



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA

ELISÂNGELA DE MATTOS E SILVA

**IMPLANTE SERIADO DE ENXERTOS DE
SUBMUCOSA INTESTINAL PORCINA COMO
TÉCNICA DE AUMENTO DA SUPERFÍCIE
INTESTINAL – ESTUDO EXPERIMENTAL EM
COELHOS**

Curitiba
2007



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA

ELISÂNGELA DE MATTOS E SILVA

**IMPLANTE SERIADO DE ENXERTOS DE
SUBMUCOSA INTESTINAL PORCINA COMO
TÉCNICA DE AUMENTO DA SUPERFÍCIE
INTESTINAL – ESTUDO EXPERIMENTAL EM
COELHOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Josué Bruginski de Paula
Coordenador: Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten

Curitiba
2007

Silva, Elisangela de Mattos e
S586i **Implante seriado de enxertos de submucosa intestinal porcina como**
 técnica
2007 **de aumento da superfície intestinal : estudo experimental em coelhos /**
 Elisangela de Mattos e Silva ; orientador, Josuê Bruginski da Paula. –
 2007.
 128 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2007
Inclui bibliografia

1. Síndrome do intestino curto. 2. Intestino delgado. 3. Bioprótese.
4. Implantes experimentais. I. Paula, Josuê Bruginski de. II. Pontifícia
Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em
Cirurgia.
III. Título.

CDD 21.ed. – 616.34

Ao pediatra Dr. Luiz Carlos Gomes de Mattos
(*in memoriam*), meu avô, pela inspiração e
exemplo.

À minha família e amigos pelo apoio, carinho,
compreensão e por serem a base e os
alicerces de tudo.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente da realização desta dissertação e que de alguma forma foram importantes para a sua conclusão.

Agradecimentos especiais ao Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da PUCPR, pela confiança e incentivo na conclusão desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Josuê Bruginski de Paula pela presença e orientação durante todas as etapas do trabalho.

À equipe do Biotério da PUCPR nas pessoas do Sr. Indalécio Mainardes Sutil, veterinário responsável e dos funcionários: Sr^a. Antônia Sueli da Silva, Sr. Alaércio Zeglan e Sr. Charlei Pires Melo, pela eficiência e carinho nos cuidados pré e pós-operatório dos animais.

À equipe de funcionários do Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUCPR: Sr^a. Rosana Nunes Ferreira, Sr. Misael Gomes Barbosa e Sr. Álvaro Roberto Gonçalves Machado, pela dedicação e profissionalismo durante os procedimentos cirúrgicos.

Agradecimentos à equipe do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, Prof^a. Dr^a. Lúcia de Noronha (patologista responsável), e biólogas: Sr^a. Ana Paula Camargo Martins e Sr^a. Marina Luise Viola de Azevedo, pela prestatividade e apoio durante a avaliação das lâminas.

Ao Frigorífico Argus Ltda. e à Indústria e Comércio de Tripas Curitiba Ltda., nas pessoas do Sr. Enéias Viega da Rosa e da Sr^a. Adriana Teixeira respectivamente, pelo fornecimento do material de confecção do enxerto.

À Ethicon/ Johnson e Johnson, na pessoa do Sr. Mauro Leindorf, representante comercial, pelo fornecimento dos fios cirúrgicos utilizados nos procedimentos.

Aos acadêmicos, Aline Von Bahten, Ewerson Luiz Cavalcanti e Silva, Heloíse Cristine Cavalcanti e Silva e Luca Rodrigo Pasqualotto, meu real reconhecimento pela participação e auxílio nos procedimentos cirúrgicos e de análise dos resultados.

Ao Sr. Júlio César Francisco, farmacêutico, pelas informações referentes à análise microbiológica do material do enxerto.

À Prof^a. Márcia Olandoski, pela orientação e realização da análise estatística e à Fabíola Ferreira dos Santos, secretária da Pós-Graduação, Mestrado em Cirurgia, pela atenção e auxílio na conclusão do trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVOS	4
1.1.1 Objetivo Geral	4
1.1.2. Objetivos Específicos	5
2. LITERATURA.....	6
2.1 SÍNDROME DO INTESTINO CURTO	7
2.1.1 Definição e Etiologia.....	7
2.1.2 Manifestações Clínicas	8
2.1.3 Adaptação Intestinal e Alterações Funcionais.....	10
2.1.4 Abordagem Clínica.....	11
2.1.5 Alternativas Cirúrgicas	13
2.2 ABORDAGENS CIRÚRGICAS EXPERIMENTAIS NA SIC	14
2.3 ABORDAGENS CIRÚRGICAS EM PACIENTES COM SIC	15
2.3.1 Técnicas para Diminuição da Velocidade do Trânsito e para Dilatação Intestinal.....	15
2.3.2 Técnicas de Redução do Calibre da Alça	19
2.3.3 Técnicas de Alongamento Intestinal.....	20
2.3.3.1 Enteroplastia Transversa Seriada (Serial Transverse Enteroplasty Procedure – STEP).....	25
2.3.4 Transplante Intestinal	28
2.3.5 Engenharia de Tecidos	29
2.4 SUBMUCOSA DE INTESTINO DELGADO - SID	29
2.4.1 Características Histológicas e Estruturais.....	30
2.4.2 Trabalhos Experimentais com SID.....	31
2.4.3 Métodos de Preparo	34
2.4.4 Tempo de Incorporação do Enxerto.....	35

2.4.5	Uso da SID em Humanos e Disponibilidade Comercial.....	36
3.	MÉTODOS.....	38
3.1	INFRA-ESTRUTURA.....	39
3.2	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	39
3.3	PREPARO DOS ENXERTOS.....	41
3.3.1	Obtenção.....	41
3.3.2	Transporte e Conservação	41
3.3.3	Confecção dos Enxertos	42
3.3.4	Avaliação Bacteriológica do Enxerto	44
3.4	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	45
3.4.1	Cuidados pré-operatórios	45
3.4.2	Indução Anestésica	45
3.4.3	Anestesia	46
3.4.4	Cirurgia.....	47
3.5	PÓS-OPERATÓRIO	50
3.6	COLETA DE MATERIAL.....	50
3.6.1	Procedimento Cirúrgico	50
3.6.2	Eutanásia	51
3.6.3	Preparo das Peças.....	51
3.7	AVALIAÇÃO ANÁTOMO- PATOLÓGICA	52
3.7.1	Preparo das Lâminas	52
3.7.2	Colorações	53
3.7.3	Análise das Lâminas	54
3.7.4	Avaliação Qualitativa das Lâminas.....	55
3.7.5	Avaliação Quantitativa das Lâminas	56
3.7.5.1	Avaliação da Superfície da Mucosa.....	58
3.7.5.2	Avaliação da Espessura da Camada Muscular	59
3.7.5.3	Contagem de Células Caliciformes.....	60
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
4.	RESULTADOS	62
4.1	ANIMAIS DE DE EXPERIMENTAÇÃO	63
4.1.1	Peso Inicial	63
4.1.2	Peso Final	64
4.2	AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DO ENXERTO	66

4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	66
4.4 COMPLICAÇÕES PÓS-OPERATÓRIAS.....	66
4.5 COLETA DO MATERIAL	67
4.5.1 Achados Intra-Operatórios	67
4.6 AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA MACROSCÓPICA	68
4.7 AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA MICROSCÓPICA.....	70
4.7.1 Avaliação Qualitativa das Lâminas.....	70
4.7.2 Avaliação Quantitativa das Lâminas	72
4.7.2.1 Avaliação da Superfície Mucosa.....	73
4.7.2.2 Avaliação da Espessura da Camada Muscular	75
4.7.2.3 Contagem de Células Caliciformes.....	77
5. DISCUSSÃO.....	80
5.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	81
5.2 PREPARO E CONSERVAÇÃO DO ENXERTO	82
5.3 COLETA DO MATERIAL	83
5.3.1 Tempo de Coleta do Material	83
5.3.2 Achados Intra-Operatórios	84
5.4 AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA MACROSCÓPICA	85
5.5 AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA MICROSCÓPICA.....	86
5.5.1 Avaliação Qualitativa das Lâminas.....	86
5.5.2 Avaliação Quantitativa.....	86
5.6 INCORPORAÇÃO DO ENXERTO	88
5.7 RESULTADOS TARDIOS.....	88
5.8 PERSPECTIVAS FUTURAS	88
6. CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXOS.....	101
Anexo A – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética.....	102
APÊNDICES	103
Apêndice A – Ficha de Acompanhamento Pré e Pós-Operatório.....	105

Apêndice B – Prontuário dos Coelhos.....	108
Apêndice C – Protocolos de Avaliação Anátomo-Patológica.....	110
Hematoxilina-Eosina	111
Tricrômico de Gomori.....	112
Alcian Blue	113
Apêndice D – Resultados da Avaliação Anátomo-Patológica	114
Superfície da Mucosa.....	115
Espessura da Camada Muscular	119
Contagem de Células Caliciformes	123
NORMAS ADOTADAS	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Divisão dos animais em grupos	40
Tabela 2 - Peso Inicial (Pré-Operatório)	63
Tabela 3 - Peso Final	64
Tabela 4 - Comparação dos pesos iniciais e finais nos animais do grupo A e B .	64
Tabela 5 - Resultados da Análise Quantitativa	73
Tabela 6 - Comparação entre os grupos A e B nas porções controle e estudo em relação à superfície mucosa.....	73
Tabela 7 - Comparação entre as porções controle e estudo nos grupos A e B em relação à superfície mucosa.....	74
Tabela 8 - Comparação entre os grupos A e B nas porções controle e estudo em relação à espessura da camada muscular	75
Tabela 9 - Comparação entre as porções controle e estudo nos grupos A e B em relação à espessura da camada muscular	76
Tabela 10 - Comparação entre os grupos A e B nas porções controle e estudo em relação à contagem de células calciformes	77
Tabela 11 - Comparação entre as porções controle e estudo nos grupos A e B em relação à contagem de células calciformes	78

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Desenho ilustrativo de invaginação intestinal como mecanismo de válvula. (Fonte: Hollwarth ME. Short-bowel syndrome. In: Puri P. Pediatric Surgery. Germany: Springer; 2006. p.273)..... **16**
- Figura 2-** Válvulas Intestinais. 2-A – Invaginação intestinal no sentido iso (I) ou anti-peristáltico (II). (Fonte: Warner BW. Short-bowel syndrome. In: Grosfeld JL *et al.* Pediatric Surgery. 6th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2006. p.1375); 2-B – Colocação de prótese de politetrafluoretileno. (Fonte: Barbieri D. Síndrome do intestino curto. In: Maksoud JG. Cirurgia Pediátrica. 2ª ed. São Paulo: Revinter; 2003. p. 801). **17**
- Figura 3-** Técnica de diminuição da velocidade do trânsito intestinal. 3-A- Isolamento de segmento de alça. 3-B - Interposição de alça intestinal anti-peristáltica. (Fonte: Hollwarth ME. Short-bowel syndrome. In: Puri P. Pediatric Surgery. Germany: Springer; 2006. p.269). **18**
- Figura 4-** Técnica de diminuição da velocidade do trânsito intestinal. 4-A – Delimitação de segmento de cólon; 4-B - Interposição de alça de cólon isoperistáltico. (Fonte: Hollwarth ME. Short-bowel syndrome. In: Puri P. Pediatric Surgery. Germany: Springer; 2006. p.269)..... **18**
- Figura 5-** Técnicas de redução do calibre da alça - *Tapering*. 5-A – Incisão na borda anti-mesentérica e ressecção de parte da alça dilatada; 5-B – Reconstrução do tubo intestinal com sutura da alça após a ressecção. (Fonte: Hollwarth ME. Short-bowel syndrome. In: Puri P. Pediatric Surgery. Germany: Springer; 2006. p.259)..... **19**
- Figura 6-** Técnicas de redução do calibre da alça – Plicatura intestinal da borda anti-mesentérica.(Fonte: Hollwarth ME. Short-bowel syndrome. In: Puri P. Pediatric Surgery. Germany: Springer; 2006.p. 265). **20**
- Figura 7-** Secção da alça com auxílio do stapler. (Fonte: Hollwarth ME. Short-Bowel Syndrome. In: Puri P. Pediatric Surgery. Germany: Springer; 2006.p. 265-67). **21**
- Figura 8-** Técnica de Bianchi. 8-A – Demarcações no segmento a ser seccionado; 8-B – Aspecto final após as anastomoses. (Fonte: Hollwarth ME. Short-bowel syndrome. In: Puri P. Pediatric Surgery. Germany: Springer; 2006.p. 265-67). **22**

- Figura 9** - Técnica de alongamento intestinal – Kimura e Soper: 9-A – Abertura da camada sero-muscular para sutura da alça ao peritônio parietal; 9-B – Secção longitudinal com divisão da alça dilatada para anastomose término-terminal. (Fonte: Barbieri D. Síndrome do intestino curto. In: Maksoud JG. Cirurgia Pediátrica. 2ª ed. São Paulo: Revinter; 2003. p. 803). **24**
- Figura 10** - Desenho esquemático das técnicas de alongamento intestinal: 10-A - Bianchi . Divisão dos vasos mesentéricos e da alça no sentido longitudinal com auxílio do *stapler*, e reanatomose término-terminal; 10-B – Kimura e Soper. Fixação da alça ao peritônio parietal e posterior secção longitudinal com anastomose término-terminal. (Fonte: Warner BW. Short-bowel syndrome. In: Grosfeld JL *et al.* Pediatric Surgery. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2006. p.1377)...... **24**
- Figura 11**- Desenho esquemático da técnica de STEP, mostrando, nas setas, os locais de realização das suturas mecânicas lineares, perpendiculares à alça e em direções opostas, formando um “zig-zag” (Fonte: Kim HB, *et al.* Serial transverse enteroplasty (STEP): a novel bowel lengthening procedure. J Pediatr Surg, 2003)...... **25**
- Figura 12** - Desenho ilustrando a submucosa na forma tubular (A), sendo prensada (B) para formar uma dupla camada (C) e ser colocada sobre uma folha de papel filtro **42**
- Figura 13** - Camada dupla de submucosa sobre a folha de papel filtro (A), sendo envolvida (B) para formar uma estrutura estável (C) antes da sua secção para confecção dos enxertos **42**
- Figura 14** - 14-A - Camada dupla de submucosa porcina entre duas folhas de papel filtro com retificação da borda dobrada do papel; 14-B - Pontos de fio de nylon 5.0 para fixar a submucosa ao papel delimitando os vértices de um quadrado de 1x1 cm; 14-C - Secção da submucosa com bisturi especial de dupla lâmina com distância de 1 cm entre elas para confecção dos enxertos..... **43**
- Figura 15** – 15-A – Bisturi utilizado para confecção dos enxertos; 15-B – Detalhe do bisturi com duplo cabo e dupla lâmina para regulagem do corte. .. **43**
- Figura 16** - Retirada de uma das superfícies do papel filtro, mantendo-se a outra para apoio e manuseio do enxerto **44**
- Figura 17** - Acesso venoso em veia de dorso da orelha para manutenção da anestesia e hidratação. **46**
- Figura 18** - 18-A - Escolha do segmento de alça para colocação dos enxertos com início há 30 cm do apêndice cecal apontado pela seta; 18-B - Marcação do início do segmento escolhido com ponto de fio de *nylon* 4.0 (seta)...... **47**

- Figura 19** - 19-A – Delimitação de intervalos de 5cm; 19-B – Marcação dos intervalos com pontos de fio de *nylon* 4.0 no segmento escolhido..... **48**
- Figura 20** - Abertura de parede total da alça intestinal no local demarcado com o segundo ponto de fio de *nylon* 4.0, onde foi suturado o primeiro enxerto. **48**
- Figura 21** - 21-A – Colocação do enxerto sobre a incisão na alça intestinal; 21-B - Sutura do enxerto de submucosa à alça intestinal com fio de polidioxanona 6.0. **49**
- Figura 22** - 22-A - Teste da anastomose do enxerto à alça intestinal; 22-B - Alça intestinal com os quatro enxertos de submucosa porcina já implantados, dois de cada lado, conforme apondados pelas pinças... **49**
- Figura 23** - 23-A - Segmento de alça contendo o enxerto (porção apontada pela pinça), aberto na sua face mesentérica e retificado; 23-B - Incisão na porção que não continha o enxerto para orientação no momento de confecção das lâminas; 23-C - Segmentos sobre papel filtro antes de serem colocados em frasco com identificação. **51**
- Figura 24** - Fotomicrografias de lâmina corada com HE; 24-A - Aumento de 4x, mostrando características da coloração com destaque para a área visibilizada na foto B; 24-B - Aumento de 10x, mostrando a diferenciação entre as camadas da parede intestinal: mucosa (M), submucosa (SM), muscular (ML) e serosa (S) (Lâmina correspondente à porção controle da peça 3 do coelho 3). **53**
- Figura 25** - Fotomicrografias de lâmina corada com Alcian Blue; 25-A - Aumento de 20x mostrando características da coloração com destaque para a área visibilizada na foto B; 25-B - Aumento de 40x, mostrando o muco e as células caliciformes corados em azul claro (seta) (Lâmina correspondente à porção controle da peça 3 do coelho 6)..... **54**
- Figura 26** - Fotomicrografia de lâmina corada com TG. 26-A - Aumento de 4x, com destaque para a área visibilizada na foto B; 26-B - Aumento de 10x, mostrando a coloração verde das células da camada muscular (Lâmina correspondente à porção controle da peça 4 do coelho 10).. **54**
- Figura 27** - Lâmina com os dois cortes histológicos, referentes a um dos quatro segmentos contendo o enxerto, de um dos coelhos, divididos com traço de caneta marcadora por cima da lamínula em porções controle (C) e estudo (E)..... **55**
- Figura 28** - Lâmina corada com HE em aumento de 10x, mostrando a transição entre as porções controle (C) e estudo (E). Presença de infiltrado linfocitário na submucosa, início de espessamento e perda do padrão organizado da camada muscular, e infiltrado na camada serosa..... **56**

- Figura 29** - Esquema de escolha dos campos para análise histopatológica dos cortes. 29-A - A partir da linha divisória no corte superior: Campos 1 e 2 (das porções controle (C) e estudo (E)). E no corte inferior: Campos 3 e 4 (das porções Controle (C) e Estudo (E)); 29-B – Foto das lâminas ilustrando a escolha dos campos. **57**
- Figura 30** - Fotomicrografia de lâmina corada com HE, aumento de 10x, mostrando o contorno da superfície mucosa (linha vermelha) utilizado para medir o comprimento da mesma (Lâmina referente à porção controle da peça 1 do coelho 9) **58**
- Figura 31** - Fotomicrografia de lâmina corada com TG em aumento de 10x, mostrando a aferição da espessura da camada muscular em cinco pontos, representados pelas linhas vermelhas (Lâmina referente à porção controle da peça 4 do coelho 10). **59**
- Figura 32** - Fotomicrografia de lâmina corada com AB em aumento de 40x, exemplificando a contagem de células calciformes coradas em azul claro (contorno vermelho) (Lâmina referente à porção controle da peça 1 do coelho 7)..... **60**
- Figura 33** - Gráfico ilustrando a comparação entre os pesos inicial e final entre os grupos A e B..... **65**
- Figura 34** - Gráfico comparando o ganho de peso (final - inicial) nos animais dos grupos A e B..... **65**
- Figura 35** - Presença de aderências entre alças em um coelho do grupo A (35-A) e um do grupo B (35-B). **68**
- Figura 36** - Identificação dos locais de implante dos enxertos com maior facilidade nos coelhos com menos tempo de evolução pós-operatória. 36-A – Coelho do grupo A; 36-B - Coelho do grupo B - alguns implantes somente puderam ser identificados com a ajuda dos pontos de referência do mesentério..... **69**
- Figura 37** - Fotografias referentes ao coelho 2. 37-A e B - Presença de aumento de volume e reação de corpo estranho com processo supurativo bloqueado na face externa de um dos enxertos..... **69**
- Figura 38** - Fotomicrografia de lâmina corada com HE, aumento de 10x, mostrando a diferença entre as porções controle (C) e enxerto (E) em uma peça do grupo A. E1 – Mucosa e Submucosa; E2 – Muscular e Serosa. **71**
- Figura 39** - Fotomicrografia de lâmina corada com HE, aumento de 10x, mostrando a diferença entre as porções controle (C) e enxerto (E) em uma peça do grupo B. E1 – Mucosa e Submucosa; E2 – Muscular e Serosa **72**

- Figura 40** - Fotomicrografia de lâminas coradas com HE mostrando a semelhança da superfície epitelial comparando-se uma porção controle (C) e uma porção estudo (E) de um coelho do grupo A <peça 4 coelho 4> e de um coelho do grupo B <peça 2 coelho 6>..... **74**
- Figura 41** - Gráfico comparando os valores de comprimento da superfície da camada mucosa dos grupos A e B, nas porções controle e estudo.... **75**
- Figura 42** - Fotomicrografia de lâminas coradas com Tricrômico de Gomori mostrando a medida da espessura da camada muscular comparando-se a porção controle (C) e a porção estudo (E) de um coelho do grupo A <peça 3 coelho 9> e de um coelho do grupo B <peça 2 coelho 10>..... **76**
- Figura 43** - Gráfico comparando os valores de espessura da camada muscular dos grupos A e B, nas porções controle e estudo. **77**
- Figura 44** - Fotomicrografias de lâminas coradas com Alcian Blue, mostrando a semelhança de distribuição de células caliciformes na superfície da mucosa, comparando-se porção controle (C) e porção estudo (E) de um coelho do grupo A e de um coelho do grupo B.....**778**
- Figura 45** - Gráfico comparando os valores de contagem de células caliciformes dos grupos A e B nas porções controle e estudo. **79**

RESUMO

INTRODUÇÃO: apesar da variedade de procedimentos cirúrgicos destinados à correção das anormalidades relacionadas à Síndrome do Intestino Curto, estes ainda não apresentaram resultados totalmente satisfatórios. **OBJETIVO:** avaliar a utilização de implantes seriados de enxertos de Submucosa de Intestino Delgado (SID) para aumento da superfície absorptiva intestinal, e analisar parâmetros objetivos. **MÉTODOS:** quatro enxertos de SID, 1x1 cm, foram suturados no íleo terminal de dez coelhos machos, New Zeland, albinos, divididos em dois grupos. O grupo A foi avaliado com 6 semanas e o B com 12 semanas de pós-operatório. Foi realizada avaliação qualitativa e quantitativa, avaliando-se comprimento da superfície mucosa, contagem de células caliciformes e espessura da camada muscular. **RESULTADOS:** um coelho do grupo B foi a óbito por deiscência e peritonite e um coelho do grupo A apresentou infecção localizada em um dos enxertos. Todos os demais evoluíram com boa incorporação da SID, sendo mais difícil identificá-la macroscopicamente nos animais do grupo B. Houve formação de células das quatro camadas da parede intestinal em ambos os grupos. Os parâmetros avaliados não apresentaram diferença estatística quando comparados os grupos A e B, e entre as porções controle e enxerto. **CONCLUSÃO:** a técnica de implantes seriados de SID no íleo terminal é viável e com poucas complicações. O neointestino formado apresentou características morfológicas semelhantes ao intestino normal, portanto a matriz implantada pode contribuir para um aumento na superfície absorptiva do intestino delgado.

Descritores: Síndrome do Intestino Curto; Matriz Extracelular; Implantes Experimentais; Bioprótese; Intestino Delgado.

ABSTRACT

INTRODUCTION: despite a lot of surgical procedures have been described for Short Bowel Syndrome management, they don't have been showed enough good results. OBJECTIVE: Evaluate the use of serial grafts implantation of Small Intestine Submucosa (SIS) for increase in the intestinal absorptive surface and analyze objective data. METHODS: four SIS grafts, 1x1 cm, were sutured in terminal ileum of ten New Zeland, albino, male rabbits, divided in two groups. The group A was analysed within 6 weeks and the group B within 12 weeks of postoperative period. Subjective and objective characteristics as: length of mucosal surface, number of goblet cells and thickness of muscular layer were observed. RESULTS: one rabbit from the group B died with deiscence and peritonitis, and another one of the group A showed local infection of one graft. All others had good incorporation of SIS, which was better in the group B. All four typical intestinal layers were present in both groups. Objective characteristics didn't show significant differences between group A and B, and between control and graft segments. CONCLUSIONS: the technique is viable and with few complications. The neointestine has similar morphologic features compared with those of the natural intestine, therefore the implant created could contribute in increasing the absorptive surface of small bowel.

Key Words: Short Bowel Syndrome; Extracellular Matrix; Experimental Implants; Bioprosthesis; Small Intestine.

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A síndrome do intestino curto (SIC) é um espectro de sinais e sintomas resultantes de alterações na digestão e absorção de nutrientes, por diminuição da superfície absorptiva intestinal devida a doença congênita ou adquirida. Essa condição complexa, que se origina da alteração da fisiologia normal intestinal, pode evoluir com consequências nutricionais, metabólicas e infecciosas graves, chegando ao óbito quando os mecanismos de adaptação intestinal e a abordagem clínica e cirúrgica, não obtiveram sucesso⁽¹⁾.

Na cirurgia pediátrica, esta síndrome ocorre principalmente devido a grandes ressecções intestinais, sendo a enterocolite necrozante a principal causa atualmente^(2,3).

O manejo dos pacientes com SIC tem melhorado significativamente com a nutrição parenteral, maior conhecimento dos mecanismos de adaptação intestinal e de fatores que influenciam nos resultados do tratamento desses pacientes. Os principais objetivos das abordagens clínica e/ou cirúrgica são: permitir que o paciente avance na terapia enteral, evitando as complicações da nutrição parenteral total (NPT); controlar as manifestações clínicas da doença como: diarreia, deficiência de nutrientes específicos e desnutrição; e permitir uma qualidade de vida a melhor possível^(3,4).

Para melhorar a absorção intestinal ou aumentar a superfície de intestino delgado, várias abordagens clínicas e cirúrgicas têm sido tentadas. Apesar da variedade de procedimentos cirúrgicos destinados à correção das anormalidades relacionadas à SIC^(5,6,7,8,9), esses ainda não apresentaram resultados totalmente satisfatórios ou não foram testados em número suficiente de pacientes para permitir comparações válidas.

O transplante intestinal é apontado como a forma mais promissora de abordagem dos pacientes com SIC. Embora alguns trabalhos apresentem ainda resultados associados a um grande número de complicações e mortalidade em alguns centros^(4,10), outros autores vêm publicando dados encorajadores em relação a esta forma de tratamento da SIC⁽¹⁰⁾. Entre as principais dificuldades em

relação ao transplante intestinal estão os fatores relacionados à rejeição e à imunossupressão, com suas complicações infecciosas e doença linfoproliferativa⁽¹¹⁾.

Pesquisas têm sido feitas utilizando diferentes tipos de matrizes acelulares como substituto de tecidos lesados ou perdidos, no intuito de induzir proliferação celular e neoformação de tecido semelhante ao do órgão receptor. A submucosa de intestino de porco é uma matriz biológica natural que vem sendo amplamente utilizada para esses fins⁽¹²⁻¹⁶⁾.

Diversos autores realizaram experimentos *in vitro* em relação à estrutura da submucosa de intestino delgado (SID), suas características biológicas, capacidade de induzir proliferação celular e técnicas de esterilização desse material^(17,18).

Estudos *in vivo*, com animais de experimentação, já utilizaram a SID como substituto de uma grande variedade de tecidos^(16,19-24), com bons resultados em relação à incorporação do enxerto, à neoformação celular, à ausência de sinais de rejeição e à resistência do enxerto.

Avanços nas pesquisas permitiram inclusive a comercialização desse produto e sua aplicação em humanos em algumas áreas, com confirmação de bons resultados à curto prazo⁽²⁵⁾.

A submucosa de intestino de porco comercializada já foi utilizada no reparo de lesões cutâneas⁽²⁶⁾, em ortopedia no reparo de tendões⁽²⁷⁾, como substituto de dura-máter⁽²⁸⁾, reforço de assoalho pélvico⁽²⁶⁾, parede abdominal⁽¹⁵⁾, diafragma⁽²⁹⁾ e região inguinal no reparo de hérnias⁽²⁵⁾. Entretanto, continuam em fase experimental os trabalhos que utilizam a submucosa em vísceras ocas, particularmente em alça intestinal^(11,13,30).

Parnigotto *et al*, em 2000, publicaram trabalho em que foi realizada anastomose de um tubo de 2cm de comprimento, de submucosa gástrica homóloga, em uma alça isolada de íleo de ratos Sprague-Dawley para avaliar aumento da superfície absorptiva. Observou-se que a matriz pode ser reintegrada a parede intestinal em período de três a seis semanas, porém não foi avaliada a função desse segmento⁽¹³⁾.

Em 2003, Wang *et al* realizaram trabalho semelhante, porém com implante de SID homóloga, em intestino de ratos. Foram feitas avaliações em períodos de

2, 4, 8, 12 e 24 semanas para analisar a evolução da incorporação do enxerto, com bons resultados⁽¹¹⁾.

O implante de submucosa porcina no intestino delgado já havia sido descrito anteriormente por Chen *et al*⁽³¹⁾ e por Greca *et al* em cães⁽¹⁴⁾ porém, em ambos os casos, os autores utilizaram apenas um enxerto.

Levando-se em consideração o difícil manejo clínico dos pacientes com SIC, a necessidade de técnicas cirúrgicas associadas, a grande variedade de técnicas existentes, bem como os resultados ainda não satisfatórios encontrados na literatura, optou-se por testar uma técnica que pudesse contribuir para a melhora dos resultados em relação a essa doença.

Baseando-se nas propriedades de neoformação tecidual da SID e na técnica de STEP, descrita por Kim *et al*⁽⁸⁾ para abordagem da SIC, optou-se por realizar uma combinação de ambos utilizando o implante seriado dessa matriz acelular em defeitos transversais e alternados criados na parede intestinal do íleo de coelhos. Esses implantes, por meio da sua capacidade de formar tecido intestinal funcional, seriam responsáveis pelo aumento da superfície absorptiva da mucosa.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é avaliar a utilização de implantes seriados de enxerto de submucosa intestinal porcina, na alça intestinal de coelhos, como técnica de aumento da superfície intestinal.

1.1.2. Objetivos Específicos

Avaliar a incorporação da submucosa de intestino delgado porcino ao intestino do coelho, baseando-se nas propriedades de formação de neomucosa e neomuscular sobre uma matriz acelular.

Caracterizar o tecido neoformado utilizando parâmetros específicos como: a superfície de mucosa, a quantidade de células caliciformes e a espessura da camada muscular.

2. LITERATURA

2 LITERATURA

2.1 SÍNDROME DO INTESTINO CURTO

2.1.1 Definição e Etiologia

A síndrome do intestino curto (SIC) é um conjunto de alterações fisiopatológicas, consequência de uma insuficiência absorptiva e digestiva da superfície intestinal, impedindo o adequado crescimento e desenvolvimento do paciente⁽¹⁾.

O quadro clínico inclui diarreia por diminuição do trajeto e aumento da velocidade do trânsito intestinal, levando a síndromes disabsortivas (emagrecimento e desnutrição progressiva), translocação bacteriana e sepse^(4,30).

A NPT resultou num marco no tratamento dos pacientes com SIC, possibilitando uma maior sobrevida⁽³²⁾.

Na população pediátrica, esta síndrome está presente, principalmente, como consequência de grandes ressecções intestinais. Anteriormente sua principal etiologia era atribuída a doenças congênitas como atresia intestinal, gastrosquise e volvo intestinal por má-rotação, entretanto estes dados têm mudado com o tempo⁽³²⁾.

Atualmente, a enterocolite necrozante (EN) tem aparecido como a principal causa de síndrome do intestino curto em crianças por resultar em grandes ressecções de alças intestinais não viáveis, representando até 32% dos casos^(1,3,33). A EN é uma inflamação aguda do intestino delgado e/ou grosso, que resulta de uma combinação de lesão isquêmica, colonização por organismos patogênicos, substrato protéico excessivo na luz intestinal e imaturidade funcional do trato gastrointestinal em neonatos. Apesar do tratamento nos estágios iniciais

consistir na manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico e da pressão sanguínea, o início da gangrena e a perfuração tornam necessária uma intervenção cirúrgica imediata e, geralmente, uma ressecção maciça⁽³³⁾.

Outras causas, menos frequentes de grandes ressecções intestinais causando SIC incluem, obstrução por mecônio ou bolo de áscaris, invaginação intestinal, volvo por má-rotação ou bridas, doença de Crohn, retocolite ulcerativa inespecífica, oclusões vasculares mesentéricas devido a procedimentos invasivos vasculares, trombose aórtica neonatal ou embolia cardiogênica, e isquemia por diminuição da perfusão vascular devida ao choque hipovolêmico, séptico ou cardiogênico^(1,4).

Embora a síndrome do intestino curto ocorra mais comumente devida à deficiência quantitativa da mucosa intestinal, ela pode ocorrer também na presença de área de superfície mucosa normal, porém com distúrbio absorptivo, motor ou ambos. Estas alterações funcionais podem ser observadas em pacientes com longos segmentos agangliônicos (doença de Hirschsprung), síndrome da pseudo-obstrução intestinal idiopática, gastrosquise por alteração da peristalse, e doença de Crohn, mesmo com comprimento intestinal normal, por diminuição da capacidade absorptiva da mucosa⁽¹⁾.

2.1.2 Manifestações Clínicas

O quadro clínico do paciente com SIC envolve três estágios. O período inicial, peri-operatório até um a três meses, de extrema perda de líquidos e eletrólitos, diarreia intensa, tendência a desidratação e lesões perineais, é seguido pelo período no qual se inicia a dieta enteral e com isso os mecanismos de adaptação intestinal. Um estágio final é atingido após um ou dois anos, no qual aparecem os sintomas de má-absorção, diarreia, deficiências nutricionais crônicas e complicações da nutrição parenteral, quando os mecanismos de adaptação são insuficientes⁽³⁾.

Os sintomas da SIC dependem da capacidade absorptiva do intestino remanescente, sendo, portanto, relacionados ao comprimento e ao local da ressecção, à idade do paciente, assim como à presença ou não de papila ileal⁽¹⁾.

Pacientes com SIC apresentam diminuição do tempo de trânsito intestinal, agravado muitas vezes pela ausência de papila ileal e cólon, sendo a diarreia a manifestação clínica dominante^(3,4).

A papila ileal tem a função de lentificar o trânsito intestinal, aumentando o tempo de contato entre os nutrientes e a superfície mucosa, e serve como barreira para prevenir a migração de microorganismos colônicos para o íleo.

A presença do cólon pode diminuir a gravidade dos sintomas, pois ele não somente representa uma área de superfície absorptiva, capaz de absorver carboidratos, proteínas e gorduras, como também é capaz de diminuir o esvaziamento gástrico precoce⁽³⁴⁾.

A diarreia é causada pela diminuição da superfície absorptiva, aumento do trânsito intestinal, hipersecreção do trato gastrointestinal, crescimento bacteriano no intestino delgado e aumento da osmolaridade colônica devido ao metabolismo dos carboidratos não absorvidos e transformados em ácidos graxos de cadeia curta pelas bactérias⁽¹⁾.

As ressecções de jejuno são melhor toleradas devido à grande capacidade adaptativa do íleo, à circulação entero-hepática de sais biliares intacta e à preservação da absorção de vitamina B12. Já as grandes ressecções de íleo não são bem toleradas pela dificuldade de adaptação do jejuno, redução do *pool* de sais biliares, má-absorção de gorduras e vitaminas lipossolúveis e deficiência de vitamina B12. Grandes ressecções de íleo são mais comumente associadas a maior incidência de colelitíase e má-absorção de gordura⁽²⁾.

Após a ressecção intestinal ocorre hipergastrinemia e hipersecreção gástrica causando perda hidreletrolítica e maior potencial para o desenvolvimento de úlceras pépticas. A atividade da lipase pancreática está diminuída pelo conteúdo ácido, reduzindo a absorção de gordura e alguns pacientes desenvolvem carências específicas (hipoalbuminemia, anemia, hipovitaminose), adquirindo mais facilmente outras doenças⁽⁴⁾.

Pode ocorrer diminuição da absorção de cálcio, aumentando a disponibilidade dos oxalatos da dieta, levando a hiperossalúria e nefrolitíase^(1,4).

2.1.3 Adaptação Intestinal e Alterações Funcionais

A resposta compensatória do intestino remanescente após grandes ressecções intestinais é denominada *adaptação intestinal*⁽²⁾, e consiste no aumento da capacidade funcional do aparelho digestivo residual por meio da instalação de uma série de processos, tentando adaptar-se à nova e desfavorável situação⁽⁴⁾.

O mecanismo de adaptação intestinal inclui:

1. alterações morfológicas que levam ao aumento da área de superfície absorptiva, através de hiperplasia e hipertrofia de todas as camadas intestinais. A superfície mucosa é aumentada através do crescimento das vilosidades e aumento da profundidade das criptas;

2. alterações funcionais que levam ao aumento da capacidade absorptiva e digestiva dos enterócitos remanescentes, através do aumento da atividade enzimática, além do aumento da proliferação e da apoptose dos mesmos; e

3. alterações mecânicas levam ao aumento do diâmetro intestinal e conseqüentemente à redução da motilidade, lentificando o trânsito intestinal, na intenção de aumentar o tempo de contato do alimento com a superfície absorptiva^(1,2).

A presença de alimento na luz intestinal é o principal fator estimulante da adaptação intestinal, exercendo ação direta sobre a mucosa, nutrindo-a, e aumentando as secreções gastrintestinais e hormônios que apresentam efeito trófico.

A composição dos nutrientes também tem influência nos efeitos sobre o mecanismo de adaptação. Gorduras enterais têm maior efeito trófico entre os macro-nutrientes, e, mais especificamente, as gorduras insaturadas e de cadeia longa, promovem um maior estímulo à adaptação. Entre as secreções endógenas, as de origem pancreáticas demonstram maior efeito trófico na mucosa quando comparadas à bile⁽¹⁾. O enteroglucagon apresenta efeito trófico lentificando o trânsito e possibilitando contato prolongado do alimento com a mucosa⁽⁴⁾.

Outros fatores que influenciam o processo de adaptação são hormônios como: GH (hormônio do crescimento), peptídeo 2 *glucagon-like*, fator de

crescimento epidermal e fator de crescimento *1 insulin-like*, que encontram-se em maior quantidade no soro de pacientes submetidos a grandes ressecções⁽³⁵⁾.

Stern *et al*⁽³⁶⁾ avaliaram a ação do soro de ratos, submetidos a ressecção intestinal, em culturas de células epiteliais intestinais e observaram indução do crescimento dessas células intestinais *in vitro*.

2.1.4 Abordagem Clínica

O principal objetivo da abordagem clínica é manter o *status* nutricional e promover o crescimento pândero-estatural da criança. A NPT deve ser iniciada precocemente para prevenir perda de peso significativa e estabelecer um balanço nitrogenado positivo⁽⁴⁾.

Apesar da NPT ter permitido melhora da sobrevivência dos pacientes com SIC, está relacionada à grande morbidade devida às suas complicações infecciosas, relacionadas ao cateter central, e hepáticas⁽³²⁾. Doença hepática induzida pela NPT é um processo multifatorial, frequente em crianças com SIC, e que pode levar à esteatose, à colestase e até à cirrose hepática. Juntamente com a sepse, a insuficiência hepática é a principal causa de óbito nos pacientes tratados com dieta parenteral⁽³⁾.

Segundo Goulet *et al*, citado por Cuffari *et al*, em neonatos submetidos à ressecção intestinal extensa, a presença de menos de 40 cm de intestino delgado em crianças com ressecção de cólon e ausência de válvula íleo-cecal está relacionada a uma forte associação com uso prolongado de NPT (mais de 48 meses)⁽³⁾.

Apesar da importância do comprimento intestinal como fator prognóstico da doença, a mensuração do seu comprimento é subjetiva e muito variável. Esforços têm sido direcionados para identificação de marcadores mais objetivos da insuficiência intestinal e que possam ser preditivos da necessidade de NPT por tempo prolongado.

Crenn *et al* relataram uma forte relação entre baixos níveis de um aminoácido plasmático e a dependência de NPT em adultos com SIC, sugerindo que este marcador produzido pela mucosa intestinal e denominado citrulina, poderá ser útil para prever o prognóstico em relação a NPT em crianças⁽³⁷⁾.

Na fase aguda o objetivo fundamental é o controle e a reposição das perdas hídricas e eletrolíticas decorrentes da diarreia intensa⁽⁴⁾. Todos os esforços são realizados no sentido de estimular o mecanismo de adaptação intestinal, para que o paciente tolere o maior volume possível de dieta enteral, assim como possa minimizar ou até mesmo evitar a exposição aos riscos e à morbidade relacionados à dieta parenteral^(1,2).

O mecanismo de adaptação intestinal deve ser estimulado com a introdução precoce de dieta enteral balanceada, com a função de exercer efeito trófico na mucosa⁽³⁷⁾. Também indispensável para o sucesso da adaptação intestinal, é a presença de motilidade e propulsão intestinal adequadas, com ou sem o auxílio de técnicas cirúrgicas⁽²⁾.

O leite materno quando disponível, é provavelmente a melhor forma de alimentação para os neonatos, promovendo proliferação celular e contribuindo para a resposta adaptativa do intestino residual. O volume de dieta administrado, pequeno no início, vai aumentando progressivamente até atingir o volume ideal ou o limite da capacidade absorptiva do paciente. A preferência é por infusão contínua, pois promove uma melhor absorção das calorias da dieta e, por isso, a gastrostomia é um procedimento útil no manejo desses pacientes⁽¹⁾.

Medicamentos que reduzem a hipersecreção gástrica, incluindo antagonistas de receptores H2 de histamina e inibidores da bomba de prótons⁽³⁾, a somatostatina e seu análogo octreotide que inibem a secreção pancreática e gastrointestinal exócrina e endócrina⁽³⁸⁾, o ácido ursodesoxicólico que estimula o fluxo de bile e alivia a disfunção hepática agravada pelo uso de NPT e a colestiramina que diminui o efeito catártico dos sais biliares são algumas das medicações utilizadas no auxílio do tratamento clínico da SIC.

Agentes farmacológicos para diminuir o trânsito intestinal e melhorar a absorção dos nutrientes, como os opióides, têm sido administrados para o tratamento da diarreia, entretanto o uso pediátrico desses medicamentos estão permitidos apenas acima de 12 anos.

O desequilíbrio da flora intestinal, com hipercolonização bacteriana, deve ser suspeitado quando ocorrer mudança na capacidade absorptiva, mudança nas características da diarreia do paciente, e presença de dilatação de alças intestinais evidentes na radiografia. O tratamento é empírico, com antibióticos para gram positivos, negativos e anaeróbios.

A glutamina, oral ou intra-venosa, pode prevenir ou recuperar a atrofia intestinal causada pelo uso prolongado da NPT, aumentando a hiperplasia da mucosa⁽⁴⁾, entretanto alguns estudos revelam resultados controversos em relação à sua utilização, assim como em relação às terapias hormonais com hormônio do crescimento e peptídeo 2 *glucagon-like*. Por esta razão estas substâncias, apesar de influenciarem no processo de adaptação intestinal, não são utilizadas rotineiramente no manejo clínico da SIC^(2,4,36).

Paralelamente à terapia medicamentosa da SIC, procedimentos cirúrgicos podem ser utilizados visando melhora do quadro clínico desses pacientes.

2.1.5 Alternativas Cirúrgicas

A intervenção cirúrgica em pacientes com SIC deve ser considerada apenas após um período de um ano de manejo clínico, tempo mínimo para permitir que a adaptação intestinal se complete nestes pacientes. Mesmo após este período, se o paciente estiver estável, apresentando boa aceitação e progressão da dieta enteral, com mínimos problemas em relação à NPT, a intervenção cirúrgica deve ser postergada⁽¹⁾.

Apenas um grupo de pacientes deve ser considerado candidato a uma das muitas técnicas cirúrgicas utilizadas em pacientes com SIC. Neste grupo encontram-se os pacientes com complicações relacionadas à nutrição parenteral, à estase, à dilatação intestinal, à propulsão inadequada com impossibilidade de avanço da dieta enteral e/ou piora na tolerância à mesma⁽³⁹⁾.

A abordagem cirúrgica da SIC visa corrigir anormalidades anatômicas e fisiológicas específicas da doença, tais como: diminuição da área de superfície mucosa, peristalse ineficaz e diminuição do comprimento intestinal. Trabalhos experimentais na tentativa de estabelecer modelos animais com SIC são descritos para estudo das técnicas cirúrgicas⁽⁴⁰⁾.

Sacher *et al* realizaram trabalho utilizando *mini-pigs* para criar um modelo animal de síndrome do intestino curto. Foram avaliados três grupos de animais submetidos à ressecção intestinal, sendo que no primeiro foram deixados 15 cm de íleo, no segundo 5 cm, e, no terceiro, foram mantidos 5 cm associados à uma

banda circular temporária para causar uma obstrução parcial e induzir dilatação da alça. Os autores concluíram que uma ressecção intestinal, mantendo apenas 5 cm de íleo terminal induziu SIC com desnutrição e perda de peso no segundo grupo de animais, porém sem dilatação intestinal, que somente foi conseguida no terceiro grupo. Como a dilatação intestinal é importante no modelo de intestino curto para estudar técnicas de alongamento intestinal, a estenose distal é mandatória⁽⁴⁰⁾.

As técnicas cirúrgicas para síndrome do intestino curto buscam encontrar um método eficaz de aumentar a capacidade digestiva e absorptiva intestinal, minimizando os efeitos da doença. Para isso é necessário, atrasar o trânsito intestinal, plicar alças intestinais dilatadas, alongar o intestino ou recuperar o intestino perdido através de transplante intestinal^(12,41,42).

2.2 ABORDAGENS CIRÚRGICAS EXPERIMENTAIS NA SIC

Entre as inúmeras técnicas testadas apenas em animais de experimentação encontram-se: a enteromiotomia helicoidal⁽⁴³⁾, colocação de expansor em alça intestinal isolada^(44,45,46) e alongamento intestinal por tensão mecânica⁽⁴⁷⁾.

A enteromiotomia helicoidal foi descrita por Dias *et al.* Estes autores realizaram enteromiotomia em segmento de jejuno de 5 cm de extensão, em ratos, e compararam com um grupo controle. O grupo em estudo apresentou aumento do calibre e do comprimento da alça em relação ao grupo controle⁽⁴³⁾.

Chen *et al.*⁽⁴⁴⁾ avaliaram as alterações anatômicas e histológicas em intestino delgado alongado por expansor tubular intra-luminal em coelhos. Uma porção isolada de 5 cm de íleo terminal foi fixada na parede abdominal com a porção proximal fechada e a porção distal exteriorizada como estoma. Após uma semana, introduziu-se um expansor tubular de borracha que foi preenchido inicialmente com 3 ml de água, sendo acrescidos 0,5 ml sucessivamente, a cada 12 horas, até completar 15 ml. Com o expansor totalmente preenchido, ele era mantido nessa alça isolada por duas semanas. Os autores concluíram que houve aumento do comprimento e da capacidade da alça isolada. Na avaliação

histológica houve hipertrofia das camadas muscular e serosa, e pouca alteração da submucosa e mucosa⁽⁴⁴⁾.

Puapong *et al* avaliaram a distensão de segmento isolado de alça intestinal em dois trabalhos, com dez e sete ratos *Sprague Dawley* respectivamente, comparados com grupos controle de mesmo tamanho. No primeiro utilizaram um dispositivo de metal para dilatar, de forma progressiva, um segmento de jejuno de 1,5 cm, isolado, a 10 cm do ângulo de Treitz⁽⁴⁵⁾; e no segundo, um segmento de 3 cm foi dilatado com infusão de solução salina a 0,2ml/h por meio de um cateter de silicone, durante uma semana⁽⁴⁶⁾. Ambos os estudos mostraram aumento da capacidade (volume da alça), aumento do diâmetro e hipertrofia da camada muscular, ausência de comprometimento das vilosidades e sem prejuízo das atividades enzimáticas (fosfatase alcalina específica e lactase)^(45,46).

Safford *et al* utilizaram tensão mecânica longitudinal, com um dispositivo intra-luminal, para produzir alongamento de segmento de alça intestinal cega, isolado e exteriorizado através da parede abdominal por ostomia em ratos. Os autores observaram crescimento intestinal pelo aumento do comprimento da alça e aumento da atividade da dissacaridase, sugerindo um potencial aumento da capacidade absorptiva⁽⁴⁷⁾.

2.3 ABORDAGENS CIRÚRGICAS EM PACIENTES COM SIC

Entre as técnicas cirúrgicas testadas experimentalmente e realizadas em pacientes com SIC encontram-se: as cirurgias para diminuir a velocidade do trânsito intestinal e causar dilatação, como as válvulas intestinais^(1,48) e as interposições de alças antiperistálticas⁽³³⁾; os procedimentos de diminuição da luz intestinal como a plicatura e o *tapping*⁽⁴²⁾; as técnicas de alongamento intestinal^(5,6,7,8,9); o transplante de intestino e as técnicas de engenharia de tecidos. Os princípios básicos e principais resultados destas técnicas serão apresentados a seguir.

2.3.1 Técnicas para Diminuição da Velocidade do Trânsito e para Dilatação Intestinal

As cirurgias para diminuir a velocidade do trânsito intestinal são indicadas nos casos de diarréia intensa e síndromes disabsortivas de difícil controle apenas com a abordagem clínica.

Várias tentativas de construção de mecanismos valvulares semelhantes à válvula íleo-cecal foram descritas, desde a criação de uma pequena intussuscepção intestinal (Figura 1) no sentido iso ou anti-peristáltico (Figura 2-A), até a colocação de um “colar” externo de teflon na circunferência da alça (Figura 2-B), foram relatados no intuito de diminuir a velocidade do trânsito intestinal⁽¹⁾. A criação de uma válvula de obstrução parcial da luz, visa induzir a dilatação da alça e a adaptação da mucosa, sendo utilizada por alguns autores como um procedimento preparatório para outro de alongamento intestinal^(1,48).

Collins *et al* observaram aumento de 42% do diâmetro de alças intestinais proximais ao local de confecção da válvula, em seis porcos, quando comparados com grupo controle. Houve aumento da espessura da mucosa, altura das vilosidades e profundidade das criptas⁽⁴⁸⁾.

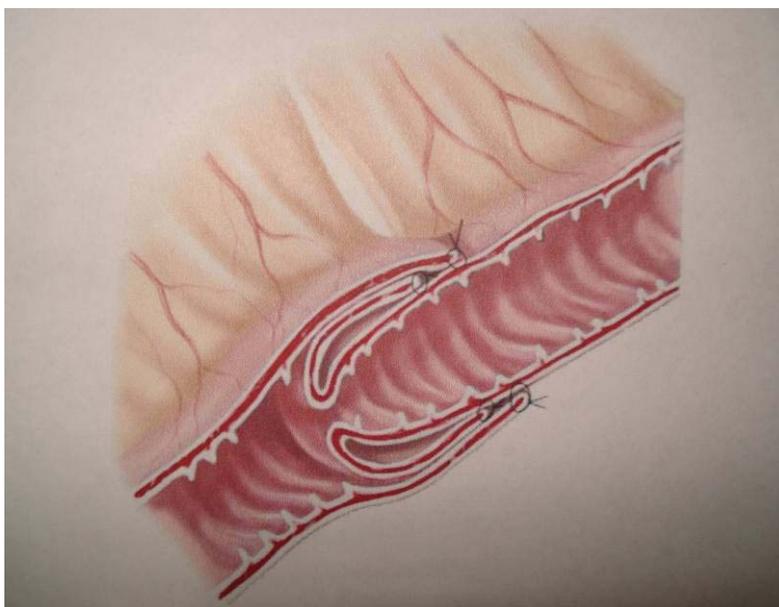


Figura 1- Desenho ilustrativo de invaginação intestinal como mecanismo de válvula. (Fonte: Hollwarth ME. Short-bowel syndrome. In: Puri P. Pediatric Surgery. Germany: Springer; 2006. p.273).

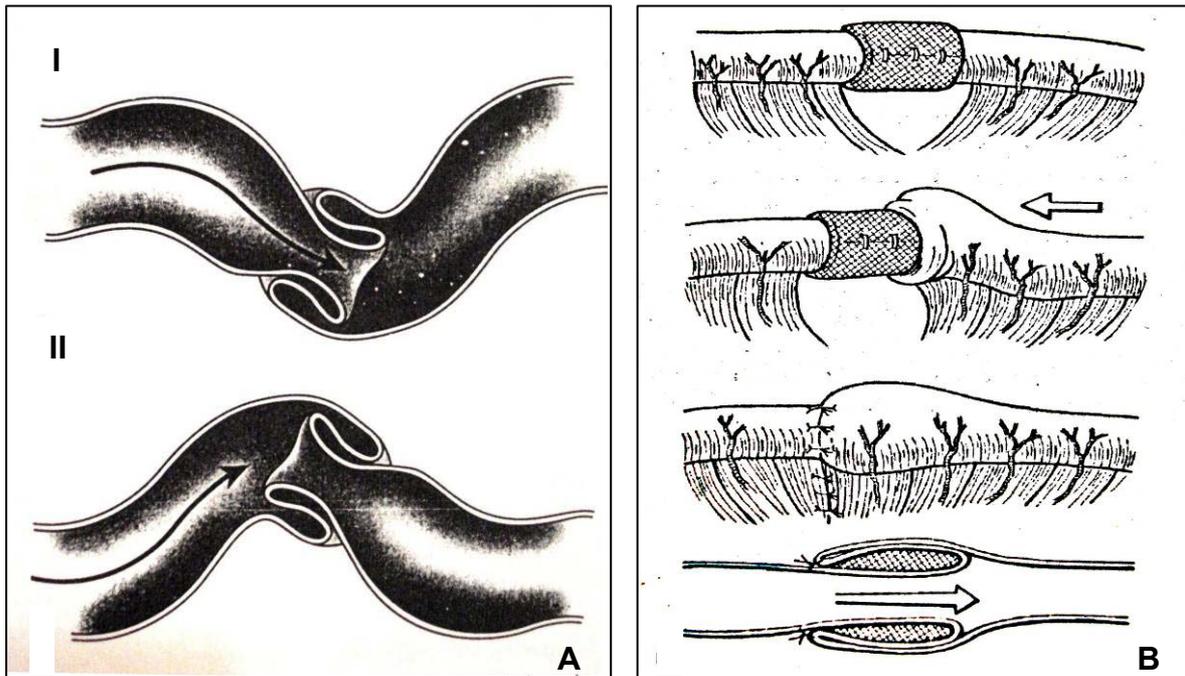


Figura 2- Válvulas Intestinais. **2-A** – Invaginação intestinal no sentido iso (I) ou anti-peristáltico (II). (Fonte: Warner BW. Short-bowel syndrome. In: Grosfeld JL *et al.* Pediatric Surgery. 6th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2006. p.1375); **2-B** – Colocação de prótese de politetrafluoretileno. (Fonte: Barbieri D. Síndrome do intestino curto. In: Maksoud JG. Cirurgia Pediátrica. 2ª ed. São Paulo: Revinter; 2003. p. 801).

A interposição de alça intestinal anti-peristáltica consiste na re-anastomose de segmento distal de alça intestinal após a sua excisão com suprimento sanguíneo mesentérico intacto e rotação de 180 graus, de forma que crie uma espécie de válvula funcional para lentificação do trânsito intestinal (Figura 3)⁽³⁴⁾.

O resultado à longo prazo permanece incerto, e em crianças existe a possibilidade desse segmento intestinal continuar crescendo levando à obstrução intestinal por longos segmentos anti-peristálticos. O uso dessa técnica também tem sido sugerido para promover benefício temporário enquanto ocorre a adaptação intestinal, causando dilatação e permitindo a aplicação de técnicas de alongamento intestinal.

Interposição de segmento de cólon sigmóide iso-peristáltico no manejo da SIC foi primeiramente descrito por Hutcher *et al* em 1973, após trabalho experimental com cães⁽³⁴⁾. Este procedimento pode ser utilizado com o mesmo objetivo do anterior, porém com a vantagem de contribuir com absorção de água, eletrólitos e nutrientes, além de apresentar alterações adaptativas na mucosa e musculatura lisa longitudinal (Figura 4).

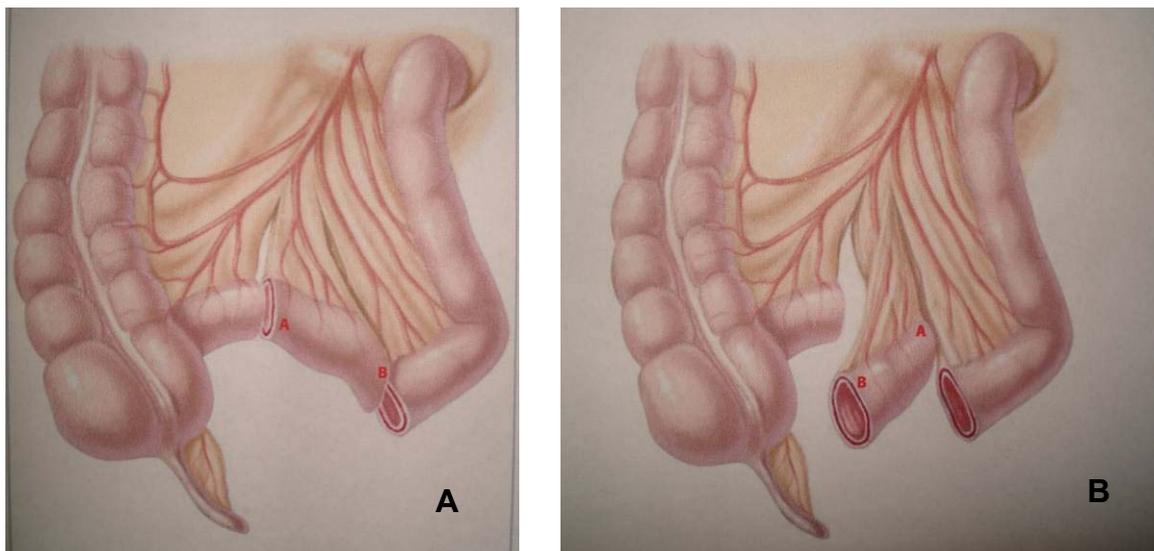


Figura 3- Técnica de diminuição da velocidade do trânsito intestinal. **3-A-** Isolamento de segmento de alça. **3-B** - Interposição de alça intestinal anti-peristáltica. (Fonte: Hollwarth ME. Short-bowel syndrome. In: Puri P. Pediatric Surgery. Germany: Springer; 2006. p.269).

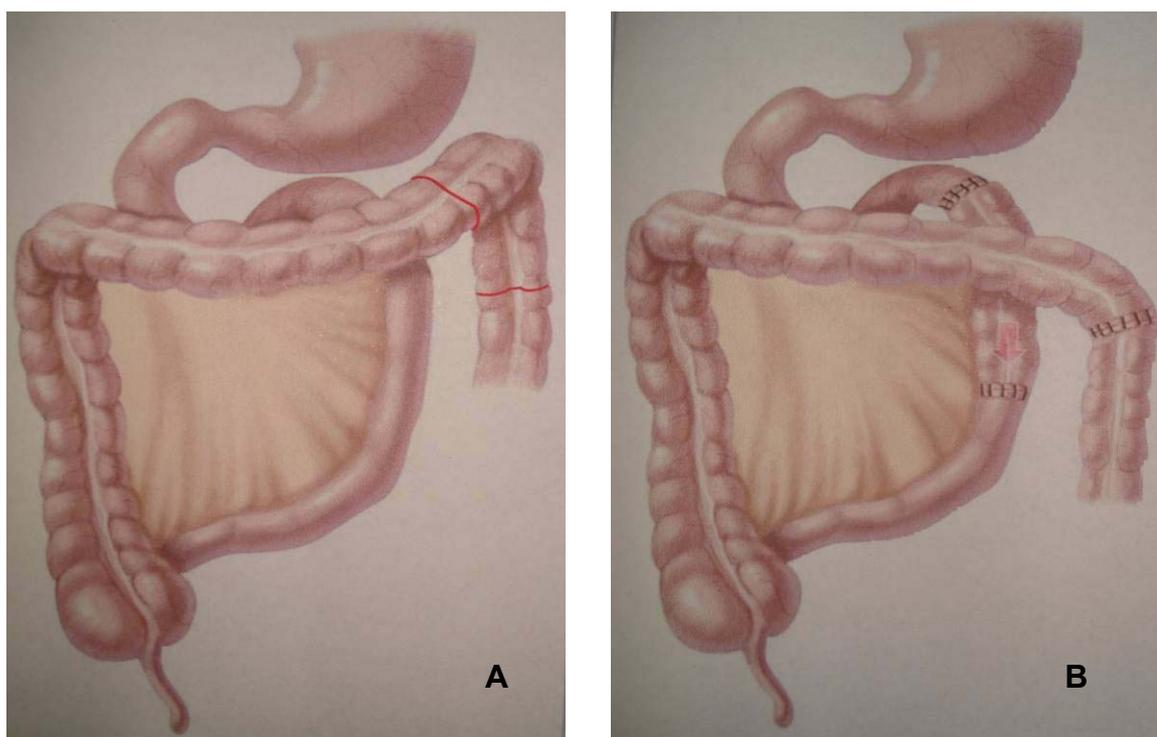


Figura 4- Técnica de diminuição da velocidade do trânsito intestinal. **4-A** – Delimitação de segmento de cólon; **4-B** - Interposição de alça de cólon isoperistáltico. (Fonte: Hollwarth ME. Short-bowel syndrome. In: Puri P. Pediatric Surgery. Germany: Springer; 2006. p.269).

2.3.2 Técnicas de Redução do Calibre da Alça

A dilatação intestinal está presente na grande maioria dos pacientes com SIC. Esta dilatação é responsável pela lentificação do trânsito intestinal, devida a contrações de baixa pressão da parede intestinal dilatada, levando à estase, super-crescimento bacteriano com a produção de toxinas e má-absorção^(1,4).

Em pacientes com dilatação de um segmento pequeno de intestino e comprimento intestinal suficiente, pode ser realizada a ressecção deste segmento e enteroanastomose término-terminal. Porém, em pacientes com intestinos muito curtos e segmentos dilatados longos, o *tapering* ou plicatura da alça promovem melhora da peristalse. Alguns pacientes com comprimento intestinal insuficiente necessitam associação desta com outras técnicas de alongamento intestinal⁽⁴⁹⁾.

O *tapering* intestinal é realizado por meio de excisão da porção anti-mesentérica do intestino dilatado, preservando a porção mesentérica e reconstruindo a forma tubular, com o intuito de diminuir a luz intestinal (Figura 5). Esta ressecção pode ser realizada com o auxílio de um grampeador cirúrgico no sentido longitudinal em relação à alça⁽⁴²⁾.

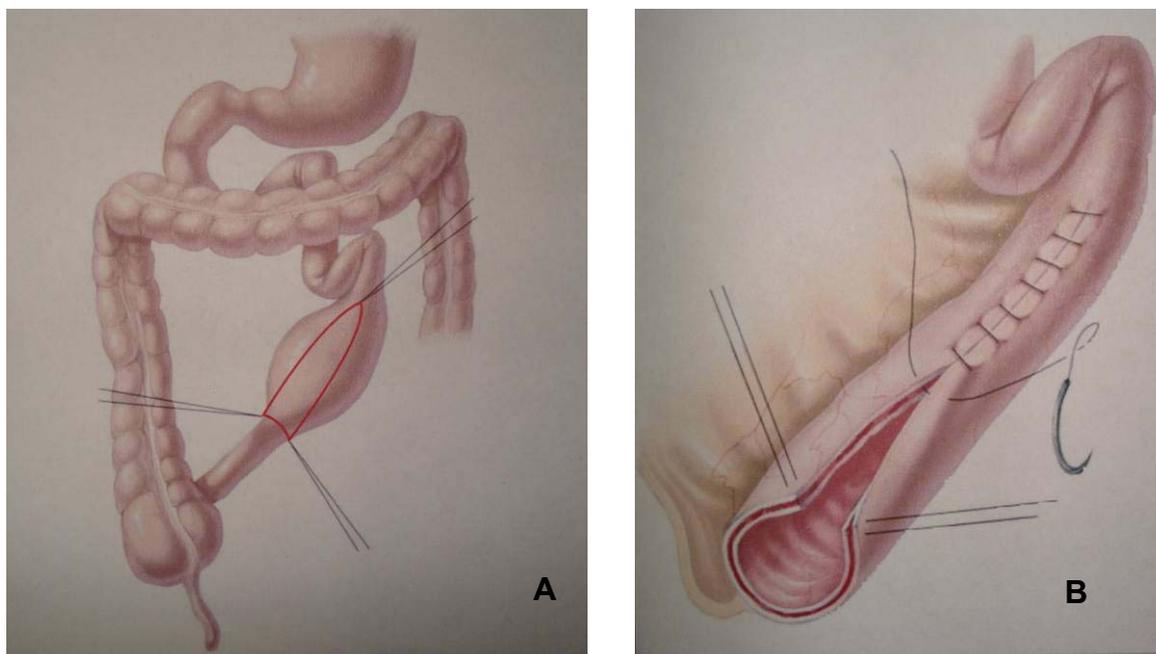


Figura 5- Técnicas de redução do calibre da alça - *Tapering*. **5-A** – Incisão na borda anti-mesentérica e ressecção de parte da alça dilatada; **5-B** – Reconstrução do tubo intestinal com sutura da alça após a ressecção. (Fonte: Hollwarth ME. Short-bowel syndrome. In: Puri P. Pediatric Surgery. Germany: Springer; 2006. p.259).

A plicatura é realizada através da inversão da borda anti-mesentérica, formando uma prega para o interior da luz intestinal (Figura 6). Como não é realizada ressecção, esta técnica não causa diminuição da superfície intestinal, porém o segmento invertido pode causar perda de continuidade com a parede da alça e evoluir para quadros de obstrução.

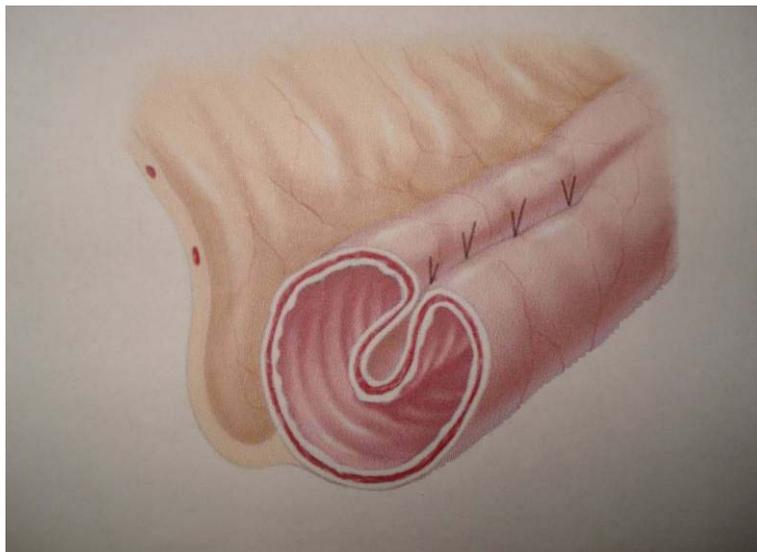


Figura 6- Técnicas de redução do calibre da alça – Plicatura intestinal da borda anti-mesentérica.(Fonte: Hollwarth ME. Short-bowel syndrome. In: Puri P. Pediatric Surgery. Germany: Springer; 2006.p. 265).

2.3.3 Técnicas de Alongamento Intestinal

A sobrevivência de crianças com SIC melhorou após a utilização de técnicas de suporte nutricional incluindo nutrição parenteral e enteral. Entretanto, as técnicas de alongamento intestinal resultam em melhora destes resultados com o aumento do comprimento do intestino, da motilidade, com o início de aumento progressivo de massa mucosa intestinal e da tolerância à dieta enteral⁽³⁹⁾.

Figuerola-Colon *et al* avaliaram sete crianças um ano antes e dois após procedimento de alongamento intestinal e observaram que os parâmetros de desenvolvimento pôndero-estatural foram mantidos ou aumentados devido a melhora do *status* nutricional, nos dois anos avaliados após o procedimento.

Houve aumento da tolerância à dieta enteral e diminuição do número de dias de hospitalização⁽³⁹⁾.

Bianchi *et al*, em 1980, descreveram uma técnica de alongamento intestinal, realizada em porcos, que consiste na divisão longitudinal da alça formando duas luzes intestinais nutridas por cada um dos folhetos mesentéricos anteriormente separados (Figura 7)⁽⁵⁾.

Os vasos mesentéricos bifurcam-se antes de chegarem na alça intestinal, sendo que cada ramo irriga uma metade da circunferência intestinal. Esta disposição da vascularização permite a formação de dois tubos intestinais que são posteriormente unidos com anastomose término-terminal isoperistáltica (Figura 8-A e B). A secção longitudinal para formação dos dois tubos é facilitada com o uso de sutura mecânica com *stapler* linear^(5,6) (Figura 7).

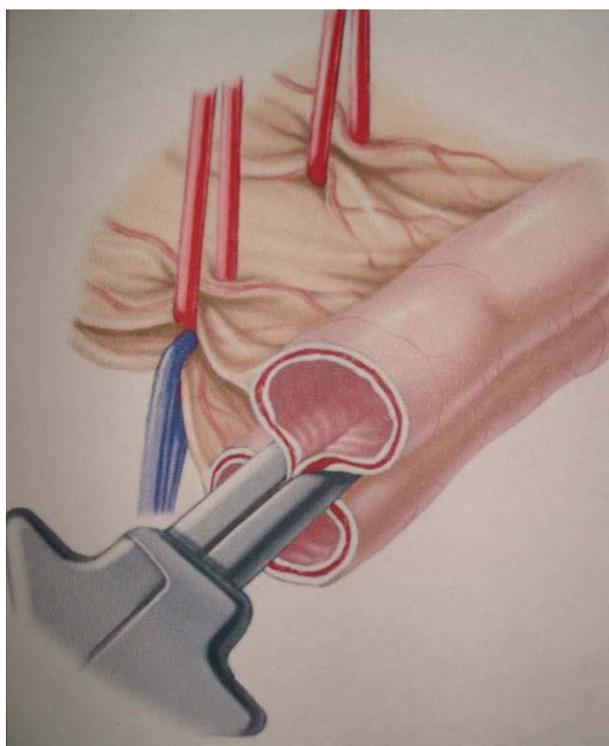


Figura 7- Secção da alça com auxílio do stapler. (Fonte: Hollwarth ME. Short-Bowel Syndrome. In: Puri P. Pediatric Surgery. Germany: Springer; 2006.p. 265-67).

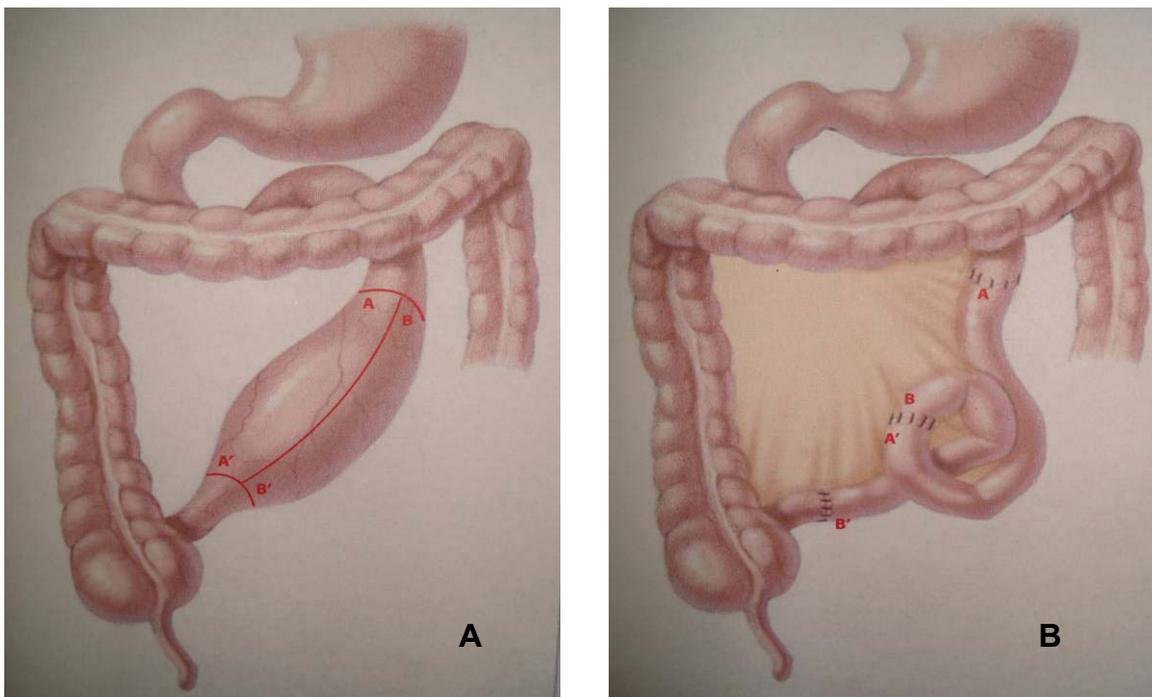


Figura 8- Técnica de Bianchi. **8-A** – Demarcações no segmento a ser seccionado; **8-B** – Aspecto final após as anastomoses. (Fonte: Hollwarth ME. Short-bowel syndrome. In: Puri P. Pediatric Surgery. Germany: Springer; 2006.p. 265-67).

Em 1999, o mesmo autor publicou os resultados da sua técnica em vinte pacientes, num período de dezesseis anos, mostrando bons resultados, com sete entre nove pacientes passando a receber exclusivamente dieta enteral. Não houve mortalidade intra-operatória e a principal causa de complicação e óbito foi relacionada à disfunção hepática, ocorrendo principalmente nos pacientes submetidos ao procedimento mais tardiamente⁽⁶⁾. O autor chama a atenção para a importância de realizar precocemente o procedimento, quando ainda estão em condições clínicas favoráveis, no intuito de reduzir o risco de estase, infecção e de lesão hepática letal⁽⁶⁾.

A dilatação intestinal, própria do processo de adaptação intestinal nos pacientes com SIC, facilita a realização do procedimento de Bianchi e o torna uma das opções, não somente no sentido de alongar a alça, como também de diminuir sua luz, facilitando a propulsão intestinal^(5,41).

Bueno *et al* questionaram a indicação desta técnica em pacientes com comprimento intestinal extremamente curto (menor que 50 cm), com icterícia ou submetidos à cirurgia no período neonatal, avaliando crianças com falha da técnica de alongamento intestinal que foram encaminhadas para transplante⁽⁵⁰⁾.

Walker *et al* avaliaram dezenove pacientes submetidos à cirurgia de Bianchi, sendo que sete foram submetidos apenas a esse procedimento e outros nove (60%) necessitaram transplante intestinal após cirurgia de Bianchi devido à insuficiência intestinal progressiva. Os autores relatam que apesar dos benefícios deste procedimento, ele ainda apresenta alta incidência de complicações⁽⁵¹⁾.

Apesar do transplante intestinal ser uma alternativa cada vez mais promissora nos casos de SIC, todos os esforços devem ser tomados na tentativa de manter e melhorar a função do intestino nativo. A cirurgia de Bianchi tem se mostrado como uma das opções para melhorar a sobrevida dos pacientes com SIC durante o inevitável período de espera por um transplante intestinal apropriado⁽⁵¹⁾.

O procedimento de Kimura e Soper foi proposto como alternativa aos pacientes que não eram candidatos à cirurgia de Bianchi, ou que tinham um mesentério limitado ou ausente associado ao intestino curto⁽⁷⁾.

Trata-se de um procedimento de alongamento intestinal em dois tempos, sendo que na primeira cirurgia uma alça de delgado é fixada pela borda anti-mesentérica à parede abdominal, ou a órgãos sólidos como o fígado, após abertura da camada sero-muscular e escarificação do peritônio ou do órgão no local onde será fixada a alça. O objetivo é promover neovascularização vinda da circulação sistêmica e após alguns meses (aproximadamente dois a três meses), o intestino é aberto longitudinalmente e dividido em duas metades que são retubulizadas e anastomosadas término-terminal como na cirurgia de Bianchi (Figura 9). A primeira parte é totalmente livre de mesentério e recebe vascularização sistêmica pela face anti-mesentérica, e a segunda recebe suplementação sanguínea pelos próprios vasos mesentéricos (Figura 10)⁽⁷⁾.

Os autores publicaram, em 1993, um caso de aplicação desta técnica em uma criança com apenas 17 cm de duodeno e 17 cm de cólon distal devido a um volvo de intestino médio intra-útero e conseguiram, alongamento intestinal significativo e boa aceitação de 50-60% das necessidades calóricas pela via enteral⁽⁷⁾.

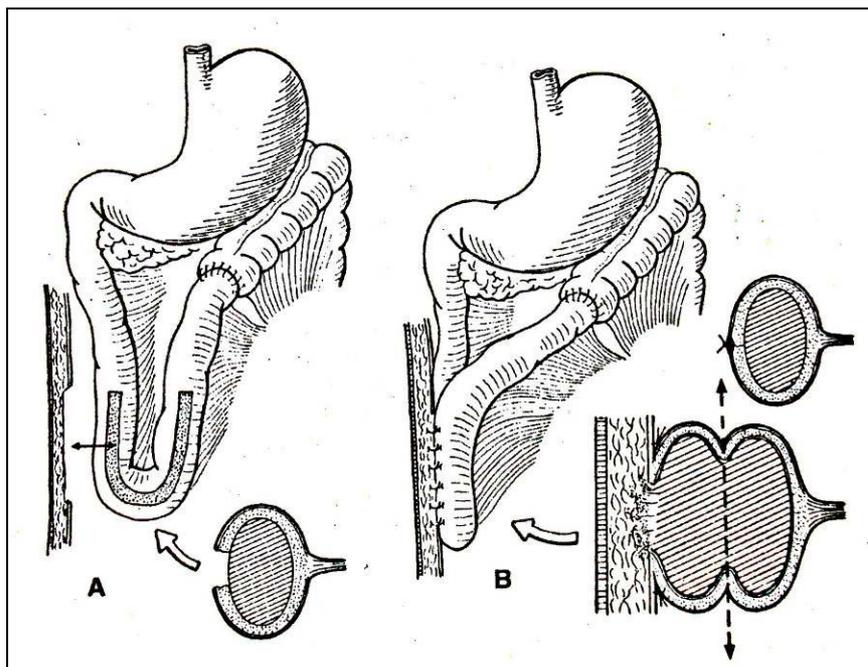


Figura 9 - Técnica de alongamento intestinal – Kimura e Soper: **9-A** – Abertura da camada sero-muscular para sutura da alça ao peritônio parietal; **9-B** – Secção longitudinal com divisão da alça dilatada para anastomose término-terminal. (Fonte: Barbieri D. Síndrome do intestino curto. In: Maksoud JG. Cirurgia Pediátrica. 2ª ed. São Paulo: Revinter; 2003. p. 803).

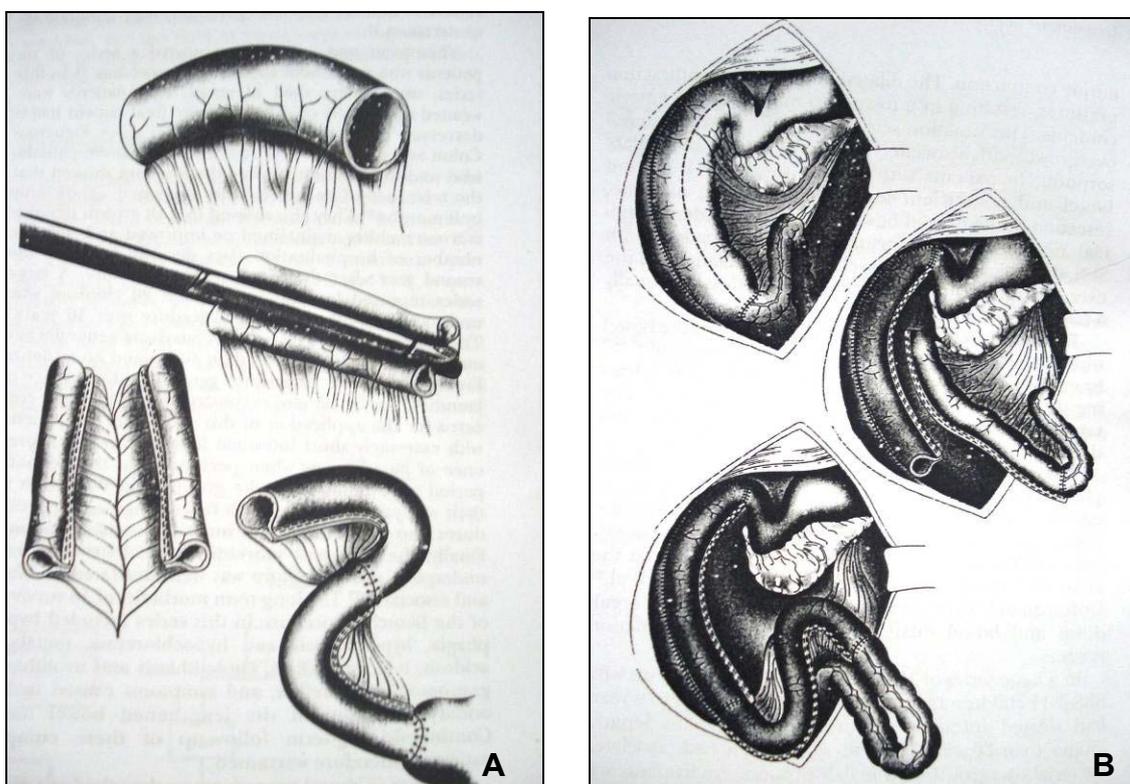


Figura 10 - Desenho esquemático das técnicas de alongamento intestinal: **10-A** - Bianchi . Divisão dos vasos mesentéricos e da alça no sentido longitudinal com auxílio do *stapler*, e reanatomose término-terminal; **10-B** – Kimura e Soper. Fixação da alça ao peritônio parietal e posterior secção longitudinal com anastomose término-terminal. (Fonte: Warner BW. Short-bowel syndrome. In: Grosfeld JL *et al.* Pediatric Surgery. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2006. p.1377).

2.3.3.1 Enteroplastia Transversa Seriada (*Serial Transverse Enteroplasty Procedure – STEP*)

Em março de 2003, Kim *et al* descreveram a técnica denominada *Serial Transverse Enteroplasty Procedure* (STEP – Procedimento de Enteroplastia Transversa Seriada), como uma nova opção cirúrgica de alongamento intestinal, na SIC⁽⁸⁾. Esta técnica, descrita primeiramente em porcos, utiliza diversas suturas mecânicas lineares, perpendiculares ao comprimento da alça e sequenciais, em direções opostas, no intuito de formar um “zig-zag”. Com isso, diminui-se a luz intestinal e aumenta-se o seu comprimento (Figura 11). Estas suturas são realizadas em sentido paralelo à direção dos vasos mesentéricos de forma que a vascularização da alça não seja colocada em risco⁽⁹⁾. Pequenos orifícios são feitos no mesentério para a colocação dos *staplers* em lados opostos em posições de 90° e 270°, considerando-se a borda mesentérica como zero grau. O diâmetro da nova luz é determinado pelo cirurgião com o ajuste dos *staplers* ⁽⁵²⁾.

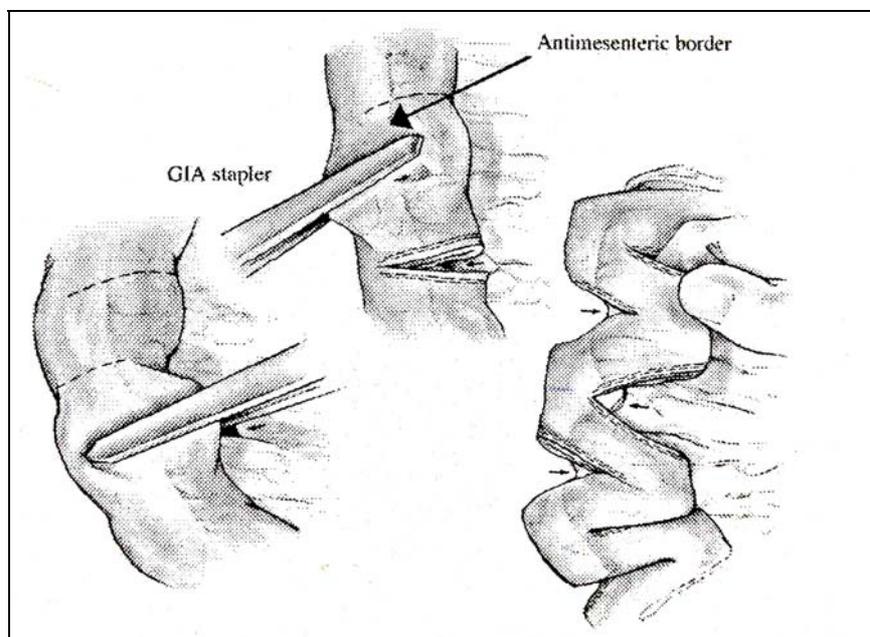


Figura 11. Desenho esquemático da técnica de STEP, mostrando, nas setas, os locais de realização das suturas mecânicas lineares, perpendiculares à alça e em direções opostas, formando um “zig-zag” (Fonte: Kim HB, *et al*. Serial transverse enteroplasty (STEP): a novel bowel lengthening procedure. J Pediatr Surg, 2003).

Em junho do mesmo ano, os autores desta técnica publicaram a sua utilização em uma criança com SIC⁽⁴¹⁾ e mais tarde, em 2005, publicaram os resultados à curto prazo de cinco crianças submetidas a mesma técnica no Children's Hospital Boston⁽⁹⁾. Não houve complicação no período peri ou pós-operatório e todos os pacientes mostraram melhora dos índices nutricionais com ganho de peso e aumento da percentagem de dieta enteral em relação à parenteral⁽⁹⁾. Em relação ao comprimento intestinal, houve um aumento significativo de 82%, comparando-se a medida inicial com a aferição imediatamente após o procedimento⁽⁹⁾. Dois dos cinco pacientes apresentavam comprometimento hepático, com os nomes já listados para transplante combinado de fígado e intestino. Destes, um apresentou normalização dos testes de função hepática após seis meses, o outro apresentou estabilização da doença hepática até ser submetido ao transplante combinado, com sucesso, após oito meses.

Os autores concordam que, assim como o procedimento de Bianchi⁽⁵¹⁾, o STEP não evita a necessidade de transplante, porém representa importante papel em melhorar a sobrevida dos pacientes com SIC durante o período de espera por um doador de órgãos⁽⁹⁾.

Essa técnica pode ser utilizada também em “bolsões intestinais” numa primeira abordagem de pacientes com gastrosquise⁽⁹⁾ e atresia intestinal^(49,52) com segmento proximal dilatado, como alternativa à ressecção deste segmento, sendo considerada portanto, não somente como um procedimento de alongamento intestinal como também um procedimento de redução da sua luz.

Ismail *et al* relataram um caso de aplicação do STEP em criança com atresia intestinal e volvo que necessitou ressecção maciça, permanecendo com segmento de jejuno proximal curto (35 cm) e dilatado. A realização do STEP na porção dilatada poupou uma ressecção adicional e propiciou alongamento desta porção, evitando segmento intestinal muito curto⁽⁴⁹⁾. Wales *et al* publicaram caso semelhante, também em criança com atresia intestinal, com sucesso⁽⁵²⁾.

A técnica de STEP apresenta como vantagem a possibilidade de até duplicar o comprimento da alça em pacientes com intestino curto, podendo ser utilizada, inclusive, após outro procedimento de alongamento intestinal^(8,9,41,49,52,53). Comparada com os procedimentos de Bianchi e de Kimura e Soper, o STEP é considerado simples de ser realizado, não necessita

anastomoses intestinais e pode ser aplicado a vários graus de dilatação intestinal⁽⁵²⁾.

Chang *et al* estudaram o impacto do STEP na função intestinal em um modelo de SIC em porcos. Após seis meses, o grupo de animais submetido ao procedimento STEP apresentou aumento do comprimento intestinal significativo, maior ganho de peso, aumento da absorção de carboidratos medida pela absorção de D-xilose, aumento da capacidade absorptiva de gordura medida pela vitamina D sérica e níveis de triglicerídeos, e aumento da citrulina sérica, marcador de massa mucosa intestinal, em relação ao grupo controle⁽⁵⁴⁾.

Além desse, diversos outros trabalhos que utilizam a técnica STEP mostram melhora no ganho de peso, estado nutricional e absorção intestinal após a utilização da mesma^(8,9,41,54).

Uma das dificuldades de popularização deste procedimento é que necessita em média 15 disparos de *stapler* em cada caso⁽¹¹⁾, sendo o custo maior do que com a utilização de outras técnicas. Outro ponto observado e que não é tema de comentários nos trabalhos da literatura, é que ocorre um reposicionamento das fibras musculares da parede intestinal ao longo da alça após a realização das suturas transversais, uma vez que as circulares passam a longitudinais e vice-versa, com várias interrupções.

Embora as técnicas de alongamento intestinal mostrem aumento significativo do comprimento das alças e redução da luz intestinal, permanece interrogado o ganho de superfície absorptiva nestes pacientes, já que no pós-operatório a área interna das alças é exatamente a mesma. Alguns trabalhos relatam uma hipertrofia e proliferação da mucosa após a aplicação das técnicas, assim como um aumento da área absorptiva intra-luminal vindo da dilatação das alças⁽⁸⁾.

Georgeson *et al*, em 1994, observaram que após os procedimentos de Bianchi e Kimura, a alça intestinal tende a dilatar novamente, aumentando a superfície absorptiva mas resultando em recorrência de problemas como estase e crescimento bacteriano. Com isso, procedimentos sequenciais de alongamento intestinal poderiam ser utilizados⁽⁵⁵⁾.

Em trabalho experimental com porcos, Kim *et al* encontraram nova dilatação das alças intestinais após seis meses da confecção da técnica STEP⁽⁸⁾.

Conforme citado por Ehrlich *et al*, a redilatação do intestino delgado é comumente observada no seguimento de pacientes submetidos a alongamento intestinal. Estes autores publicaram dois casos de uma segunda aplicação do procedimento STEP, oito e seis meses e meio após a primeira, devido à redilatação com recorrência do crescimento bacteriano e má-absorção. A reaplicação do procedimento exigiu cuidado no grampeamento e remoção de segmentos de “alça-cega” que poderiam causar estase⁽⁵³⁾.

À longo prazo, a abordagem das redilatações recorrentes após procedimentos de alongamento intestinal, ainda não foi tratada em publicações.

2.3.4 Transplante Intestinal

O transplante intestinal é uma terapia definitiva promissora para pacientes com SIC e insuficiência intestinal, já com resultados surpreendentes de até 80% de sobrevida imediatamente após o transplante e altas taxas de autonomia digestiva completa adquirida pelos pacientes⁽¹⁰⁾.

Entretanto a morbidade e mortalidade relacionadas ao uso crônico de imunossupressores e toda a sua variedade de complicações infecciosas (infecções oportunistas) e neoplásicas (doenças linfoproliferativas pós-transplante), rejeição do enxerto e múltiplas hospitalizações, continuam promovendo dificuldades no manejo desses pacientes^(1,51).

Segundo Tzakis *et al*⁽³²⁾, o momento ideal de indicação do transplante intestinal é quando a criança começa a apresentar dificuldades de acesso venoso central para NPT ou sinais de disfunção hepática que ainda possam ser revertidos com a retomada da dieta enteral. Os mesmos autores concluíram, em trabalho avaliando 70 casos de crianças transplantadas, que os melhores resultados foram observados em crianças mais velhas, que ainda não apresentavam disfunção hepática e que não estavam hospitalizadas antes do transplantes⁽³²⁾.

A maioria dos centros de transplante intestinal recomenda que os pacientes sejam encaminhados precocemente, antes que desenvolvam complicações como sepse e insuficiência hepática progressiva⁽⁵⁰⁾. Entretanto, a dificuldade em encontrar doadores faz com que o tempo de espera seja, às vezes, maior do que

a média de sobrevida esperada para este grupo, podendo ir a óbito enquanto aguardam o transplante.

Nesses casos as técnicas de alongamento intestinal, diminuição da velocidade do trânsito e redução do calibre da luz intestinal podem ter papel importante em melhorar os sintomas e amenizar as complicações infecciosas e de disfunção hepática enquanto é planejado o transplante intestinal⁽⁵⁰⁾.

2.3.5 Engenharia de Tecidos

O objetivo da engenharia de tecidos é criar tecidos capazes de substituir, da forma mais funcional possível, outros tecidos lesados ou ausentes. Consiste em estimular a migração, a proliferação e a diferenciação celular a partir de cultura de células em matrizes tridimensionais. Estas matrizes podem ser retalhos de polímero, AlloDerm ou submucosa de intestino delgado⁽⁵⁶⁾.

A engenharia de tecidos oferece uma alternativa atrativa para a substituição intestinal. Alguns modelos experimentais utilizam polímeros tubulares biodegradáveis semeados com células epiteliais intestinais. O suprimento sanguíneo é originário do mesentério e após algum tempo é notada a formação de cistos de neointestino que podem ser anastomosados ao intestino nativo⁽¹⁾.

Diversos trabalhos experimentais sugerem que a engenharia de tecidos terá futuramente um papel importante na SIC^(1,56).

2.4 SUBMUCOSA DE INTESTINO DELGADO - SID

(SMALL INTESTINAL SUBMUCOSA - SIS)

Paralelamente aos experimentos na área de engenharia de tecidos, estudos têm sido realizados na tentativa de utilizar matrizes biológicas acelulares na substituição dos tecidos perdidos ou danificados e confecção de próteses. Diversos materiais, como a dura-máter humana, o pericárdio bovino⁽⁵⁵⁾ e as submucosas de intestino delgado (SID) e de bexiga urinária⁽⁵⁷⁾, são utilizados para este fim⁽¹⁵⁾.

A SID porcina é a que tem sido estudada com maior frequência. Foi primeiramente descrita como prótese biológica utilizada como substituto vascular, e a partir de então vem sendo utilizada em diversas outras áreas^(12,17).

Badylak *et al*⁽¹⁸⁾ testaram e comprovaram a habilidade de aderência e proliferação de seis tipos diferentes de células cultivadas em matrizes extracelulares (ECM), de submucosa de intestino de porco e de bexiga urinária, e observou *in vitro* a migração e organização espacial das células sobre estas matrizes.

Segundo Hodde⁽⁵⁹⁾, as ECMs derivadas de tecido porcino estão associadas à repopulação rápida e extensa por células do hospedeiro quando utilizadas no reparo de tecidos *in vivo*. Até o momento constatou-se que suas características histológicas estimulam o reparo de órgãos e tecidos lesados, com formação de tecido similar em estrutura e função aos tecidos vizinhos⁽⁵⁸⁾. Esta neoformação tecidual sobre a matriz acelular com células similares às do tecido onde foi implantada é chamada de “remodelação inteligente”⁽¹⁷⁾.

Uma variedade de estudos experimentais já utilizaram a SID como bioenxerto no reparo de bexiga⁽²²⁾, ureter⁽²⁰⁾, uretra⁽⁶⁰⁾, esôfago^(16,23,57), intestino delgado^(11,13,14,19), parede abdominal⁽¹⁵⁾, traquéia⁽⁶¹⁾, tendões⁽⁶²⁾ e ligamentos^(63,64), diafragma⁽⁶⁵⁾, células musculares lisas e duramáter⁽²⁸⁾. Matrizes acelulares também foram utilizadas com sucesso como *bypass* arterial coronariano, reconstrução de válvula cardíaca^(13,55) e próteses e enxertos vasculares⁽¹²⁾.

2.4.1 Características Histológicas e Estruturais

A SID consiste em uma matriz tridimensional contendo vários tipos de colágeno extracelular, tipo I, III, IV, V e VI, proteínas estruturais como proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas, e fatores de crescimento (VEGF e PDGF)^(57,58).

O colágeno fornece suporte estrutural e estabilidade ao tecido, permitindo que este se incorpore ao tecido do hospedeiro e permita a infiltração de células.

As proteínas estruturais conferem bioatividade a diversas citocinas, estimulam a divisão, migração e diferenciação celular, e auxiliam na aderência e interação entre as células e a matriz⁽¹⁵⁾.

A submucosa intestinal é rica em fatores de crescimento que participam ativamente da migração, da proliferação de fibroblastos e da angiogênese, atuando na revascularização e cicatrização de ferimentos^(15,17).

O fator de crescimento do endotélio (VEGF) induz a formação de estruturas similares aos capilares na matriz tridimensional de fibrina, promovendo uma neovascularização local. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) atua na proliferação fibroblástica e é suplementado pela imediata deposição de fibronectina, proteína com atividade quimiotóxica e adesiva responsável pela retenção de células do hospedeiro no local da ferida⁽¹⁷⁾.

Segundo alguns autores a resposta imune da SID parece limitar-se à ação dos linfócitos T-helper 2, produzindo anticorpos não ligados ao complemento, contribuindo para os baixos índices de reação imunológica e rejeição do tecido implantado. Quando comparada a materiais sintéticos, a SID apresenta maior resistência à infecção, o que pode estar relacionado à rápida neovascularização induzida pelo enxerto após o implante^(15,17).

Holtom *et al*, com o intuito de verificar as propriedades antimicrobianas inerentes à SID, sugeridas por alguns trabalhos, realizaram experimento mostrando a ausência desta atividade em discos de submucosa colocados em placas com semeadura de seis bactérias diferentes, sendo que a SID não causou inibição do crescimento desses organismos, permitindo inclusive, crescimento de colônias sobre a submucosa⁽⁶⁶⁾.

Em relação às propriedades estruturais a SID apresenta porosidade que permite a infiltração de células, crescimento vascular e limitado fluxo de água. Apresenta força e flexibilidade semelhantes ao intestino delgado, e são mais complacentes do que os materiais sintéticos ou enxertos venosos⁽¹⁷⁾.

2.4.2 Trabalhos Experimentais com SID

Apesar de já existirem produtos aprovados para uso médico da SID em situações específicas, mantém-se o interesse por estudos empregando a submucosa *in natura* submetida a métodos próprios de esterilização e conservação, como matriz colágena no reparo de diversas estruturas. Poucos trabalhos experimentais utilizam a SID comercializada (Surgisis®)^(65,67).

Como será exemplificado a seguir, a SID, já foi utilizada em diversas áreas da medicina com bons resultados.

Greca *et al* publicaram artigo comparando o emprego da SID com o uso de tela de polipropileno no reparo de defeitos de parede total do abdome de ratos. Concluíram que a SID é uma opção segura e eficaz, com maior depósito de colágeno I comparativamente à tela de polipropileno⁽¹⁵⁾. Em outro estudo comparativo, entre SID e pericárdio bovino como enxerto na veia cava de cães, Greca *et al* observaram resultados similares com ambos os materiais, sendo a SID uma outra opção para o reparo de lesões venosas extensas⁽²³⁾. Outros estudos, do mesmo autor, utilizaram anastomose de enxerto de SID em tendão em coelhos⁽⁶²⁾, em bexiga urinária de cães para aumento da capacidade vesical⁽²²⁾ e em ureter de porcos⁽²⁰⁾.

Em urologia, Lai *et al* também utilizaram SID para aumento da capacidade vesical. Os autores compararam o uso de dois tipos de matrizes, SID e enxerto de ácido poliglicólico, semeadas com células musculares autólogas como uma cobertura de suporte sobre o urotélio prolapsado após abertura dos planos musculares na ampliação vesical⁽⁶⁸⁾. Os mesmos autores realizaram trabalho utilizando SID semeada com células musculares esqueléticas para reparo de defeito abdominal em ratos, com melhores resultados quando comparados com o mesmo procedimento sem semeadura de células⁽⁶⁹⁾.

Existem relatos de uso de SID em: regeneração de cartilagem de orelha⁽⁷⁰⁾, regeneração de trompas uterinas⁽⁷¹⁾, substituto de duramáter⁽²⁸⁾, cicatrização de ligamento colateral medial do joelho⁽⁶⁴⁾, substituto de uretra⁽⁶⁰⁾, todos em coelhos, e reparo de defeitos na fáscia lata de cães⁽⁷²⁾.

O uso de SID em grandes defeitos diafragmáticos, foi relatado por Sandoval *et al*⁽⁶⁵⁾. Estes autores utilizaram a SID comercializada (Surgisis®), de 0,2 e 0,4 mm de espessura, em reconstrução diafragmática de cães com bons resultados.

Em relação ao uso de SID no trato gastrintestinal, Badylak *et al* realizaram sutura de retalho em lesões esofágicas parciais e enxertos tubulares em lesões completas de cães. Os animais foram reavaliados em tempos diferentes para coleta do material de estudo, variando de 4 dias a 15 meses, e foi observado que a SID foi incorporada completamente entre 30 e 60 dias com substituição da mesma por tecido muscular orientado e contíguo ao tecido adjacente⁽⁵⁷⁾.

Em outro estudo realizado em 2001, os mesmos autores utilizaram SID em reparo de lesão parcial de intestino delgado de 20 cães e de lesão total com colocação de enxerto tubular em quatro animais. Destes quatro cães, três foram a óbito por deiscência e um apresentou obstrução parcial. Entre os animais que receberam implante de retalho de SID houve presença de camada epitelial, musculatura lisa, colágeno e cobertura de serosa em diferentes estágios de organização, em período de pós-operatório que variou de duas semanas a um ano⁽³¹⁾.

Souza Filho *et al* publicaram os seus resultados do emprego de SID em estudos semelhantes, no reparo de lesões provocadas na parede anterior de esôfago cervical e abdominal⁽²³⁾ e em duodeno de cães⁽¹⁹⁾. Em ambos os casos, observaram ausência de infecção ou fístula e presença de re-epitelização completa da mucosa.

Parnigotto *et al*⁽¹³⁾ publicaram trabalho com uso de interposição de 2 cm de submucosa homóloga gástrica, tubulizada, para aumento da superfície intestinal de doze ratos *Sprague-Dawley*. A anastomose dos enxertos tubulizados foi realizada em alças isoladas de íleo, posicionadas em um túnel subcutâneo, com reavaliação em períodos de uma, três e seis semanas. Três ratos morreram por complicações pós-operatórias e os demais apresentaram diferentes graus de incorporação do enxerto.

Wang *et al*^(11,30) avaliaram regeneração e morfologia após a realização do mesmo procedimento descrito no trabalho de Parnigotto *et al*, porém utilizando submucosa intestinal homóloga, no íleo de ratos. Demonstraram formação de neomucosa com morfologia intestinal típica, caracterizada por uma camada de células epiteliais colunares com células caliciformes, células de Paneth, enterócitos absortivos e células enteroendócrinas nos enxertos tubulares de SID.

Em 2006, Ansaloni *et al* publicaram trabalho semelhante. Os autores anastomosaram um segmento tubular de 3 cm de comprimento de Surgisis® em segmento isolado de alça intestinal de ratos *Sprague-Dawley* e não observaram estenose ou aderências. Após 24 semanas ocorreu regeneração completa do intestino delgado com identificação das camadas mucosa, muscular e serosa⁽⁷³⁾.

2.4.3 Métodos de Preparo

Para atingir critérios de segurança clínica, materiais biológicos de tecidos animais devem ser submetidos a processos de tratamento para minimizar a resposta imune do hospedeiro e eliminar a possibilidade de infecção e transmissão de doenças⁽⁵⁸⁾.

Este processo de esterilização do material utiliza uma série de substâncias que podem interferir na bioatividade de componentes da matriz, importantes para a proliferação celular e desenvolvimento de novo tecido sobre ela. Por isso, muitos autores estudam o uso destas substâncias e sua ação na SID⁽⁵⁸⁾.

Hodde, Record e Badylak⁽⁵⁹⁾ concluíram, em trabalho experimental, que células endoteliais microvasculares humanas são capazes de aderir diretamente a matrizes extracelulares através de proteínas como colágeno tipo I, IV e fibronectina. A aderência e a proliferação celular são similares em matrizes submetidas ou não a processos de esterilização.

Hodde *et al* mostraram que é possível manter a arquitetura tridimensional da SID após esterilização da mesma com ácido peracético, liofilização e óxido de etileno. Fibronectina, glicosaminoglicanos e FGF-2 são mantidos, porém o fator de crescimento VEGF encontrou-se significativamente diminuído⁽⁷⁴⁾. Em um estudo sequencial, os mesmos autores, observaram que o FGF-2 que permanece na matriz é capaz de estimular a diferenciação das células PC12 e de estimular os fibroblastos a secretarem seu próprio VEGF endógeno. Com isso, após tratamento da SID com agentes oxidativos e alquilantes, necessários para oferecer segurança clínica no seu uso, o biomaterial manteve sua bioatividade intrínseca⁽⁵⁸⁾.

Embora alguns métodos de esterilização e tratamento da SID já estejam em fases avançadas de estudo, a maioria dos trabalhos experimentais que a utilizaram, o fizeram com formas variadas de tratamento.

Lai *et al*⁽⁶⁸⁾, após isolamento da SID, realizaram descélularização utilizando Triton X-100 0,2% e hidróxido de amônia 26,5 mmol/L por 10 a 14 dias, seguido de água desionizada por 72 h.

Badylak *et al*^(31,57) realizaram em seus trabalhos, tratamento da ECM de SID com banhos sucessivos de ácido peracético (0,1%) para promover a

descelularização do material, seguido de lavagens com solução salina para tornar o pH neutro. O processo de esterilização foi concluído com irradiação gama.

Parnigotto *et al*⁽¹³⁾, que obtiveram submucosa gástrica homóloga de ratos *Sprague-Dawley* para uso no aumento de superfície intestinal, prepararam o material com lavagens com solução salina tamponada contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina B, e, posteriormente, submeteram a matriz a um protocolo de descelularização.

Nos trabalhos de Wang *et al*^(11,30), utilizando SID, o processo de esterilização da submucosa foi feito com etanol 75%, lavagem com solução salina, e conservação das peças à 4°C em solução de sulfato de neomicina 10% por uma semana à três meses.

Um protocolo utilizado em diversos trabalhos por Greca *et al*^(19,20,22-24,62) para conservação e manutenção da SID, mantinha os enxertos apenas em solução de neomicina 10% após a lavagem dos mesmos com solução salina.

2.4.4 Tempo de Incorporação do Enxerto

Entre os diversos trabalhos encontrados na literatura^(11,13,30,57) que avaliaram a incorporação do enxerto de SID nos diversos órgãos, podemos observar uma grande variedade de tempos de reabertura para coleta do material de estudo. Esses tempos aparentemente foram escolhidos empiricamente pelos cirurgiões, além de variarem os modelos animais, os órgãos em estudo e a forma de uso do enxerto.

Badylak *et al*⁽⁵⁷⁾, em experimento com 15 cães e tempos de coleta do material de 4 dias a 15 meses, observaram total incorporação do enxerto de SID de 30 a 60 dias do seu implante em defeitos na parede esofágica. Houve substituição por tecido muscular esquelético contíguo ao órgão adjacente e formação de epitélio escamoso completo e intacto. Em nenhum animal a submucosa pode ser identificada macro ou microscopicamente após 50 dias.

Souza Filho *et al*⁽²³⁾ observaram reepitelização completa da SID e incorporação do enxerto avaliado após período único de sessenta dias, em trabalho semelhante em esôfago de cães.

Lopes *et al*⁽¹⁶⁾, em estudo experimental com 67 ratos submetidos a reparo com SID de defeito causado na parede anterior do esôfago cervical ou abdominal, observaram que, com 150 dias, houve total substituição do enxerto por tecido esofageano com epitélio escamoso estratificado e regeneração completa de fibras musculares, porém não foram realizadas avaliações antes desse tempo.

Ao avaliarem a incorporação do enxerto de submucosa gástrica em íleo de ratos, Parnigotto *et al*⁽¹³⁾ identificaram, após uma semana, presença de espessamento da área de enxerto com múltiplos fibroblastos, células inflamatórias, neovascularização evidente, fibras musculares e serosa revestindo externamente a matriz e ausência de epitelização. Com três semanas houve presença das quatro camadas da parede intestinal, superfície epitelizada com vilosidades e duas camadas de células musculares bem visíveis. Na sexta semana as camadas de células musculares tornaram-se evidentes e grande quantidade de células calciformes e criptas puderam ser visibilizadas.⁽¹³⁾

Greca *et al*, ao avaliarem implante de SID como alternativa para ampliação vesical em cães, observaram proliferação do urotélio recobrando toda superfície do enxerto e presença de algumas fibras musculares lisas em 100% dos casos, com 30 dias de evolução⁽²¹⁾.

Poulose *et al*⁽⁷⁵⁾, em 2005, avaliaram o implante de SID na superfície peritoneal de doze porcos utilizando como parâmetros o depósito de colágeno e a neovascularização. O resultado foi a incorporação parcial e total do enxerto em grupos avaliados após duas e oito semanas respectivamente. Esses autores observaram contração significativa do enxerto após oito semanas, sendo portanto, sugerido por eles, que em reparos de hérnias com SID deva-se usar áreas maiores de enxerto quando comparadas ao uso de materiais sintéticos⁽⁷⁵⁾.

2.4.5 Uso da SID em Humanos e Disponibilidade Comercial

O grande número de pesquisas *in vivo* envolvendo materiais utilizados como matrizes acelulares no desenvolvimento de tecidos, assim como estudos sobre os processos de esterilização e conservação das mesmas, permitem que algumas delas já estejam disponíveis para utilização em humanos.

Produtos como Contigen® (a base de colágeno), Allo Derm® e Permacol® (matrizes dérmicas a base de colágeno), Surgisis® e Symphaxis® (SID) são exemplos atualmente autorizados para comercialização⁽⁶⁷⁾.

Considerando apenas o uso dos produtos feitos com SID, o Surgisis® está disponível em duas espessuras, 0,4mm e 0,2mm, e tem sido utilizado em diversas aplicações cirúrgicas como em herniorrafias inguinais^(25,26,75), abdominais⁽⁷⁶⁾ e diafragmáticas⁽²⁹⁾, e em dermatologia no auxílio do reparo de úlceras venosas crônicas e feridas com dificuldade de cicatrização⁽⁵⁸⁾. Outras aplicações incluem: reparo vascular, substituição de dura-máter, correção de curvatura peniana na doença de Peyronie⁽⁷⁷⁾, ampliações vesicais e reparo de tendões e ligamentos^(27,57).

Holcomb III *et al*⁽²⁹⁾ realizaram três reparos de defeitos diafragmáticos congênitos extensos (Hérnia de Morgani - 2 casos, Hérnia de Bochdalek - 1 caso), por via videolaparoscópica, utilizando implante de Surgisis® (0,2mm). Em acompanhamento de quatro anos não foi observada recorrência em nenhum dos casos.

Helton *et al* utilizaram Surgisis® para reparo de hérnias abdominais ventrais em 53 pacientes e observaram segurança e resultados satisfatórios em cirurgias limpas e limpas-contaminada⁽⁷⁶⁾.

Em 2006, Gabriel *et al* relataram três casos de gastrosquises volumosas com dificuldade de fechamento da parede abdominal, em que foi utilizado Surgisis® com sucesso⁽⁶⁷⁾.

O Symphaxis® é utilizado em reparos uroginecológicos, tais como cistoceles, retoceles, enteroceles e cirurgia de incontinência urinária (*Sling*)⁽²⁶⁾.

A grande diversidade de aplicações desses produtos ainda está longe de ser esgotada, porém depende de estudos experimentais sistemáticos para confirmar a segurança e eficácia deste material nos diversos tecidos.

3. MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 INFRA-ESTRUTURA

Todo o estudo foi realizado nas dependências e laboratórios do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

A análise microbiológica do enxerto foi conduzida no Laboratório de Microbiologia do CCBS e os procedimentos cirúrgicos ocorreram nos Laboratórios de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do CCBS. Os animais foram mantidos no Biotério Central da PUCPR e os estudos anátomo-patológicos foram realizados no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR.

3.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para a realização deste estudo obedeceu-se à Lei Federal 6638 e as normativas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados 13 coelhos machos, New Zeland, albinos, incluindo três animais para o ensaio piloto e outros dez para o experimento, mantidos no biotério com temperatura ambiente e controle artificial de iluminação com períodos de 12/12h. Os coelhos foram adquiridos de criadouro particular pelo menos um mês antes do procedimento cirúrgico, para ambientalização, ganho de peso e desverminação com ivermectina 10mg/ml na dose de 0,4ml por coelho⁽⁷⁹⁾.

Os animais foram mantidos em quarentena, recebendo alimentação balanceada com ração específica para a espécie e água *ad libitum* até o início do jejum pré-operatório⁽⁷⁹⁾.

Durante todo o período, os coelhos ficaram em gaiolas individuais com grades e fundo de metal, com vasilhas também de metal para colocação de água e ração.

Cada animal foi numerado no dorso da orelha direita com uma caneta de tinta à base de água⁽⁷⁹⁾.

Após a realização de todos os procedimentos cirúrgicos, os coelhos foram divididos aleatoriamente em dois grupos de cinco (Tabela 1). Os animais do grupo A foram mantidos por um período de seis semanas de pós-operatório antes de serem submetidos à eutanásia para coleta do material de estudo, e os do grupo B por período de doze semanas. Cada animal foi acompanhado e seguiu um protocolo de acompanhamento pré e pós-operatório, conforme o encontrado no apêndice A.

Um prontuário com instruções de cuidados e medicações, a partir do primeiro dia de jejum até a liberação de ração seca *ad libitum*, foi elaborado para cada coelho, para ser seguido como forma de orientação para os funcionários do biotério no manejo dos animais. O prontuário do coelho de número um consta como exemplo no apêndice B.

Tabela 1 - Divisão dos animais em grupos

Grupo	Número dos coelhos
A	1,2,3,4,9
B	5,6,7,8,10

O protocolo da pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA-PUCPR), no dia 14 de agosto de 2006, sob o registro de número 153 (Anexo A).

3.3 PREPARO DOS ENXERTOS

3.3.1 Obtenção

Os segmentos de submucosa intestinal porcina utilizados para preparo dos enxertos foram obtidos a fresco, em frigorífico e abatedouro na região metropolitana de Curitiba (Frigorífico Argus Ltda.). Nas dependências do frigorífico, uma empresa terceirizada (Indústria e Comércio de Tripas Curitiba Ltda.) é responsável pelo isolamento da submucosa do intestino delgado do porco para uso na confecção de embutidos.

A submucosa foi obtida a fresco até quatro horas após o abate dos animais, já isolada das camadas mucosa e muscular por equipamento industrial próprio para esta finalidade. As alças intestinais passam por um sistema de rolos que “descascam” a submucosa, ficando as fibras e mucosa residuais para serem retiradas pelos próprios funcionários com lavagens e fricção.

Depois de isolada a submucosa, esta passa por um teste de integridade da membrana. O teste para avaliar a presença ou não de perfuração na submucosa é realizado com a injeção de água sob pressão no interior da sua luz. Após este teste, uma porção de 50 cm de submucosa foi coletada para o experimento.

No procedimento habitual, a submucosa segue para um processo de secagem e conservação para confecção de embutidos.

3.3.2 Transporte e Conservação

Os segmentos foram transportados em frascos de vidro com solução salina 0,9% e lavados antes do preparo dos enxertos.

A conservação se fez em geladeira de uso doméstico, à temperatura de 4 a 8°C por até 12 horas antes da confecção dos enxertos.

3.3.3 Confeção dos Enxertos

Considerando a forma tubular da submucosa, esta foi prensada para formar uma camada dupla (Figura 12), e colocada sobre metade de uma folha de papel filtro qualitativo (Qualy®) de 205 μm de espessura e 15 cm de diâmetro, a qual foi dobrada envolvendo a SID para formar uma estrutura mais estável, permitindo sua secção para confecção dos enxertos (Figura 13).

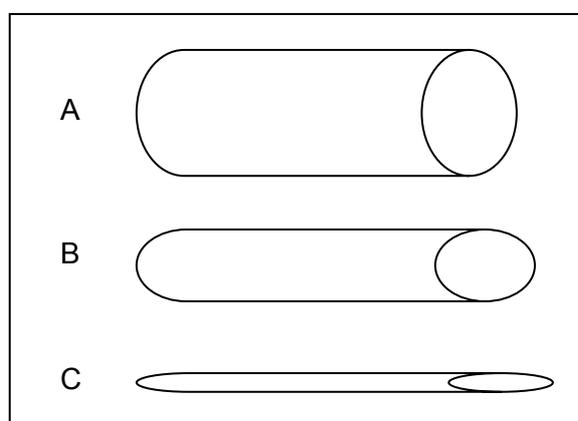


Figura 12- Desenho ilustrando a submucosa na forma tubular (A), sendo prensada (B) para formar uma dupla camada (C) e ser colocada sobre uma folha de papel filtro



Figura 13 - Camada dupla de submucosa sobre a folha de papel filtro (A), sendo envolvida (B) para formar uma estrutura estável (C) antes da sua secção para confecção dos enxertos

Depois de alinhada a SID com a borda dobrada do papel, foram feitos pontos de fio de *nylon* 5.0 agulhado, fixando a dupla membrana de submucosa ao papel filtro, e delimitando os vértices de um quadrado de 1x1 cm (Figura 14). Os quadrados foram seccionados com bisturi especialmente confeccionado, de cabo duplo e duas lâminas paralelas (Figura 15), com distância de 1 cm entre elas, conforme ilustrado na figura 14-B e C. Com o auxílio de uma tesoura delicada de uso doméstico, uma das superfícies do papel filtro foi retirada, mantendo-se apenas os vértices da submucosa fixados à outra superfície do papel que serviu como apoio para o manuseio do enxerto (Figura 16).

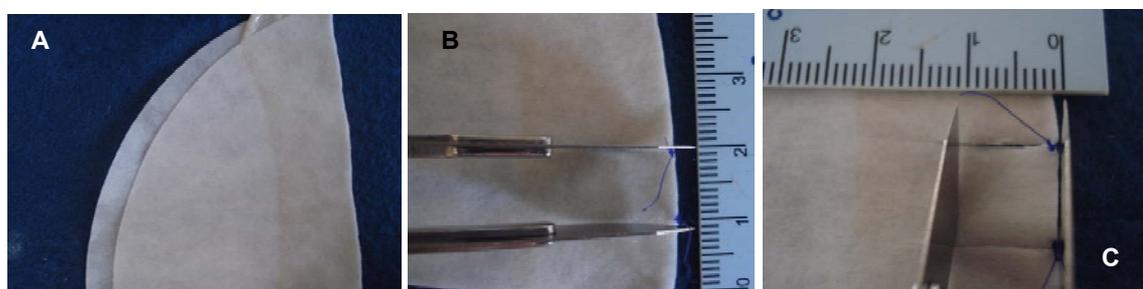


Figura 14 – 14-A - Camada dupla de submucosa porcina entre duas folhas de papel filtro com retificação da borda dobrada do papel; 14-B - Pontos de fio de *nylon* 5.0 para fixar a submucosa ao papel delimitando os vértices de um quadrado de 1x1 cm; 14-C - Secção da submucosa com bisturi especial de dupla lâmina com distância de 1 cm entre elas para confecção dos enxertos.

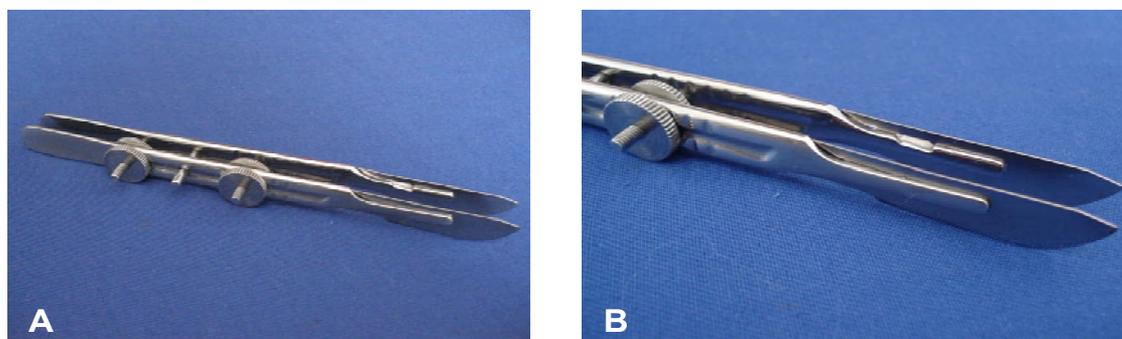


Figura 15 – 15-A – Bisturi utilizado para confecção dos enxertos; 15-B – Detalhe do bisturi com duplo cabo e dupla lâmina para regulagem do corte.



Figura 16 - Retirada de uma das superfícies do papel filtro, mantendo-se a outra para apoio e manuseio do enxerto.

Os enxertos de 1x1 cm foram colocados em frascos de coleta de exames, estéreis, de plástico, de 60 ml cada, contendo 40 ml de solução de neomicina 10% previamente preparada em farmácia de manipulação.

Para cada um dos dez coelhos foram preparados seis enxertos, que também foram mantidos em geladeira de uso doméstico, a uma temperatura entre 4 e 8°C, por período nunca maior do que uma semana antes da sua utilização no procedimento cirúrgico. Como era previsto o implante de quatro enxertos por coelho, optou-se por confeccionar dois enxertos extras, caso houvesse alguma intercorrência com eventual dano à eles.

3.3.4 Avaliação Bacteriológica do Enxerto

Após todo o processo de preparo e conservação, alguns dos enxertos foram enviados para análise quanto à presença, quantificação e qualificação de microorganismos, por uma equipe de pesquisadores da PUCPR que realizam essa avaliação de forma rotineira.

O projeto desenvolvido por essa equipe visa a realização de cultura, antibiograma e o desenvolvimento de uma técnica de esterilização da submucosa intestinal porcina, para utilizá-la como matriz com potencial de aderência de células mioblásticas no transplante das mesmas em miocárdio infartado de ratos Wistar⁽⁷⁸⁾.

Os enxertos enviados ao laboratório foram lavados com solução salina sob fluxo laminar, colocados em caldo TSB (caldo trípico de soja) e deixados em estufa a 37°C por 24 h. Este procedimento foi realizado em triplicata. Após este período foi retirada uma alíquota do caldo e semeada nos ágars Mac Conkey e Sabouraud, identificando-se colônias de bactérias que foram submetidas a testes bioquímicos para identificação do gênero e espécie.

A cultura e o antibiograma (teste de sensibilidade a antimicrobianos por difusão em disco) foram realizados conforme técnica padrão utilizada no Laboratório de Microbiologia da PUCPR. Esse trabalho teve o intuito de avaliar a eficácia da solução de neomicina utilizada para conservação do material.

3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

3.4.1 Cuidados pré-operatórios

No pré-operatório os coelhos ficaram em jejum de sólidos por período de 48 horas, e jejum completo, inclusive de líquidos, nas 6 horas que antecederam o procedimento.

Durante o período de jejum de sólidos foi oferecido água acrescida de glicose, sendo um frasco de 10 ml de glicose 50% diluído para cada recipiente de água de 250 ml. A glicose foi acrescentada com o objetivo de amenizar o apetite do coelho durante o período de jejum^(36,80,81).

3.4.2 Indução Anestésica

A indução anestésica foi realizada com injeção intramuscular de cloridrato de ketamina (50 mg/ml) e cloridrato de xilasina (23 mg/ml).

A dose da ketamina foi de 35 mg/kg (0,7 ml/kg) e a da xilasina 10 mg/kg (0,43 ml/kg), porém existiu grande variação entre os coelhos em relação a quantidade de anestésico necessária para a indução e a manutenção do efeito anestésico^(79,82).

Antibiótico profilático foi administrado após a indução anestésica, por via subcutânea nas seguintes doses: 0,15ml/kg ou 6mg/kg de peso de gentamicina

40mg/ml (Gentocin®) e 0,25 ml/Kg ou 100/20 mg/kg de sulfa/trimetoprim 400 e 80 mg/ml (Tribissen®).

Seguiu-se a obtenção de acesso venoso em veia do dorso da orelha para manutenção da anestesia (Figura 17) e hidratação. Procedeu-se o preparo da região abdominal com a tricotomia com tricótomo elétrico Golden A5 da marca Oster®.



Figura 17 – Acesso venoso em veia de dorso da orelha para manutenção da anestesia e hidratação.

3.4.3 Anestesia

Após indução anestésica os coelhos foram submetidos à anestesia geral conforme protocolo da instituição. Para a manutenção da anestesia, doses extras de ketamina foram administradas por via intravenosa conforme necessário⁽⁷⁹⁾.

Durante o procedimento cirúrgico os coelhos foram mantidos em ventilação espontânea, em ar ambiente e com solução de NaCl 0,9% e SG 5% intravenosos.

Toda a medicação utilizada foi adquirida em farmácia especializada em produtos veterinários, com exceção do tiopental, utilizado posteriormente para eutanásia, que foi adquirido pela Associação Paranaense de Cultura - PUCPR.

3.4.4 Cirurgia

Sob anestesia, o coelho foi colocado sobre uma mesa tipo calha em decúbito dorsal, com fixação em extensão dos membros anteriores e posteriores, com amarras de plástico.

A anti-sepsia da parede abdominal foi feita com PVPI degermante e tópico, antes da colocação de campos cirúrgicos estéreis. Em condições assépticas, a laparotomia foi realizada por meio de incisão mediana em abdome inferior e abertura por planos.

Identificou-se um segmento de alça de 25 cm de intestino delgado em íleo terminal, a 30 cm da ponta do apêndice cecal em direção proximal (Figura 18). Nos extremos desse segmento de 25 cm escolhido para estudo, foram feitos pontos de fio de *nylon* 4.0 na borda mesentérica para permitir sua localização durante a reintervenção e coleta do material. A intervalos de 5 cm nesse segmento, foram realizados quatro pontos com o mesmo fio, que serviram de referência para colocação dos quatro enxertos alternados de SID (Figura 19).

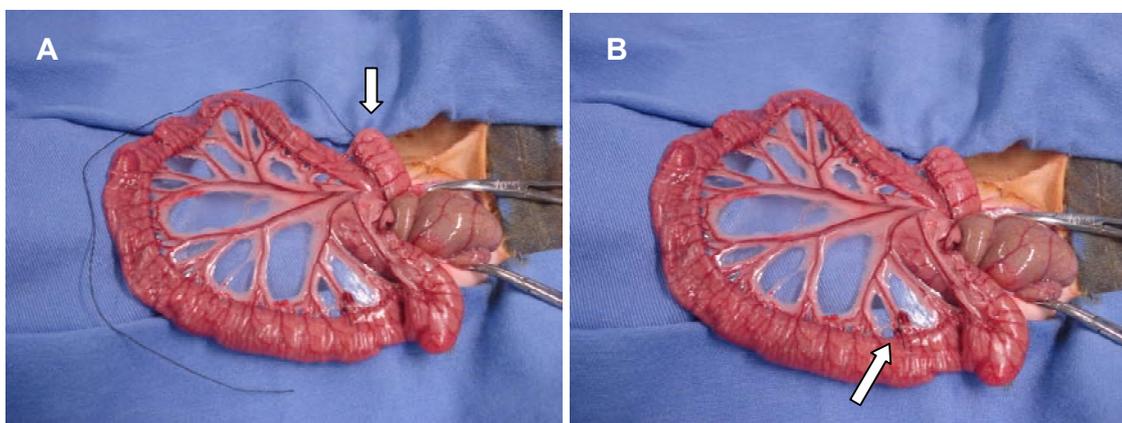


Figura 18 – 18-A - Escolha do segmento de alça para colocação dos enxertos com início há 30 cm do apêndice cecal apontado pela seta; **18-B** - Marcação do início do segmento escolhido com ponto de fio de *nylon* 4.0 (seta).

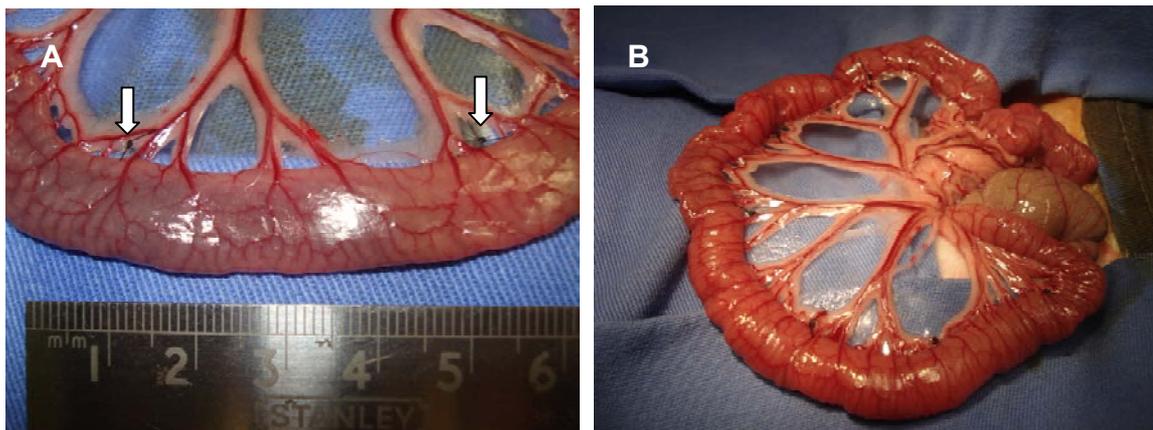


Figura 19 – 19-A – Delimitação de intervalos de 5cm; **19-B –** Marcação dos intervalos com pontos de fio de *nylon* 4.0 no segmento escolhido.

No local demarcado com o primeiro ponto de referência, foi realizada abertura de todos os planos da parede da alça em metade do seu diâmetro, da porção mesentérica à anti-mesentérica, onde foi suturado o primeiro enxerto (Figura 20). Esta incisão foi baseada na técnica de enteroplastia transversa seriada (STEP), proposta e realizada por Kim *et al* para diminuição da luz e alongamento intestinal⁽⁸⁾.

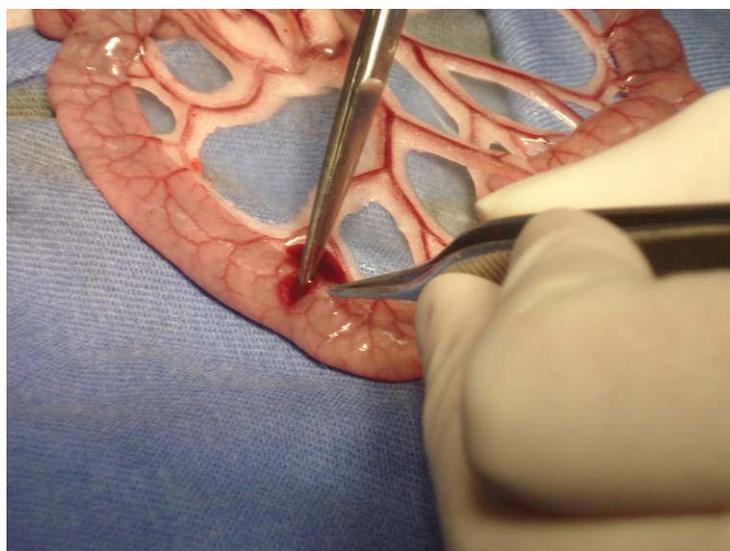


Figura 20 - Abertura de parede total da alça intestinal no local demarcado com o segundo ponto de fio de *nylon* 4.0, onde foi suturado o primeiro enxerto.

Este procedimento foi repetido nos demais pontos de referência, portanto, quatro vezes em cada coelho, sendo que nos pontos dois e quatro os enxertos foram suturados na face oposta.

Os enxertos de SID porcina previamente preparados, foram anastomosados com fio de polidioxanona 6.0 (PDS II 6.0®) através de sutura contínua, interrompida nos vértices da incisão (Figuras 21), seguindo a sequência dos pontos de referência, alternando face anterior e posterior do segmento de íleo escolhido para estudo. As suturas foram realizadas com auxílio de lupa cirúrgica com aumento de 3 vezes, modelo BLS-1, Neitz®.

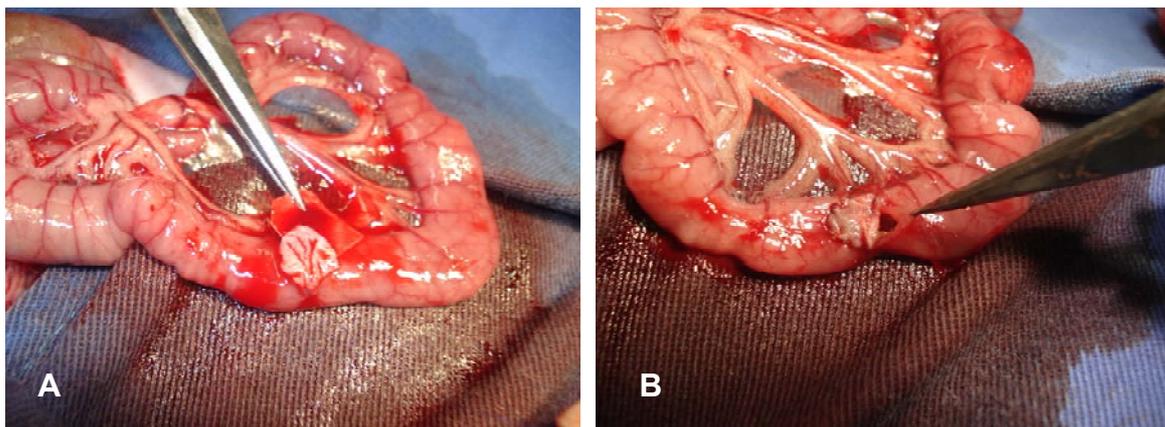


Figura 21 – 21-A – Colocação do enxerto sobre a incisão na alça intestinal; **21-B -** Sutura do enxerto de submucosa à alça intestinal com fio de polidioxanona 6.0.

Após a conclusão do procedimento cirúrgico, do teste das suturas para detectar extravazamento de conteúdo luminal (Figura 22-A) e da revisão da hemostasia, a alça contendo os enxertos (Figura 22-B) foi recolocada na cavidade abdominal. A parede abdominal foi fechada por planos com fios de poliglactina 3.0, violeta (Vicryl 3.0®) e fio de *nylon* 4.0 e o curativo foi realizado com gaze e esparadrapo.

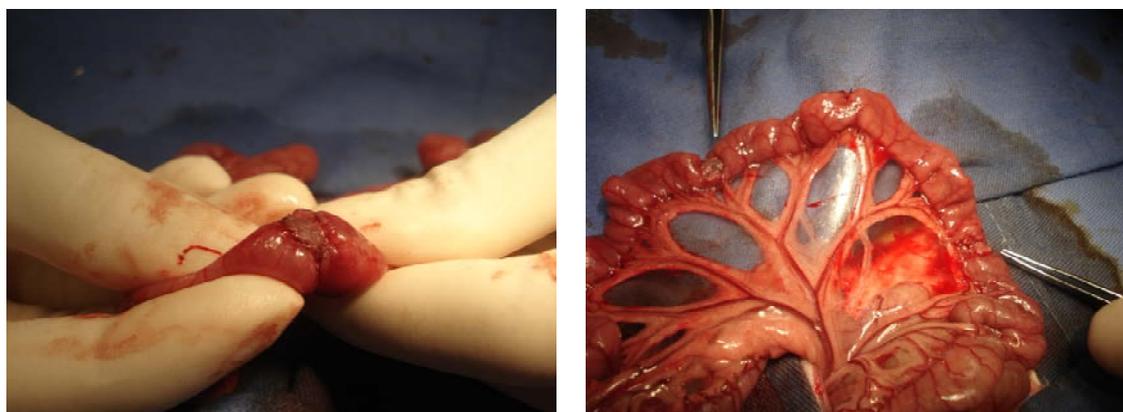


Figura 22 – 22-A - Teste da anastomose do enxerto à alça intestinal; **22-B -** Alça intestinal com os quatro enxertos de submucosa porcina já implantados, dois de cada lado, conforme apondados pelas pinças.

Todos os fios cirúrgicos utilizados foram fornecidos pela empresa Ethicon/Johnson e Johnson.

3.5 PÓS-OPERATÓRIO

Os coelhos receberam analgesia no pós-operatório imediato com flunixinina meglumina 16,6 mg/ml (Banamine®) injetável, por via subcutânea, na dose de 0,1 ml/kg ou 1,6 mg/kg de peso, repetida por mais dois dias. Os animais foram mantidos com profilaxia antibiótica, com os mesmos antibióticos utilizados durante a indução anestésica, por mais dois dias e administrados por via subcutânea, uma vez ao dia.

O jejum completo no pós-operatório para sólidos e líquidos, ocorreu nas primeiras 36 horas. Nas 48 horas seguintes, apenas água acrescida de glicose foi permitida. A partir do 4º PO foi iniciada ração umedecida, sendo oferecido 1/4 da quantidade diária recomendada. A quantidade de ração foi aumentada progressivamente, sendo oferecida a metade da quantidade nos próximos dois dias, 3/4 no 7º dia, e no 8º dia de PO a quantidade total da dieta seca foi oferecida.

O protocolo completo de condutas no pré e pós-operatório encontra-se no apêndice A, e o prontuário de orientação de cuidados pós-operatórios para a equipe do biotério, com um dos coelhos como exemplo encontra-se no apêndice B.

Conforme o grupo ao qual o coelho pertencia, foi programada a reintervenção para coleta do material.

3.6 COLETA DE MATERIAL

3.6.1 Procedimento Cirúrgico

A reintervenção foi realizada através de laparotomia mediana e esquema anestésico idênticos aos da primeira intervenção. O segmento de íleo em estudo,

contendo os 25 cm demarcados no primeiro procedimento com pontos de *nylon* 4.0, foi retirado em bloco. Após a retirada do material de interesse, o animal foi submetido à eutanásia.

3.6.2 Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia com injeção intra-venosa de dose letal de tiopental sódico 2,5% (Thiopentax®), na dose de 150 mg/kg EV, na diluição de 0,5 g/ml, com os animais ainda anestesiados, até parada cardiorrespiratória monitorizada por estetoscópio⁽⁷⁹⁾.

3.6.3 Preparo das Peças

A peça em estudo, foi levada para uma mesa e dissecada com liberação de aderências, sem comprometer as regiões dos enxertos. Foram obtidos quatro anéis de tubo intestinal contendo os enxertos de submucosa intestinal porcina, correspondentes aos quatro pontos de referência. Cada anel foi aberto na sua face mesentérica formando uma peça retangular de parede intestinal (Figura 23-A). Apenas como método de orientação técnica para a confecção das lâminas, uma incisão foi realizada na lateral da porção que não continha o enxerto (Figura 23-B).

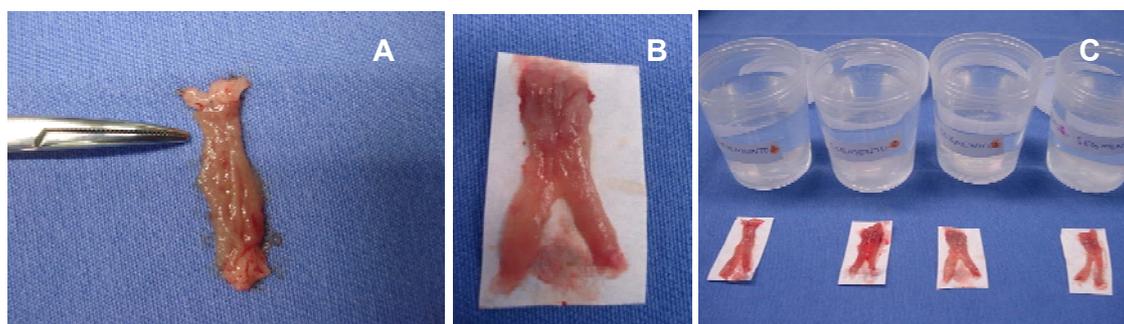


Figura 23- **23-A** - Segmento de alça contendo o enxerto (porção apontada pela pinça), aberto na sua face mesentérica e retificado; **23-B** - Incisão na porção que não continha o enxerto para orientação no momento de confecção das lâminas; **23-C** - Segmentos sobre papel filtro antes de serem colocados em frasco com identificação.

Após avaliação macroscópica, cada peça foi colocada sobre um pedaço de papel filtro para mantê-la estendida. Este conjunto era submerso em formalina 10%, em um frasco para coleta de exame, de plástico, devidamente identificado por etiqueta com o número do coelho e do enxerto correspondentes aos pontos de referência de 1 a 4 (Figura 23-C).

3.7 AVALIAÇÃO ANÁTOMO- PATOLÓGICA

Para estudo microscópico, as peças devidamente identificadas foram enviadas para o Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR.

3.7.1 Preparo das Lâminas

As peças foram fixadas em formalina 10%, colocadas em blocos de parafina e cortadas em um micrótomo para confecção das lâminas, conforme protocolo do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR.

Os cortes histológicos foram realizados com espessura de quatro micra e corados de acordo com os protocolos específicos para cada uma das três colorações utilizadas, a saber: Hematoxilina-Eosina (HE), PAS/Alcian Blue (AB) e Tricrômico de Gomori (TG).

Foram preparadas doze lâminas para cada coelho, sendo uma de cada coloração para cada uma das quatro peças coletadas.

Cada lâmina continha dois cortes histológicos da mesma peça, cada corte histológico contendo uma porção de tecido correspondendo ao enxerto (estudo) e outra sendo utilizada como controle.

Optou-se pela confecção das lâminas com dois cortes de cada peça para permitir avaliação de maior número de campos nas porções estudo e controle, e com isso, obter-se maior número de dados histológicos por coelho.

3.7.2 Colorações

A Hematoxilina-Eosina (HE) é a combinação de corantes mais utilizada em estudos histológicos. A hematoxilina é um corante básico que cora em púrpura azulado as substâncias basófilas, isto é, núcleo e organelas que contenham DNA. A eosina é um corante ácido e confere uma cor róseo-avermelhada a estruturas acidófilas (Figura 24) ⁽²¹⁾.

Esta coloração foi utilizada para a avaliação qualitativa das lâminas e para a aferição do comprimento da superfície da mucosa nas porções controle e estudo dos cortes. Este dado foi utilizado na comparação das duas porções avaliando a capacidade de neoformação mucosa sobre a superfície do enxerto, assim como a formação de criptas e vilosidades.

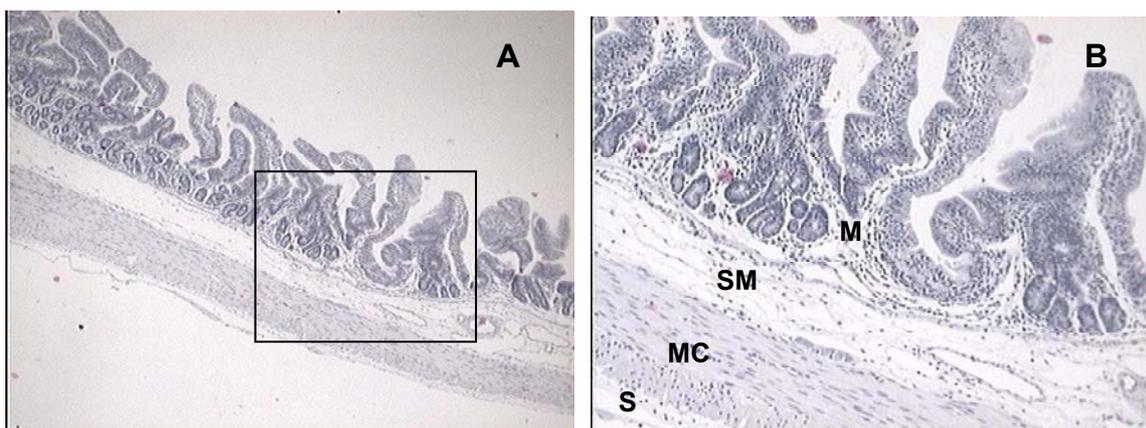


Figura 24 - Fotomicrografias de lâmina corada com HE; **24-A** - Aumento de 4x, mostrando características da coloração com destaque para a área visibilizada na foto B; **24-B** - Aumento de 10x, mostrando a diferenciação entre as camadas da parede intestinal: mucosa (M), submucosa (SM), muscular (ML) e serosa (S) (Lâmina correspondente à porção controle da peça 3 do coelho 3).

O *periodic acid – Schiff/ Alcian Blue* (PAS/Alcian Blue) é uma coloração específica para identificação do muco produzido pelas células caliciformes e permite a identificação e contagem destas células pela presença da mucina em seu interior, que se cora em azul. (Figura 25). A presença de células caliciformes na mucosa neoformada foi utilizada como um fator indicativo da funcionalidade do novo epitélio da porção estudo ⁽²¹⁾.

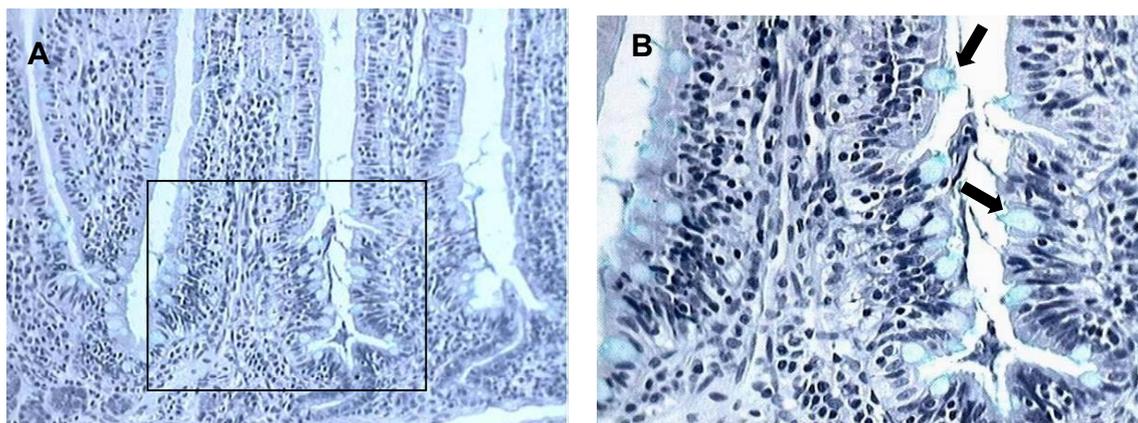


Figura 25 - Fotomicrografias de lâmina corada com Alcian Blue; **25-A** - Aumento de 20x mostrando características da coloração com destaque para a área visibilizada na foto B; **25-B** - Aumento de 40x, mostrando o muco e as células caliciformes corados em azul claro (seta) (Lâmina correspondente à porção controle da peça 3 do coelho 6).

O Tricrômico de Gomori (TG) é uma técnica que cora em verde as fibras musculares, o que permitiu a medida da espessura de toda camada muscular (longitudinal e transversal) comparando as porções enxerto e controle de cada lâmina (Figura 26).

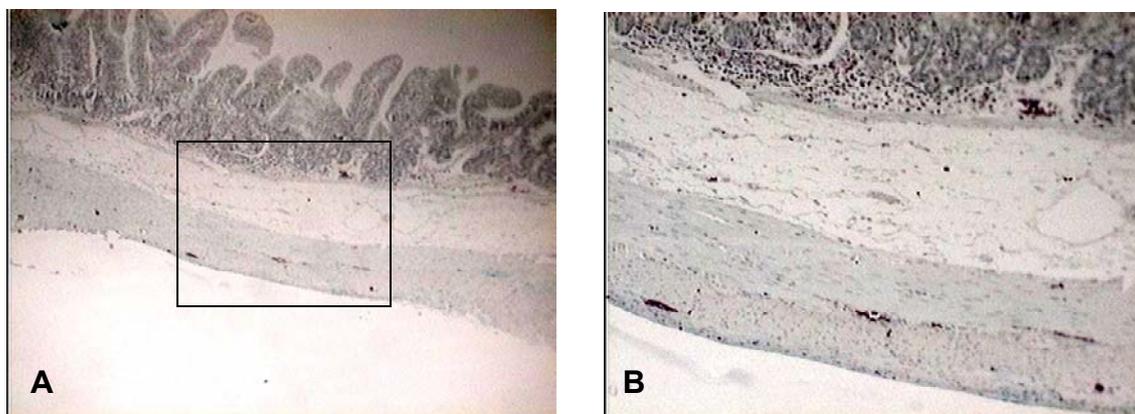


Figura 26 - Fotomicrografia de lâmina corada com TG. **26-A** - Aumento de 4x, com destaque para a área visibilizada na foto B; **26-B** - Aumento de 10x, mostrando a coloração verde das células da camada muscular (Lâmina correspondente à porção controle da peça 4 do coelho 10).

3.7.3 Análise das Lâminas

Para cada coloração foi elaborado um protocolo de avaliação das lâminas conforme os encontrados no apêndice C.

A análise foi realizada em duas etapas, sendo a primeira uma avaliação qualitativa das lâminas e a segunda uma avaliação quantitativa. A primeira etapa

foi realizada apenas utilizando-se as lâminas coradas com HE, e a segunda, com o intuito de avaliar parâmetros específicos, foi realizada utilizando-se as três colorações.

3.7.4 Avaliação Qualitativa das Lâminas

A análise qualitativa das lâminas foi realizada com a utilização de microscópio óptico Olympus BX 50, com aumento de 4 e 10 vezes.

A primeira inspeção das lâminas ao microscópio serviu para identificar as porções controle (C) e estudo (E) de cada corte histológico, separando-os através de um traço feito por cima da lamínula com caneta para retroprojeter (Figura 27).

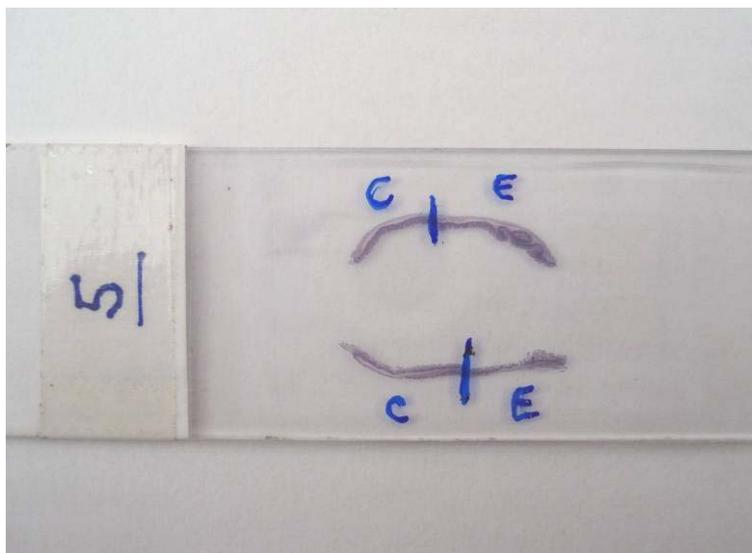


Figura 27 - Lâmina com os dois cortes histológicos, referentes a um dos quatro segmentos contendo o enxerto, de um dos coelhos, divididos com traço de caneta marcadora por cima da lamínula em porções controle (C) e estudo (E).

Os parâmetros qualitativos que permitiram a diferenciação entre porção controle e estudo foram: fibrose caracterizada pela presença de fibroblastos e colágeno, processo inflamatório crônico caracterizado pela presença de infiltrado linfocitário e de histiócitos, reação granulomatosa de corpo estranho ao redor do fio de sutura e desorganização das camadas da parede intestinal (Figura 28).

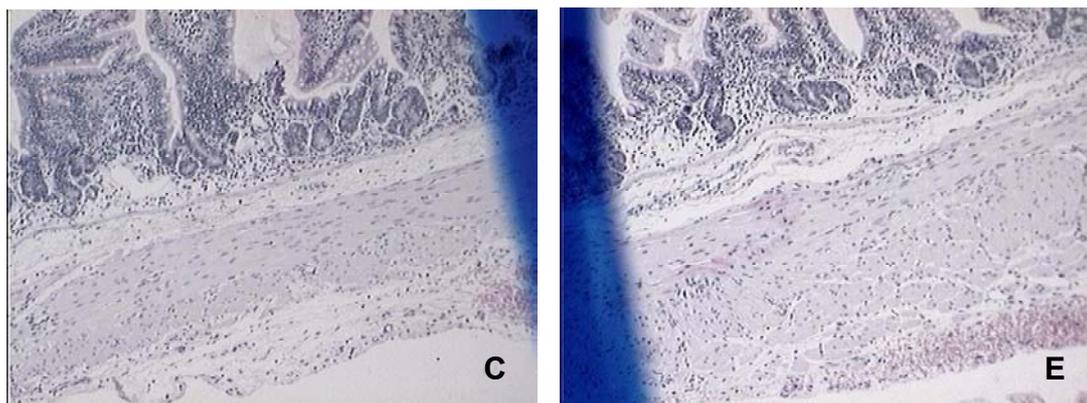


Figura 28 - Lâmina corada com HE em aumento de 10x, mostrando a transição entre as porções controle (**C**) e estudo (**E**). Presença de infiltrado linfocitário na submucosa, início de espessamento e perda do padrão organizado da camada muscular, e infiltrado na camada serosa.

Uma vez realizada a marcação nas lâminas coradas com HE, estas serviram como referência para a marcação nas outras colorações, já que os cortes de cada peça foram feitos em seqüência e tinham a mesma apresentação sobre a lâmina. As lâminas das outras colorações foram colocadas sobre a lâmina equivalente corada com HE e, por transparência, o traço de caneta era copiado.

Outra finalidade da análise qualitativa das lâminas foi verificar a presença das quatro camadas da parede intestinal no corte histológico, possibilitando com isso, a triagem dos cortes adequados para uma avaliação objetiva dos parâmetros escolhidos.

3.7.5 Avaliação Quantitativa das Lâminas

A análise das lâminas em relação aos dados quantitativos foi realizada de maneira cega, para que não houvesse identificação do grupo ou do coelho ao qual pertenciam. Para isso, a identificação original das lâminas foi coberta com um pedaço de papel branco, as lâminas foram misturadas, e atribuiu-se novos números de identificação que só foram retirados após a leitura de todas as lâminas.

A escolha dos campos foi realizada seguindo uma seqüência padronizada, em todas as lâminas das três colorações avaliadas. Foram escolhidos oito

campos de cada lâmina, que continha dois cortes de tecido, sendo preferencialmente, quatro em cada corte (dois da porção estudo e dois da porção controle). Seguindo a orientação da peça a partir da linha de divisória, foram obtidos os dois primeiros campos que permitissem a leitura, de cada lado, podendo estes estar contíguos ou não, dependendo das condições do corte. Quando a lâmina continha um dos cortes no qual não foi possível identificar as porções estudo e controle, os quatro campos foram obtidos sequencialmente no outro corte. Os campos foram escolhidos conforme o esquema da figura 29.

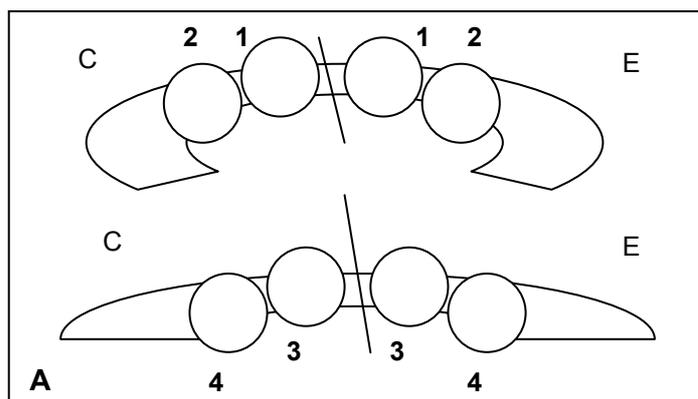
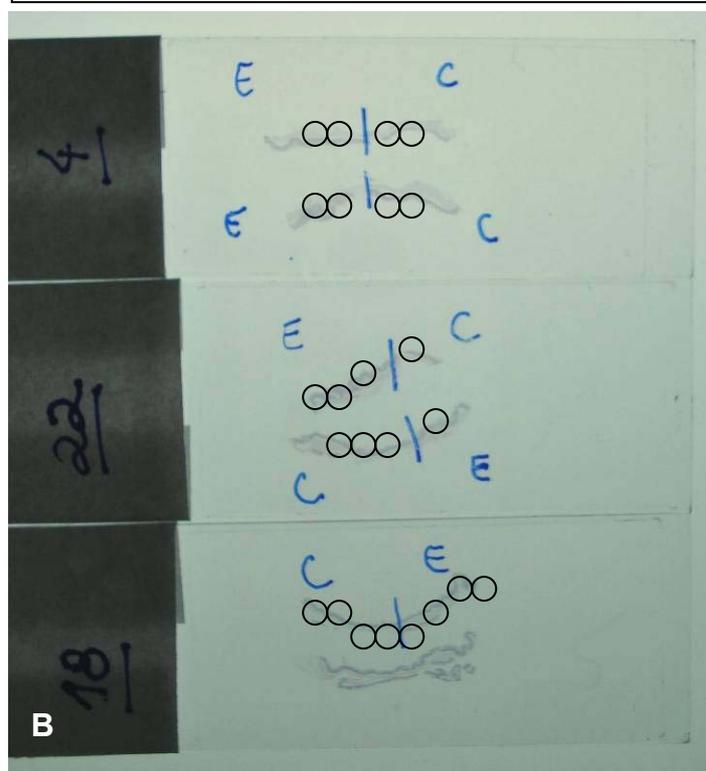


Figura 29 - Esquema de escolha dos campos para análise histopatológica dos cortes. **29-A** - A partir da linha divisória no corte superior: Campos 1 e 2 (das porções controle (C) e estudo (E)). E no corte inferior: Campos 3 e 4 (das porções Controle (C) e Estudo (E)); **29-B** - Foto das lâminas ilustrando a escolha dos campos.



As lâminas coradas com Alcian Blue foram avaliadas diretamente no microscópio, enquanto as coradas com HE e TG foram avaliadas através de um

programa de computador específico (Image Proplus® versão 4.5). Para isso, as imagens correspondentes aos campos escolhidos nas lâminas coradas com HE e TG, com aumento de dez vezes, foram capturadas pelo sistema de vídeo acoplado ao microscópio (Câmera de vídeo Sony CCD 101 – Íris Color Vídeo Câmera) e digitalizadas para o programa de computador Image Proplus®, permitindo seu armazenamento e posterior avaliação.

3.7.5.1 Avaliação da Superfície da Mucosa

A medida da superfície mucosa neoformada foi avaliada nos cortes com coloração HE. Em cada imagem digitalizada foi realizado um contorno da superfície mucosa desprezando-se ilhas e artefatos, conforme pode ser observado na figura 30. O programa Image Proplus® possui uma ferramenta que permite medir a extensão dessa linha, fornecendo valores em micra, proporcionais ao aumento utilizado para obtenção da imagem.

Esta avaliação foi realizada apenas por um observador, já que não há subjetividade para execução dessa tarefa.

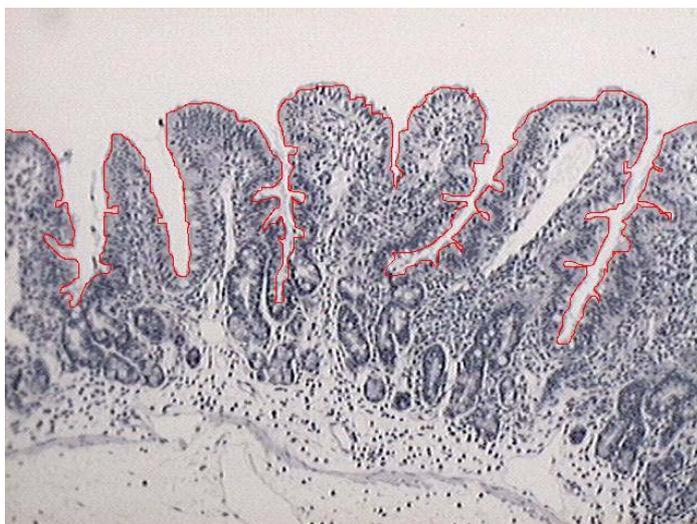


Figura 30 - Fotomicrografia de lâmina corada com HE, aumento de 10x, mostrando o contorno da superfície mucosa (linha vermelha) utilizado para medir o comprimento da mesma (Lâmina referente à porção controle da peça 1 do coelho 9)

3.7.5.2 Avaliação da Espessura da Camada Muscular

A medida da espessura da camada muscular, incluindo as camadas longitudinal e transversal, foi realizada nas imagens digitalizadas das lâminas coradas com Tricrômico de Gomori.

Devido à irregularidade da espessura da camada muscular, optou-se pela avaliação por dois examinadores, que faziam as delimitações da camada muscular por meio de cinco linhas transversais à orientação da peça em cada campo.

As cinco linhas foram escolhidas pelos examinadores dividindo-se proporcionalmente o campo em seis partes (Figura 31). Os valores de comprimentos das linhas eram fornecidos pelo próprio programa de computador, em micrômetros, proporcionais ao aumento utilizado.

A média referente às dez linhas medidas pelos dois examinadores foi usada como estimativa da espessura da camada muscular naquele campo.

A opção de avaliação desse dado por dois examinadores, foi devida ao fato destes poderem escolher diferentes locais de medida da camada muscular em cada campo, e com isso, obter maior número de medidas num mesmo campo, resultando num valor mais característico daquele campo.

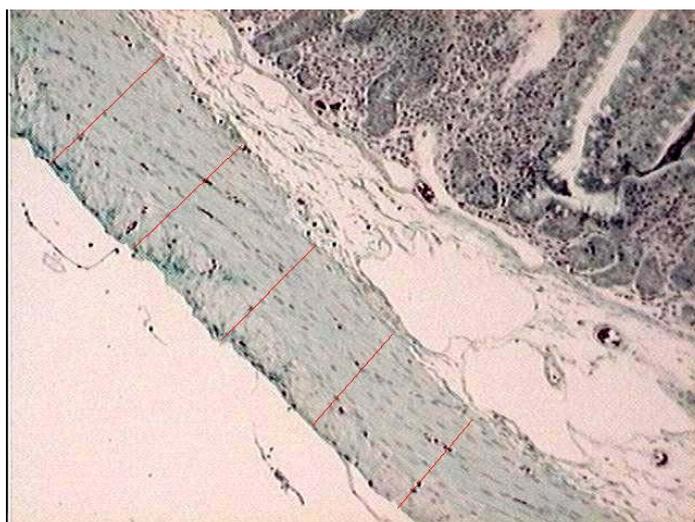


Figura 31 - Fotomicrografia de lâmina corada com TG em aumento de 10x, mostrando a aferição da espessura da camada muscular em cinco pontos, representados pelas linhas vermelhas (Lâmina referente à porção controle da peça 4 do coelho 10).

3.7.5.3 Contagem de Células Caliciformes.

A contagem de células caliciformes foi feita nas lâminas com a coloração Alcian Blue, diretamente no microscópio e com aumento de 40 vezes.

O aumento de 40 vezes é necessário para possibilitar a contagem das células caliciformes, entretanto esse aumento não permite a visualização de uma vilosidade da mucosa intestinal em toda sua extensão. Por isso optou-se também por dois examinadores que, diretamente no microscópio, seguiram a orientação de escolher a partir da linha divisória entre as porções controle e estudo os dois primeiros campos que permitissem leitura sem sobreposição; sabendo-se que haveria diferença entre os campos observados (Figura 29).

Cada avaliador realizou contagem simples de células nos campos escolhidos (Figura 32), sendo quatro na porção controle e quatro na porção estudo para cada lâmina, anotando os resultados em protocolo específico (anexo D). Os dados dos dois examinadores foram somados, totalizando oito contagens para cada porção estudo ou controle em cada lâmina, sendo que a média desses valores forneceu um valor mais característico de contagem de células caliciformes na porção mucosa correspondente a cada animal.

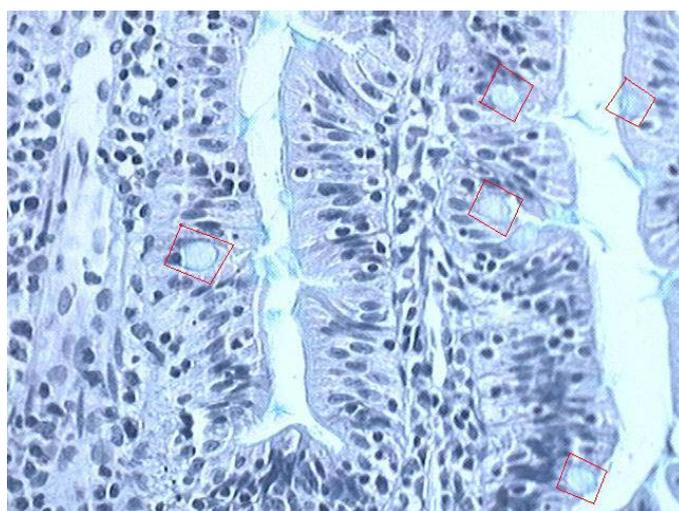


Figura 32 - Fotomicrografia de lâmina corada com AB em aumento de 40x, exemplificando a contagem de células caliciformes coradas em azul claro (contorno vermelho) (Lâmina referente à porção controle da peça 1 do coelho 7).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no estudo foram expressos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões.

Para a análise estatística foi utilizado o programa computacional SPSS, v.14.

Foram utilizados testes não-paramétricos devido ao pequeno tamanho da amostra. Para a comparação dos grupos foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney e para as comparações entre as porções (controle e estudo) utilizou-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon.

Valores de $p \leq 0,05$ indicaram significância estatística.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 ANIMAIS DE DE EXPERIMENTAÇÃO

4.1.1 Peso Inicial

A média de peso dos coelhos imediatamente antes da primeira cirurgia foi de 2058,8 g, variando de 1706 g a 2562 g. No grupo A, a média foi de 2234,4 g e no grupo B, 1919,0 g (Tabela 2).

Tabela 2 - Peso Inicial (Pré-Operatório)

GRUPO A	Peso (em gramas)	GRUPO B	Peso (em gramas)
Coelho 1	2502	Coelho 5	---
Coelho 2	2468	Coelho 6	1710
Coelho 3	1800	Coelho 7	1706
Coelho 4	2162	Coelho 8	1698
Coelho 9	2240	Coelho 10	2562
Média	2234,4	Média	1919
Desvio Padrão	282,9	Desvio Padrão	428,7

O coelho de número cinco foi excluído das análises devido ao seu óbito no 26^o dia de PO.

Comparando-se as médias dos pesos iniciais (no pré-operatório) dos grupos A e B, observou-se ausência de diferença estatística representada por $p=0,286$.

4.1.2 Peso Final

No momento da segunda cirurgia para coleta do material, o peso dos coelhos variou de 2834 g a 4024 g, com uma média de 3216,4 g. No grupo A, após seis semanas, a média foi de 2968,4 g, e no grupo B, após doze semanas, foi de 3526,5 g (Tabela 3).

Tabela 3 - Peso Final

GRUPO A	Peso (em gramas)	GRUPO B	Peso (em gramas)
Coelho 1	3056	Coelho 5	----
Coelho 2	3020	Coelho 6	3412
Coelho 3	2892	Coelho 7	2938
Coelho 4	2834	Coelho 8	3732
Coelho 9	3040	Coelho 10	4024
Média	2968,4	Média	3526,5
Desvio Padrão	99,20	Desvio Padrão	465,18

Na comparação entre as médias dos pesos finais (no momento da segunda cirurgia) dos grupos A e B, observou-se ausência de diferença estatística representada por $p = 0,111$.

Quando comparados os pesos inicial e final nos animais do grupo A e B separadamente, obtiveram-se os resultados da tabela 4 e figuras 33 e 34.

Tabela 4 - Comparação dos pesos iniciais e finais nos animais do grupo A e B

Variável	Grupo	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de p
Peso inicial	A	5	2234,40	2240,00	1800,00	2502,00	282,91	
Peso final		5	2968,40	3020,00	2834,00	3056,00	99,20	
Diferença peso (final - inicial)		5	734,00	672,00	552,00	1092,00	224,66	0,043
Peso inicial	B	4	1919,00	1708,00	1698,00	2562,00	428,70	
Peso final		4	3526,50	3572,00	2938,00	4024,00	465,18	
Diferença peso (final - inicial)		4	1607,50	1582,00	1232,00	2034,00	343,03	0,068

Houve diferença estatística significativa ($p=0,043$) quando comparados o peso inicial com o final nos animais do grupo A, porém esta diferença não foi observada nos animais do grupo B ($p=0,068$).

Figura 33 – Gráfico ilustrando a comparação entre os pesos inicial e final entre os grupos A e B.

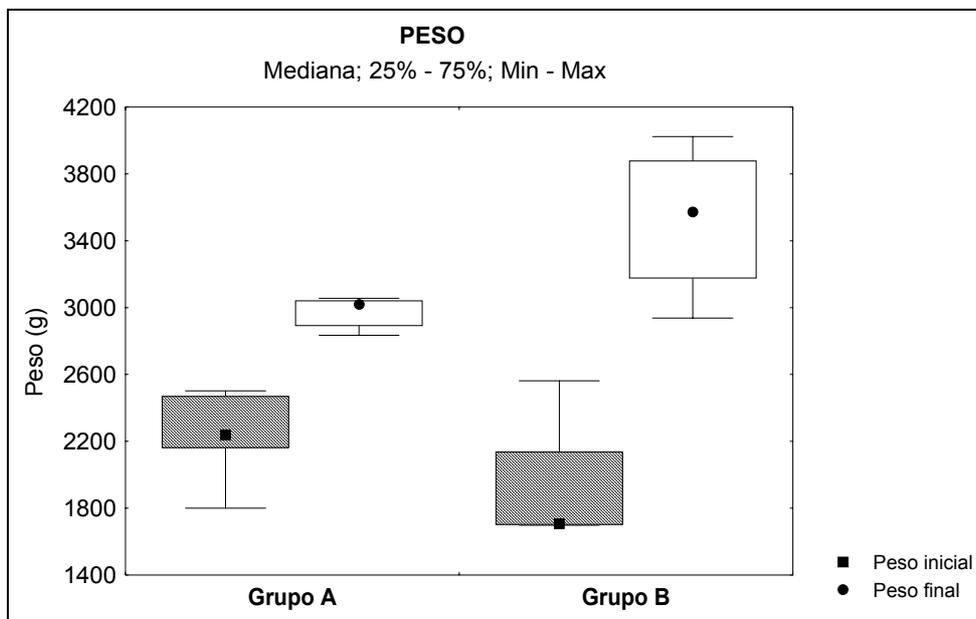
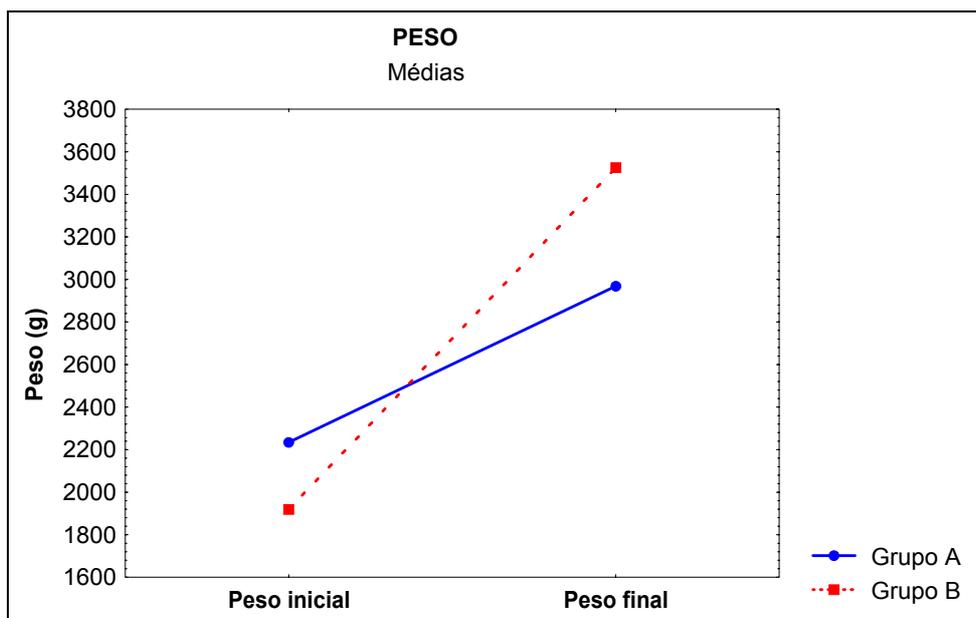


Figura 34 - Gráfico comparando o ganho de peso (final - inicial) nos animais dos grupos A e B.



4.2 AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DO ENXERTO

No estudo bacteriológico do enxerto mantido em neomicina 10%, após semeadura em ágar Mac Conkey e Sabouraud, foi observado o crescimento de microrganismos de espécies diferentes, resultando colônias vermelhas e brancas. As provas bioquímicas realizadas para a identificação do gênero das enterobactérias caracterizaram duas espécies de *E.coli*, não sendo possível a identificação das espécies pela não disponibilidade do *kit* próprio para este fim. O resultado foi confirmado após três procedimentos⁽⁷⁸⁾.

As duas espécies de *E.coli* foram submetidas ao antibiograma que indicou sensibilidade a ciprofloxacina, norfloxacina e imipenem.

4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Não houve intercorrência no trans-operatório em nenhum caso. O método de escolha da área de implante dos enxertos e a demarcação dos pontos de referência com fio de *nylon* 4.0 não apresentaram dificuldades.

Os enxertos foram implantados sem causar estenoses na luz intestinal, acotovelamentos de alça ou hematomas da parede do intestino. Todos os enxertos foram testados antes do fechamento da parede abdominal e término da cirurgia, e não apresentavam extravazamento de conteúdo intestinal.

O tempo operatório do procedimento variou de 70 min à 140min, com uma média de 87,8min.

4.4 COMPLICAÇÕES PÓS-OPERATÓRIAS

Não houve complicações no pós-operatório (PO) imediato, correspondente à primeira semana, em ambos os grupos.

Dos dez coelhos, apenas um (coelho número cinco), pertencente ao grupo B, foi a óbito antes da data prevista para a coleta do material e, portanto, foi

excluído do estudo. O óbito ocorreu no 26^o dia de PO e o animal foi submetido à necrópsia e estudo anátomo-patológico para identificação da causa.

Na necropsia, após a abertura da cavidade abdominal, identificou-se grande quantidade de líquido fecalóide e aderência de alças principalmente no local de anastomose dos enxertos. Em um dos implantes identificou-se perfuração com extravazamento de conteúdo intra-luminal, por provável deiscência de sutura, justificando assim, os achados de peritonite fecal. No estudo histológico identificou-se o local de deiscência pela presença de solução de continuidade da luz intestinal. Havia também, grande quantidade de infiltrado inflamatório com reação de corpo estranho.

Houve uma complicação pós-operatória, que foi o aparecimento de um aumento de volume abaixo da incisão abdominal do coelho de número 10, pertencente ao grupo B, que apareceu no 12^o dia de PO. O coelho foi submetido à ultra-sonografia abdominal no 18^o PO, realizada pela equipe da Faculdade de Medicina Veterinária da PUCPR, Campus São José dos Pinhais. O exame demonstrou hérnia incisional com conteúdo formado apenas de tecido gorduroso (epíplon), sem alças intestinais. Pelo bom estado geral do coelho e funcionamento do trato gastrintestinal normal, foi optado por tratamento conservador.

Todos os demais coelhos permaneceram bem e não apresentaram outras intercorrências até o dia da reabertura para coleta do material de estudo.

4.5 COLETA DO MATERIAL

O tempo operatório do segundo procedimento, para retirada do material de estudo, variou de 15 min a 35 min, com uma média de 20,8 min. E não houve intercorrência durante este procedimento.

4.5.1 Achados Intra-Operatórios

Houve pouca aderência entre as alças intestinais, porém em todos os casos estas eram frouxas, sem acotovelamento das alças, nem comprometimento do trânsito intestinal, sendo desfeitas facilmente, sem comprometer a integridade

da alça e o local do enxerto, e não dificultando a ressecção do segmento em estudo (Figura 35).

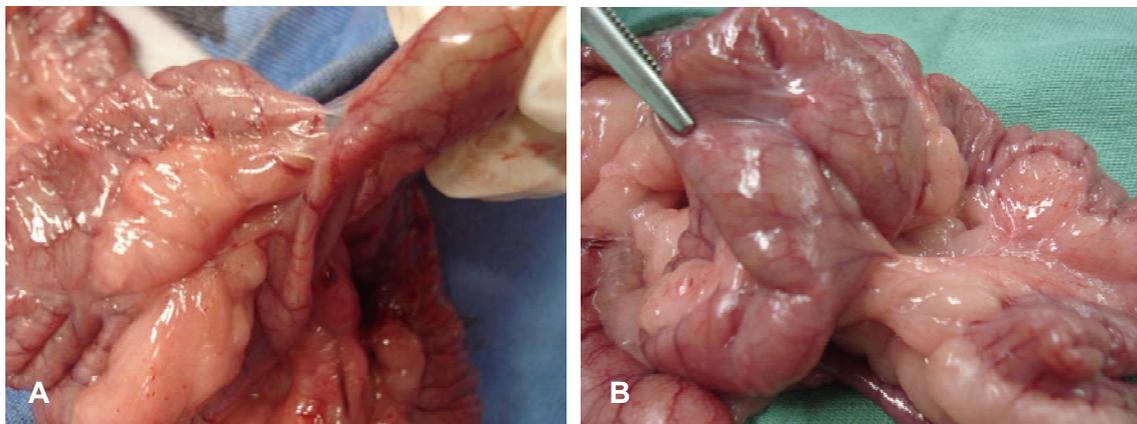


Figura 35 - Presença de aderências entre alças em um coelho do grupo A (**35-A**) e um do grupo B (**35-B**).

A identificação do segmento de íleo e dos locais com a presença do enxerto ocorreu sem dificuldades, devido aos pontos de fio *nylon* 4.0 colocados como referência.

4.6 AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA MACROSCÓPICA

Os locais dos enxertos puderam ser facilmente identificados macroscopicamente em todos os coelhos do grupo A, com menos tempo de evolução pós-operatória (Figura 36-A). Em um coelho deste grupo (número 2) um dos enxertos apresentou nítida reação de corpo estranho na face externa da alça intestinal, com abaulamento da mesma, porém sem sinais de perfuração ou extravazamento de conteúdo intestinal (Figura 37).

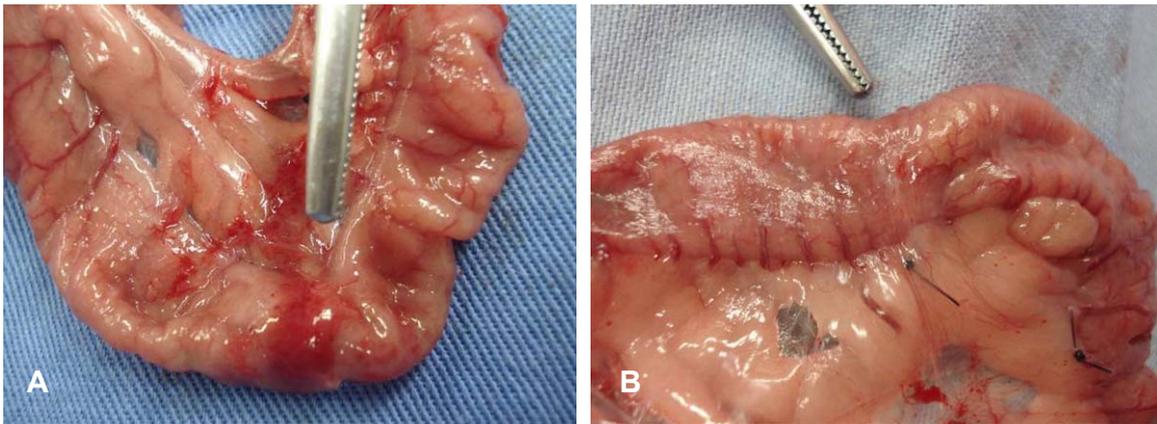


Figura 36 - Identificação dos locais de implante dos enxertos com maior facilidade nos coelhos com menos tempo de evolução pós-operatória. **36-A** – Coelho do grupo A; **36-B** - Coelho do grupo B - alguns implantes somente puderam ser identificados com a ajuda dos pontos de referência do mesentério.

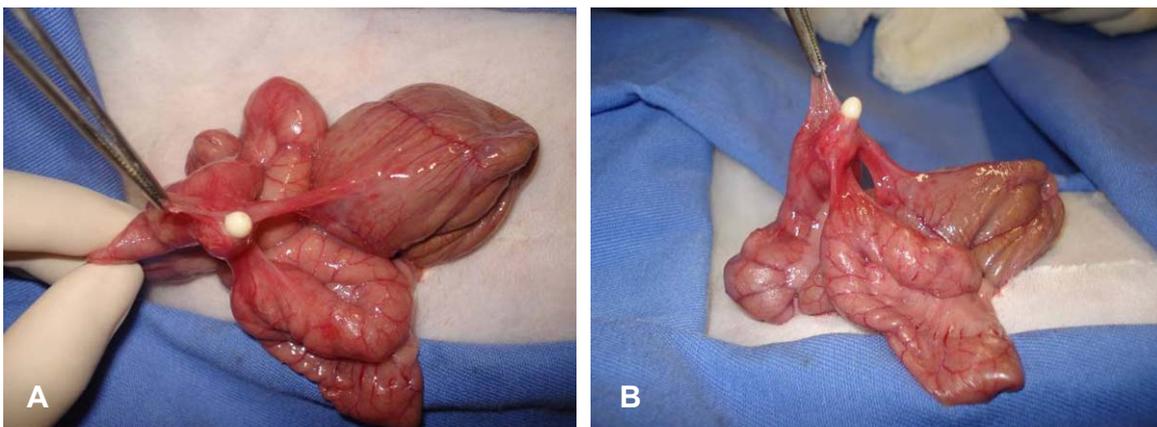


Figura 37 - Fotografias referentes ao coelho 2. **37-A e B** - Presença de aumento de volume e reação de corpo estranho com processo supurativo bloqueado na face externa de um dos enxertos.

Nos coelhos do grupo B, com doze semanas de pós-operatório, alguns enxertos apenas puderam ser identificados devido à presença do fio de *nylon* 4.0 no mesentério, colocado durante a primeira cirurgia como ponto de referência para o implante da submucosa (Figura 36-B).

Na palpação das alças intestinais, todos os casos (grupo A e B) apresentaram algum grau de espessamento da parede da alça no local do enxerto.

4.7 AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA MICROSCÓPICA

Devido ao óbito do coelho cinco, o material correspondente a nove coelhos gerou 108 lâminas e 216 cortes histológicos para serem avaliados nas três colorações descritas nesse trabalho.

4.7.1 Avaliação Qualitativa das Lâminas

Na análise qualitativa das lâminas, cinco cortes em quatro lâminas, em cada coloração utilizada, foram descartados pela impossibilidade de identificação da transição entre a porção controle e estudo.

Apenas na lâmina referente ao enxerto 3 do coelho 2, ambos os cortes estavam comprometidos e foram descartados. Esta lâmina correspondia ao enxerto que macroscopicamente apresentava reação de corpo estranho, descrito no item anterior, confirmada pela presença de grande quantidade de células inflamatórias que impossibilitaram a demarcação da transição entre a porção controle e estudo, assim como a identificação das diferentes camadas da parede intestinal.

Em todos os cortes selecionados, as porções estudo apresentaram células pertencentes às quatro camadas da parede intestinal em diferentes níveis de organização (Figura 38 e 39).

As porções estudo sempre se mostraram mais espessas em comparação com as porções controle, apresentando uma área central com infiltrado inflamatório e fibrose, recoberta na face interna por epitélio colunar intestinal típico, com presença de vilosidades e células caliciformes em ambos os grupos. Na face externa houve formação de fibras musculares longitudinais e transversais recobrendo a área ou entremeadas às células inflamatórias e fibrose (Figura 38 e 39).

As porções estudo também se apresentavam revestidas por serosa espessada, conforme mostrado nas figuras 38 e 39.

Todas estas avaliações subjetivas, foram realizadas com o auxílio de um patologista.

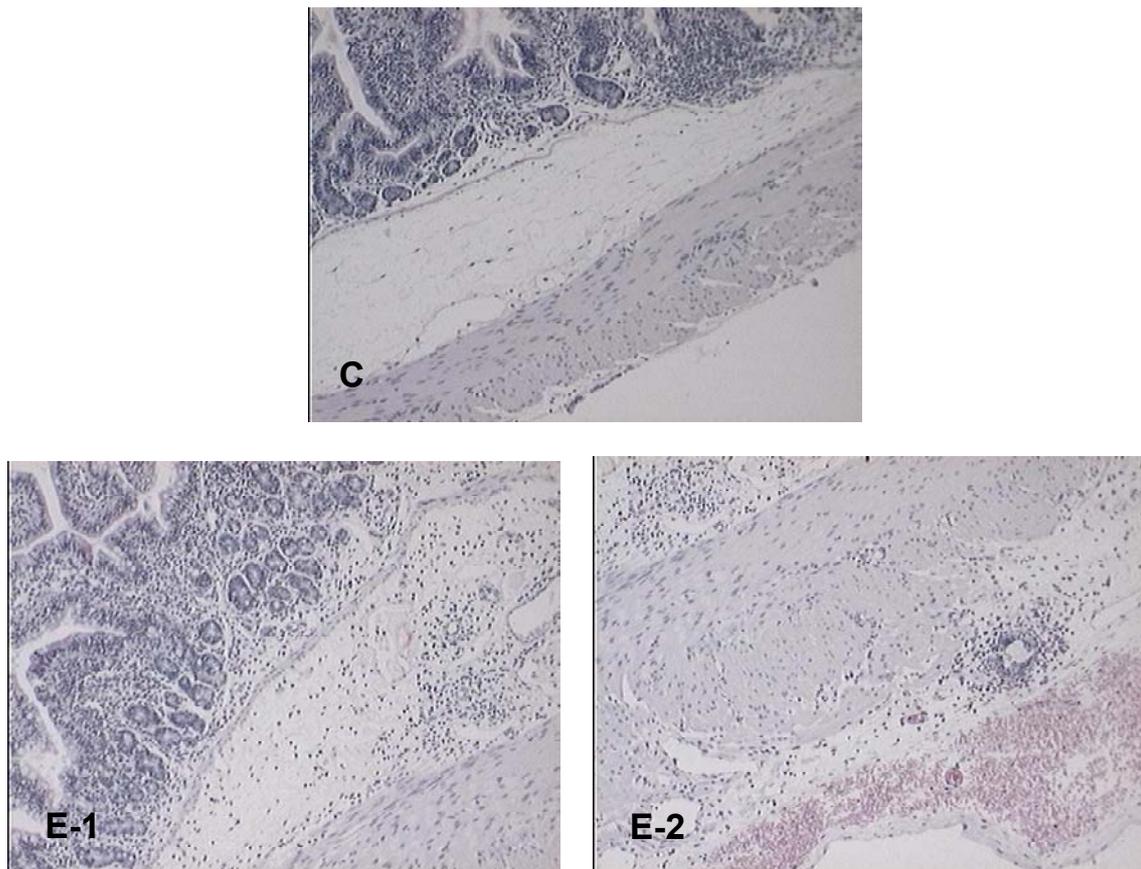


Figura 38 - Fotomicrografia de lâmina corada com HE, aumento de 10x, mostrando a diferença entre as porções controle (**C**) e enxerto (**E**) em uma peça do grupo A. **E1** – Mucosa e Submucosa; **E2** – Muscular e Serosa.

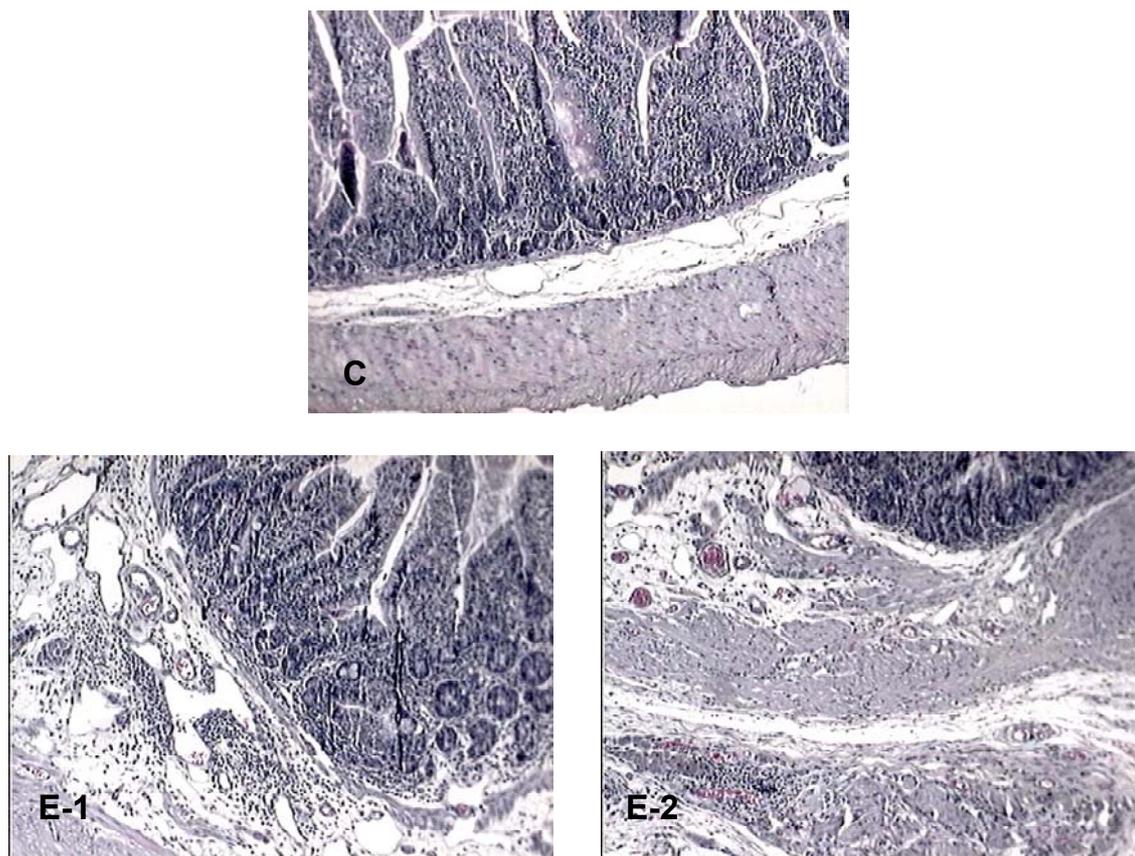


Figura 39 - Fotomicrografia de lâmina corada com HE, aumento de 10x, mostrando a diferença entre as porções controle (C) e enxerto (E) em uma peça do grupo B. E1 – Mucosa e Submucosa; E2 – Muscular e Serosa

4.7.2 Avaliação Quantitativa das Lâminas

Todos os dados referentes a cada uma das lâminas encontram-se em detalhes no apêndice D. Os valores aqui apresentados referem-se às médias em relação a cada coelho, para os três parâmetros avaliados (superfície da mucosa, contagem de células caliciformes e espessura da camada muscular), e podem ser visualizados na tabela 5.

Tabela 5 - Resultados da Análise Quantitativa

GRUPO A	Superfície da Mucosa		Contagem de céls. Caliciformes		Espessura da Muscular	
	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
Coelho 1	4.285,82	4.084,85	20,63	19,25	257,56	299,47
Coelho 2	4.495,31	3.588,54	18,00	16,79	918,16	824,47
Coelho 3	4.587,65	4.878,16	15,59	14,88	168,49	215,45
Coelho 4	4.586,17	4.732,47	15,88	15,31	197,87	252,02
Coelho 9	4.497,91	4.880,85	25,72	31,38	406,22	518,54
Média	4.490,57	4.432,97	19,16	19,52	389,66	421,99
DP	123,05	575,05	4,18	6,84	309,33	253,90
GRUPO B						
Coelho 6	4.824,42	4.570,76	12,25	12,83	172,38	248,40
Coelho 7	4.097,70	4.028,26	16,44	16,38	199,22	297,04
Coelho 8	4.586,78	5.012,44	16,00	18,13	169,27	264,17
Coelho 10	4.886,23	5.200,42	32,59	34,84	289,86	416,25
Média	4.598,78	4.702,97	19,32	20,54	207,68	306,46
DP	358,13	521,52	9,05	9,79	56,41	75,94

4.7.2.1 Avaliação da Superfície Mucosa

Comparando-se as médias dos comprimentos da superfície da mucosa na porção controle entre os grupos A e B, e na porção estudo entre os grupos A e B, usando o teste de Mann-Whitney, não se obteve diferença significativa, conforme mostrado na tabela 6.

Tabela 6 - Comparação entre os grupos A e B nas porções controle e estudo em relação à superfície mucosa

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de p
Controle	A	5	4490,57	4497,91	4285,82	4587,65	123,05	0,413
	B	4	4598,78	4705,60	4097,70	4886,23	358,13	
Estudo	A	5	4432,98	4732,47	3588,54	4880,85	575,05	0,556
	B	4	4702,97	4791,60	4028,26	5200,43	521,52	

A comparação entre as porções estudo e controle dentro de cada grupo, usando o teste estatístico de Wilcoxon, observada na tabela 7, não demonstrou valor de p significativo.

Tabela 7 - Comparação entre as porções controle e estudo nos grupos A e B em relação à superfície mucosa

Grupo	Variável	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de p
A	Controle	5	4490,57	4497,91	4285,82	4587,65	123,05	0,893
	Estudo	5	4432,98	4732,47	3588,54	4880,85	575,05	
	Diferença (E-C)	5	-57,60	146,30	-906,77	382,95	524,04	
B	Controle	4	4598,78	4705,60	4097,70	4886,23	358,13	0,465
	Estudo	4	4702,97	4791,60	4028,26	5200,43	521,52	
	Diferença (E-C)	4	104,19	122,38	-253,66	425,66	319,19	

A figura 40 e 41 ilustram a semelhança das superfícies mucosas considerando-se as comparações aqui descritas.

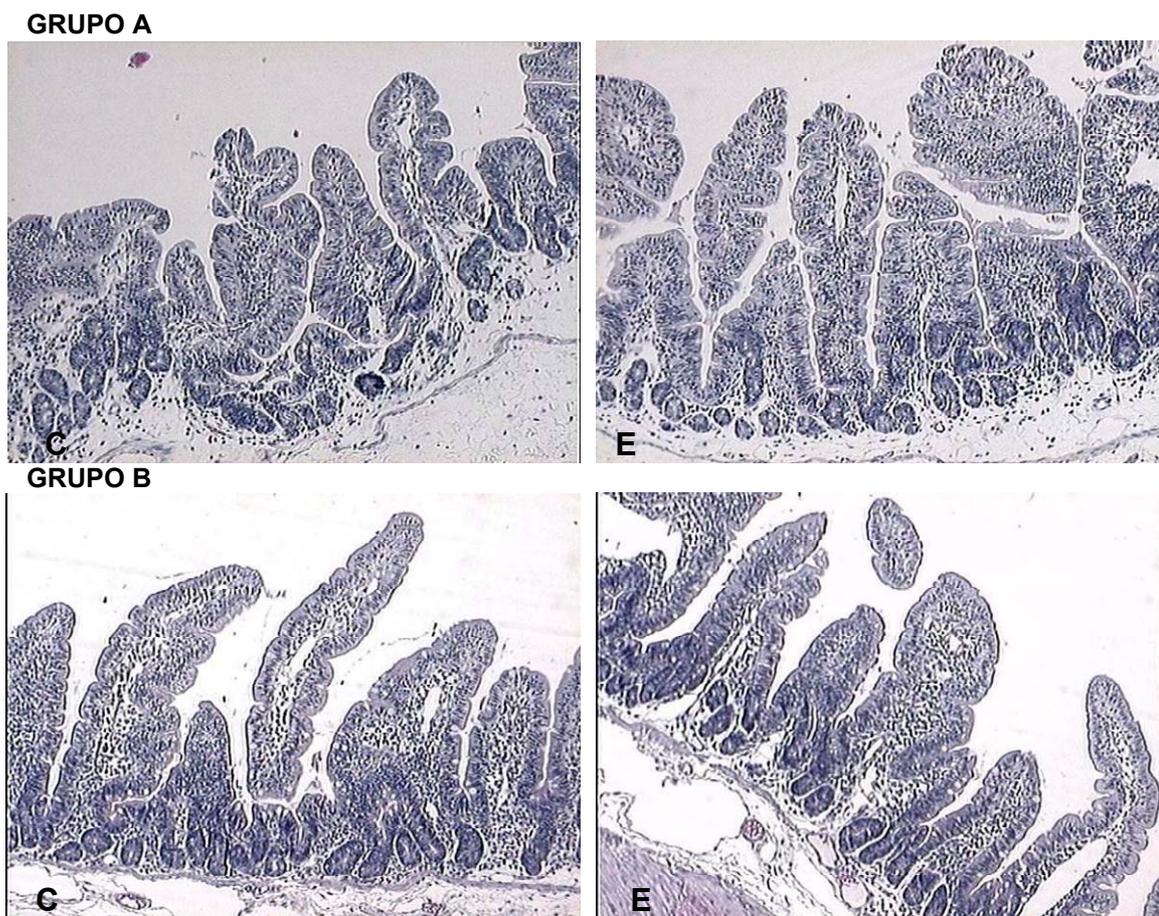
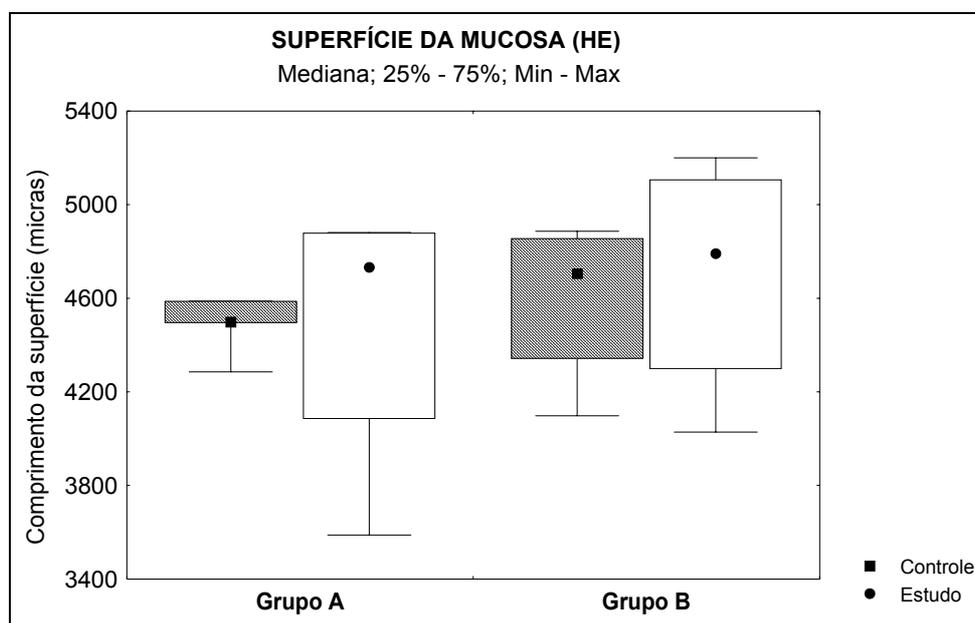


Figura 40 - Fotomicrografia de lâminas coradas com HE mostrando a semelhança da superfície epitelial comparando-se uma porção controle (C) e uma porção estudo (E) de um coelho do grupo A <peça 4 coelho 4> e de um coelho do grupo B <peça 2 coelho 6>.

Figura 41 - Gráfico comparando os valores de comprimento da superfície da camada mucosa dos grupos A e B, nas porções controle e estudo



4.7.2.2 Avaliação da Espessura da Camada Muscular

Comparando-se as médias de espessura da camada muscular na porção controle, entre os grupos A e B, e na porção estudo, usando o teste de Mann-Whitney, não se observou diferença estatística, conforme mostrado na tabela 8.

E a comparação entre porções estudo e controle dentro de cada grupo (A e B), usando o teste estatístico de Wilcoxon, também não demonstrou valor de p significativo (Tabela 9).

Tabela 8 - Comparação entre os grupos A e B nas porções controle e estudo em relação à espessura da camada muscular

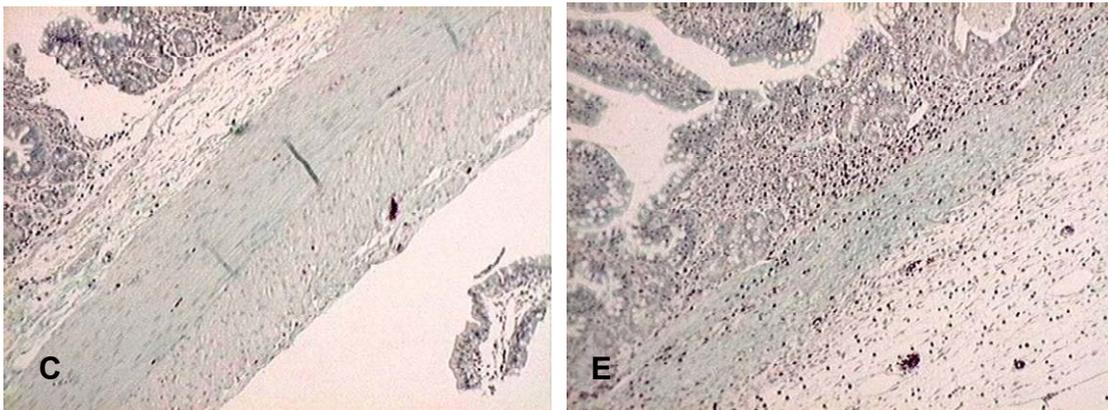
Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de p
Controle	A	5	389,66	257,56	168,49	918,16	309,33	0,556
	B	4	207,68	185,80	169,27	289,86	56,41	
Estudo	A	5	421,99	299,47	215,45	824,47	253,90	0,730
	B	4	306,46	280,60	248,40	416,25	75,94	

Tabela 9 - Comparação entre as porções controle e estudo nos grupos A e B em relação à espessura da camada muscular

Grupo	Variável	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de p
A	Controle	5	389,66	257,56	168,49	918,16	309,33	0,345
	Estudo	5	421,99	299,47	215,45	824,47	253,90	
	Diferença (E-C)	5	32,33	46,96	-93,69	112,31	75,93	
B	Controle	4	207,68	185,80	169,27	289,86	56,41	0,068
	Estudo	4	306,46	280,60	248,40	416,25	75,94	
	Diferença (E-C)	4	98,78	96,36	76,02	126,38	20,78	

Pode-se observar na figura 42, a semelhança das espessuras da camada muscular. E na figura 43 a semelhança dos valores de mediana para este parâmetro de avaliação.

GRUPO A



GRUPO B

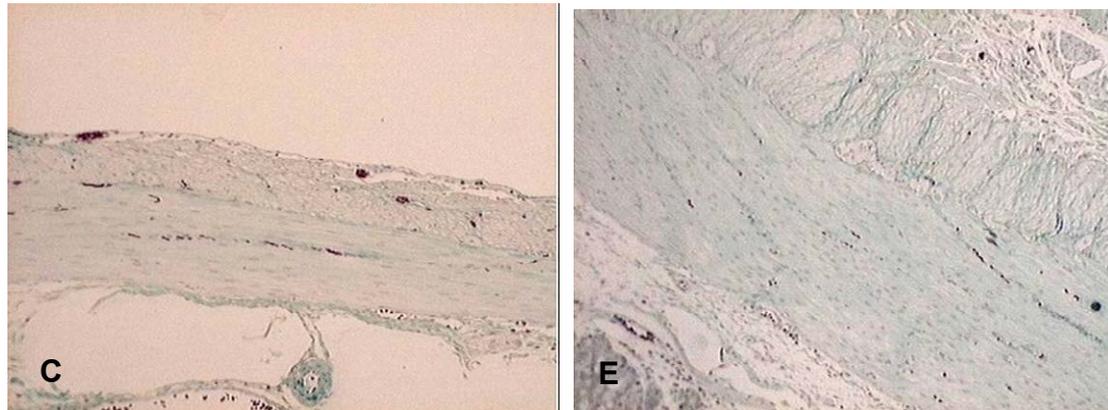
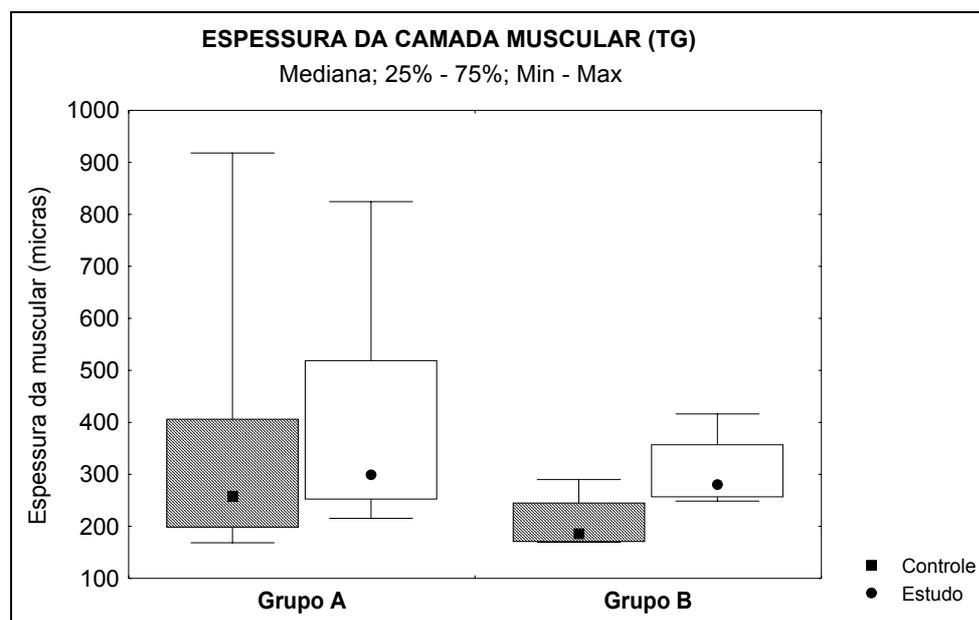


Figura 42 - Fotomicrografia de lâminas coradas com Tricrômico de Gomori mostrando a medida da espessura da camada muscular comparando-se a porção controle (C) e a porção estudo (E) de um coelho do grupo A <peça 3 coelho 9> e de um coelho do grupo B <peça 2 coelho 10>.

Figura 43 - Gráfico comparando os valores de espessura da camada muscular dos grupos A e B, nas porções controle e estudo.



4.7.2.3 Contagem de Células Caliciformes

Na tabela 10, encontram-se as médias do número de células caliciformes entre os grupos A e B, na porção controle e na porção estudo. Os resultados do teste estatístico indicam a não rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5%, utilizando-se o teste de Mann-Whitney, indicando similaridade entre os dados.

Tabela 10 - Comparação entre os grupos A e B nas porções controle e estudo em relação à contagem de células caliciformes

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de p
Controle	A	5	19,16	18,00	15,59	25,72	4,18	0,905
	B	4	19,32	16,22	12,52	32,59	9,05	
Estudo	A	5	19,52	16,79	14,88	31,38	6,84	1,000
	B	4	20,54	17,25	12,83	34,84	9,79	

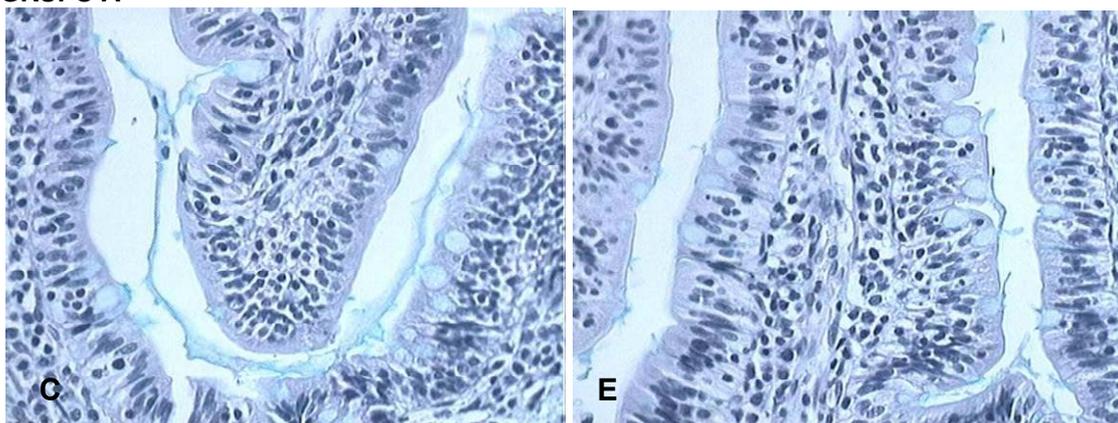
A não rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5%, também foi observada utilizando-se o teste de Wilcoxon na avaliação da comparação entre porções estudo e controle dentro de cada grupo (A e B), confirmando a similaridade entre os dados (Tabela 11).

Tabela 11 - Comparação entre as porções controle e estudo nos grupos A e B em relação à contagem de células caliciformes

Grupo	Variável	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Valor de p
A	Controle	5	19,16	18,00	15,59	25,72	4,18	0,500
	Estudo	5	19,52	16,79	14,88	31,38	6,84	
	Diferença (E-C)	5	0,36	-0,72	-1,38	5,66	2,98	
B	Controle	4	19,32	16,22	12,25	32,59	9,05	0,144
	Estudo	4	20,54	17,25	12,83	34,84	9,79	
	Diferença (E-C)	4	1,22	1,35	-0,06	2,25	1,14	

Conforme as comparações acima, pode-se observar na figura 44 e 45 a semelhança do número de células caliciformes nas porções controle e estudo, e em ambos os grupos.

GRUPO A



GRUPO B

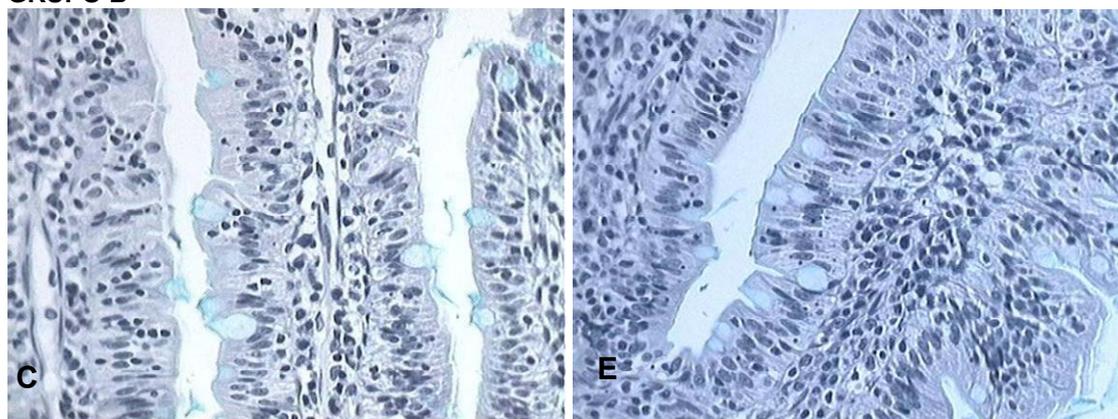
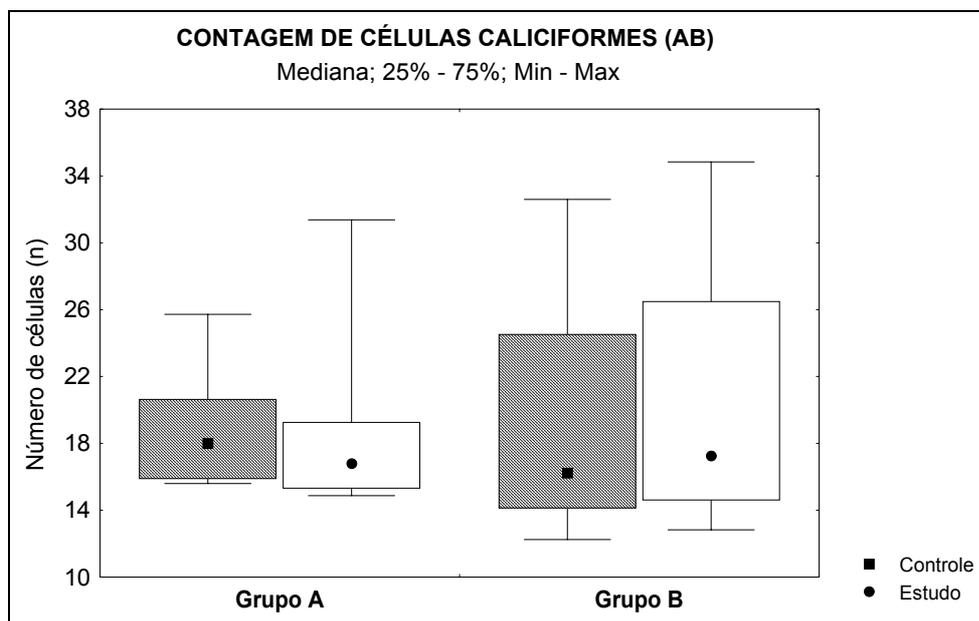


Figura 44 - Fotomicrografias de lâminas coradas com Alcian Blue, mostrando a semelhança de distribuição de células caliciformes na superfície da mucosa, comparando-se porção controle (C) e porção estudo (E) de um coelho do grupo A e de um coelho do grupo B.

Figura 45 - Gráfico comparando os valores de contagem de células caliciformes dos grupos A e B nas porções controle e estudo.



5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Optou-se pelo coelho como animal de experimentação pela sua disponibilidade e facilidade de manipulação. Além disso, o coelho, embora seja lagomorfo e tenha algumas diferenças anatômicas em outras porções do trato gastrointestinal em relação aos humanos, apresenta o intestino delgado com dimensões similares as de um recém-nascido, criando situação análoga àquelas em que as cirurgias para SIC são realizadas com maior frequência.

A escolha de gaiolas com fundo de metal, foi devida a uma intercorrência com um dos coelhos do ensaio piloto que, mantido em gaiola com fundo de madeira coberto de cepilho, foi a óbito no 5^o dia de pós-operatório, devido a uma perfuração intestinal por corpo estranho. A perfuração ocorreu em região proximal do intestino delgado, longe do local dos enxertos e com estes íntegros, sem aderências ou deiscência. O corpo estranho causador da perfuração foi um “bolo de cepilho” que o coelho provavelmente ingeriu durante o período de jejum pós-operatório.

A comparação dos pesos na fase inicial entre os coelhos do grupo A e os do grupo B (peso inicial A x B), assim como na fase final (peso final A x B), não demonstraram diferenças significantes entre os grupos ($p=0,286$ e $p=0,111$ respectivamente), de onde pode-se dizer que se tratava de um grupo homogêneo de animais em relação ao peso, tanto na fase inicial como na final (Figura 33).

Em ambos os grupos, os animais apresentaram ganho de peso facilmente visibilizado no gráfico 2 (peso final – peso inicial). Embora significativa no grupo A ($p=0,043$), a diferença entre os pesos inicial e final nos coelhos do grupo B não atingiu significância estatística ($p=0,068$), mesmo apresentando média dos pesos iniciais menor e média dos pesos finais maior do que o grupo A. Este dado pode

ter ocorrido devido ao fato do tamanho da amostra estar reduzido no grupo B após a exclusão de um animal por óbito (número 5).

Com esses resultados podemos dizer que o desenvolvimento dos coelhos em relação ao peso, não sofreu interferência da presença dos enxertos na alça intestinal, no grupo A.

Como todos os coelhos apresentaram ganho de peso, embora não significativo no grupo B, pode-se afirmar que o procedimento cirúrgico e a presença do enxerto, não causaram alterações que comprometessem o ganho de peso em ambos os grupos.

5.2 PREPARO E CONSERVAÇÃO DO ENXERTO

A utilização do papel filtro e dos pontos de *nylon* 4.0 como método para estabilização da dupla camada de SID, foi essencial para permitir a secção do material e confecção dos enxertos na medida desejada. Sem a utilização dos mesmos um folheto de SID deslizava sobre o outro, não permitindo a secção.

A utilização do bisturi com duplo cabo e dupla lâmina também foi importante para facilitar o corte e uniformizar o tamanho dos enxertos. Este ou outro modelo de confecção dos enxertos de SID, não foi encontrado em outros trabalhos publicados anteriormente.

A neomicina é um antibiótico de amplo espectro. Em geral, os microorganismos sensíveis são inibidos por concentrações de 5 a 10 µg/mL ou menos. As espécies gram-negativas sensíveis incluem a *E.coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris*. As espécies gram-positivas incluem *Staphilococcus aureus* e *E. faecalis*⁽⁵⁸⁾.

Devido à sua localização no organismo, a submucosa intestinal é colonizada por microorganismos da família das enterobactérias, especificamente, as espécies de *Escherichia coli*. Apesar da solução de sulfato de neomicina a 10% apresentar comprovada ação local no combate a estes microorganismos, os resultados da análise bacteriológica do enxerto mostraram que a ação local desse antibiótico não foi suficiente para a efetiva esterilização *in vitro* da SID.

Após esse resultado, as amostras de submucosa foram tratadas com ciprofloxacina 5µg/mL e norfloxacina 400mg/mL por 48 horas, pela equipe que

realizou o teste microbiológico. Foram realizadas nova cultura e antibiograma, sendo que desta vez não foi identificado crescimento bacteriano, entretanto, foi observado o desenvolvimento de fungos⁽⁷⁸⁾. O teste realizado com ciprofloxacina e norfloxacina mostrou efetividade destes antibióticos no controle bacteriano da SID num período de 48 horas, entretanto, ainda são necessários estudos adicionais, inclusive em relação ao controle do crescimento fúngico⁽⁷⁸⁾.

No presente estudo os testes citados acima foram realizados em paralelo ao andamento do trabalho, portanto a manutenção dos enxertos foi realizada apenas com solução de neomicina 10%. Essa opção foi influenciada pelos trabalhos realizados por Greca *et al*^(15,20,22,24,62) e Souza Filho *et al*^(19,23), que a utilizaram, e que não observaram nenhum sinal de infecção que comprometesse a incorporação do enxerto ou a condução do experimento. A neomicina também foi o método de conservação utilizado por Wang *et al*, porém estes realizavam a esterilização do enxerto com solução de etanol 75% e lavagem com solução salina para posterior armazenamento do enxerto em solução desse antibiótico a 4° C^(11,30).

Um consenso em relação aos métodos de esterilização e conservação da SID está longe de ser alcançado, porém deve ser foco de atenção na busca por enxertos livres de microorganismos e que mantenham suas características biológicas responsáveis pela proliferação e diferenciação celular.

5.3 COLETA DO MATERIAL

5.3.1 Tempo de Coleta do Material

A divisão dos animais em grupos A e B, foi importante para a avaliação das alterações sofridas pelo enxerto em dois tempos diferentes, seis e doze semanas.

A escolha destes períodos foi baseada nos dados macro e microscópicos fornecidos pelos trabalhos de Wang *et al*^(11,30), Badylak *et al*⁽⁵⁷⁾ e Panigotto *et al*⁽¹³⁾, em relação ao tempo e evolução da incorporação do enxerto na parede de órgãos no trato gastrintestinal.

Apesar dos parâmetros avaliados não terem apresentado diferença estatística, as peças referentes ao grupo B apresentavam uma maior organização do tecido neoformado. Portanto, é importante a realização de trabalhos com maior estratificação dos tempos de avaliação dos enxertos, no período até 6 semanas, a fim de melhor definir as etapas da incorporação da SID.

5.3.2 Achados Intra-Operatórios

As poucas aderências encontradas nos locais que continham os enxertos e a facilidade de manuseio e liberação das mesmas (Figura 35), estão em concordância com achados da literatura, de forma que em trabalhos publicados anteriormente com uso de SID no trato gastrointestinal, pouca ou nenhuma aderência foi encontrada^(11,30).

Wang *et al* em trabalho com anastomose de enxerto tubular de SID em alça intestinal isolada de ratos, observaram que algumas aderências estavam presentes nos animais avaliados com duas semanas de implante, porém com vinte e quatro semanas quase não havia aderência^(11,30).

Os mesmos autores encontraram dois casos de estenose e de peritonite relacionada à fístula no local da anastomose⁽³⁰⁾. Parnigotto *et al*⁽¹³⁾, em trabalho semelhante, também com enxertos de parede total, não observaram estenose.

Badylak *et al* em estudo com SID em lesões esofágicas observaram estenose em todos os quatro casos em que foi usado enxerto tubular de SID, mas em nenhum dos onze casos em que foi utilizado enxerto parcial⁽⁵⁷⁾. Os piores resultados das próteses de parede total se repetiram em estudo com uso de SID em intestino delgado de cães, no qual ocorreu estenose em um caso, e deiscência com óbito nos outros três, dos quatro casos avaliados. Os vinte e três cães que receberam enxertos parciais não apresentaram estenose⁽³¹⁾.

Em concordância com os artigos citados acima, no presente estudo, que utilizou enxertos parciais de SID anastomosados a alça, não houve nenhum caso de estenose.

Como foi observado na avaliação microbiológica dos enxertos, estes não eram estéreis. Este achado pode ter influenciado no óbito do coelho número cinco por deiscência e peritonite, e também na exclusão do enxerto de número 3 do

coelho 2, que apresentou aumento de volume com reação de corpo estranho e abscesso localizado na parede da alça.

Com exceção desses dois casos, os demais animais não apresentam infecção. A não ocorrência de infecção na grande maioria dos casos pode estar relacionada a uma possível atividade bactericida da SID citada por Holtom *et al*, porém não confirmada por esses autores⁽⁶⁶⁾.

A idéia inicial desse estudo incluía a medida do comprimento da alça antes e após o implante dos enxertos, assim como, na reabertura após período de seis e doze semanas. Entretanto, nas primeiras tentativas de aferição do comprimento do segmento em estudo após os implantes de SID, obtiveram-se diferentes valores para medidas consecutivas do mesmo segmento, devido à peristalse das alças intestinais. Essa mesma dificuldade em quantificar o ganho em centímetros após procedimento de alongamento intestinal, foi relatada por Kim *et al* em seus artigos sobre a técnica STEP^(8,49).

5.4 AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA MACROSCÓPICA

A identificação do enxerto e a visualização da linha de sutura com a alça intestinal foi difícil pelos autores na maioria dos artigos avaliados, principalmente nos animais com mais tempo de pós-operatório. Esta afirmação também foi verdadeira nesse experimento, conforme pode ser visualizado na figura 36, e de onde podemos concluir que os pontos de *nylon* 4.0 colocados no mesentério, como referência, foram essenciais para a localização dos enxertos. O uso desses pontos foi de grande valor, devendo sempre serem utilizados para a avaliação microscópica do local exato do implante da SID.

Parnigotto *et al*⁽¹³⁾ conseguiram identificar a sutura da submucosa com o íleo apenas nos animais avaliados com uma semana, sendo que nos demais, com três e seis semanas, foi possível identificar apenas uma pequena diferença macroscópica entre o íleo e a prótese⁽¹³⁾. Em trabalho de Badylak *et al*, foi possível identificar visualmente os enxertos apenas até o 50º dia, após esse período o local de implante da submucosa era identificado somente com a palpação da parede do órgão, que estava espessada⁽⁵⁷⁾.

A retração do enxerto, apesar de não ter sido avaliada no presente estudo, deve ser considerada em estudos futuros, já que foi observada em algum grau tanto nos trabalhos que utilizaram enxertos tubulares^(11,13,30) como nos que utilizaram retalhos planos⁽⁷⁵⁾.

A idéia inicial era, antes e após o término do implante dos enxertos de submucosa, medir o segmento intestinal em estudo para registro do alongamento ganho com a presença dos enxertos. Porém, devido à presença da peristalse intestinal, houve grande dificuldade de aferição, com valores diferentes mesmo após medidas consecutivas. Por este motivo, optou-se por abandonar esse critério de avaliação.

5.5 AVALIAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA MICROSCÓPICA

5.5.1 Avaliação Qualitativa das Lâminas

Todos os cortes avaliados continham células das quatro camadas da parede intestinal, confirmando as propriedades histológicas da SID em estimular a proliferação celular e a formação de tecido semelhante ao tecido no qual o enxerto foi implantado. Diversos outros autores que utilizaram a SID em seus experimentos, já haviam obtido este resultado quando os enxertos foram avaliados em tempos semelhantes ao utilizado neste estudo^(11,30).

5.5.2 Avaliação Quantitativa

A ausência de diferença estatística significativa entre os parâmetros avaliados do grupo A em relação ao grupo avaliado com doze semanas (grupo B) pode ter sofrido influência importante do tamanho da amostra.

As figuras 41, 43 e 45 ilustram a semelhança entre os valores dos parâmetros objetivos comparando-se a porção controle e a porção estudo, e o grupo A e o grupo B, com valores de mediana, valor mínimo e valor máximo.

Em relação à superfície da mucosa, pode-se dizer que houve formação de células epiteliais, vilosidades e criptas na porção que continha o enxerto, já que não houve diferença entre os comprimentos da superfície em relação ao grupo controle. O epitélio neoformado pode ser considerado morfológicamente semelhante ao epitélio intestinal normal mesmo no grupo A (Figura 40).

Wang *et al*⁽³⁰⁾, observaram neomucosa com aspecto típico do intestino delgado, com vilosidades e criptas bem desenvolvidas após doze semanas da anastomose de enxerto tubular em íleo de ratos Sprague Dawley. Este aspecto foi ainda mais semelhante ao intestino normal após vinte e quatro semanas de avaliação, entretanto esta diferença não apresentou significância estatística. Estes autores também avaliaram morfológicamente a neomucosa utilizando parâmetros objetivos como: enterócitos absorptivos pela atividade da fosfatase alcalina, células caliciformes com a coloração de Alcian Blue, e células de Panneth e enteroendócrinas com imunohistoquímica. Na avaliação imunohistoquímica da camada muscular, os autores observaram células musculares bem diferenciadas, porém apenas uma camada de células musculares foi identificada⁽³⁰⁾.

No presente estudo, pudemos identificar duas camadas de células musculares em diferentes estágios de organização, tanto no grupo avaliado com seis como com doze semanas, conforme foi ilustrado na figura 42.

Na avaliação da espessura da camada muscular houve uma maior variação entre os valores máximos e mínimos, e desvio padrão, referentes aos coelhos do grupo A, com menos tempo de pós-operatório. Este dado poderia sugerir uma maior desorganização das fibras musculares pelo infiltrado inflamatório na fase inicial, entretanto, não apresentou significância estatística, mostrando serem necessários estudos com amostras maiores para confirmar ou não esta tendência.

A presença de células caliciformes na camada mucosa da porção estudo, em ambos os grupos, oferece um parâmetro a mais em relação à semelhança entre o epitélio neoformado e o epitélio normal. A visualização de produção de muco por estas células, pela coloração de Alcian Blue, sugere funcionalidade deste novo epitélio já presente após seis semanas de implante da SID.

5.6 INCORPORAÇÃO DO ENXERTO

Baseando-se nos diferentes resultados apresentados na literatura em relação ao tempo de incorporação do enxerto de submucosa^(11,13,29,57), apresentados anteriormente, estudos adicionais fazem-se necessários para definir exatamente os tempos de cada etapa de formação de epitélio de revestimento, fibras musculares e organização do tecido neoformado sobre a SID.

Grupos maiores de animais e avaliações em diversos períodos de tempo, devem ser realizados, permitindo o mapeamento da incorporação da SID na parede intestinal ou em outros sítios de implante.

5.7 RESULTADOS TARDIOS

Apesar de já utilizada em humanos em algumas áreas, muitas dúvidas ainda restam em relação aos resultados à longo prazo, da utilização da submucosa intestinal porcina como bioenxerto.

Zheng *et al*, após terem observado a formação de edema não-infeccioso e dor em pacientes submetidos ao reparo de tendão com uso de SID porcino comercializado, realizaram avaliação da SID (Restore SIS) com técnicas de PCR para identificar presença de células e/ou DNA porcino. Estes autores chamaram a atenção para o fato da submucosa intestinal do porco não ser uma matriz totalmente acelular e conter DNA porcino com possíveis implicações na sua utilização em seres humanos⁽²⁷⁾. Estes dados não foram confirmados por outros estudos e necessitam de maiores investigações.

Apesar de não ter sido foco desse estudo, a celularidade e a presença de DNA porcino devem ser avaliadas neste material, já que pode ter repercussões ainda não estudadas, com comprometimento dos resultados a longo prazo.

5.8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Baseando-se no achados deste estudo, alguns questionamentos importantes devem ser considerados para investigações futuras.

Não há consenso em relação às técnicas de esterilização e conservação da SID nos diversos trabalhos publicados na literatura. Portanto, primeiramente, faz-se necessário encontrar um enxerto de SID estéril, aperfeiçoando-se as técnicas em estudo atualmente e certificando-se de que estas não interfiram nas propriedades histológicas da submucosa, que garantem a adesão e proliferação celular para a formação de neotecido. Deve-se confirmar ainda, a acelularidade desse enxerto e a necessidade ou não de se utilizar enxertos homólogos.

Uma opção seria realizar estudos experimentais utilizando segmentos de SID comercializada (Sugisis®), que já possui métodos de esterilização e conservação definidos, porém não divulgados para reprodução. A desvantagem dessa opção seria o custo elevado do material para ser empregado em estudos experimentais.

O implante de enxertos parciais em relação à circunferência da alça, parece ser preferível em relação aos enxertos de parede total tubulizados, devido aos resultados já apresentados em alguns trabalhos^(11,30,57). Como o ganho de superfície absorptiva deve ser proporcional ao tamanho e quantidade de enxertos implantados, deve-se tentar implantar enxertos maiores e em maior quantidade, e definir o número e a distância mínima e máxima entre os enxertos.

Valores precisos do tempo de incorporação dos enxertos ainda não foram definidos. Para isso, são necessários estudos com amostras maiores e maior fragmentação dos tempos de reabertura no período até 6 semanas do implante da SID, que é o período no qual se observa a maior diferença de resultados em relação a formação das diferentes camadas da parede do órgão.

O implante de enxertos alternados, conforme realizado no experimento e baseando-se nas incisões realizadas na técnica STEP, teoricamente gera um alongamento da alça intestinal. Avaliar o ganho de comprimento da alça com o implante dos enxertos deve ser foco de investigações futuras.

A presença de células caliciformes produtoras de muco no epitélio neoformado foi considerada um fator indicativo de funcionalidade, entretanto, são necessários estudos adicionais em relação aos aspectos funcionais, assim como em relação aos aspectos de retração do enxerto.

Como o procedimento visa o aumento da superfície absorptiva em pacientes com Síndrome do Intestino Curto, há necessidade de se testar a técnica de implantes de SID em um modelo animal de SIC. Isso permitiria a avaliação da

melhora dos padrões funcionais e absorptivos intestinais, assim como do ganho de peso e aceitação de dieta enteral, em animais que já possuam alterações anatômicas e funcionais inerentes à síndrome e aos mecanismos de adaptação intestinal associados a ela.

6. CONCLUSÃO

6 CONCLUSÕES

Os enxertos foram incorporados à parede intestinal nos períodos de 6 e 12 semanas e houve formação de células representativas das quatro camadas da parede do órgão em graus variados de organização.

Como não houve diferença significativa dos parâmetros quantitativos avaliados, nas comparações entre as porções controle e estudo, esta pode ser considerada uma porção nova de tecido com presença de camadas muscular e mucosa semelhantes ao intestino normal.

A anastomose seriada de enxertos de SID no íleo terminal de coelhos relacionou-se à formação de um novo tecido intestinal e mostrou-se uma técnica viável e com poucas complicações.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Warner BW. Short-Bowel Syndrome. In: Grosfeld JL, O'Neil Jr JA, Fonkalsrud EW, Coran AG. Pediatric Surgery. 6th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2006. p.1369-98.
2. Hollwarth ME. Short-Bowel Syndrome. In: Puri P. Pediatric Surgery. 1st ed. Germany: Ed. Springer; 2006. p.257-75.
3. Cuffari C *et al.* Short Bowel Syndrome. Internet. Disponível: <http://www.emedicine.com>. Last Update: June, 2006.
4. Barbieri D, Maksoud JG. Síndrome do Intestino Curto. In: Maksoud JG. Cirurgia Pediátrica. 2^a ed. São Paulo: Ed. Revinter; 2003. p.795-804.
5. Bianchi A. Intestinal loop lengthening – a technique for increasing small intestinal length. J Pediatr Surg. 1980; 15:145-51.
6. Bianchi A. Experience with longitudinal intestinal lengthening and tailoring. Eur J Pediatr Surg. 1999; 9(4):256-9.
7. Kimura K, Soper RT. A new bowel elongation technique for the short-bowel syndrome using the isolated bowel segment Iowa models. J Pediatr Surg. 1993; 28:792-4.
8. Kim HB, Fauza D, Garza J. Serial transverse enteroplasty (STEP): a novel bowel lengthening procedure. J Pediatr Surg. 2003; 38:425-9.
9. Javid PJ, Kim HB, Duggan CP, Jaksic T. Serial transverse enteroplasty is associated with successful short-term outcomes in infants with short-bowel syndrome. J Pediatr Surg. 2005; 40:1019-24.
10. López Santamaria M, Hernández Oliveros S. Indications, techniques and outcomes of small bowel transplant. Nutr Hosp. 2007; 22(2): 13-23.
11. Wang ZQ, Watanabe Y, Toki A. Experimental assessment of small intestinal submucosa as small bowel graft in a rat model. J Pediatr Surg. 2003; 38(11): 1596-601.
12. Lantz GC, Badylak SF, Coffey AC, Geddes LA. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. J Surg Res. 1989; 47:74-80.
13. Parnigotto PP, Marzaro M, Artusi T, Perrino G, Conconi MT. Short Bowel Syndrome: Experimental approach to increase intestinal surface in rats by gastric homologous acellular matrix. J Pediatr Surg. 2000; 35(9):1304-8.

14. Greca FH, Biondo- Simões MLP, Ioshii SO, Chin EWK, Kimura LY, el Tawil I, Berlatto F. Enxerto de submucosa intestinal para reparo de parede de intestino delgado de cães. *Acta Cir Bras.* 2001; 16:16-21.
15. Greca FH, Souza Filho ZA, Rocha SL, Borsato KS, Fernandes HAD, Niiside MA. Small intestinal submucosa to repair anterior abdominal wall defect in rats. *Acta Cir Bras.* 2004; 19(5):472-7.
16. Lopes MF, Cabrita A, Ilharco J, Pessa P, Patricio J. Grafts of porcine intestinal submucosa for repair of cervical and abdominal esophageal defects in the rat. *J Invest Surg.* 2006; 19(2):105-11.
17. Brown-Etris M, Cutshall WD, Hiles MC. A new biomaterial derived from small intestine submucosa and developed into a wound matrix device. *Wounds.* 2002; 14:150-66.
18. Badylak SF, Record R, Lindberg K, Hodde J, Park K. Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1998; 9(8): 863-78. (Abstract)
19. Souza Filho ZA, Greca FH, Rocha SL, Ioshii SO, Domasnki AC, Kfoury D, Campos PDP, Silva RFKC. Porcine submucosa graft for the treatment of duodenal injuries in dogs. *Acta Cir Bras.* 2005; 20(5):394-8.
20. Greca FH, Noronha L, Bendhack M, Feres A, Soccol A, Duda JR. Use of small intestine submucosa as ureteral allograft in pigs. *Int Braz J Urol.* 2004; 30(4):327-34.
21. Cormack DH. Histologia e seus Métodos de Estudo. In: Comarck DH. *Fundamentos de Histologia.* 1st ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan; 1996. p.5-7.
22. Greca FH, Biondo-Simões MLH, Andrade dos Santos EA, Zanelatto-Gonçalves PC, Kin Chin EW, Ioshii SO. Retalho de submucosa de intestino delgado autólogo para aumento da capacidade da bexiga: estudo experimental em cães. *Rev Col Bras Cir* 2002; 29:294-9.
23. Souza Filho ZA, Ioshii SO, Greca FH, Biondo-Simões MLP, Rocha SL, Duda JR, Oliveira Filho HR. Small intestine submucosa for repair of cervical esophageal lesions in dog model. *Acta Cir Bras.* 2003; 18(3).
24. Greca FH, Noronha L, Costa FDA, Souza Filho ZA, Soccol AT, Feres AN, Duda JR, Adams E. comparative study of the biocompatibility of the porcine intestinal submucosa and bovine pericardium used as grafts in the inferior cava vein of dogs. *Acta Cir Bras.* 2005; 20(4).
25. Gagliardi S, Ansaloni L, Catena F, Gazzotti F, D'Alessandr L, Pinna AD. Hernioplasty with Surgisis[®] inguinal hernia matrix (IHM) trade mark. *Surg Technol Int.* 2007; 16: 128-33. (Abstract)
26. Handle Cook[®]. Relatório Técnico - Curativo SIS/ Membranas regeneradoras. Distribuição exclusiva do fabricante. 2006; 18 p.

27. Zheng MH, Chen J, Kirilak Y, Willers C, Xu J, Wood D. Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005; 73(1):61-7. (Abstract)
28. Cobb MA, Badylak SF, Janas W, Simmons-Byrd A, Boop FA. Porcine small intestinal submucosa as a dural substitute. *Surg Neurol.* 1999; 51(1): 99-104. (Abstract)
29. Holcomb III GW, Ostlie DJ, Miller KA. Laparoscopic patch repair of diaphragmatic hernias with Surgisis. *J Pediatr Surg.* 2005; 40: E1-5.
30. Wang ZQ, Watanabe Y, Noda T, Yoshida A, Oyama T, Toki A. Morphologic evaluation of regenerated small bowel by small intestinal submucosa. *J Pediatr Surg.* 2005; 40(12): 1898-902.
31. Chen MK, Badylak SF. Small bowel tissue engineering using small intestinal submucosa as a scaffold. *J Surg Res.* 2001; 99(2): 352-8.
32. Kato T, Mittal N, Nishida S, Levi D, Yamashiki N, Tzakis A *et al.* The role of intestinal transplantation in the management of babies with extensive gut resection. *J Pediatr Surg.* 2003; 38(2):145-49.
33. Petty JK, Ziegler MM. Operative strategies for necrotizing enterocolitis: the prevention and treatment of short-bowel syndrome. *Semin Pediatr Surg.* 2005; 14: 191-98.
34. Hutcher NE, Mendez-Picon G, Salzberg AM. Prejejunal transposition of colon to prevent the development of short bowel syndrome in puppies with 90 per cent small intestine resection. *J Pediatr Surg.* 1973; 8:771.
35. Avissar NE, Ziegler TR, Toia L, Gu L, Ray EC, Berlanga-Acosta J, Sax HC. ATB^o/ASCT2 expression in residual rabbit bowel is decreased after massive enterectomy and is restored by growth hormone treatment. *J Nutrition.* 2004; 134 (9):2173-7.
36. Stern LE, Erwin CR, O' Brien DP, Huang FS, Warner BW. Serum from mice after small bowel resection enhances intestinal epithelial cell growth. *J Ped Surg.* 2001; 36(1): 184-89.
37. Crenn P, Coudray-Lucas C, Thuillier F, *et al.* Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. *Gastroenterology.* 2000; 119:1496.
38. Nehra V, Camilleri M, Burton D, *et al.* An open trial of octreotide long-acting release in the management of short bowel syndrome. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96:1494. (Abstract)
39. Figueroa-Colon R, Harris PR, Birdsong R, *et al.* Impact of intestinal lengthening on the nutritional outcome for children with short bowel syndrome. *J Pediatr Surg.* 1996; 31(7):912-6.

40. Sacher P, Stauffer UG. An animal model for short-bowel syndrome in piglets to assess the efficiency of bowel-lengthening procedures. *Eur J Pediatr Surg.* 1997; 7(4):207-11.
41. Kim HB, Lee PW, Garza J. Serial transverse enteroplasty for short bowel syndrome: a case report. *J Pediatr Surg.* 2003; 38:881-5.
42. Warner BW, Chaet MS: Nontransplant surgical options for management of the short bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1993; 17: 1. (Abstract)
43. Dias AI, Martins JL, Moriya EM, Seda Neto J. Helicoidal enteromyotomy in rats: an experimental model of intestinal lengthening. *Transplant Proc.* 2004; 36(4):1012-4.
44. Chen Y, Zhang J, Qu R, Wang J, Xie Y. An animal experiment on short gut lengthening. *Chin Med J.* 1997; 110(5):354-7.
45. Park J, Puapong DP, Wu BM, Atkinson JB, Dunn JCY. Enterogenesis by mechanical lengthening: morphology and function of the lengthened small intestine. *J Pediatr Surg.* 2004; 39(12):1823-7.
46. Puapong DP, Wu BM, Lam MM, Atkinson JB, Dunn JCY. Distension Enterogenesis: increasing the size and function of small intestine. *J Pediatr Surg.* 2006; 41:763-7.
47. Safford SD, Freemerman AJ, Safford KM, Bentley R, Skinner MA. Longitudinal mechanical tension induces growth in the small bowel of juvenile rats. *Gut.* 2005; 54(8):1085-90.
48. Collins J III, Vicente Y, Georgeson K, *et al.* Partial intestinal obstruction induces substantial mucosal proliferation in the pig. *J Pediatr Surg.* 1996; 31:415.
49. Ismail A, Alkadhi A, Alnagaar O, Khirate A. Serial transverse enteroplasty in intestinal atresia management. *J Pediatr Surg.* 2005; 40:E05-E06.
50. Bueno J, Gutierrez J, Mazariegos GV, *et al.* Analysis of patients with longitudinal intestinal lengthening procedure referred for intestinal transplantation. *J Pediatr Surg.* 2001; 36:178.
51. Walker SR, Nucci A, Yaworski JA, Barksdale Jr EM. The Bianchi procedure: a 20-year single institution experience. *J Pediatr Surg.* 2006; 41:113-9.
52. Wales PW, Sanjeev D. Serial transverse enteroplasty as primary therapy for neonates with proximal jejunal atresia. *J Pediatr Surg.* 2005; 40:E31-E34.
53. Ehrlich PF, Mychaliska GB, Teitelbaum DH. The 2 STEP: na approach to repeating a serial transverse enteroplasty. *J Pediatr Surg.* 2007; 42:819-22.

54. Chang RW, Javid PJ, Oh JT, Andreoli S, Kim HB, Fauza D, Jaksic T. Serial transverse enteroplasty enhances intestinal function in a model of short bowel syndrome. *Ann Surg.* 2006; 243(2):223-8.
55. Georgeson K, Halpin D, Figueroa R *et al.* Sequential intestinal lengthening procedures for refractory short bowel syndrome. *J Pediatr Surg.* 1994; 29(2):316-20.
56. Grikscheit TC, Vacanti JP. The Impact of Tissue Engineering in Pediatric Surgery. In: Grosfeld JL, O'Neil Jr JA, Fonkalsrud EW, Coran AG. *Pediatric Surgery.* 6th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2006. p.21-30.
57. Badylak S, Meurling S, Chen M, Spievack A, Simmons-Byrd ^a Resorbable bioscaffold for esophageal repair in a dog model. *J Pediatr Surg.* 2000; 35(7): 1097-1103.
58. Hodde J, Janis A, Hiles M. Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: Part II. bioactivity and matrix interaction. *J Mater Sci: Mater Med.* 2007; 18(4):545-50.
59. Hodde JP, Record RD, Tullius RS, Badylak SF. Retention of endothelial cell adherence to porcine-derived extracellular matrix after disinfection and sterilization. *Tissue Eng.* 2002; 8(2): 225-34.
60. Kropp BP, Ludlow JK, Spicer D, Rippey MK, Badylak SF, Adams MC *et al.* Rabbit urethral regeneration using small intestinal submucosa onlay grafts. *Urology.* 1998; 52(1): 138-42. (Abstract)
61. Gubbels SP, Richardson M, Trune D, Bascom DA, Wax MK. Tracheal reconstruction with porcine small intestine submucosa in a rabbit model. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006; 134(6):1028-35. (Abstract)
62. Greca FH, Silva APG, Dallolmo VC, Mima WH, Okawa L, Alencar TG. Interposição de submucosa intestino delgado para reparo de tendão em coelhos. *Acta Cir Bras.* 2003; 18 (suppl 2 – Temas Livres Experimentais).
63. Liang R, Woo SL, Takakura Y, Moon DK, Jia F, Abramowitch SD. Long-term effects of porcine small intestine submucosa on the healing of medial collateral ligament: a functional tissue engineering study. *J Orthop Res.* 2006; 24(4):811-9. (Abstract)
64. Musahl V, Abramowitch SD, Gilbert TW, Tsuda E, Wang JH, Badylak SF *et al.* The use of porcine small intestinal submucosa to enhance the healing of the medial collateral ligament – tissue engineering study in rabbits. *J Orthop Res.* 2004; 22(1): 214-20. (Abstract)
65. Sandoval JA, Lou D, Engum SA, Fischer LM, Bouchard CM, Davis MM, Grosfeld JL. The whole truth: comparative analysis of diaphragmatic hernia repair using 4-ply vs 8-ply small intestinal submucosa in a growing animal model. *J Pediatr Surg.* 2006; 41(3):518-23.

66. Holtom PD, Shinar Z, Benna J, Patzakis MJ. Porcine small intestine submucosa does not show antimicrobial properties. *Clin Orthop Relat Res.* 2004; (427): 18-21. (Abstract)
67. Gabriel A, Gollin G. Management of complicated gastroschisis with porcine small intestinal submucosa and negative pressure wound therapy. *J Pediatr Surg.* 2006; 41: 1836-40.
68. Lai JK, Chang PY, Lin JN. Bladder autoaugmentation using various biodegradable scaffolds seeded with autologous smooth muscle cells in a rabbit model. *J Pediatr Surg.* 2005; 40:1869-73.
69. Lai JY, Chang PY, Lin JN. Body wall repair using small intestinal submucosa seeded with cells. *J Pediatr Surg.* 2003; 38(12): 1752-55.
70. Pribitkin EA, Ambro BT, Bloeden E, O'Hara BJ. Rabbit ear cartilage regeneration with a small intestinal submucosa graft. *Laryngoscope.* 2004; 114(9) supl 2: 1-19.
71. Tavaeu JW, Tartaglia M, Buchannan D, Smith B, Koenig G, Thomfohrde K *et al.* Regeneration of uterine horn using porcine small intestinal submucosa grafts in rabbits. *J Invest Surg.* 2004; 17(2): 81-92. (Abstract)
72. Dejardin LM, Arnoczky SP, Clarke RB. Use of small intestinal submucosal implants for regeneration of large fascial defects: an experimental study in dogs. *J Biomed Mater Res.* 1999; 46(2): 203-11. (Abstract)
73. Ansaloni L, Bonasoni P, Cambrini P, Catena F, De Cataldis A, Gagliardi S *et al.* Experimental evaluation of Surgisis as scaffold for neointestine regeneration in a rat model. *Transplant Proc.* 2003; 38(6): 1844-8.
74. Hodde J, Janis A, Ernst D, Zopf D, Sherman D, Johnson C. Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: Part I. Composition and matrix architecture. *J mater Sci Mater Med.* 2007; 18(4): 537-43.
75. Poulouse BK, Scholz S, Moore DE, Schimidt CR, Grogan EL, Lao OB *et al.* Physiologic properties of small intestine submucosa. *J Surg Res.* 2005; 123(2): 262-7.
76. Helton WS, Fisichella PM, Berger R, Horgan S, Espat NJ, Abcarian H. Short-term outcomes with small intestinal submucosa for ventral abdominal hernia. *Arch Surg.* 2005; 140(6): 549-60.
77. Breyer BN, Brant WO, Garcia MM, Bella AJ, Lue TF. Complications of porcine small intestine submucosa graft for Peyronie's disease. *J Urol.* 2007; 177(2): 589-91.
78. Guarita LCS, Francisco JC, Hammerschmidt M. Associação da submucosa do intestino e das células mioblásticas esqueléticas no miocárdio infartado. Relatório final de trabalho do PIBIC - CNPq – PUCPR. 2007; p 5.

79. Suckow MA, Douglas FA. The Laboratory Rabbit. volume in the laboratory animal pocket reference series. 1st ed. New York: Ed CRC Press; 1997.p. 145.
80. Testini M, Scacco S, Loiotila L, Papa F, Vergari R, Regina G, Nicolardi V, Paccione F. Comparison of oxidative phosphorylation in the anastomosis of small and large bowel: an experimental study in the rabbit. *Eur Surg Res.* 1998; 30:1-7.
81. Testini M, Portincasa P, Scacco S, Piccini G, Minerva F, Lissidini G, Papa F, Loiotila L, Bonomo GM, Palasciano G. Contractility in vitro and mitochondrial response in small and large rabbit bowel after anastomosis. *World J Surg.* 2002; 26(4):493-8.
82. Moreira Jr H, Wexner SD, Yamaguchi T, Pikarsky AJ, Choi JS, Weiss EG, Nogueras JJ, Sardinha TC, Billotti VL. Use of Bioresorbable Membrane (Sodium Hyaluronate + Carboxymethylcellulose) After Controlled Bowel Injuries in a Rabbit Model. *Dis Colon Rectum.* 2000; 43:182-7.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética

Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCPR, em 14 de agosto de 2006.



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria Acadêmica e de Pesquisa
Núcleo de Bioética

Curitiba, 29 de agosto de 2006.

PARECER N. 34.06/CEUA-PUCPR

Prezado (a) Pesquisador (a),

Informo a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCPR, em reunião realizada no dia 14 de agosto do corrente ano avaliou o Projeto Intitulado "A Avaliação da Enteroanastomose Seriada de Enxertos Homólogos de Submucosa Intestinal como Técnica de Alongamento Intestinal- Experimental em Coelhos", sob o registro no CEUA /PUCPR nº 153.

O experimento classificado como de categoria A será realizado com o número de 10 Coelhos New Zealand, os quais após o experimento serão Barbiturico Benzodiazepinico, EV, dose letal.

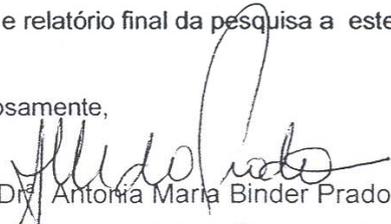
O colegiado do CEPA entendeu que o projeto avaliado está de acordo com as normas éticas vigentes no país e por isso emite o seguinte parecer:

APROVADO COM RECOMENDAÇÕES

- Não há assinatura do Decano do CCSC na folha de rosto
- Decrever a concentração de dose letal
- Corrigir o cronograma

Lembramos o senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEPA.

Atenciosamente,


Prof.ª Dr.ª Antonia Maria Binder Prado

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCPR

Ilma Sra

Josue Bruginski de Paula

APÊNDICES

APÊNDICES

Apêndice A – Ficha de Acompanhamento Pré e Pós-Operatório

FICHA DO COELHO N^o _____

Data da aquisição: ___/___/___

PESO:

Peso Pré-Operatório (1^a cirurgia): _____ g

Peso na 2^a cirurgia: _____ g

PREPARO PRÉ- OPERATÓRIO:

Jejum:

De sólidos - 48h antes da cirurgia

Início dia: ___/___/___ Hora: __:__ h

De Líquidos – 6hs antes da cirurgia

Início dia: ___/___/___ (dia da cirurgia) Hora: __:__ h

Anti-Vermes:

Ivermectin: _____ ml

Dia: ___/___/___

INTRA-OPERATÓRIO:

Data da 1^a Cirurgia: ___/___/___

Hora de início: __:__ h.

Reidratação:

() SG 5% _____ ml

() SF0,9% _____ ml

Anestésicos:

Ketamina: _____ ml

Xilasina: _____ ml

Necessário doses adicionais: () Sim () Não

Ketamina:

1. _____ ml 3. _____ ml 5. _____ ml

2. _____ ml 4. _____ ml 6. _____ ml

Hora de término da cirurgia: __:__ h.

ATB (Trans-operatório):

Gentocin: _____ ml

Tribrisen: _____ ml

Analgésico:

Banamine: _____ ml

PÓS- OPERATÓRIO:

Jejum absoluto – 36h

Apenas água com glicose – nas próximas 48h

Início dia: ___/___/___ Hora:__:__h

4º dia – ração umedecida controlada:

- 1/4 por 2 dias

Início dia: ___/___/___

- 1/3 por mais 2 dias

Início dia: ___/___/___

- 1/2 por mais 1 dia

Início dia: ___/___/___

- Quantidade normal

Início dia: ___/___/___

ATB (Por mais dois dias)

Gentocin:_____ml

Tribissen:_____ml

Analgésico (Por mais dois dias)

Banamine:_____ml

REABERTURA:

Data da 2ª Cirurgia: ___/___/___

Hora de início:__:__h.

Reidratação: ()SG 5% _____ml

() SF0,9% _____ml

Anestésicos:

Ketamina:_____ml

Xilasina:_____ml

EUTANÁSIA:

Com Tiopental EV até PCR

Hora do término:__:__

Apêndice B – Prontuário dos Coelhos

Exemplo de prontuário do coelho número 1, utilizado como forma de orientação dos procedimentos de cuidados e medicações, desde o início do jejum pré-operatório até a liberação de ração seca *ad libitum* no pós-operatório, aos funcionários do biotério.

PRONTUÁRIO DO COELHO Nº 1**Dia 30/01**

Jejum de sólidos após 12h.
Apenas água com glicose.

Dia 31/01

Jejum de sólidos.
Apenas água com glicose.

Dia 01/02

Jejum total após 8h.
Cirurgia À tarde – fazer antibiótico.

Dia 02/02

Manter jejum absoluto.
Antibiótico + Analgésico

Dia 03/02

Apenas água com glicose - começar pela manhã.
Antibiótico + Analgésico

Dia 04/02

Apenas água com glicose.

Dia 05/02

Manter água com glicose
Começar com ração pela manhã – 1 copinho de café (UMEDECIDA)

Dia 06/02

Manter água com glicose
Ração – 2 copinhos de café (UMEDECIDA)

Dia 07/02

Manter água com glicose
Ração – 2 copinhos de café (UMEDECIDA)

Dia 08/02

Água NORMAL
Ração – 3 copinhos de café (UMEDECIDA)

Dia 09/02

Água NORMAL
Ração – 4 copinhos de café (SECA)

Dia 10/02

Água NORMAL
Ração NORMAL

Apêndice C – Protocolos de Avaliação Anátomo-Patológica

Protocolos de Avaliação Anátomo-Patológica das três colorações realizadas:

Hematoxilina-Eosina

Tricrômico de Gomori

Alcian Blue

Hematoxilina-Eosina

Lâmina nº _____ (identificação para à esquerda)

Segmento _____ Coelho _____

Corte 1(superior)

PARÂMETROS	SEGM CONTROLE		SEGM ESTUDO	
	Campo 1	Campo 2	Campo 1	Campo 2
Fibroblastos jovens				
Reação granulomatosa (corpo estranho no fio)				
Identificação das camadas				
Mucosa				
Submucosa				
Muscular				
Serosa				
COMPRIMENTO DA SUPERFÍCIE MUCOSA (micras)				

Corte 2 (inferior)

PARÂMETROS	SEGM CONTROLE		SEGM ESTUDO	
	Campo 3	Campo 4	Campo 3	Campo 4
Fibroblastos jovens				
Reação granulomatosa (corpo estranho no fio)				
Identificação das camadas				
Mucosa				
Submucosa				
Muscular				
Serosa				
COMPRIMENTO DA SUPERFÍCIE MUCOSA (micras)				

Tricrômico de Gomori

Lâmina nº _____ (identificação para à esquerda)

Segmento _____ Coelho _____

Corte 1 (superior)

PARÂMETROS	SEGM CONTROLE		SEGM ESTUDO	
Identificação de Cam. Musc.	Campo 1	Campo 2	Campo 1	Campo 2
Longitudinal				
Transversal				

PARÂMETROS	SEGM CONTROLE		SEGM ESTUDO	
Espessura das Cam Musc.	Campo 1	Campo 2	Campo 1	Campo 2
Medida 1				
Medida 2				
Medida 3				
Medida 4				
Medida 5				

Corte 2 (inferior)

PARÂMETROS	SEGM CONTROLE		SEGM ESTUDO	
Identificação de Cam. Musc.	Campo 3	Campo 4	Campo 3	Campo 4
Longitudinal				
Transversal				

PARÂMETROS	SEGM CONTROLE		SEGM ESTUDO	
Espessura das Cam Musc.	Campo 3	Campo 4	Campo 3	Campo 4
Medida 1				
Medida 2				
Medida 3				
Medida 4				
Medida 5				

Alcian Blue

Lâmina nº _____ (identificação para à esquerda)

Segmento _____ Coelho _____

Corte 1 (superior)

PARÂMETROS	SEGM CONTROLE		SEGM ESTUDO	
	Campo 1	Campo 2	Campo 1	Campo 2
Presença de células Caliciformes				
CONTAGEM DE CÉLS				

Corte 2 (inferior)

PARÂMETROS	SEGM CONTROLE		SEGM ESTUDO	
	Campo 3	Campo 4	Campo 3	Campo 4
Presença de células Caliciformes				
CONTAGEM DE CÉLS				

Apêndice D – Resultados da Avaliação Anátomo-Patológica

Resultados da análise quantitativa da avaliação anátomo-patológica.

Superfície da Mucosa

Espessura da Camada Muscular

Contagem de Células Caliciformes

Superfície da Mucosa

HEMATOXILINA-EOSINA (SUPERFÍCIE DA MUCOSA)

GRUPO A												
	SEGM 1			SEGM 2			SEGM 3			SEGM 4		
COELHO 1	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
Campo 1	3538,55	3908,11	3269,75	3243,1	4357,28	2691,33	2855,12	5350,03				
Campo 2	5644,92	5765,79	3634	5622,2	4154,7	3251,9	5834,58	5282,86				
Campo 3	3677,23	3370,26	3948,18	3427,71	4634,48	4216,44	4737,04	3877,02				
Campo 4	4776,5	2668,9	4710,25	4241,22	4192,27	4572,08	4608,33	3868,68				
Média	4409,3	3928,265	3890,545	4133,558	4334,683	3682,938	4508,768	4594,648	MEDIA	4285,824	4084,852	4084,852
DesvPad	992,5933	1325,93	612,7642	1083,018	218,376	864,9235	1232,119	833,9179	DP	272,9974	386,574	386,574
CoefVar	22,51%	33,75%	15,75%	26,20%	5,04%	23,48%	27,33%	18,15%	CV	6,37%	9,46%	9,46%
	SEGM 1			SEGM 2			SEGM 3			SEGM 4		
COELHO 2	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
Campo 1	2535,93	3377,47	6835,84	4286,67	5871,12	3628,48	5426,99	3631,21				
Campo 2	3061,67	2999,16	6079	5580,68	2408,79	2513	2408,79	2513				
Campo 3	2512,77	2241,62	5375,67	4403,78	5612,13	2235,6	5612,13	2235,6				
Campo 4	2402,78	4226,23	5821	3938,6	4829,758	3002,073	4495,308	3588,542				
Média	2628,288	3211,12	6027,878	4552,433	1624,224	733,683	1724,296	841,2725				
DesvPad	294,7022	825,2228	611,9885	713,3981								
CoefVar	11,21%	25,70%	10,15%	15,67%	33,63%	24,44%	38,36%	23,44%	CV	38,36%	23,44%	23,44%
	SEGM 1			SEGM 2			SEGM 3			SEGM 4		
COELHO 3	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
Campo 1	3761,19	4282,05	3976,96	6042,34	4480,58	4107,56	4821,02	4939,02				
Campo 2	2759,67	3370,25	5092,82	6133,81	5229,36	5738,41	5320,36	5035,86				
Campo 3	4557,38	6513,67	3554,23	5450,41	5696,74	5042,8	5775,35	3500,37				
Campo 4	4695,85	5476,24	4426,35	4437,4	4180,46	4569,41	5074,1	3410,9				
Média	3943,523	4910,553	4262,59	5515,99	4896,785	4864,545	5247,708	4221,538	MEDIA	4587,651	4878,156	4878,156
DesvPad	890,2377	1373,261	658,1432	780,257	692,0699	696,55	406,5656	886,0245	DP	592,1161	528,9029	528,9029
CoefVar	22,57%	27,97%	15,44%	14,15%	14,13%	14,32%	7,75%	20,99%	CV	12,91%	10,84%	10,84%

Espessura da Camada Muscular

TRICRÔMICO DE GOMORI (ESPESSURA DA MUSCULAR)

GRUPO A												
	SEGM 1			SEGM 2			SEGM 3			SEGM 4		
	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo	Controle	Estudo
COELHO1												
Campo 1	160,511	317,871	174,461	281,222	383,568	456,495	290,626	382,279	COELHO 1			
Campo 2	128,752	339,702	218,983	526,815	396,017	274,705	408,643	216,129	CONTROLE ESTUDO			
Campo 3	163,874	76,23	271,699	269,826	306,123	262,725	264,489	259,161	MEDIA 257,5628 299,4709			
Campo 4	241,705	169,234	269,29	368,594	168,848	171,345	273,415	419,202	DP 66,89696 57,01062			
Média	173,7105	225,7593	233,6083	361,6143	313,639	291,3175	309,2933	319,1928	CV 25,97% 19,04%			
DesvPad	48,01216	125,1953	46,31914	118,6423	104,3985	119,402	67,11559	96,96679				
CoefVar	27,64%	55,46%	19,83%	32,81%	33,29%	40,99%	21,70%	30,38%				
COELHO2												
Campo 1	893,895	818,444	538,654	773,73	994,013	1052,765	COELHO 2					
Campo 2	935,238	615,619	693,339	792,94	1040,433	1104,635	CONTROLE ESTUDO					
Campo 3	1151,316	309,888	874,499	590,224	996,689	1124,517	MEDIA 918,1648 824,4706					
Campo 4	1294,463	513,1	678,017	1073,182	927,421	1124,603	DP 196,3142 269,0844					
Média	1068,728	564,2628	696,1273	807,519	989,639	1101,63	CV 21,38% 32,64%					
DesvPad	188,1163	211,7937	137,7801	199,2889	46,61882	33,90374						
CoefVar	17,60%	37,53%	19,79%	24,68%	4,71%	3,08%						
COELHO 3												
Campo 1	116,509	80,396	246,131	236,413	127,573	230,862	162,18	158,117	COELHO 3			
Campo 2	318,783	133,825	222,4	248,895	131,998	234,527	157,396	268,732	CONTROLE ESTUDO			
Campo 3	108,836	206,057	238,471	233,876	124,841	253,397	168,28	225,109	MEDIA 168,4893 215,4518			
Campo 4	135,191	269,691	137,916	176,077	140,743	280,481	158,581	210,774	DP 32,9633 32,12721			
Média	169,8298	172,4923	211,2295	223,8153	131,2888	249,8168	161,6093	215,683	CV 19,56% 14,91%			
DesvPad	99,91705	82,76687	49,86603	32,49542	6,958596	22,70223	4,890345	45,61063				
CoefVar	58,83%	47,98%	23,61%	14,52%	5,30%	9,09%	3,03%	21,15%				

Contagem de Células Caliciformes

ALCIAN BLUE (CONTAGEM DE CÉLULAS CALICIFORMES)

GRUPO A																	
		SEGM 1			SEGM 2			SEGM 3			SEGM 4						
COELHO1	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	
Campo 1	14	14	17	16	16	20	8	4	35	22	16	14	25	18	33	19	
Campo 2	18	26	18	17	25	23	6	6	26	36	10	17	16	14	21	25	
Campo 3	20	28	14	16	36	19	6	2	27	20	7	13	49	50	35	15	COELHO1
Campo 4	16	27	6	2	38	25	8	13	18	32	1	3	57	32	18	28	CONTROLE ESTUDO
Média	15,38	18,25			17,87	14,00			17,50	19,62			31,75	25,12			MED
DesvPad	4,31	8,66			13,44	9,04			11,40	10,59			14,86	11,88			DP
CoeffVar	28,02%	47,48%			75,20%	64,57%			65,15%	53,99%			46,80%	47,31%			CV
		SEGM 1			SEGM 2			SEGM 3			SEGM 4						
COELHO2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	
Campo 1	7	7	7	3	69	22	23	37	24	12	7	3	24	12	7	3	
Campo 2	13	16	12	5	32	44	16	68	51	8	4	2	51	8	4	2	
Campo 3	8	18	0	2	52	42	14	0	10	7	3	5	10	7	3	5	COELHO2
Campo 4	11	21	1	20	48	43	8	5	12	12	0	1	12	12	0	1	CONTROLE ESTUDO
Média	7,38	11,50			32,75	32,62			13,88	6,25			13,88	6,25			MED
DesvPad	4,81	8,02			21,57	22,47			16,71	4,27			16,71	4,27			DP
CoeffVar	65,20%	69,72%			65,87%	68,89%			120,44%	68,29%			120,44%	68,29%			CV
		SEGM 1			SEGM 2			SEGM 3			SEGM 4						
COELHO 3	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	
Campo 1	19	19	5	8	13	17	15	9	13	15	15	6	26	9	8	5	
Campo 2	14	34	4	1	11	21	5	3	16	23	7	4	31	13	12	3	
Campo 3	53	27	7	4	26	16	19	19	19	27	6	2	19	20	1	8	COELHO3
Campo 4	26	39	9	10	16	21	13	10	29	32	7	22	27	15	8	14	CONTROLE ESTUDO
Média	17,12	17,75			14,75	14,50			14,00	16,37			16,50	10,88			MED
DesvPad	16,33	14,28			6,12	6,50			7,73	11,35			10,84	5,64			DP
CoeffVar	95,36%	80,45%			41,44%	44,85%			55,20%	69,32%			65,68%	51,89%			CV
		SEGM 1			SEGM 2			SEGM 3			SEGM 4						
COELHO1	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	
Campo 1	19	19	5	8	13	17	15	9	13	15	15	6	26	9	8	5	
Campo 2	14	34	4	1	11	21	5	3	16	23	7	4	31	13	12	3	
Campo 3	53	27	7	4	26	16	19	19	19	27	6	2	19	20	1	8	COELHO3
Campo 4	26	39	9	10	16	21	13	10	29	32	7	22	27	15	8	14	CONTROLE ESTUDO
Média	17,12	17,75			14,75	14,50			14,00	16,37			16,50	10,88			MED
DesvPad	16,33	14,28			6,12	6,50			7,73	11,35			10,84	5,64			DP
CoeffVar	95,36%	80,45%			41,44%	44,85%			55,20%	69,32%			65,68%	51,89%			CV

SEGMENTO 1												
COELHO 4	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 1	21	25	13	22	26	13	17	5	30	32	16	15
Campo 2	4	29	7	24	11	7	10	6	34	16	19	0
Campo 3	37	29	12	5	14	10	0	1	18	11	18	2
Campo 4	15	19	9	13	7	6	7	6	26	7	35	9
Média	14,75	20,75			11,50	6,75			22,00	19,50	15,25	14,25
DesvPad	10,37	8,26			7,76	3,54			8,07	9,35	8,96	11,03
CoeffVar	70,34%	39,80%			67,52%	52,38%			36,69%	47,95%	58,73%	77,40%
SEGMENTO 2												
COELHO 9	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 1	55	36	30	11	55	53	21	53	37	48	48	6
Campo 2	18	77	27	15	23	52	49	29	20	38	58	4
Campo 3	52	57	34	27	31	13	13	10	18	60	13	2
Campo 4	37	66	17	6	48	20	31	7	38	36	11	2
Média	33,75	36,88			33,87	29,6			30,38	48,88	4,88	10,12
DesvPad	14,06	26,89			15,17	20,21			17,38	10,02	4,02	8,66
CoeffVar	41,65%	72,93%			44,78%	68,23%			57,21%	20,50%	82,37%	85,52%
SEGMENTO 3												
COELHO 6	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 1	17	15	22	17	9	11	14	10	12	18	10	11
Campo 2	12	10	18	16	13	17	8	12	14	24	7	5
Campo 3	18	10	17	9	8	7	17	13	9	23	18	8
Campo 4	7	13	11	14	11	6	15	7	13	18	15	12
Média	15,25	13,00			11,88	10,38			12,75	17,25	12,00	10,38
DesvPad	4,83	3,02			3,40	3,70			3,20	5,04	3,63	3,66
CoeffVar	31,69%	23,26%			28,62%	35,67%			25,07%	29,19%	30,21%	35,30%
SEGMENTO 4												
COELHO 4	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 1	21	25	13	22	26	13	17	5	30	32	16	15
Campo 2	4	29	7	24	11	7	10	6	34	16	19	0
Campo 3	37	29	12	5	14	10	0	1	18	11	18	2
Campo 4	15	19	9	13	7	6	7	6	26	7	35	9
Média	14,75	20,75			11,50	6,75			22,00	19,50	15,25	14,25
DesvPad	10,37	8,26			7,76	3,54			8,07	9,35	8,96	11,03
CoeffVar	70,34%	39,80%			67,52%	52,38%			36,69%	47,95%	58,73%	77,40%
SEGMENTO 5												
COELHO 9	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 1	55	36	30	11	55	53	21	53	37	48	48	6
Campo 2	18	77	27	15	23	52	49	29	20	38	58	4
Campo 3	52	57	34	27	31	13	13	10	18	60	13	2
Campo 4	37	66	17	6	48	20	31	7	38	36	11	2
Média	33,75	36,88			33,87	29,6			30,38	48,88	4,88	10,12
DesvPad	14,06	26,89			15,17	20,21			17,38	10,02	4,02	8,66
CoeffVar	41,65%	72,93%			44,78%	68,23%			57,21%	20,50%	82,37%	85,52%
SEGMENTO 6												
COELHO 6	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 1	17	15	22	17	9	11	14	10	12	18	10	11
Campo 2	12	10	18	16	13	17	8	12	14	24	7	5
Campo 3	18	10	17	9	8	7	17	13	9	23	18	8
Campo 4	7	13	11	14	11	6	15	7	13	18	15	12
Média	15,25	13,00			11,88	10,38			12,75	17,25	12,00	10,38
DesvPad	4,83	3,02			3,40	3,70			3,20	5,04	3,63	3,66
CoeffVar	31,69%	23,26%			28,62%	35,67%			25,07%	29,19%	30,21%	35,30%
SEGMENTO 7												
COELHO 4	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 1	21	25	13	22	26	13	17	5	30	32	16	15
Campo 2	4	29	7	24	11	7	10	6	34	16	19	0
Campo 3	37	29	12	5	14	10	0	1	18	11	18	2
Campo 4	15	19	9	13	7	6	7	6	26	7	35	9
Média	14,75	20,75			11,50	6,75			22,00	19,50	15,25	14,25
DesvPad	10,37	8,26			7,76	3,54			8,07	9,35	8,96	11,03
CoeffVar	70,34%	39,80%			67,52%	52,38%			36,69%	47,95%	58,73%	77,40%
SEGMENTO 8												
COELHO 9	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 1	55	36	30	11	55	53	21	53	37	48	48	6
Campo 2	18	77	27	15	23	52	49	29	20	38	58	4
Campo 3	52	57	34	27	31	13	13	10	18	60	13	2
Campo 4	37	66	17	6	48	20	31	7	38	36	11	2
Média	33,75	36,88			33,87	29,6			30,38	48,88	4,88	10,12
DesvPad	14,06	26,89			15,17	20,21			17,38	10,02	4,02	8,66
CoeffVar	41,65%	72,93%			44,78%	68,23%			57,21%	20,50%	82,37%	85,52%
SEGMENTO 9												
COELHO 6	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 1	17	15	22	17	9	11	14	10	12	18	10	11
Campo 2	12	10	18	16	13	17	8	12	14	24	7	5
Campo 3	18	10	17	9	8	7	17	13	9	23	18	8
Campo 4	7	13	11	14	11	6	15	7	13	18	15	12
Média	15,25	13,00			11,88	10,38			12,75	17,25	12,00	10,38
DesvPad	4,83	3,02			3,40	3,70			3,20	5,04	3,63	3,66
CoeffVar	31,69%	23,26%			28,62%	35,67%			25,07%	29,19%	30,21%	35,30%
SEGMENTO 10												
COELHO 4	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 1	21	25	13	22	26	13	17	5	30	32	16	15
Campo 2	4	29	7	24	11	7	10	6	34	16	19	0
Campo 3	37	29	12	5	14	10	0	1	18	11	18	2
Campo 4	15	19	9	13	7	6	7	6	26	7	35	9
Média	14,75	20,75			11,50	6,75			22,00	19,50	15,25	14,25
DesvPad	10,37	8,26			7,76	3,54			8,07	9,35	8,96	11,03
CoeffVar	70,34%	39,80%			67,52%	52,38%			36,69%	47,95%	58,73%	77,40%
SEGMENTO 11												
COELHO 9	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 1	55	36	30	11	55	53	21	53	37	48	48	6
Campo 2	18	77	27	15	23	52	49	29	20	38	58	4
Campo 3	52	57	34	27	31	13	13	10	18	60	13	2
Campo 4	37	66	17	6	48	20	31	7	38	36	11	2
Média	33,75	36,88			33,87	29,6			30,38	48,88	4,88	10,12
DesvPad	14,06	26,89			15,17	20,21			17,38	10,02	4,02	8,66
CoeffVar	41,65%	72,93%			44,78%	68,23%			57,21%	20,50%	82,37%	85,52%
SEGMENTO 12												
COELHO 6	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 1	17	15	22	17	9	11	14	10	12	18	10	11
Campo 2	12	10	18	16	13	17	8	12	14	24	7	5
Campo 3	18	10	17	9	8	7	17	13	9	23	18	8
Campo 4	7	13	11	14	11	6	15	7	13	18	15	12
Média	15,25	13,00			11,88	10,38			12,75	17,25	12,00	10,38
DesvPad	4,83	3,02			3,40	3,70			3,20	5,04	3,63	3,66
CoeffVar	31,69%	23,26%			28,62%	35,67%			25,07%	29,19%	30,21%	35,30%
SEGMENTO 13												
COELHO 4	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 1	21	25	13	22	26	13	17	5	30	32	16	15
Campo 2	4	29	7	24	11	7	10	6	34	16	19	0
Campo 3	37	29	12	5	14	10	0	1	18	11	18	2
Campo 4	15	19	9	13	7	6	7	6	26	7	35	9
Média	14,75	20,75			11,50	6,75			22,00	19,50	15,25	14,25
DesvPad	10,37	8,26			7,76	3,54			8,07	9,35	8,96	11,03
CoeffVar	70,34%	39,80%			67,52%	52,38%			36,69%	47,95%	58,73%	77,40%
SEGMENTO 14												
COELHO 9	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 1	55	36	30	11	55	53	21	53	37	48	48	6
Campo 2	18	77	27	15	23	52	49	29	20	38		

COELHO 7	SEGMENT 1			SEGMENT 2			SEGMENT 3			SEGMENT 4			COELHO 7		
Campo 1	C1	E1	C2	E2	C1	E1	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 2	35	29	13	11	25	16	34	7	12	4	7	11	11	1	2
Campo 3	51	30	19	34	40	20	21	19	20	5	1	10	12	0	3
Campo 4	37	27	28	21	16	29	8	13	11	2	3	20	21	14	17
Média	28,75	26,50	15	23	13	17	18	14	21	2	2	15	14	8	13
DesvPad	12,79	8,18	19,38	18,50	9,62	6,39	49,65%	6,32	8,37	76,59%	8,25	8,87	9,38	11,62	16,44
CoeffVar	44,49%	30,86%	49,65%	34,55%	6,32	8,37	76,59%	94,36%	6,88	6,46	73,45%	55,55%	58,47%	48,07%	16,38
COELHO 8	SEGMENT 1			SEGMENT 2			SEGMENT 3			SEGMENT 4			COELHO 8		
Campo 1	C1	E1	C2	E2	C1	E1	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 2	14	15	10	2	35	23	3	20	31	9	12	13	26	10	6
Campo 3	19	18	4	3	32	15	10	21	45	23	13	17	19	14	8
Campo 4	17	27	8	10	16	48	6	16	11	12	11	20	30	5	18
Média	11,62	12,50	14	7	27	27	22	35	23	18	11	27	37	24	22
DesvPad	5,21	8,57	16,87	19,62	12,80	14,16	75,85%	19,25	19,625	16,25	20,75	7,28	10,48	16,00	18,12
CoeffVar	44,80%	68,55%	75,85%	72,16%	40,97%	64,16%	44,83%	50,53%	19,94%	20,90%	3,19	3,79	19,94%	20,90%	16,00
COELHO 10	SEGMENT 1			SEGMENT 2			SEGMENT 3			SEGMENT 4			COELHO 10		
Campo 1	C1	E1	C2	E2	C1	E1	E2	C1	E1	C2	E2	C1	E1	C2	E2
Campo 2	43	37	39	21	22	37	21	13	48	8	5	25	37	18	13
Campo 3	29	40	34	26	30	48	24	25	32	22	25	22	48	20	24
Campo 4	40	23	51	43	58	48	29	47	34	25	51	30	57	43	75
Média	40,88	33,50	49	44	47	68	21	44	39	49	16	23	35	21	11
DesvPad	7,24	9,09	35,12	37,12	14,37	16,44	40,90%	29,125	31,25	25,25	37,5	8,03	22,00	32,59	34,84
CoeffVar	17,71%	27,13%	40,90%	44,29%	53,93%	49,86%	31,81%	58,67%	21,03%	8,61%	6,85	2,99	21,03%	8,61%	2,99

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

Comissão Internacional de Editores de Revistas Médicas. Normas para a apresentação de artigos propostos para publicação em revistas médicas. In: Miranda JÁ. Normas de Vancouver. 1998 Fev 14: (69 ecrans). Disponível em: URL: <http://homepage.esoterica.pt/~nx2fmd/Normas.html>.

Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social - IPARDES. Universidade Federal do Paraná, Biblioteca Central. Normas para apresentação de documentos científicos/ Teses, dissertações, monografias e trabalhos acadêmicos. Curitiba: Ed da UFPR; 2000. vol. 2. p.44.

Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social - IPARDES. Universidade Federal do Paraná, Biblioteca Central. Normas para apresentação de documentos científicos/ Redação e editoração. Curitiba: Ed da UFPR; 2000. vol. 8. p.96.

International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. Nomina Anatômica Veterinária. 3ª edição. New York, Ed Ithaca, 1983.