pós-operatório**, a morte de quatro ratos foi mais precoce sugerindo uma menor resistência desses animais ao porte da cirurgia, uma vez que não houve necrose do colo abaixado e da colostomia perineal. Na necropsia não foram observadas fezes livres na cavidade, apesar do grau leve de putrefação dificultar a avaliação.

A morte dos dois animais que ocorreu tardiamente não foi esclarecida na necropsia. O achado de grande quantidade de fezes distribuídas ao longo do colo associado à distensão sugere impacção fecal com hipótese diagnóstica de obstrução intestinal. Nestes casos o envolvimento da quantidade de mucosa invaginada pode ter sido maior, funcionando como estenose e isto faz a diferença para a resposta adaptativa intestinal demonstrada pelos diferentes graus de dilatação. Quando este grau de dilatação é maior, ocorre a formação de verdadeiras câmaras de segmentação, com parede translúcida, simulando um segmento de armazenamento entre os haustros<sup>26</sup>.

O achado de aderências ocorreu somente nos ratos do Grupo Amputado com Válvula. Consequência esperada, principalmente, no segmento intestinal operado, mas sem repercussões clínicas. As aderências eram frouxas e longas e a maioria se estabeleceu entre o intestino delgado e o aparelho reprodutor. Não foi causa de morte nos animais.

A eutanásia dos animais do Grupo Amputado com Válvula no 40º dia pós-operatório permitiu excluir a obstrução tardia e demonstrar que o processo de distensão abdominal é autolimitado.

## **6.2 Papel Funcional da Válvula – Seromiotomia**

Vários modelos experimentais têm sido propostos para auxiliar na compreensão da fisiopatologia das doenças intestinais como megacolo Chagásico, doença de Hirschsprung, adenocarcinoma colônico, entre outras, os quais são desenvolvidos para simular a doença e estudar as alterações estruturais e morfológicas do plexo mientérico<sup>45</sup>.

Este trabalho tem uma proposta diferente, ou seja, desenvolveu um modelo experimental que propõe restabelecer, nos casos de amputação abdominoperineal, a função intestinal neoanal. A primazia da técnica é evitar uma colostomia abdominal definitiva. A surpresa da técnica é que ela preenchendo a pelve resolve o difícil problema do vazio pélvico

e possibilita uma reconstrução da vagina, quando a proposta é exenteração pélvica. É uma técnica simples, com aumento mínimo no tempo operatório.

A escolha do modelo experimental é fundamentada na necessidade de se voltar a atenção para a estrutura das válvulas e sua relação com a parede intestinal contígua, com ênfase para os elementos musculares da parede intestinal e dos elementos reguladores da função motora intestinal no plexo mientérico. Considera-se de relevância estudar não apenas os aspectos da técnica que o modelo põe em evidência, mas principalmente investigar a integridade dos elementos nervosos da parede intestinal que a interrupção local (seromiectomia) das camadas serosa e musculares potencialmente modificaria. A atividade motora do tubo gastrointestinal é crítica para a vida e a ausência de atividade motora é uma das indicações para transplante intestinal<sup>46</sup>. Em humanos, a técnica é realizada no colo desde 1991, mas não viabiliza o estudo morfológico das válvulas<sup>16</sup>.

Na literatura a citação: “as operações foram desenvolvidas para interromper as vias nervosas na parede do intestino. As vias de execução no plexo mientérico podem ser interrompidas por corte da musculatura longitudinal em uma direção circular (miotomia). Um anel do músculo longitudinal com o plexo mientérico poderia ser removido, deixando a musculatura subjacente circular, a submucosa e a mucosa intactas (miectomia)<sup>29</sup> valida esta proposta. A diferença está na profundidade da miotomia.

Os autores Furness e Costa, em 1979, propuseram a secção da camada muscular longitudinal e secção do plexo mientérico e este modelo experimental propõe interromper as vias nervosas da parede intestinal seccionando toda a espessura da parede muscular do intestino, na sequência camada serosa, muscular longitudinal, plexo mientérico e muscular circular, deixando intactas a mucosa, a muscular da mucosa, e a submucosa conforme realizada por Lázaro da Silva em 1974<sup>15,16</sup>. A seromiectomia realizada de forma linear, circunferencial somada a invaginação parcial da seromuscular interrompe as vias de execução do plexo mientérico<sup>47,42</sup>.

Neste modelo a válvula confeccionada foi modificada comparada com a válvula proposta na literatura<sup>24,25,26,27</sup>. Após a secção da seromuscular seguida de sutura das bordas cruentas fez-se apenas o aproximar dessas bordas, com menor quantidade de invaginação da seromuscular e por consequência com menor quantidade de mucosa invaginada. Fato relevante, pois muda a resposta intestinal adaptativa e consequentemente muda as alterações ocorridas na parede intestinal, o que aparentemente produziu menores repercussões mecânicas, obstrutivas. Uma das perguntas nesta tese é exatamente qual a

correlação destas modificações cirúrgicas discretas na parede intestinal com as alterações nas camadas e nos elementos nervosos da parede colônica.

### 6.2.1 Microscopia Descritiva

A preocupação em documentar a válvula sob o aspecto da anatomia microscópica é de fundamental importância. É preciso ter o conhecimento da sua natureza tecidual e saber se a técnica cirúrgica realizada cumpriu seu objetivo. Isto faz diferença na evolução e no aprimoramento da mesma e na sua aplicação de forma ideal e inequívoca.

A inflamação é um processo fisiopatológico fundamental, crucial para a sobrevivência, mas também é causa de morbimortalidade considerável. Inflamação pode ter efeitos profundos na função neuronal entérica e na neuropatia inflamatória e está emergindo como tópico importante na neurogastroenterologia<sup>32</sup>. Não é surpresa e há evidências de que alterações inflamatórias na inervação do tubo gastrointestinal levam à mudanças na função motora. As consequências funcionais da inflamação irão depender na natureza dos estímulos inflamatórios. A resposta do Sistema Nervoso Entérico para inflamação não é uniforme. Varia de acordo com local e tipo de inflamação. Muitas anormalidades contráteis do músculo em modelos animais de colites são devido a defeitos musculares específicos ou a alterações no mecanismo de transdução do sinal. Em modelos de colite há uma frequência reduzida de contrações migratórias gigantes colônicas, ou seja, uma redução da motilidade propulsiva no cólon proximal e médio, mas não no distal. Essas contrações migratórias gigantes são responsáveis pelos movimentos do bolo fecal. Esse defeito de motilidade pode ter um componente neural ou a desordem pode estar restrita à função muscular<sup>44, 48</sup>.

A resposta inflamatória leva à disfunção neuronal e degeneração que após um tempo pode levar à aganglionose, distúrbios motores graves como acalasia, pseudo-obstrução ou megacolo. O mecanismo da injúria neuronal entérica e perda celular não estão ainda claros. Isso justifica vários estudos<sup>32</sup>. Exemplo clássico é a infecção pelo *Tripanossoma cruzi*, em que a inflamação é o fator mais importante no processo da disfunção neuronal do que a consequente aventada imunidade antineural no intestino humano. A extensão dessa disfunção determinará a gravidade da seqüela e a adaptação clínica do paciente. No colo humano, com doença de Chagas crônica, até 30% de desnervação mientérica não apresenta dilatação visceral, mas 70% da desnervação leva a este quadro<sup>48</sup>.

A seromiotomia proposta, induz como resposta, um processo inflamatório crônico que gera alterações celulares circunferencialmente, mas de extensão curta, com substituição por

tecido cicatricial, fibroso que pode de forma localizada interromper os circuitos mecânicos e provavelmente químicos. A análise descritiva pela Hematoxilina e Eosina confirma isto. A submucosa e a muscular da mucosa, no local da válvula, encontram-se estruturalmente preservada na análise sistemática das lâminas.

A despeito das intensas alterações descritas na região das válvulas a observação sistemática nas lâminas, das áreas adjacentes (intervalos de parede intestinal a montante e adjacente à 3ª válvula), mostra aspecto estrutural preservado e com deposição de tecido conjuntivo similar ao Grupo Simulado. A descrição na coloração Hematoxilina e Eosina confirma a normalidade da estrutura histológica do segmento intestinal examinado, exceto por alterações muito localizadas na região das válvulas. Existe um equilíbrio imune refinado entre o estado de ativação crônica de células imunes funcionais no intestino e mecanismos regulatórios que mantêm esta inflamação em grau baixo e controlada<sup>49</sup>. Como as alterações que as válvulas geram são tênues, a resposta morfológica é discreta a ponto de não criarem doença no segmento operado.

Esses dados em conjunto permitem indicar que os mecanismos atuantes na condição de seromiotomia neste modelo constituem válvulas e não estenoses cicatriciais, uma vez que a análise sistemática de toda a extensão do colo distal e proximal às válvulas por microscopia de luz óptica não mostra evidência de processo cicatricial ou deposição de colágeno difusos na parede colônica. A avaliação dos parâmetros morfométricos através da coloração para tecido conjuntivo evidencia o aspecto habitual da deposição de colágeno comparativamente entre o Grupo Simulado, o Grupo Amputado e o Grupo Amputado com Válvula e confirma a análise qualitativa.

As válvulas propostas não alteram a espessura da parede, não produzem processo inflamatório exuberante ou difuso e não compromete a mucosa, a muscular da mucosa e a submucosa. As válvulas confeccionadas devem ser compreendidas como um fator auxiliar no contexto da adaptação intestinal. Os resultados corroboram com a opinião de que a técnica proposta induz a adaptação natural do intestino, deve ser considerada, pois não existe interferência negativa no processo adaptativo<sup>50</sup>.

Apesar da mucosa não ter sido o foco deste estudo é importante lembrar que estudos em animais e humanos mostraram que as válvulas artificiais tornam o trânsito intestinal mais lento, promovem ganho ponderal após ressecções intestinais e aumentam o tempo de contato do conteúdo luminal com a mesma<sup>26,50,51</sup>.

Sabe-se que regimes dietéticos e agentes hormonais estimulam hipertrofia jejunal e colônica. Há várias implicações do contacto da mucosa com elementos da dieta no controle da

proliferação celular<sup>52,53,54</sup>. Na sequência, é preciso avaliar o real benefício do estudo da proliferação celular da mucosa frente à injúria da estase e da dilatação decorrentes da confecção das válvulas embora não existam evidências qualitativas (microscopia descritiva) de alterações no aspecto estrutural da mucosa. Há, no entanto, evidências preliminares, não morfométricas, de que pode ocorrer após amputação e colostomia terminal diminuição da espessura da parede também à custa de redução da espessura da mucosa.

É preciso estudar posteriormente a eletrofisiologia deste segmento e esclarecer se a seromiotomia altera a concentração, ou disponibilização de neurotransmissores que contribuem com uma alteração de motilidade do segmento operado e da mucosa neste segmento. A plasticidade do comportamento eletrofisiológico parece ser propriedade fundamental dos neurônios entéricos na maioria das regiões do tubo digestivo. Os estados comportamentais são provavelmente determinados por mudanças nas concentrações de neurotransmissores, mediadores parácrinos ou hormônios nas redondezas externas. Uma elevada excitabilidade é encontrada no intestino após sensibilização por antígeno externo<sup>55,56</sup>. Parece-nos que a válvula cria um segmento que pode ser comparado com o segmento sigmoide que na fisiologia normal é um segmento intestinal de armazenamento.

A similaridade da estrutura histológica da parede intestinal nos três grupos confirma que a técnica não gera descompensação e “doença” na parede intestinal.

### 6.2.2 Espessura

A necessidade de estudar as válvulas biológicas contentivas tem também a preocupação de esclarecer se não está sendo criado um novo estado de “doença” para o animal. A espessura é parâmetro fidedigno para este fim. Todos os modelos de obstrução intestinal induzindo hipertrofia colônica no intestino delgado de cobaia, no coelho, no cão e desnervação mientérica química com cloreto de benzalcônio geram dilatação e hipertrofia intestinal que têm sido muito úteis para auxiliar na compreensão da fisiopatologia e na patogênese de várias doenças que atingem o colo<sup>45, 57,34</sup>.

É sabido que o processo obstrutivo leva à estase do conteúdo da alça a montante. A musculatura do intestino responde com aumento de volume da célula muscular e aumento do número de células musculares caracterizando a hipertrofia que se expressa pelo aumento da espessura da parede intestinal<sup>58, 51</sup>. A possibilidade da célula muscular sofrer duplicação foi uma conquista recente da pesquisa<sup>58</sup>. A célula muscular vai à mitose simples ou, através da diferenciação dos fibroblastos situados na linha de transição entre a submucosa e a camada

muscular, em células musculares levando ao aumento do número delas, fato que é auxiliado pelo estímulo do hormônio de crescimento<sup>59</sup>.

A despeito de três válvulas terem sido confeccionadas, e todas elas incluídas no segmento mostrado para análise histológica, na ausência de alterações qualitativas específicas, o local escolhido para estudo morfométrico foi cranial à terceira válvula e entre a terceira e a segunda válvula, pois nos modelos simulados de hipertrofia intestinal o diâmetro máximo ocorreu nos primeiros centímetros próximos à estenose com redução proximal progressiva. Em modelos de obstrução intestinal sabe-se que ocorre aumento da pressão luminal, que ativa os receptores mientéricos e estimulam a atividade motora do segmento proximal à obstrução<sup>60, 61,57</sup>.

Neste modelo as espessuras das camadas musculares interna e externa não variaram significativamente entre os grupos no segmento intestinal caudal e cranial.

Essa dilatação é consequência de dois mecanismos. O primeiro é a estenose parcial obtida com as suturas e consequente aumento de resistência ao fluxo, sendo a válvula mais cranial a maior responsável por ser a primeira a receber o impacto fecal. A jusante da sutura cranial, as fezes já estavam moldadas e afuniladas não exercendo maiores repercussões, apenas sendo retidas. O segundo é que a pequena dilatação estabelecida à montante das suturas serviu para desencadear o segundo processo patológico de estase. Esse aumento no diâmetro da alça ocasiona acomodação de maior quantidade de conteúdo intestinal no local, estase, retardo do trânsito do conteúdo intestinal, confirmando matematicamente a relação fluxo, pressão, diâmetro e resistência pelas fórmulas:

$\Delta P$       diferença de pressão

F          fluxo

R          resistência

T          tensão

D          diâmetro

P          pressão

$$F = \Delta P \div R$$

$$T = D \times P \text{ (Lei de Laplace)}$$

$$\Delta P = F \times R$$

$$P = T \div D$$

Como a pressão é no mesmo órgão e nas mesmas condições teremos  $\Delta P=P$ , substituindo os dados:

$$F X R = T \div D$$

Entende-se que, quanto maior a dilatação intestinal maior será o diâmetro da alça e menor será a velocidade de fluxo do conteúdo intestinal. Logo, a estenose parcial leva a um aumento do diâmetro intestinal a montante, diminuindo a velocidade de fluxo do conteúdo fecal e ocasionando estase. Esta decorre de dois fatores: do aumento da resistência ao fluxo pela sutura e da dilatação da alça intestinal que diminui a velocidade de fluxo e retarda o trânsito intestinal<sup>24</sup>.

A confecção das válvulas leva a alteração do peristaltismo, com conseqüente estase e distensão intestinal a montante, em diferentes graus, que inibem e retardam o trânsito intestinal<sup>24,25,26</sup>. A diferença é que as válvulas confeccionadas geram dilatação autolimitada e não geram alterações degenerativas nem morfológicas da parede e nem sinais de descompensação da alça intestinal como foi observado na atresia intestinal congênita e em modelo experimental de obstrução intestinal<sup>47</sup>. Isto passa a ser uma vantagem desta técnica operatória, uma vez que não provoca condição patológica no intestino operado, e esta condição nos induz a ponderar que gera um ambiente de estímulo com resposta adaptativa próxima do fisiológico

A construção cirúrgica de válvulas promoveu alterações musculares de menor monta, ocasionadas possivelmente pela função simulada de piloros e não de estenoses cicatriciais. Julga-se que a seromiectomia é responsável por uma alteração do peristaltismo local por secção dos feixes nervosos, somado a invaginação da seromuscular e da presença do esporão mucoso, que são obstáculos a passagem do conteúdo do lúmen. Isto resulta em contrações com diferentes intensidades de forças dependendo do tamanho dos obstáculos e por conseqüência diferentes graus de hipertrofia das camadas musculares chegando a ter hipertrofia mas não ser significativa.

O estudo da espessura neste modelo confirma que as válvulas não geram condições patológicas na parede intestinal. É cedo para falar que a técnica de construção das válvulas cirúrgicas resulta em continência fecal, pois o que parece acontecer é um retardo do fluxo intestinal. O aumento da pressão intraluminal causado pelo acúmulo do conteúdo no segmento proximal à injúria cirúrgica produz tensões transluminais. Estas tensões são distribuídas circunferencial e longitudinalmente através de arranjos em pontes cruzadas dos

feixes de colágeno da submucosa, referidos como “componente esquelético” da parede intestinal. O crescimento do músculo implica em aumento da espessura (hipertrofia) e aumento da circunferência e diâmetro (dilatação) intestinais<sup>60, 62</sup>. Esta proposta de válvula biológica é interessante porque promove um retardo do conteúdo intestinal de forma discreta e atenuada que não gera alterações patológicas descritas na literatura como nos modelos de obstrução. Este fato, provavelmente pode estar ligado com a falta de estímulos, de forma intensa ou contínua, aos receptores murais, a ponto de não alterar a atividade motora no segmento proximal a válvula de forma extrema, como ocorre em modelos de obstrução intestinal. É factível que os neurotransmissores possam também não estar alterados de forma significativa.

A espessura da serosa, no segmento intestinal cranial, que teve maiores valores no Grupo Amputado com Válvula merece reflexões. O segmento intestinal operado denominado caudal ficou exposto aos fatores de manipulação, secção, sutura, injúria, infecção e contaminação gerando resposta local de aderência, onde fatores externos como estes são responsáveis pela alteração da serosa<sup>63</sup>. Nos ratos do Grupo Amputado com Válvula, a serosa do segmento intestinal cranial, que corresponde ao segmento a montante e distante da terceira válvula corresponde exatamente à parte do segmento intestinal localizado na cavidade abdominal que não sofreu influência direta destas injúrias. Mas este segmento foi o segmento abaixado, que mudou de sítio de localização da cavidade abdominal para o espaço retrorretal.

No local onde foi confeccionada a terceira válvula é um local onde o intestino é bastante fino e translúcido o que justifica a dificuldade técnica de confecção da mesma, pois foi exatamente na terceira válvula onde ocorreu o maior número de abertura da mucosa durante a seromiotomia. Isto pode gerar uma reação inflamatória local maior, com espessamento da serosa, o que não apresenta uma explicação razoável para o fato, uma vez que o espessamento no segmento intestinal cranial é o segmento examinado que está longe da terceira válvula.

O que ocorreu foi uma adaptação nesta camada quando este segmento foi abaixado da cavidade abdominal para a pelve. Deve-se considerar que o tamanho da amostra pode ter influenciado, uma vez que a serosa não foi medida em todas as lâminas examinadas única e exclusivamente porque estavam parcialmente ausentes na maioria delas. A medida não seria real. Exatamente pela característica mais fina da parede intestinal deste segmento que foi mudado de ambiente, da cavidade abdominal para o espaço retrorretal, é que a dissecação, mesmo cuidadosa pode ter lesado esta camada. Além da dissecação, lembrar que o preparo do material pode contribuir para a ausência da mesma nas lâminas. É importante ressaltar que a

microscopia descritiva mostra no Grupo Amputado uma reação inflamatória inespecífica restrita à camada serosa, comprovando que a mesma se altera após a dissecação local.

### 6.2.3 Plexo Mientérico

A excisão do plexo mientérico elimina mais de 99% das fibras nervosas nas camadas musculares, o que sugere que as células musculares lisas do intestino recebem sua inervação quase exclusivamente do plexo mientérico<sup>64</sup>. Isto revela a importância do estudo da densidade do plexo no segmento submetido à seromiectomia.

A confecção das válvulas altera os elementos da parede intestinal e retarda a velocidade do trânsito intestinal e por consequência altera as forças mecânicas da musculatura o tempo de exposição do mesmo à mucosa. As situações clínicas ou experimentais, as mais diversas, de desnervação ou de outras formas de injúria no plexo mientérico revelam alteração da densidade neuronal<sup>65</sup>.

A confecção das válvulas gerou injúria no plexo mientérico restrita ao local da secção onde eles não são visibilizados respondendo o objetivo primordial da proposta vigente. A válvula cirúrgica é desnervada.

A preservação da estrutura e densidade dos elementos neurais nas regiões entre as válvulas reflete a qualidade da técnica proposta e confirma que a intensidade, o grau e o modo como a injúria acontece é que leva a diferentes respostas adaptativas. Apesar de existir o fenômeno neuroplástico que é a capacidade do neurônio adquirir adaptações morfológicas às injúrias, quando ocorre destruição a reinervação não acontece. No local onde foram confeccionadas as válvulas comprovou-se desnervação até o 40º pós-operatório. Até este dia não ocorreu reinervação. Provavelmente porque a secção foi total e teve uma resposta inflamatória crônica com substituição de tecido fibroso no local da injúria<sup>62, 32, 66, 67</sup>.

A análise comparativa quantitativa, entre os grupos, quanto ao aspecto da densidade dos elementos nervosos da parede intestinal no segmento caudal à terceira válvula com maiores valores das proporções no Grupo Simulado em comparação com o Grupo Amputado sustenta a influência que as alterações ambientais do meio intraluminal geram nos elementos nervosos.

No Grupo Amputado os ratos não foram submetidos a cirurgia proposta, a seromiectomia. Neste grupo o intestino abaixado se comportou como segmento de passagem rápida das fezes uma vez que perdeu o ânus e os esfíncteres e ficou com colostomia no períneo. Isso configura um quadro de alteração da velocidade de trânsito do conteúdo

intraluminal e a presença deste conteúdo alterado leva a mudanças importantes de resposta da mucosa com alterações nos plexos. Sabe-se que a muscular da mucosa tem posição estratégica na parede e sua contração ou relaxamento altera sua conformação, independentemente de outros movimentos intestinais e aumentam a exposição da mucosa ao conteúdo do lúmen. Os mecanismos envolvidos na propulsão parecem estar ligados à consistência dos conteúdos intestinais em cada região gastrointestinal de adultos. Em fetos humanos e crianças jovens, padrões motores intestinais podem não ser capazes de propelir conteúdos intestinais analmente se sua viscosidade é muito alta<sup>39</sup>. A diferença neste grupo é que o mesmo não foi submetido à construção das válvulas. Sem nenhum mecanismo controlador, o conteúdo passa rapidamente. Isso gerou diminuição da densidade neuronal dos elementos nervosos da parede intestinal e do plexo mientérico, que foi estatisticamente significativo. Houve descompensação intestinal traduzida pela desnervação tanto dos elementos nervosos da camada muscular circular como do plexo mientérico. Na literatura, postula-se que mudanças nas características físicoquímicas do conteúdo luminal levam à mudanças induzidas dos neuromediadores com respostas sensomotoras como observadas na Síndrome de Intestino Irritável pós-infecção e nas alterações persistentes no Sistema Nervoso Entérico de humanos e que podem ser parte responsável pelos sintomas observados<sup>68</sup>.

Já no Grupo Amputado com Válvula, o parâmetro densidade expresso como Produto Gênico Protéico positivo MI + Área plexo dividido pela Área total, com maiores valores para o Grupo Simulado, confirma que a válvula é desnervada de forma parcimoniosa e localizada. Isto ajuda a explicar que a válvula é desnervada decorrente da perda do plexo mientérico após a secção (seromiectomia) com provável repercussão no peristaltismo, que explica em parte porque a confecção da mesma retarda o tempo de trânsito do conteúdo intestinal.

Mais interessante registrar que nas proporções estudadas que revelaram a densidade dos elementos nervosos da camada muscular circular a desnervação não foi estatisticamente significativa. As alterações leves na espessura e no diâmetro do colo não foram suficientes para gerar uma alteração importante e clinicamente evidente na densidade neuronal. Pode-se especular que a presença da válvula alterou a velocidade de trânsito do conteúdo luminal, proporcionou maior contato deste com a parede intestinal, alterando provavelmente o estado físicoquímico do tecido local, restaurando o microambiente próximo do fisiológico, com resposta adaptativa dos elementos da parede intestinal.

A seromiectomia secciona as camadas musculares. Neste local da parede intestinal onde as válvulas foram confeccionadas é desnervado. A desnervação do plexo mientérico acarreta distúrbio do peristaltismo, da absorção, gera falta de coordenação motora e retenção

de fezes no reto e no colo sigmóide. Segundo a literatura a inflamação é o fator mais importante no processo da neurolise, e em diferentes extensões, determinará a gravidade das sequelas e o grau de adaptação clínica do animal<sup>69,70</sup>. É importante lembrar que a desnervação pode provavelmente comprometer a despolarização seja por alterar a população das Células Intersticiais de Cajal ou a neurotransmissão excitatória ou a inibição da neurotransmissão inibitória ou porque gera um padrão de dilatação que no segmento operado não é o suficiente para desencadear ou permitir o movimento propulsivo<sup>39</sup>. Talvez estas válvulas promovam um sistema que simule o fisiológico uma vez que cada válvula proporciona uma barreira mecânica formando segmentos colônicos intervalvulares sem dano celular e gerando um grau de distensão, que por si só pode desencadear atividade neural nos segmentos intervalvulares que auxiliam na eliminação do conteúdo fecal mediante uma prensa abdominal ou após estímulo externo de irrigação.

A avaliação comparativa quantitativa da densidade dos elementos nervosos da parede intestinal, entre os grupos, na região cranial à terceira válvula, é mais um dado que confirma que a válvula é um procedimento que não gera repercussões negativas no segmento a montante do segmento operado. Ela preserva as estruturas da parede intestinal. Diversos autores têm relatado uma maior densidade de neurônios mioentéricos em áreas onde as camadas de músculo liso são mais espessas<sup>71,72</sup>. A alteração da espessura nos segmentos examinados não foi expressiva e isto pode ajudar a explicar o fato da densidade dos elementos neurais do intestino ter o mesmo comportamento.

Não ocorreu desnervação na totalidade do segmento modificado pelas válvulas, apenas perda de neurônios do plexo mientérico (despopulação de células ganglionares) e desnervação intramuscular no local da secção. A válvula não destrói como um todo o Sistema Nervoso Entérico no segmento operado, mas o torna inoperante localmente, alteração esta que não foi suficiente para gerar obstrução, não levou a espessamento muscular e gerou graus diferentes de dilatação autolimitada. Quando a destruição neuronal do plexo mientérico atinge certa proporção, a atividade motora inteira do órgão desorganiza-se, e um nível mais avançado de doença aparece (por exemplo, o megacolo)<sup>73</sup>. Por isto, a confecção das válvulas no colo de ratos não acarretou disfunção e nem alterações microscópicas e macroscópicas importantes de distensão e hipertrofia e densidade, provavelmente porque o grau de desorganização que ela acarreta é sutil e não ocorre a formação de uma “doença” como, por exemplo, uma obstrução intestinal.

A válvula é desnervada, cria um segmento de armazenamento, não altera a espessura da parede intestinal, altera de forma sutil a densidade (plexo mientérico) no segmento caudal

sem alterar o segmento cranial e a dilatação é autolimitada. É notório que o modo de confeccionar a válvula modifica os elementos envolvidos nos fenômenos adaptativos. A quantidade de mucosa invaginada na luz intestinal leva a diferentes graus de dilatação e diferentes respostas fisiológicas, as quais por sua vez podem determinar alterações diferentes da densidade que podem ser clinicamente reproduzidas na alteração de motilidade.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que as válvulas intestinais por seromiotomias circunferenciais não são fatores de interferência negativa na adaptação intestinal após ressecção. Ao contrário parecem ser parte do processo adaptativo que altera parcialmente a função peristáltica e permite um retardo mecânico garantindo o restauro do padrão funcional próximo ao fisiológico

A tradução dos achados da ciência básica e experimental para a aplicação e acompanhamento clínico de pacientes com distúrbios da evacuação motivaram o desenvolvimento deste modelo aqui estudado, que a despeito de toda a complexidade dos elementos envolvidos permite compreender alguns aspectos importantes da estrutura morfológica da parede intestinal e do plexo mientérico e sua correlação com os aspectos clínicos tanto experimentalmente quanto em nossos pacientes.

### **6.3 Perspectivas**

A cirurgia para doenças colorretais pode ser danosa para o sistema nervoso autônomo e entérico. Este é um ponto importante para cirurgiões, mas pouco se sabe sobre o mecanismo de injúrias nervosas que induzem alterações na motilidade colorretal após as operações. O distúrbio de motilidade pós-operatória é um fator importante que altera o transporte do conteúdo intestinal e pode ser responsável por desordens defecatórias após ressecção do reto em humanos<sup>74</sup>.

A válvula por mais destrutiva que for não consegue impedir o funcionamento de todos os mecanismos de motilidade. Provavelmente torna-os menos efetivos e descoordenados, por isto não é obstrutiva e sim contendora. Estudo da densidade, morfologia e identificação das Células Intersticiais de Cajal, neste modelo, merecem ser planejados uma vez que sua implicação pode ser hipotetizada, na ausência de grandes alterações estruturais do plexo mientérico.

A presença da válvula retarda o tempo de trânsito do conteúdo intestinal e aumenta o tempo de contato dos nutrientes com a mucosa, decorrente da estase e dilatação que ela provoca<sup>26</sup>. Isto pode até possibilitar um aumento da absorção de água, entre outras alterações

locais, uma vez que o contato direto da mucosa com nutrientes no lúmen e hormônios afetam a proliferação de células, e os autores relatam que a forma vilosa do intestino humano parece depender da dieta<sup>75</sup>. O aumento da espessura da mucosa parece ocorrer também em doenças inflamatórias da parede intestinal na espécie humana e já foi descrito no megacolo chagásico<sup>57</sup>, na doença de Crohn e na colite ulcerativa<sup>39,44</sup>. É preciso avaliar o real benefício do estudo da mucosa neste modelo.

É preciso aprofundar os estudos no segmento operado, através da investigação do comportamento das outras células (não imunes) no tubo gastrointestinal. Essas também estão envolvidas no complexo funcionamento entre mediadores inflamatórios e células residentes e infiltradoras que ocorrem durante a inflamação intestinal. Células enteroendócrinas, células do músculo liso e Células Intersticiais de Cajal são mais do que meros coadjuvantes na inflamação, como destacado por estudos recentes que demonstram sua função quando sinalizam suas contribuições para homeostasia e disfunção gastrointestinal<sup>30,44</sup>.

Este é um tempo de progresso notável que tem se desenvolvido no entendimento da biologia básica do Sistema Nervoso Entérico. Há investigadores empenhados disponíveis e há necessidade clínica substancial, para investigar a fisiopatologia, marcadores diagnósticos e novas terapias para as doenças funcionais do intestino<sup>28</sup>. Um caminho possível é o esforço combinado bem coordenado, entre clínicos, neurocientistas, governo e indústria que provavelmente levará à avanços que serão importantes para a saúde e a qualidade de vida dos nossos pacientes. Da compreensão do complexo funcionamento dos elementos do Sistema Nervoso Entérico nascerão terapêuticas e propostas de reabilitação não sintomáticas, e sim embasadas e sedimentadas na etiopatogenia das doenças.

No caso desta técnica, todo progresso de investigação facilitará a compreensão do seu funcionamento e o seu aprimoramento, para uma aplicação clínica mais eficaz. É técnica de fácil execução e tem importante potencial de aplicação clínica.

## 7 CONCLUSÃO

---

“Eu, Coelet, fui rei de Israel em Jerusalém.  
Eu resolvi pesquisar e investigar  
com sabedoria tudo o que  
acontece debaixo do sol.  
Essa é uma tarefa penosa que  
Deus entregou aos homens,  
para com ela ficarem ocupados.”

*Eclesiastes, 1: 12–13.*

O estudo morfológico e imunohistoquímico das válvulas confeccionadas no colo esquerdo de ratos submetidos à amputação abdominoperineal e colostomia perineal mostra uma desnervação no local da sermiotomia que contribui para o retardo do fluxo intestinal e a preservação dos elementos musculares e de tecido conjuntivo da parede intestinal e elementos nervosos nos locais interválvulas.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

---

“Quando você descobre algo de novo,  
todos dizem que não é verdade.  
Quando você prova que é verdade,  
todos dizem que não é importante.  
Quando você prova que é importante,  
todos dizem que não é novo

*M E Montaigne*

---

\* Vancouver

1. Degni M. Estudo anatomocirúrgico das artérias do colo sigmoide e do segmento retossigmoideo (Tese). Porto Alegre: Faculdade de Medicina da Universidade de Porto Alegre, 1947.
2. Miles WE. A method of performing abdomino-perineal excision for carcinoma of the rectum and of the terminal portion of the pelvic colon. *Lancet* 1908; 2: 1812-13.
3. Niccholls RJ, Ritchie J, Wasworth J, Parks AG. Total excision or restorative resection for carcinoma of the middle third of the rectum. *Br J Surg* 1979; 66:625-7.
4. Williams NS. The rationale for the preservation of the anal sphincter in patients with low rectal cancer. *Br J Surg* 1984; 71: 575-81.
5. Lavery IC, Lopez-Kostner F, Fazio VW, Fernandez-Martin M, Mikom JW, Church JM. Chances of cure are not compromised with sphincter-saving procedures for cancer of the lower third of the rectum. *Surg* 1997; 122: 779-85.
6. Habr-Gama A, De Souza PM, Rebeiro U Jr, Nadalin W, Gansl R, Souza Jr AHS. Low rectal cancer: impact of radiation and chemotherapy on surgical treatment. *Dis Colon Rectum* 1998; 41:1087-96.
7. Heald RJ, Husband EM, Ryall RDH. The mesorectum in rectal cancer surgery – the clue to pelvic recurrence? *Brit J Surg* 1982; 69:613-6.
8. Grinnell RS. Distal intramural spread of carcinoma of the rectum and rectosigmoid. *Surg Gynecol Obstet* 1954; 99:421-4.
9. Quer EA, Dahlin DC, Mayo CW. Retrograde intramural spread of carcinoma of the rectum and rectosigmoid. *Surg Gynecol Obstet* 1953; 96:24.
10. Williams NS, Dixon MF, Johnston D. Reappraisal of the 5 centimetre rule of distal excision for carcinoma of the rectum: a study of distal intramural spread and of patients survival. *Br J Surg* 1983; 70:150.
11. Heald RJ, Smedh RK, Kald A, Sexton R, Moran BJ. Abdominoperineal excision of the rectum – an endangered operation. *Dis Colon Rectum*, 1997; 40(7):747-51.
12. Fernandes RM, Miguir ELB, Donoso TV. Perfil da clientela estomizada residente no município de Ponte Nova, Minas Gerais. *Rev Bras Coloproct* 2011; 30(4):385-92.
13. Meirelles CA, Ferraz CA. Avaliação da qualidade do processo de demarcação do estoma intestinal e das intercorrências tardias em pacientes ostomizados. *Rev Latino-Am Enferm* 2001; 9(5):32-8.
14. Lázaro da Silva, A. Tratamento do câncer reto-anal. Colostomia perineal. São Paulo: Atheneu; 1998. p.1-206.

15. Lázaro da Silva A. Tentativa de tratamento do “Dumping” através de um “esfincter” ileal. *Rev Assoc Med Minas Gerais* 1974; 25(1):32-33.
16. Lázaro da Silva A. Amputação abdominoperineal com colostomia perineal. *Rev Bras Coloproct* 1991; 11(3):105-8.
17. Lázaro da Silva A. Amputacion Abdominoperineal com colostomia perineal. *Pren Med Argent* 1993; 82:800-04.
18. Lázaro da Silva A. Abdominoperineal excision of the rectum and anal canal with perineal colostomy. *Eur J Surg* 1995; 161:761-64.
19. Lázaro da Silva A. Amputação abdominoperineal com colostomia perineal. *Dia a Dia Gastroenterol* 1997; 2(3): 22-3.
20. Gurusamy KS, Marzouk D, H. Benziger. A review of contemporary surgical alternatives to permanent colostomy *International Journal of Surgery* 2005; 3:193-205.
21. Sato T, Konishi F, Ueda K, Kashivagi H, Kanazawa K, Nagai H. Physiological anorectal reconstruction with pudendal nerve anastomosis and a colonic S-pouch after abdominoperineal resection: report of 2 successful cases. *Surg* 2000; 128(1):116-120.
22. Goldsmith HS. Fecal control following pyloric valve transposition after abdominoperineal resection. *Tech Coloproctol* 2003; 7:95–101.
23. Altomare D F, Rinaldi M, Martinelli E, Veglia A, Sallustio P. Perineal colostomy following Miles procedure: from reconstructive surgery to the artificial anal sphincter. *Osp Ital Chir* 2000; 6(6):572-77.
24. Silva Junior AL, Lázaro da Silva A, Castro LPF. Histopatologia da sermiotomia dupla e sutura seromuscular no cólon descendente de ratos. *Rev Col Bras Cir* 1999; 26(6):367-73.
25. Veloso SG, Biet R, Rios MA. Leite VHR, Lázaro da Silva A. Eficácia da confecção de válvulas colônicas após ressecção retoanal em ratos. *Rev Col Bras Cir* 2001; 28(5):356-63.
26. Deoti B. Avaliação radiográfica do cólon esquerdo de ratos após confecção de válvulas continentais para retardo do trânsito intestinal. (Tese) Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da UFMG; 2004
27. Siqueira SL, Lázaro da Silva A, Reis OAF, Fantauzzi RS, Silva Jr. OM, Sales PGO. Estudo de válvulas artificiais no cólon esquerdo após amputação abdominoperineal parcial do reto mais colostomia perineal, em cães. *Arq Gastroenterol* 2006; 43(2):125-31.
28. Hansen MB (2003 b). The Enteric Nervous System II: Gastrointestinal Functions *Pharmacology & Toxicology* 2003b; 92, 249–57.

29. Furness JB, Costa M. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neurosci* 1980; 5:1-20.
30. Marvin-Guy L, Lopes LV, Affolter M, Courtet-Compondu MC, Wagnière S, Bergonzelli GE, Fay LB, Kussmann M. Proteomics of the rat gut: Analysis of the myenteric plexus-longitudinal muscle preparation. *Proteomics* 2005; 5:2561-69.
31. Hansen MB. The Enteric Nervous System I: Organization and Classification *Pharmacology & Toxicology* 2003a; 92:105-13.
32. Buttow NC, Santin M, Macedo LC, Teixeira ACN, Novakowski GS, Armelin TRB, Assmann K. Study of the myenteric and submucous plexuses after BAC treatment in the intestine of rats. *Biocell* 2004; 28(2):135-42.
33. Batista FA, Zucoloto S, Alessi AC, Souza AI, Nogueira E, Valadão CAA. Histomorfometria dos neurônios do plexo mioentérico do colon descendente de equinos expostos ao cloreto de benzalcônio. *ARS Veterin* 2005; 21(Suppl): 193-98.
34. Hanani M; Ledder O; Yutikin V; Abu-Dalu R; Huang TY; Hartig W, Vannucchi MG, Faussone-Pelegrini MS. Regeneration of myenteric plexus in the mouse colon after experimental denervation with benzalkonium chloride. *J. Comp. Neurol.*, 2003; 462 (3):315-327.
35. Sternini C. Structural and chemical organization of the myenteric plexus. *Ann Rev Physiol* 1988; 50:81-93.
36. Gabella G. On the ultrastructure of the enteric nerve ganglia. *Scand J Gastroenterol* 1982; 71(Suppl.):15-25.
37. Furness JB. The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroenterol. Motil* 1987; 20:32-8.
38. Arantes RME, Nogueira AMMF. Distribution of enteroglucagon and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. *Cell and Tissue Research (Print)*, Alemanha. 1997; 290:61.
39. Burns AJ, Roberts RR, Bornstein JC, Young HM. Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and early postnatal stages. *Semin Pediatr Surg* 2009; 18:196-205.
40. Karaosmanoglu T, Aygun B, Wade PR, Gershon MD. Regional differences in the number of neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine and colon: an evaluation of markers used to count neurons. *Anat Rec* 1996; 244: 470-80.
41. Furness JB, Costa M. The enteric nervous system. Edinburg. Churchill Livingstone 1987; 287p.

42. Costa M, Furness JB. Neuronal peptides in the intestine. *Brit Med Bull* 1982; 38(3):247-52.
43. Carvalho GD, Masseno APB, Zanini MS, Zanini SF, Porfírio LC, Machado JP, Mauad H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. *Rev Ceres* 2009; 56(1): 51-7.
44. Lomax AE, Fernandez E, Sharkey KA. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol. Motil.* 2005; 17: 4-15.
45. Gabella G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J Anat* 1971; 109(1):81-95.
46. Huizinga JD, Lammers WJEP. Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G1–G8.
47. Gabella G. Hypertrophy of intestinal smooth muscle. *Cell Tissue Res* 1975; 163(2):199-214.
48. Fernandes MIM, Zucoloto S, Collares EF, Ferriolli Filho F. Morphometric investigations of the colon mucosa in chronic *Trypanosoma cruzi* infected rats. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1991; 60:119-22.
49. Ben-Horin S, Chowers Y. Neuroimmunology of the gut: physiology, pathology and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8:490-95.
50. Furtado MCV, Lázaro da Silva A, Rena CL, Barra AA, Rossman FMC. Influência de válvulas artificiais sobre a morfometria intestinal de ratos. *Rev Col Bras Cir* 2008; 35(5):315-22.
51. Rena CL, Lázaro da Silva A, Barra AA, Furtado MCV, Rena RL, Rena RL. Alterações morfométricas da musculatura dos músculos longitudinal e circular de ratos submetidos à criação de piloros no intestino delgado. *Rev Col Bras Cir* 2007; 34(1):41-7.
52. Nygaard K. Resection of the small intestine in rats. III. Morphological changes in the intestinal tract. *Acta Chir Scand* 1967; 133(3):233-48.
53. Cassidy MM, Lightfoot FG, Grau LE, Story JA, Kritchevsky D, Vahouny V. Effect of chronic intake of dietary fibers on the ultrastructural topography of rat jejunum and colon: a scanning electron microscopy study. *Am J Clin Nutr* 1981 34:218-28.
54. Goerg KJ, Specht W, Nell G, Rummel, Schulz L. Effect of Deoxycholate on the perfused rat colon. Scanning and transmission electron microscopic study of the morphological alterations occurring during the secretagogue action of deoxycholate. *Digest* 1982; 25(3):145-54.

55. Wood JD. Application of classification schemes to the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 1994; 48:17-29.
56. Ekblad E, Bauer AJ. Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16(1 Suppl):123-28.
57. Gobbi H. Estudo morfológico e morfométrico dos gânglios submucosos e das camadas musculares e avaliação da atividade da acetilcolinesterase do cólon do rato com hipertrofia secundária a estenose cirúrgica experimental. (Tese) Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 1995.
58. Gabella G. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. *Gastroenterol* 1989; 96:1487-93.
59. Vinter-Jensen L, Juhl CO, Dajani EZ, Niesen K, Djurhuus JC. Chronic systemic treatment with epidermal growth factor induces smooth muscle cell hyperplasia and hypertrophy in the urinary tract of mature Goettingen minipigs. *Br J Uro* 1997; 79: 532-38.
60. Earlam RJ. Ganglion cell changes in experimental stenosis of the gut. *Gut* 1971; 12:393-98.
61. Barbosa AJA, Tafuri WL. Ganglion cell number in hypertrophic colon above experimental stenosis. *Braz J Med Biol Res* 1983; 16:165-69.
62. Gabella G. Hypertrophy of visceral smooth muscle. *Anat Embryol* 1990; 182:409-424.
63. França WMG. Avaliação histológica e imunohistoquímica da maturidade dos plexos mioentéricos na gastrosquise experimental de ratos realizada em duas diferentes idades gestacionais. (Tese) Campinas: Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Campinas; 2006.
64. Makhlof GM. Neural and hormonal regulation of function in the gut. *Hosp Pract* 1990; 2:79-98.
65. Araújo EJA, Sant'Ana DMG, Molinari SL, Miranda Neto MH. Effect of protein and vitamin B deficiency on the morphoquantitative aspects of the myenteric plexus of the descending colon of adult rats. *Arq Neuropsiquiatr* 2003; 61(2-A):226-33.
66. Belkind-Gerson J, Graeme-Cook F, Winter H. Enteric Nervous System Disease and Recovery, Plasticity and Regeneration. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42, 343-50.
67. Grundy D, Schemann M. Enteric nervous system. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22:102-10.
68. Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil* 2004, 16(1 Suppl):55-9.

69. Tafuri WL, Maria TA, Lopes ER. Lesões do plexo mientérico do esôfago, do jejuno e do cólon de chagásicos crônicos. Estudo ao microscópio eletrônico. *Rev Inst Med Trop* 1971; 13:76-91.
70. Debas HT, Mulvihill SJ. Neuroendocrine design of the gut. *Am J Surg* 1991; 161:243-249.
71. Saffrey MJ, Burnstock G. Growth factors and the development and plasticity of the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 1994; 49:183-96.
72. Fregonesi CEPT, Molinari SL, Miranda Neto MH. Avaliação da população de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos do corpo do estômago de ratos com diabetes crônico induzido pela estreptozotocina. *Acta Scientiarum Biological Scienc* 2004; 26(1):107-12.
73. Maifrino LBM, Liberti EA, Watanabe SII, Souza RR. Morphometry and acetylcholinesterase activity of the myenteric neurons of the mouse colon in the chronic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60(5):721-25.
74. Iizuka I, Koda K, Seike K, Shimizu K, Takami Y, Fukuda H, Tsuchida D, Oda K, Takiguchi N, Miyazaki M. Defecatory malfunction caused by motility disorder of the neorectum after anterior resection for rectal cancer. *Am J Surg* 2004; 188:176-80.
75. Mello EVSL, Stabile SR, Miranda Neto MH. Effect of maternal protein deprivation on morphological and quantitative aspects of the myenteric plexus neurons of proximal colon in rats. *Arq Neuropsiquiatr* 1995; 55:106-13.

## APÊNDICE A

### Número de Pontos por Válvula e Abertura da Mucosa

**TABELA 4**

Variáveis número de pontos por válvula e abertura da mucosa no GACV

Variável	N RATOS	N PONTOS	%	$\bar{X} \pm s$	P valor
Número de pontos confeccionados na V1	13	4	54,2	4,46 ± 0,509	0,813
	11	5	45,8		
Número de pontos confeccionados na V2	18	4	75	4,25 ± 0,442	0,999
	6	5	25		
Número de pontos confeccionados na V3	11	4	45,8	4,67 ± 0,702	0,497
	10	5	41,7		
	3	6	12,5		

Legenda: GACV = Grupo Amputado com Válvula; N= número; % = porcentagem;  $\bar{X}$  = média; s= desvio padrão; nível de significância= 0,20 (Análise Univariada - Regressão Logística); V1 = 1ª válvula; V2 = 2ª válvula; V3 = 3ª válvula

**TABELA 5**

Abertura da mucosa por válvula nos ratos do GACV

Abertura da Mucosa	N Ratos	N Abertura	p valor
V1	2	2	0,634
V2	zero	zero	
V3	8	10	

Legenda: GACV = Grupo Amputado com Válvula; N ratos = número de animais; N abertura = número de abertura da mucosa por válvula; V1 = 1ª válvula; V2 = 2ª válvula; V3 = 3ª válvula

**TABELA 6**

Influência das variáveis número de pontos por válvula e abertura da mucosa no óbito dos animais

Variável	p Valor
Número de pontos confeccionados V1	0,813
Número de pontos confeccionados V2	0,999
Número de pontos confeccionados V3	0,497
Abertura da Mucosa	0,634

Nível de significância = 0,20 (Análise Univariada - Regressão logística); V1 = 1ª válvula; V2 = 2ª válvula; V3 = 3ª válvula

## APÊNDICE B

### Espessura Caudal

**TABELA 7**

Análise da espessura da camada muscular dos grupos GS, GA, GACV, do segmento intestinal caudal

Camada	Grupo	N	I	M	$\bar{X} \pm s$	Mi	IC	EPM	p valor
MI	GS	4	18	90	33,81 ± 13,02	31,29	13,08 - 54,54	6,51	0,340
	GA	6	29	144	32,53 ± 9,60	33,34	22,46 - 42,61	3,92	
	GACV	7	30	150	27,00 ± 7,63	28,12	19,94 - 34,06	2,88	
ME	GS	4	18	90	12,31 ± 3,23	12,12	7,16 - 17,46	1,61	0,089
	GA	6	29	144	11,30 ± 2,24	10,67	8,95 - 13,66	0,91	
	GACV	7	30	125	17,04 ± 5,52	15,3	11,92 - 22,15	2,08	
MT	GS	4	18	90	46,12 ± 14,63	45,35	22,83 - 69,41	7,31	0,767
	GA	6	29	144	43,83 ± 11,48	45,54	31,79 - 55,89	4,68	
	GACV	7	30	135	50,82 ± 15,53	45,46	36,46 - 65,19	5,87	
SE	GS	4	14	75	8,18 ± 2,29	8,73	4,54 - 11,83	1,04	0,316
	GA	5	15	30	10,39 ± 4,67	11,55	4,57 - 16,20	2,09	
	GACV	6	17	85	15,94 ± 8,93	16,53	6,56 - 25,32	3,64	

Teste estatístico: Kruskal-Wallis

p valor < ou = 0,05

Legenda: MI = camada muscular circular; ME = camada muscular longitudinal; MT = camada muscular total; SE = camada serosa; N = número de ratos; I = número de imagens; M = número de medidas;  $\bar{X}$  = média; s = desvio padrão; Mi = mediana; IC = intervalo de confiança; EPM = erro padrão da média; GS = Grupo Simulado; GA = Grupo Amputado; GACV = Grupo Amputado com Válvula

## Espessura Cranial

TABELA 8

Análise da espessura da camada muscular dos grupos GS, GA, GACV, do segmento intestinal cranial

Camada	Grupo	N	I	M	$\bar{X} \pm s$	Mi	IC	EPM	p valor
MI	GS	5	26	130	12,42 $\pm$ 5,02	14,16	6,19 - 18,66	2,24	0,241
	GA	5	25	120	8,41 $\pm$ 3,02	9,51	4,64 - 12,17	1,35	
	GACV	7	35	165	12,17 $\pm$ 4,56	12,48	7,95 - 16,39	1,72	
ME	GS	5	26	129	3,17 $\pm$ 1,34	3,35	1,50 - 4,85	0,6	0,079
	GA	5	25	120	2,08 $\pm$ 0,62	2,17	1,30 - 2,86	0,28	
	GACV	7	35	165	4,12 $\pm$ 1,64	4,09	2,59 - 5,64	0,62	
MT	GS	5	26	129	15,60 $\pm$ 6,33	17,51	7,73 - 23,46	2,83	0,199
	GA	5	25	120	10,49 $\pm$ 3,64	11,77	5,96 - 15,02	1,63	
	GACV	7	35	165	16,29 $\pm$ 6,12	16,57	10,63 - 21,95	2,31	
SE	GS	4	11	55	1,65 $\pm$ 0,50	1,41	0,85 - 2,45	0,25	<b>0,024</b>
	GA	2	6	30	2,24 $\pm$ 1,86	2,24	14,49 - 18,99	1,31	
	GACV	5	16	80	7,75 $\pm$ 2,23	8,15	4,98 - 10,52	0,99	

Teste Estatístico: Kruskal-Wallis

p valor &lt; ou = 0,05

Legenda: GS = Grupo Simulado; GA = Grupo Amputado; GACV = Grupo Amputado com Válvula; N = número de ratos; I = número de imagens; M = número de medidas;  $\bar{X}$  = média; s = desvio padrão; Mi = mediana; IC = intervalo de confiança; EPM= erro padrão da média; MI = camada muscular circular; ME = camada muscular longitudinal; MT = camada muscular total; SE = camada serosa

TABELA 9

Análise estatística comparativa entre grupos dois a dois das médias das medidas da camada serosa

Camada	Grupo	p valor
SE	GS X GA	1,000
	GS X GACV	0,014
	GA X GACV	0,053

Teste de Mann-Whitney. Nível de significância= correção de Bonferroni = 0,05/3 = 0,0167. Legenda: SE = serosa; GS = Grupo Simulado; GA = Grupo Amputado; GACV = Grupo Amputado com Válvula

## APÊNDICE C

### Produto Gênico Proteico Cranial

**TABELA 10**

Análise do PGP no segmento intestinal **cranial** nos grupos GS, GA, GACV

Relação - Proporção	Grupo	N	I	M	$\bar{X} \pm s$	Mi	IC	EPM	p valor
Área Plexo/ Comprimento	GS	6	32	171	1,79 ± 0,97	1,83	0,775 - 2,823	0,3982	0,622
	GA	5	25	250	1,17 ± 1,362	1,164	0,521 - 2,863	0,6095	
	GACV	7	37	370	1,595 ± 0,745	1,619	0,906 - 2,284	0,2816	
PGP pos MI / Area MI	GS	6	32	171	0,013 ± 0,003	0,014	0,009 - 0,017	0,0015	0,471
	GA	5	25	250	0,012 ± 0,006	0,014	0,004 - 0,020	0,0029	
	GACV	7	37	370	0,011 ± 0,002	0,011	0,009 - 0,013	0,0008	
PGP pos MI / Area Total	GS	6	32	171	0,013 ± 0,003	0,014	0,009 - 0,017	0,0015	0,471
	GA	5	25	250	0,011 ± 0,006	0,013	0,003 - 0,019	0,0028	
	GACV	7	37	370	0,011 ± 0,002	0,011	0,009 - 0,013	0,0008	
PGP pos MI Área plexo / Área total	GS	6	32	171	0,036 ± 0,008	0,032	0,027 - 0,045	0,0034	0,310
	GA	5	25	250	0,043 ± 0,009	0,043	0,030 - 0,055	0,0044	
	GACV	7	37	370	0,034 ± 0,007	0,034	0,027 - 0,041	0,0027	

Teste estatístico: kruskal Wallis

p valor < ou = 0,05

Legenda: PGP = Proteine Gene Peptide; GS = Grupo Simulado; GA = Grupo Amputado; GACV = Grupo Amputado com Válvula; N = número de ratos; I = número de imagens; M = número de medidas;  $\bar{X}$  = média das médias; s = desvio padrão; Mi = mediana; IC = intervalo de confiança; EPM = erro padrão da média; Pos = positivo.

## APÊNDICE D

### Tricrômico de Gomori – Caudal

**TABELA 11**

Análise do TG no segmento intestinal **caudal** nos grupos GS, GA, GACV

<b>Coloração</b>	<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>I</b>	<b>M</b>	<b><math>\bar{X} \pm s</math></b>	<b>Mi</b>	<b>IC</b>	<b>EPM</b>	<b>p valor</b>
	GS	5	21	63	0,132 ± 0,082	0,137	0,030 - 0,234	0,0367	
TG caudal	GA	6	29	87	0,309 ± 0,153	0,323	0,148 - 0,470	0,0626	0,096
	GACV	4	26	78	0,206 ± 0,122	0,162	0,012 - 0,400	0,061	

Teste estatístico: Kruskal Wallis

p valor < ou = 0,05

Legenda: TG = tricrômico de Gomori; GS = Grupo Simulado; GA = Grupo Amputado; GACV = Grupo Amputado com Válvula; N = número de ratos; I = número de imagens; M = número de medida;  $\bar{X}$  = média das médias; s = desvio padrão; Mi = mediana; IC = intervalo de confiança; EPM= erro padrão da media.

## APÊNDICE E



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 125/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Morfologia e imunohistoquímica das válvulas confeccionadas no cólon de ratos submetidos à colostomia perineal**", que tem como responsável(is) **Alcino Lázaro da Silva**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **22/ 06/2011**.

Este certificado expira-se em **22/ 06/ 2016**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 125/2011**, related to the project entitled "**Morphology and histochemistry of the valve made up on the rat colon submitted to perineal colostomy**", under the supervisors of **Alcino Lázaro da Silva**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **June 22, 2011**.

This certificate expires in **June 22, 2016**.

Belo Horizonte, 27 de Junho de 2011.

**Prof<sup>a</sup>. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
**Coordenadora do CETEA/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA)**

PROTOCOLO Nº

**PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO**

Use a tecla TAB, o MOUSE ou as SETAS do teclado para selecionar o campo a ser preenchido. A tecla de ESPAÇO pode ser usada para marcar com "X" as opções. Se o item do formulário não se aplicar ao projeto, informe com NSA (não se aplica). Para a sua segurança, mantenha na sua pasta de documentos uma cópia do formulário preenchido.

**1. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO**

**TÍTULO:**

- Em português: - *Morfologia e imunohistoquímica das células confeccionadas no colón de ratos submetidos a colostomia perineal*
- Em Inglês: - *Morphology and immunohistochemistry of serotonergic manufactured at rat colon subject to perineal colostomy*

**Finalidade:** - Ensino - Pesquisa - Treinamento  
(Projetos de ensino devem ser renovados a cada dois anos)

**Previsão para a execução:** Início *01/02/2006* Término: *01/06/2008*

**Responsável:** *ALCINO LAZARO DA SILVA*

(Quando se tratar de projeto de pesquisa de alunos dos cursos de pós-graduação, o responsável é o professor orientador)

**Qualificação:** *Prof. Emérito de UFMG*

**Instituição:** *UFMG*

**Unidade:** *Medicina*

**Departamento:** *Cirurgia*

**Endereço p/ contato:** (Se for o de uma Unidade da UFMG, informe apenas telefone e e-mail)

Rua/Av.: Nº *R. PATAGÔNIA, 66/203*

Bairro *SIOM*- Cep: *30320-080*- Cidade: *BH* /UF: *MG*

Telefone: *(31) 3235 2682*- FAX: *(31) 3222 1051*



E-mail: *laredesino@bol.com.br*

**APROVADO PELA CÂMARA DEPARTAMENTAL**  
Em: *03/01/2008*  
*Prof. Marcelo Eller Miranda*  
Inscrição 094587  
Chefe do Departamento de Cirurgia  
Faculdade de Medicina - UFMG

**Colaboradores e titulação:**

*Aline Carvalho Dinale; graduanda da Faculdade de Medicina (UFMG)*  
*Aline de Lima Andrade Ferreira; graduanda da Faculdade de Medicina (UFMG)*

(Se for necessário, acrescente no último campo outros colaboradores, com a respectiva titulação, separados por ponto-e-vírgula)

	<p align="center"><b>FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG</b> <b>DEPARTAMENTO DE CIRURGIA</b></p> <p align="center">Av. Prof. Alfredo Balena 190 - 4º andar Caixa postal 340 - cep 30130-100 31-3248-9759 e 3248-9760(telefax)</p>	
---	---	---

**PARECER**

**TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA**

**MORFOLOGIA E IMUNOHISTOQUÍMICA DAS VÁVULAS  
CONFECCIONADAS NO COLON DE RATOS SUBMETIDOS À COLOSTOMIA  
PERINEAL.**

**PESQUISADOR**

**Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva**  
**Professor Emérito da Faculdade de Medicina da UFMG**

**COLABORADORES**

Aline Carvalho Dinali  
Aline de Lima Andrade Ferreira  
Graduandas da Faculdade de Medicina da Ufmg

**INSTITUIÇÃO**

Departamento de Cirurgia – Faculdade de Medicina da UFMG

**HISTÓRICO**

Desde 1907, quando Miles propôs a amputação abdomino-perineal, os pacientes sobrevivem mantendo colostomia terminal abdominal. Com o intuito de evitar a colostomia abdominal, a exemplo de outros autores surgiram propostas para a realização de colostomia perineal. Trata-se da realização de incisões na serosa e camada muscular (sériomiotomia extramucosa), acima do estroma esteriorizado no períneo, local onde se fez a amputação e que se sabe não consegue obviamente preservar o conjunto esfcteriano.

Em nosso meio, vários trabalhos foram realizados pelo Prof. Alcino, estudando a possibilidade de se manter colostomia perineal com razoável função de contenção fecal.

**MÉRITO**

Esta pesquisa faz parte de uma série de estudos já realizados visando estudar a função e as alterações histopatológicas deste segmento colônico modificado e se propõe agora estudar as alterações da morfologia e imunohistoquímica destas válvulas confeccionadas. O estudo será realizado em ratos dentro do mesmo protocolo já aprovado por esta câmara para experimentos anteriores.

**CONCLUSÃO**

O projeto é bom, no entanto faltam quais marcadores que serão utilizados, o laboratório que fará o exame de imunohistoquímica, assim como a fonte financiadora.

Favor providenciar e incluir estes dados para reavaliação e parecer final.

Belo Horizonte, 02 de abril de 2008.

***Parecer aprovado pela Câmara Departamental em 02/04/2008***

  
Prof. Walter Antônio Pereira  
Inscrição: 077925  
Chefe Departamento de Cirurgia - FMUFMG

Dra. Bertha Davila  
COLETOLOGIA  
CRM-MG 28602

## 9 APÊNDICE

### 9.1 Resultado Cirúrgico

#### 9.1.1 Pré, trans e pós-operatório

No **pré-operatório**, os animais do Grupo Simulado e Grupo Amputado evoluíram sem intercorrências. No Grupo Amputado com Válvula um rato anestesiado morreu antes de ir para a mesa operatória imediatamente após o término da depilação abdominal.

No **transoperatório**, os animais do Grupo Simulado e Grupo Amputado não apresentaram nenhuma intercorrência. Os ratos evoluíram bem no pós-operatório até o dia da eutanásia. A abertura da mucosa, ou seja, da luz intestinal, durante a seromiotomia, ocorreu em 10 ratos, num total de 12 perfurações. Destas, dez perfurações foram na terceira válvula, todas puntiformes e em um único ponto. Em dois ratos a abertura da mucosa foi na terceira e na primeira válvula. A abertura da mucosa ocorreu em apenas um rato que morreu.

No **pós-operatório** dez (41,6%) animais do Grupo Amputado com Válvula apresentaram infecção do músculo da coxa esquerda no local da anestesia, todos operados no mesmo dia. Um rato apresentou deiscência da sutura da colostomia na parte inferior, próximo da cauda. Foi tratada com Rifocina<sup>R</sup> Spray, de 12h/12h, até a melhora clínica dos sinais flogísticos (Tabela 12).

**TABELA 12**

Complicações trans e pós-operatórias dos animais no  
GS, GA, GACV

<b>Complicação</b>	<b>Nº de ratos</b>
Abertura puntiforme da mucosa	10
Abscesso encapsulado	1
Aderências abdominais	4
Deiscência de sutura da cauda	1
Hérnia Incisional	1
Lesão testicular	1
Infecção de músculo - coxa esquerda	10
Prolapso da colostomia	30
Mortes	6

GS = Grupo Simulado; GA = Grupo Amputado; GACV = Grupo Amputado com Válvula

### 9.1.2 Peso

Para análise do peso dos animais foi feita uma estatística descritiva do peso pré-operatório em que a mediana foi igual nos três grupos. Aplicando o teste de Kruskal-Wallis o “p” valor não apresentou diferença estatística o que demonstra que o peso dos ratos no pré-operatório é igual nos três grupos (Tabela 13).

**TABELA 13**

Análise comparativa dos pesos dos ratos no pré-operatório no GS, GA, GACV

<b>Grupos</b>	<b>N</b>	<b><math>\bar{X} \pm s</math></b>	<b>Mi</b>
GS	6	353,33 ± 15,05	350
GA	6	343,33 ± 38,29	350
GACV	24	347,92 ± 71,13	350
<b>Total</b>	<b>36</b>		

**p valor = 0,982**

Teste estatístico: Kruskal Wallis

Nível de significância < ou = 0,05

Legenda: N = número de ratos por grupo;  $\bar{X}$  = média; s = desvio padrão; Mi = mediana; Gs = Grupo Simulado; GA = Grupo Amputado; GACV = Grupo Amputado com Válvula

Foi feita a comparação do peso pré-operatório com o peso pós-operatório nos três grupos, em que foi aplicado o teste de Wilcoxon, para dados não paramétricos. O “p” valor foi estatisticamente significativo o que demonstra que o peso variou significativamente do período pré-operatório para o período pós-operatório (Tabela 14).

**TABELA 14**

Análise comparativa dos pesos dos ratos no pré-operatório e pós-operatório dos três grupos

Grupo	N	Peso		$\bar{X} \pm s$ (peso)		p valor
		Pré-operatório	Pós-operatório	Pré-operatório	Pós-operatório	
		Min-Máx	Min-Máx			
GS	6	340-380	400-440	353,33 $\pm$ 15,05	425,00 $\pm$ 15,16	0,028
GA	6	280-380	330-450	343,33 $\pm$ 38,29	405,00 $\pm$ 43,24	0,026
GACV	24	230-500	290-500	347,92 $\pm$ 71,13	372,22 $\pm$ 59,66	0,007

Teste estatístico: Wilcoxon

**p valor < ou = 0,05**

Legenda: N=número de ratos por grupo; Min= menor valor do peso dos ratos por grupo; Máx= maior valor do peso dos ratos por grupo;  $\bar{X}$ = média; s= desvio padrão; GS=Grupo Simulado; GA=Grupo Amputado; GACV=Grupo Amputado com Válvula

O peso pós-operatório dos animais nos três grupos foi estatisticamente significativo (Mann-Whitney, “p” valor = 0,0167 correção de Bonferroni), sendo que o peso do Grupo Simulado foi maior que do Grupo Amputado com Válvula.

Comparando os três grupos no ganho médio de peso pós-operatório pelo teste de Mann-Whitney observou-se que o peso variou significativamente entre os grupos e que houve diferença estatística entre o Grupo Simulado e Grupo Amputado com Válvula. Na estatística descritiva pode-se observar que a mediana do ganho de peso do Grupo Simulado foi de 75g e do Grupo Amputado com Válvula foi 20g indicando que o Grupo Simulado ganhou mais peso do que o Grupo Amputado com Válvula. Também houve diferença estatisticamente significativa entre o Grupo Amputado e Grupo Amputado com Válvula (Mann-Whitney) com maior ganho de peso mediano do Grupo Amputado (65g) em relação ao Grupo Amputado com Válvula (20g) (Tabela 15).

**TABELA 15**

Comparação entre grupos 2 a 2 quanto ao ganho médio de peso pós-operatório no GS, GA, GACV

<b>Grupos</b>	<b>p Valor</b>
GS x GA	0,36
GS x GACV	<b>0,002</b>
GA x GACV	<b>0,002</b>

Legenda: GS = Grupo Simulado; GA = Grupo Amputado; GACV=Grupo Amputado com Válvula.

Teste estatístico: Mann-Whitney; Nível significância < ou = 0,0167; Correção de Bonferroni = 0,05/3 = 0,0167

### 9.1.3 Macroscopia

No Grupo Simulado, quanto às complicações pós-operatórias, um rato (3,33%) evoluiu com hérnia incisional (Figura 22).

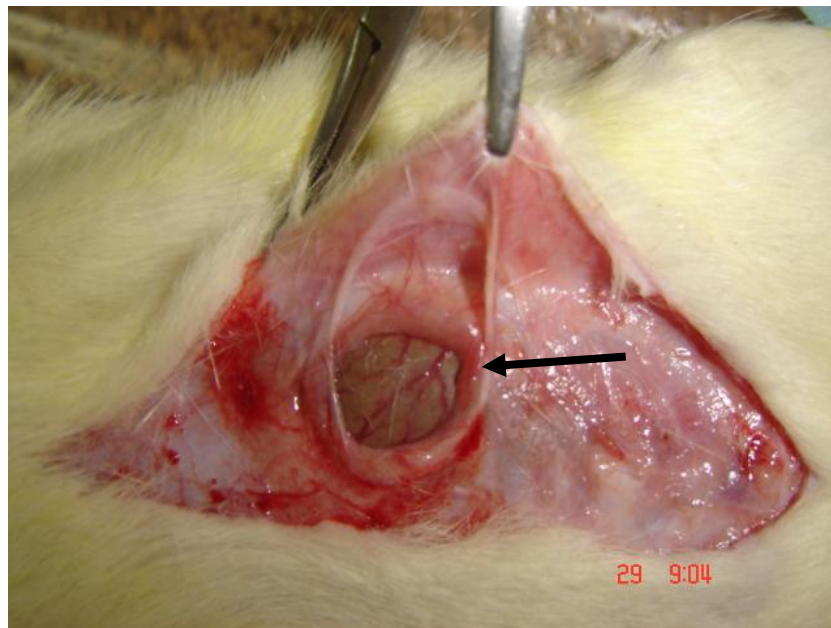


Figura 22 – Hérnia incisional na abertura da cavidade abdominal (seta). Rato do Grupo Simulado.

Na relaparotomia, no dia da morte, não foi evidenciado nenhum achado significativo. O padrão encontrado em todo colo ressecado foi a presença de fezes em cíbalos, sem distensão e a mucosa com aspecto enrugado no sentido longitudinal (Figura 23 e Figura 24).



Figura 23 – Cíbalos na luz intestinal (setas). Rato do Grupo Simulado.



Figura 24 – Aspecto enrugado da mucosa, no sentido longitudinal.

No Grupo Amputado, todos os ratos (100%) apresentaram ânus entreaberto, sempre borrado de fezes pastosas (Figura 25).



Figura 25 – Ânus borrado de fezes pastosas (seta). Rato do Grupo Amputado

O padrão encontrado na peça ressecada mostrava colo fino, preenchido por fezes pastosas, nunca em formato de cíbalos, sendo que algumas peças encontravam-se sem fezes (Figura 26).



Figura 26 – Colo fino e sem conteúdo fecal no seu interior. Rato do Grupo Amputado.

No Grupo Amputado com Válvula, 10 ratos (41,66%) tiveram complicações anestésicas. Desenvolveram infecção no local que foi aplicada a anestesia (coxa esquerda) em diferentes graus, mas nenhum animal perdeu a perna (Figura 27).

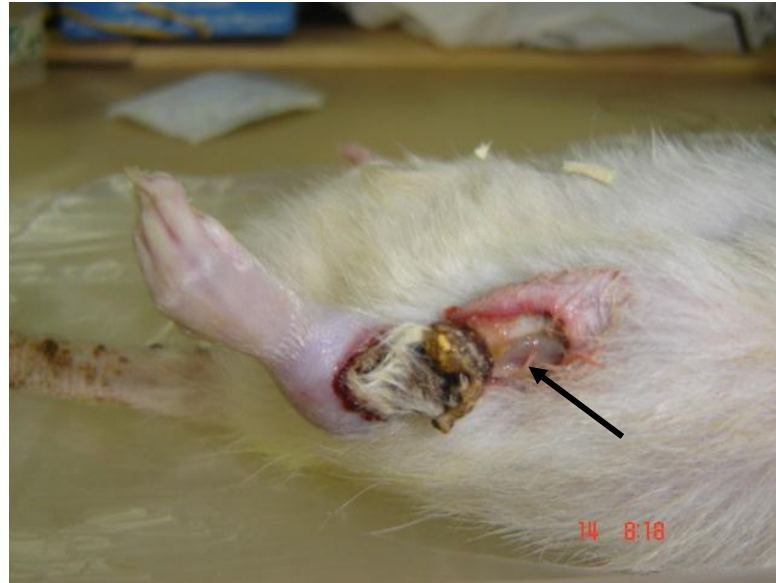


Figura 27 – Infecção da coxa esquerda – grau avançado – determinado pela exposição de estruturas nobres (seta). Rato do Grupo Amputado com Válvula.

As intercorrências durante a laparotomia foram uma lesão de testículo com sutura primária e abertura de uma alça após a confecção do ponto, que rasgou por tração excessiva da hemostática de reparo, tendo extravasamento de pequena quantidade de conteúdo fecal na cavidade. Este rato morreu no quarto dia pós-operatório.

Todos os ratos apresentaram prolapso, em diferentes graus, da colostomia perineal. Nenhum rato apresentou borramento de fezes no momento da colheita da peça cirúrgica, sempre com fezes bem formadas (Figura 28).



Figura 28 – Animal anestesiado para coleta do material. Prolapso de maior grau da colostomia. Fezes formadas. Rato do Grupo Amputado com Válvula.

Na relaparotomia, um rato apresentou aderência do intestino delgado com o aparelho reprodutor; um apresentou aderência da parede abdominal com aparelho reprodutor; um apresentou aderência do aparelho reprodutor com o colo dilatado e outro apresentou aderência da parede abdominal com o intestino delgado. Todos os animais eram do Grupo Amputado com Válvula (Figura 29).

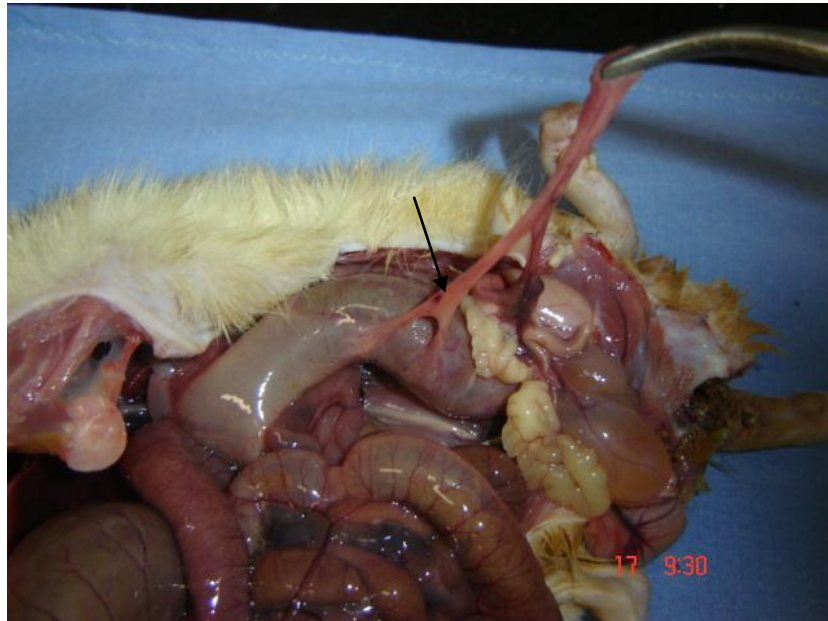


Figura 29 – Aderências (seta) do aparelho reprodutor com o colo dilatado. Rato do Grupo Amputado com Válvula.

Um rato apresentou abscesso encapsulado no nível da sutura da colostomia perineal com a pele (Figura 30).

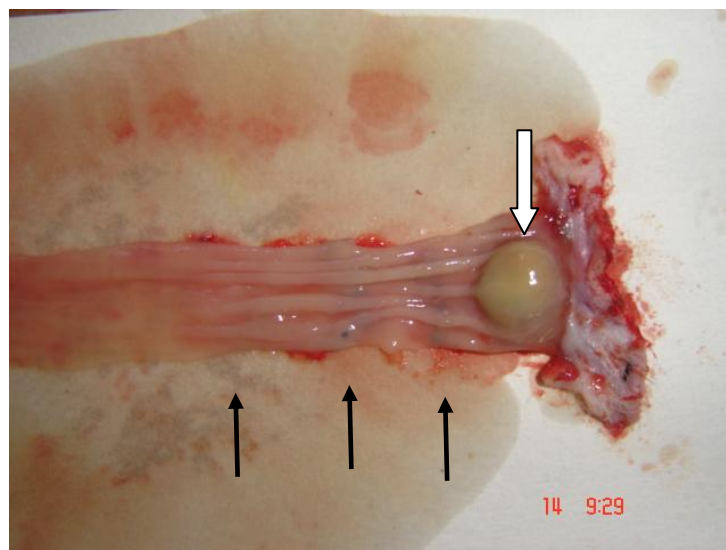


Figura 30 – Abscesso encapsulado (seta cheia). Fios cirúrgicos (seta fina). Rato do Grupo Amputado com Válvula.