

**MARCOS VIEIRA DE SOUSA**

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DA PAREDE CÓLICA NA  
COLITE DE EXCLUSÃO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**Bragança Paulista**

**2009**

**MARCOS VIEIRA DE SOUSA**

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DA PAREDE CÓLICA NA  
COLITE DE EXCLUSÃO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**ORIENTADOR**

**PROF. DR. CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco (USF) para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Bragança Paulista**

**2009**

WI 522  
S697a

Sousa, Marcos Vieira.

Avaliação das alterações histopatológicas da  
parede cólica na colite de exclusão: estudo experimental  
em ratos / Marcos Vieira de Souza. --  
Bragança Paulista, 2009.

65 p.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação  
*Stricto Sensu* em Ciências da Saúde pela Universidade São  
Francisco.

Orientação: Carlos Augusto Real Martinez.

Co-orientadora: Denise Gonçalves Priolli.

1. Cólon. 2. Colite. 3. Colostomia. 4. Processamento de  
imagem assistida por computador. 5. Ratos. I. Martinez, Carlos  
Augusto Real. II. Priolli, Denise Gonçalves. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecárias do Setor de  
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.



---

## **Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

---

---

### **Membros titulares:**

1. Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
  2. Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro
  3. Prof. Dr. René Crepaldi Filho
- 

---

### **Membros suplentes:**

1. Profa. Dra. Alessandra Gambero
  2. Prof. Dr. Rogério Tadeu Palma
- 

**Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da  
Universidade São Francisco.**

**Data: 26/02/2009**

## **DEDICATÓRIA**

A Renato e Nairdez, meus pais.

À Maria, Marinalva, Mauro, Márcia e Magali, meus irmãos.

À Maria Fernanda, minha esposa.

A todos os meus amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, pelo privilégio da vida, pela felicidade de ter uma família, de ter uma profissão digna, e de possuir amigos.

Aos professores Marcelo Lima Ribeiro, meu amigo; Denise Priolli; e Carlos Augusto Real Martinez, meu orientador, amigo, exemplo de médico, cientista e, sobretudo, uma das pessoas mais fantásticas que conheci na vida.

Ao Daniel Duarte da Conceição Miranda, Waldemar Bartchewsky Junior e Demétrius Paiva Arçari, pela paciência e dedicação durante meu aprendizado no Laboratório de biologia molecular.

Ao professor José Aires Pereira pela confecção das lâminas.

À professora Izilda Aparecida Cardinalli pela interpretação das lâminas.

À professora Márcia Helena Serra Pivatto pelas aulas de estatística.

À Adriana Valim Portes pela colaboração durante a coleta do material.

Aos alunos de iniciação científica, Felipe Rodrigues Máximo, Ana Paula Pimentel Spadari, Camila Helaehil Alfredo e Priscila Bartocci pelo apoio durante a cirurgia experimental.

Ao Fabiano Augusto Sallowicz pelo apoio e disponibilidade no laboratório.

*A grandeza não consiste em receber  
honras, mas em merecê-las.*

*Aristóteles*

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS .....	10
RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
1 . INTRODUÇÃO .....	14
1.1 A COLITE DE EXCLUSÃO.....	14
1.2 A ETIOPATOGENIA DA CE.....	14
1.3 A COLITE DE EXCLUSÃO E SEUS SINAIS E SINTOMAS .....	15
1.4 OS ASPECTOS MACROSCOPICOS DA COLITE DE EXCLUSÃO.....	15
1.5 AS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DA COLITE DE EXCLUSÃO .....	16
1.6 OS ESTUDOS SOBRE COLITE DE EXCLUSÃO.....	17
1.7 O USO DA MORFOMETRIA COMPUTADORIZADA .....	17
2 . OBJETIVOS .....	19
2.1. OBJETIVO GERAL .....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. MÉTODO .....	20
4. RESULTADOS .....	29
5. DISCUSSÃO .....	40
5.1 QUANTO AO MÉTODO.....	40
5.1.1 O ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO .....	40
5.1.2 O PRÉ-OPERATÓRIO .....	42
5.1.3 O AGENTE ANESTÉSICO E A TÉCNICA CIRÚRGICA .....	43
5.1.4 O TEMPO DE EXCLUSÃO .....	46
5.2 - QUANTO AOS RESULTADOS .....	48
5.2.1 AS CAMADAS DA MUCOSA CÓLICA.....	51
5.2.2 EROSÕES E ULCERAÇÕES DA MUCOSA INTESTINAL.....	54
5.2.3 A CONGESTÃO VASCULAR.....	55
5.2.4 AS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS .....	56
6. CONCLUSÕES .....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	
ANEXOS	

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Variância no comprimento das criptas da mucosa cólica, nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, em relação aos diferentes tempos de exclusão considerados no estudo.....	36
<b>Tabela 2</b> - Variância na espessura da camada muscular da mucosa, nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, em relação aos diferentes tempos de exclusão considerados no estudo.....	36
<b>Tabela 3</b> - Variância na espessura da camada submucosa, nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, em relação aos diferentes tempos de exclusão considerados no estudo.....	37
<b>Tabela 4</b> - Variância na espessura da camada muscular própria, nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, em relação aos diferentes tempos de exclusão considerados no estudo.....	37
<b>Tabela 5</b> - Correlação entre medidas morfométricas e o período de tempo nos segmentos sem trânsito intestinal.....	38
<b>Tabela 6</b> - Características morfológicas e o período de tempo nos segmentos sem trânsito intestinal.....	38

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Exposição do campo cirúrgico.....	20
<b>Figura 2</b> - Ligadura entre pinças dos vasos sangüíneos da arcada marginal. Presença de fezes no interior do cólon.....	20
<b>Figura 3</b> - Secção do intestino grosso do animal, um centímetro acima da placa da Peyer.....	21
<b>Figura 4</b> - Aspecto final após confecção do estoma proximal.....	21
<b>Figura 5</b> - Irrigação do cólon distal para a remoção de resíduos fecais.....	22
<b>Figura 6</b> - Aspecto da parede abdominal após realização do procedimento cirúrgico.....	23
<b>Figura 7</b> - Segmento intestinal aberto longitudinalmente, pela borda anti-mesocólica.....	24
<b>Figura 8</b> - Segmento proximal do intestino grosso fixado sobre placa de isopor com a superfície mucosa voltada para cima.....	24
<b>Figura 9</b> - Equipamento utilizado para a análise de imagem assistida por computador.....	26
<b>Figura 10</b> - Espessura das criptas da mucosa cólica comparando os subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão.....	28
<b>Figura 11</b> - Espessura da camada muscular da mucosa comparando os subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão.....	29
<b>Figura 12</b> - Espessura da camada submucosa comparando os subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão.....	30
<b>Figura 13</b> - Espessura da camada muscular da mucosa comparando os subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão.....	31

<b>Figura 14</b> - Superfície mucosa cólica no cólon provido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal.....	32
<b>Figura 15</b> - Superfície mucosa cólica no cólon desprovido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal.....	32
<b>Figura 16</b> - Ulcerações da mucosa cólica comparando os subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão.....	33
<b>Figura 17</b> - Congestão vascular na camada submucosa comparando os subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão.....	34
<b>Figura 18</b> - Escore inflamatório comparando os subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão.....	35

## RESUMO

**OBJETIVO:** Avaliar as alterações histopatológicas da parede intestinal comparando segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito intestinal e relacioná-las ao tempo de exclusão de trânsito. **MÉTODO:** Quarenta e cinco ratos Wistar machos foram submetidos à derivação do trânsito intestinal no cólon esquerdo por meio de colostomia proximal e fístula mucosa distal. Os animais foram divididos em três grupos experimentais e cada grupo em dois subgrupos. No primeiro subgrupo realizou-se a derivação do trânsito intestinal (subgrupo experimento) e no segundo, composto de cinco animais, realizou-se apenas laparotomia sem derivação de trânsito (subgrupo controle). O sacrifício foi realizado seis (grupo A), doze (Grupo B) e dezoito semanas (Grupo C) após a realização do procedimento cirúrgico inicial. Segmentos dos cólons providos e desprovidos de trânsito intestinal foram removidos e submetidos a estudo histopatológico. Foram analisadas as variáveis: comprimento das criptas cólicas, ulceração na mucosa, espessura das camadas muscular da mucosa, submucosa e muscular própria, congestão vascular, número de células caliciformes e graduação inflamatória comparando os dois segmentos cólicos nos diferentes grupos experimentais. As variáveis, comprimento das criptas intestinais, espessura das camadas muscular da mucosa, submucosa e muscular própria foram mensuradas por meio de método de imagem assistida por computador. Na análise estatística foram utilizados testes de igualdade de médias e medianas, análise de variância e correlação estabelecendo-se nível de significância de cinco por cento ( $p < 0,05$ ). **RESULTADOS:** A exclusão de trânsito intestinal mostrou-se associada com a redução do comprimento das criptas cólicas, aumento da espessura das camadas muscular da mucosa, submucosa e muscular própria. Verificou-se maior quantidade de ulcerações da superfície mucosa e maior grau de inflamação com o progredir do tempo de exclusão. Houve correlação significativa entre presença de ulcerações na mucosa, congestão vascular da submucosa, aumento da espessura das camadas submucosa e muscular própria, presença de células caliciformes, infiltrado inflamatório, graduação inflamatória e o tempo de exclusão de trânsito. **CONCLUSÃO:** A derivação do trânsito intestinal encontra-se relacionada a alterações na parede cólica do segmento excluído que pioram com o progredir do tempo de exclusão de trânsito.

**Descritores:** Cólon. Colite. Colostomia. Ratos. Processamento de Imagem Assistida por Computador.

## ABSTRACT

**PURPOSE:** To evaluate histopathological alterations of the colon wall in segments with and without intestinal transit, by computer-assisted imaging, and to correlate these with the length of time diversion. **METHODS:** Forty-five Wister male rats were submitted to diversion of left side of colon by proximal stoma and distal mucous fistula. Animals was divided in three groups and subdivided in two subgroups. In the first was made diversion colitis, in the second only laparotomy without colon diversion in five rats (control group). After six (group A), twelve (group B) and eighteen weeks (group C) of initial surgery the animals were death. Colon segments with and without transit were subjected to histopathological study. The variables colon crypt length, mucosal ulceration, muscle layer thickness of the muscularis mucosa, submucosa and muscularis propria, vascular congestion, number of calciform cells, inflammatory grade and degree of inflammation, comparing the two colon segments in the different experimental groups were studied. Intestinal crypt length, muscle layer thickness of the mucosa, submucosa and muscularis propria and calciform cells were measured by computer-assisted imaging method. Mean equality, variance analysis and correlation tests were used in the statistical analysis, and the significance level was set at 5%. **RESULTS:** Comparison between segments with and without transit showed that the latter presented reduced length of colon crypts and increased muscle layer thickness of the muscularis mucosa, submucosa and muscularis propria. There were greater quantities of ulceration of the mucosal and greater degree of inflammation with increasing time without transit. Mucosal ulceration, submucosal vascular congestion, increased thickness of the submucosal and muscularis propria layers, presence of goblet cells, inflammatory infiltrate and inflammatory grade correlated significantly with the length of time without transit. **CONCLUSION:** Histological alterations occurred in all layers of the colon wall, in the segments without intestinal transit. Ulcerations in the intestinal mucosa, increased number of goblet cells, greater vascular congestion of the submucosal layer and inflammatory reaction were related to increasing length of time without transit.

**Key words:** Colon. Colitis. Colostomy. Rats. Computer-assisted image processing

## **1 . INTRODUÇÃO**

### **1.1 A COLITE DE EXCLUSÃO**

Em 1981 foi descrita, pela primeira vez, uma enfermidade denominada colite de exclusão (CE) (Glotzer et al., 1981). Apresentada sem etiopatogenia esclarecida, a CE foi definida como um processo inflamatório que surgia na mucosa cólica de segmentos desprovidos de trânsito intestinal, após a realização de operação de derivação intestinal, em doentes que não apresentavam doença inflamatória intestinal pré-existente. Desde então, esta enfermidade vem sendo reconhecida com maior frequência (Geraghty e Talbot, 1991; Habr-Gama et al., 1997). A doença também vem sendo descrita em segmentos excluídos de trânsito, utilizados na reconstituição do trânsito urinário, ou empregados para a confecção de neovaginas (Toolenaar et al., 1993; Hage et al. 1995; Syed et al., 2001; Desrayaud et al., 2003; Abbasakoor et al., 2004). Com o aumento da violência urbana aumentando os casos de traumatismo ano-reto-cólico e com a incidência cada vez maior do câncer colorretal e doenças inflamatórias intestinais, as operações de derivação do trânsito fecal vêm sendo realizadas com maior frequência, fazendo com que o número de doentes sujeitos ao desenvolvimento da CE aumente de modo proporcional (Barreto et al., 2002).

### **1.2 A ETIOPATOGENIA DA CE**

Diversas teorias foram propostas para explicar a etiopatogenia da CE e, dentre elas, destaca-se a que relaciona o surgimento da doença com a diminuição dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) na luz intestinal (Giardiello et al., 1995; Kiely et al., 2001). A mucosa do trato gastrointestinal é única na obtenção de substratos para o seu metabolismo diretamente do lúmen intestinal e da circulação sanguínea (Roediger, 1982). A privação de nutrientes essenciais deflagrando mecanismo etiopatogênico da CE é suposto desde 1981 (Glotzer et al., 1981). Os AGCC representam o principal substrato energético para o metabolismo dos colonócitos (Giardelo et al., 1995; Kiely et al., 2001). No cólon desprovido de trânsito, a ausência de fibras oriundas da dieta,

impede a formação dos AGCC e sua conseqüente absorção e utilização metabólica pelas células epiteliais da mucosa cólica (Edwards et al., 1999). A escassez de AGCC no intestino grosso rapidamente resulta em hipoplasia e inflamação da mucosa e nessa situação, a glutamina, substrato energético secundário para essas células, passa a ser primordial, podendo ser utilizada preferencialmente à glicose como fonte energética (Roediger, 1982; Roediger 1990). A deficiência dos AGCC na luz intestinal determina o processo inflamatório e altera a capacidade de absorção da mucosa, provocando perda da função de barreira contra a translocação de antígenos intraluminares (Velásquez et al., 1997; Edwards et al., 1999) que está associada com bacteremia, septicemia, insuficiência renal e disfunção pulmonar, o que pode ocasionar falências orgânicas e por vezes a morte (Pinto Júnior et al., 2007). Não sendo diferente, as crianças com CE podem apresentar quadros de bacteremia repetitiva e, mais raramente, septicemia (Ordeim et al., 1992).

### **1.3 A COLITE DE EXCLUSÃO E SEUS SINAIS E SINTOMAS**

Apesar da maioria dos pacientes serem assintomáticos no momento da descoberta da CE, a presença de alguns sintomas como sangramento ou eliminação de muco pelo canal anal e dor, pode induzir ao diagnóstico incorreto de outras formas de inflamação intestinal (Glotzer, 1981; Biondo-Simões, 2000). Essas alterações, embora reversíveis com a reconstituição do trânsito intestinal, adquirem importância nos enfermos cuja derivação torna-se permanente por razões de ordem clínica, assim como no diagnóstico diferencial com outras moléstias inflamatórias do cólon (Lopes-Paulo, 2002).

### **1.4 OS ASPECTOS MACROSCOPICOS DA COLITE DE EXCLUSÃO**

A mucosa do cólon excluso pode apresentar desde aspecto macroscopicamente normal até graus diferentes de inflamação com eritema, friabilidade, granulações, petéquias, erosões com sangramentos espontâneos, edema ou pólipos inflamatórios (Giardelo et al., 1995; Edwards et al., 1999). O exame

endoscópico do segmento excluído de trânsito encontra-se alterado em 70 a 90% dos doentes (Ferguson et al., 1991). A inflamação, caracteristicamente, é limitada aos segmentos excluídos de trânsito e, a mucosa do cólon proximal não excluído apresenta-se normal na maioria dos casos (Glotzer et al, 1981).

### **1.5 AS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DA COLITE DE EXCLUSÃO**

Embora a CE tenha sido descrita pela primeira vez há quase três décadas, seus aspectos histopatológicos permaneceram obscuros até 1987, quando foram descritas detalhadamente as alterações histopatológicas na CE severa, em peça cirúrgica ressecada de paciente que havia sido submetido à derivação intestinal após traumatismo cólico (Murray et al., 1987; Pinto Júnior et al., 2007).

As principais alterações histopatológicas encontradas na CE relacionam-se a presença de graus diferentes de inflamação da parede cólica (Geraghty e Talbot, 1991; Kieli et al., 2001). Estudos realizados em portadores de CE apresentam resultados controversos, demonstrando que a doença cursa com uma variedade de alterações histológicas, não existindo, entretanto, padrão característico (Geraghty e Talbot, 1991). As alterações mais comuns incluem erosões ou ulcerações da mucosa, processo inflamatório crônico inespecífico, hiperplasia linfóide nodular difusa, criptite, infiltrado inflamatório na lâmina própria, depleção de mucinas no epitélio mucoso, atrofia das criptas cólicas e, mais raramente, displasias teciduais (Geraghty e Talbot, 1991; Kieli et al., 2001). A hiperplasia linfóide é considerada a alteração histológica mais característica (Murray et al., 1987; Komorowski et al., 1990; Yeong et al., 1991; Drut et al., 1992). Estas alterações parecem aumentar de intensidade à medida que progride o tempo de exclusão e, podem ser revertidas após o restabelecimento do trânsito intestinal (Kieli et al., 2001). A diferenciação destes aspectos com os relacionados às doenças inflamatórias intestinais torna-se particularmente importante em pacientes submetidos à derivação por doença inflamatória subjacente, pois as alterações pós-derivação podem ser confundidas com recidiva da doença inflamatória

intestinal em um segmento previamente normal, e desta forma, retardar o restabelecimento do trânsito fecal ou motivar terapêuticas inadequadas.

### **1.6 OS ESTUDOS SOBRE COLITE DE EXCLUSÃO**

A maioria dos estudos publicados avaliando as alterações histopatológicas da CE tem sido feitos em casuísticas humanas, o que torna difícil análise uniforme, pois, a doença de base, as diferentes técnicas cirúrgicas utilizadas e o tempo de exclusão do trânsito variam de forma significativa em cada publicação (Biondo-Simões, 2000). A falta de uniformidade na descrição dos diferentes aspectos histopatológicos encontrados na CE, além da casuística heterogênea, torna problemático o estabelecimento de um padrão histopatológico peculiar. Não obstante as evidências conhecidas até a presente data, poucos estudos avaliaram a CE de modo experimental, existindo questionamentos quanto às alterações encontradas na parede cólica e sua relação com o tempo de exclusão de trânsito (Keli et al., 1997, Biondo-Simões, 2000; Lopes-Paulo, 2002). Na maioria dos estudos, a interpretação das alterações histológicas encontradas é feita de forma subjetiva, portanto, dependentes da experiência do patologista na avaliação dos espécimes estudados (Lopes-Paulo, 2002).

### **1.7 O USO DA MORFOMETRIA COMPUTADORIZADA**

O uso de análise de imagem assistida por computador, também denominada morfometria computadorizada, ou análise estereológica, permite quantificar numericamente as mais variadas estruturas. (Baar e Oort, 1983). Na medicina, a análise de imagem assistida por computador vem sendo utilizada com vários objetivos, e apresenta como vantagens em relação aos métodos convencionais, a possibilidade de avaliar quantitativamente estruturas macro e microscópicas, de forma objetiva e rápida (Baar e Oort, 1983). A quantificação de elementos estruturais é parte fundamental nos estudos experimentais e anátomo-patológicos (Martinez et al. 2002) e vem sendo empregada na mensuração da espessura das diversas camadas que

compõe a parede cólica (Lopes-Paulo, 2002; Lopes-Paulo et al., 2002; Sousa et al., 2008), na avaliação do volume dessas camadas (Kissmeyer-Nielsen, 1994; Lopes-Paulo et al., 2002), na quantificação da intensidade de expressão de proteínas e edema existentes na parede cólica (Biondo-Simões et al., 2000; Martinez et al., 2008; Nonose et al., 2009) e na avaliação do infiltrado inflamatório (Priolli et al., 2003).

A possibilidade do emprego de modelo experimental de CE em animais, associado a método de análise que permita avaliação objetiva, garante maior fidedignidade na interpretação dos resultados encontrados, uniformizando a descrição dos diferentes aspectos microscópicos. Variáveis passíveis de avaliação quantitativa, tais como altura das criptas cólicas, espessura das camadas muscular da mucosa, submucosa e muscular própria, população de células caliciformes e inflamatórias podem ser determinadas de modo mais preciso (Lopes-Paulo, 2002). A elaboração de modelo experimental de CE permite ainda avaliar a importância do tempo de exclusão fecal nas diversas alterações inflamatórias encontradas, melhorando a compreensão da influência do tempo de exclusão na evolução da enfermidade. O conhecimento de diferentes aspectos histopatológicos relacionados à CE possibilita a elaboração de novas estratégias para o tratamento e prevenção de doença que, provavelmente, apresentará incidência progressiva, determinando custo econômico e social cada vez mais alto.

## **2 . OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

O objetivo do presente estudo é avaliar as alterações histopatológicas encontradas na parede do cólon de ratos submetidos à derivação intestinal.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Comparar as principais alterações histopatológicas encontradas no cólon desprovido de trânsito, com as encontradas no cólon provido de trânsito.

Mensurar por morfometria computadorizada, a espessura das criptas cólicas e das camadas muscular da mucosa, submucosa e muscular própria, comparando segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal.

Correlacionar a espessura das diferentes camadas da parede cólica dos segmentos desprovidos de trânsito intestinal ao tempo de exclusão.

Correlacionar as principais alterações histopatológicas encontradas nos segmentos cólicos desprovidos de trânsito intestinal ao tempo de exclusão.

Definir o rato como modelo experimental para o desenvolvimento da colite de exclusão.

### 3. MÉTODO

A realização deste estudo obedeceu à Lei Federal 6.638 e às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade São Francisco, Bragança Paulista (ANEXO I).

Foram utilizados 45 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade São Francisco, com peso variando entre 300 a 380 gramas, e média de idade de quatro meses. Os animais foram distribuídos aleatoriamente, em três grupos experimentais de 15 animais. Cada grupo experimental composto por 15 animais foi dividido em dois subgrupos. No primeiro subgrupo realizou-se a derivação do trânsito intestinal (subgrupo experimento) e no segundo, composto de cinco animais, realizou-se apenas laparotomia sem derivação de trânsito (subgrupo controle). Os grupos e subgrupos foram formados de acordo com a data do sacrifício, a ser realizado em seis semanas (Grupo A), 12 semanas (Grupo B) e 18 semanas (Grupo C).

No dia anterior ao procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em jejum, exceto água, por 12 horas. Foram alojados em gaiolas individuais, identificadas pelo número do animal e, os dados de acompanhamento pós-operatório anotados em fichas individuais. No dia da intervenção foram pesados e anestesiados com o emprego de cloridrato de xilazina 2%<sup>1</sup> + cloridrato de quetamina<sup>2</sup> na dose de 0,1ml/100g, administradas por via intra-peritoneal.

Depois de anestesiados, foram restringidos em mesa cirúrgica em decúbito dorsal horizontal, realizando-se tricotomia abdominal e anti-sepsia com polivinil pirrolidona-iodo (PVPI). Posteriormente foram então cobertos com campo cirúrgico fenestrado, previamente autoclavado (Figura 1). A cavidade abdominal foi acessada

---

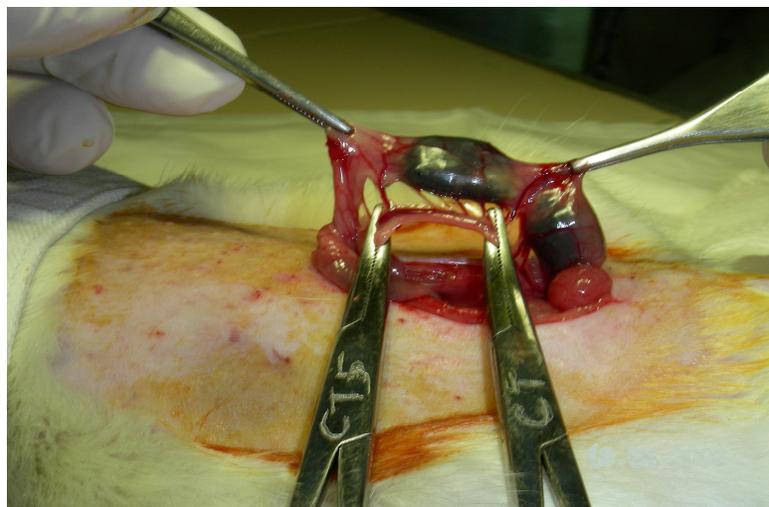
<sup>1</sup> Anasedan – Vetbrands – sedativo, analgésico e relaxante muscular

<sup>2</sup> Francotar – Virbac do Brasil – anestésico geral

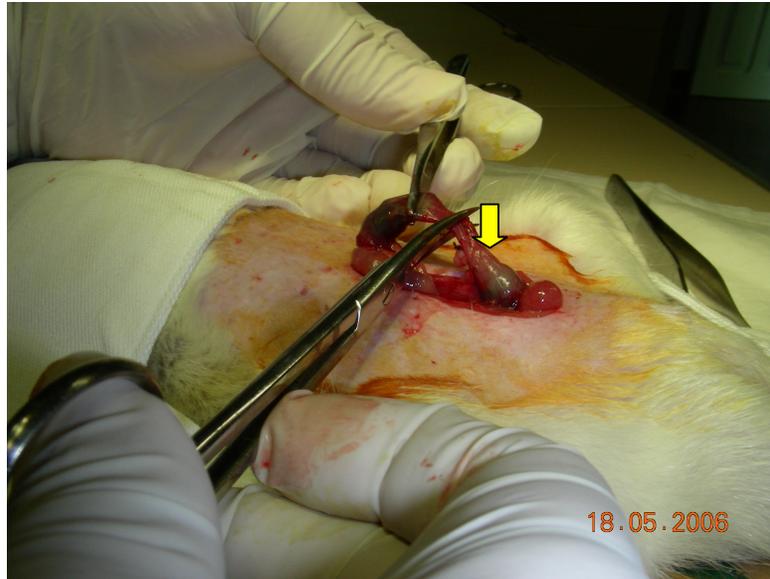
por incisão longitudinal mediana com três centímetros de extensão, sendo identificada a porção retossigmoideana do intestino grosso. Com o auxílio de paquímetro e, após ligadura dos vasos da arcada marginal (Figura 2), seccionou-se o colo um centímetro acima da placa de Peyer (Figura 3). Após remoção do conteúdo fecal eventualmente presente, o segmento proximal do colo seccionado foi exteriorizado por incisão circular com três milímetros de diâmetro, realizada no flanco esquerdo interessando toda a parede abdominal.



**Figura 1:** Exposição do campo cirúrgico



**Figura 2:** Ligadura entre pinças dos vasos sangüíneos da arcada marginal. Presença de fezes no interior do cólon.



**Figura 3:** Secção do intestino grosso do animal, um centímetro acima da placa da Peyer (seta)

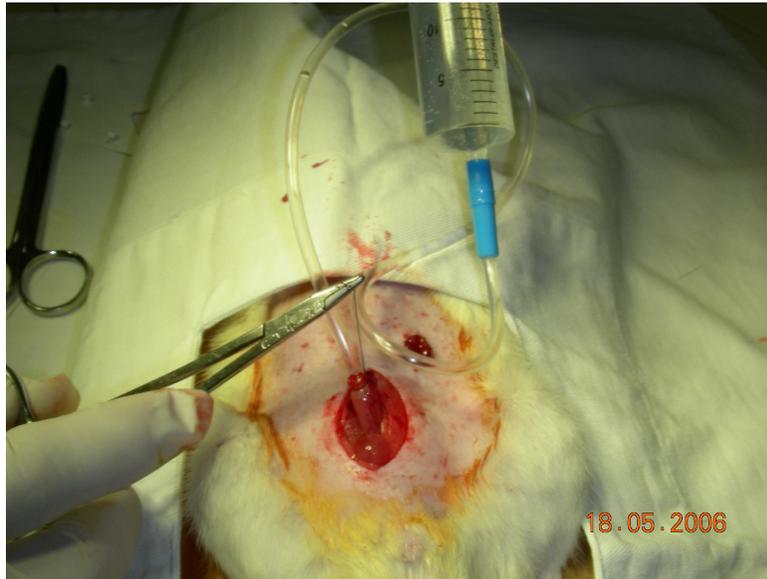
A fixação da colostomia foi realizada com sutura em pontos separados de fio absorvível monofilamentar 6-0<sup>3</sup> nos quatro pontos cardinais e entre eles, sempre amarrados com três nós (Figura 4).



**Figura 4 –** Aspecto final após confecção do estoma proximal.

<sup>3</sup> Monocryl - Ethicon, Inc.Somerville, NJ

O segmento distal do intestino grosso seccionado foi cateterizado com sonda de polivinil 12 F, fixada por ligadura com fio de algodão 3-0 e irrigada com soro fisiológico 0,9%, até que o efluente drenado pelo ânus do animal não mais apresentasse saída de material fecal (Figura 5).



**Figura 5** - Irrigação do cólon distal para a remoção de resíduos fecais.

Após a irrigação, o cateter foi removido sendo o cólon distal exteriorizado como fístula mucosa na região lateral inferior esquerda da parede abdominal. A fixação da colostomia distal foi realizada com a mesma técnica utilizada para a colostomia proximal. A parede abdominal foi fechada em dois planos de sutura: peritônio e aponeurose, com pontos contínuos de fio de ácido poliglicólico 4-0<sup>S</sup> e a pele com pontos separados de fio monofilamentar de nylon 4-0<sup>4</sup> (Figura 6).

Concluída a operação, os animais foram mantidos por 10 minutos sob lâmpada aquecida, e após recuperação anestésica, alojados em gaiolas individuais, sendo

---

<sup>4</sup> Mononylon - Ethicon, Inc.Somerville, NJ, USA

liberados para ingestão de água e ração padronizada, após terem recuperado completamente o estado de vigília. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais até a data do sacrifício, permanecendo em ambiente climatizado com controle de temperatura e luminosidade, pesados semanalmente, não tendo sido tomado nenhum cuidado adicional em relação à ferida operatória e ao estoma confeccionado.

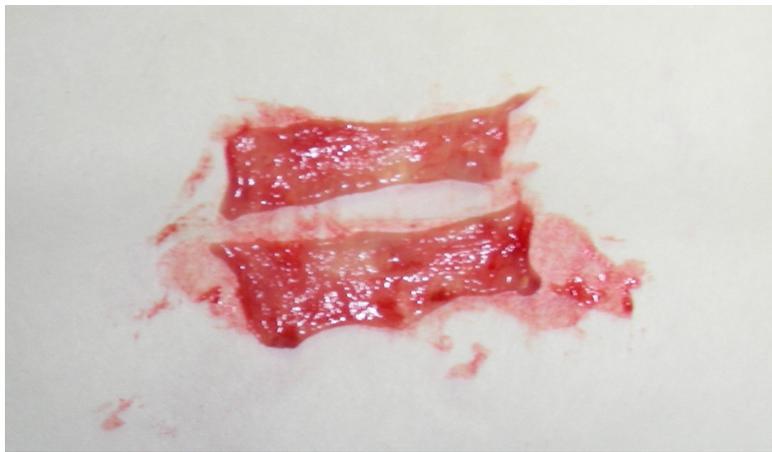


**Figura 6** - Aspecto da parede abdominal após realização do procedimento cirúrgico

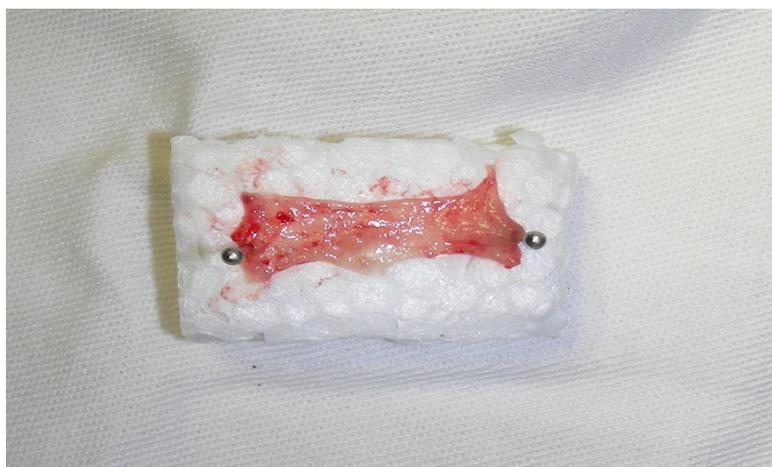
Na véspera do dia programado para o sacrifício foram novamente mantidos em jejum por 12 horas, exceto para água. Foram novamente anestesiados com a mesma técnica anteriormente descrita, e submetidos à tricotomia abdominal, anti-sepsia e laparotomia mediana, com abertura da cavidade por planos. Os segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito foram totalmente removidos.

As amostras coletadas do intestino grosso para o estudo histológico, sempre foram obtidas em todos os animais de local previamente determinado (um cm a partir da face interna da fixação da colostomia no peritônio parietal). Os segmentos

extirpados foram abertos longitudinalmente (Figura 7) pela borda anti-mesocólica, sendo dispostos e presos sobre estrutura plana (Figura 8), com a superfície mucosa voltada para cima e fixados em solução de formaldeído tamponado a 10%. Os espécimes permaneceram fixados por 72 horas e posteriormente desidratados em sucessivas concentrações crescentes de álcool e clarificação em xileno. O material foi incluído em blocos de parafina e submetido a dois cortes longitudinais para realização do estudo histopatológico e análise de imagem assistida por computador. As lâminas foram coradas pela técnica da hematoxilina-eosina.



**Figura 7:** Segmento intestinal aberto longitudinalmente, pela borda anti-mesocólica .



**Figura 8 –** Segmento proximal do intestino grosso fixado sobre placa de isopor com a superfície mucosa voltada para cima.

A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico comum (Nikon H550S<sup>5</sup>) com magnificação final de 100x. Os parâmetros histológicos foram analisados qualitativa e quantitativamente por patologista experiente em enfermidades do trato digestivo, que desconhecia a origem do material e os objetivos do estudo. Foram analisados os seguintes parâmetros histológicos: espessura das diferentes camadas da parede cólica, superfície mucosa, infiltrado inflamatório, graduação inflamatória, congestão vascular submucosa e número de células calciformes.

O comprimento das criptas da mucosa cólica e a espessura das camadas muscular da mucosa, submucosa e muscular própria foram mensurados por análise de imagem assistida por computador, avaliando-se a imagem de cinco campos aleatórios. A imagem selecionada no campo de visão do microscópio, após adequadamente focada, foi capturada por câmera de vídeo (Nikon® DS-Fi1<sup>6</sup>) previamente acoplada a microscópio óptico. A seguir foi processada e analisada pelo programa NIS-Elements<sup>7</sup> instalado em um computador (Pentium 4 DC, 1 Gbyte Memória RAM, 2 HD de 200Gbyte, placa de vídeo-captura ASUS) (Figura 9).

A mensuração das camadas da parede cólica nos cinco campos selecionados dos segmentos com e sem trânsito intestinal, foi sempre realizada em local onde existiam pelo menos quatro criptas cólicas contíguas e íntegras. O programa após calibramento prévio permitia o estabelecimento de dois pontos determinados pelo patologista onde, automaticamente, calculava distância entre os locais selecionados. Os valores encontrados eram transferidos para uma planilha de dados que, após cinco medidas, calculava a média com os respectivos desvios padrões. O valor final adotado para cada camada mensurada nos segmentos provido e desprovido de trânsito intestinal, foi representado pela média dos valores encontrados na avaliação dos cinco campos selecionados.

---

<sup>5</sup> Microscópio Óptico Comum Mod. Nikon H550S

<sup>6</sup> Câmera de Vídeo Digital Mod. Nikon DS-Fi1 5.0 mega pixels

<sup>7</sup> Software que permite captura, arquivamento e análise de imagens para os níveis mais avançados de pesquisa. Permite mais de seis dimensões para a análise.



**Figura 9:** Equipamento utilizado para a análise de imagem assistida por computador.

A superfície mucosa foi analisada de acordo com a presença de erosões ou ulcerações e classificada em normal, erodida ou ulcerada. A intensidade do infiltrado inflamatório foi graduada em leve, moderada ou intensa de acordo com o tipo de células presentes (linfócitos, eosinófilos, neutrófilos) e com a sua intensidade (de + a ++++). A congestão vascular foi classificada em ausente (-) ou presente (+) e, quando presente, em cruzes (+ a ++++). O número de células calciformes foi avaliado em normal ou diminuído.

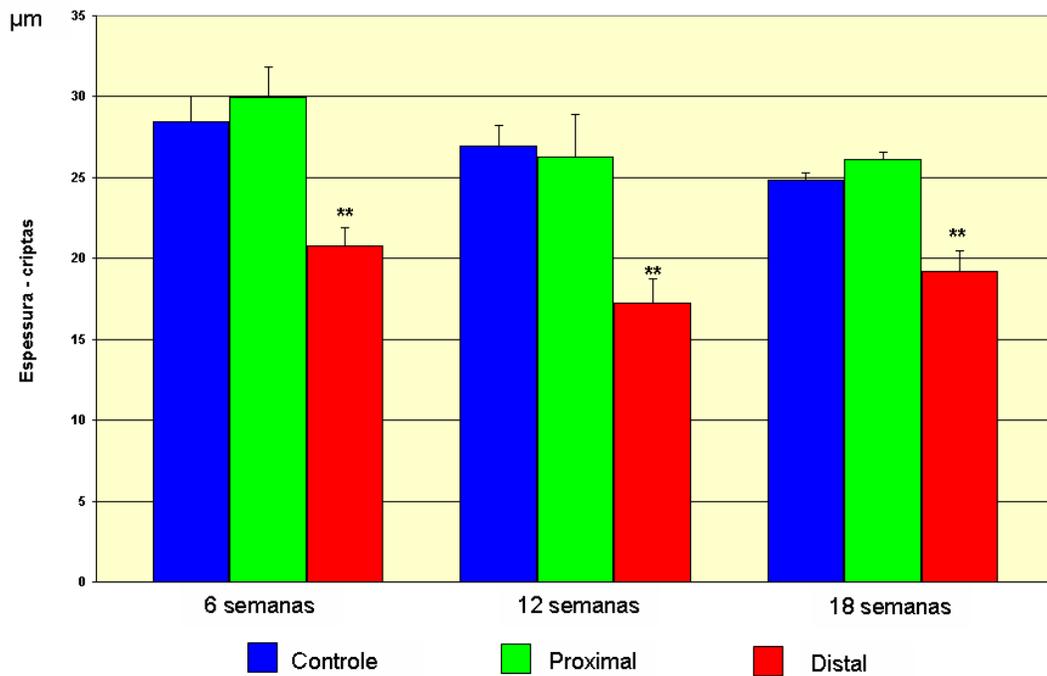
Para as variáveis: aspecto da superfície mucosa, congestão vascular, infiltrado inflamatório, foram atribuídos pontos de 0 (ausente) a 4 (intensidade máxima de cada variável isolada). Esses pontos foram somados para a aquisição de um novo parâmetro estudado – graduação inflamatória – cujos valores oscilaram de 0 (inflamação ausente) a 12 (inflamação máxima encontrada). Com os resultados dessa somatória determinou-se a graduação inflamatória em cada segmento estudado. De acordo com os pontos obtidos na graduação inflamatória estratificou-se a graduação

em ausente (0), leve (1, 2, 3,4), moderada (5, 6, 7,8) e intensa (9,10,11 e 12), ao que se denominou de grau de inflamação.

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada adotando-se nível de significância de cinco por cento ( $p < 0,05$ ). Todos os dados obtidos foram expressos pelo valor médio, desvio padrão e respectivos intervalos de confiança, sendo analisados pelo programa estatístico SPSS for Windows (versão 13.0). Foram utilizados os testes: “t” de Student, Mann-Whitney para a comparação entre as variáveis nos segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito intestinal. Para o estudo da variância entre as mensurações realizadas nos segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal nos diferentes grupos experimentais, utilizou-se o teste ANOVA, adotando-se o pós-teste de Student-Newman-Keuls para a avaliação das diferenças comparando cada grupo experimental proposto. Para avaliação das correlações existentes entre as variáveis e os diferentes tempos de exclusão propostos, utilizou-se os testes de correlação de Pearson e Spearman.

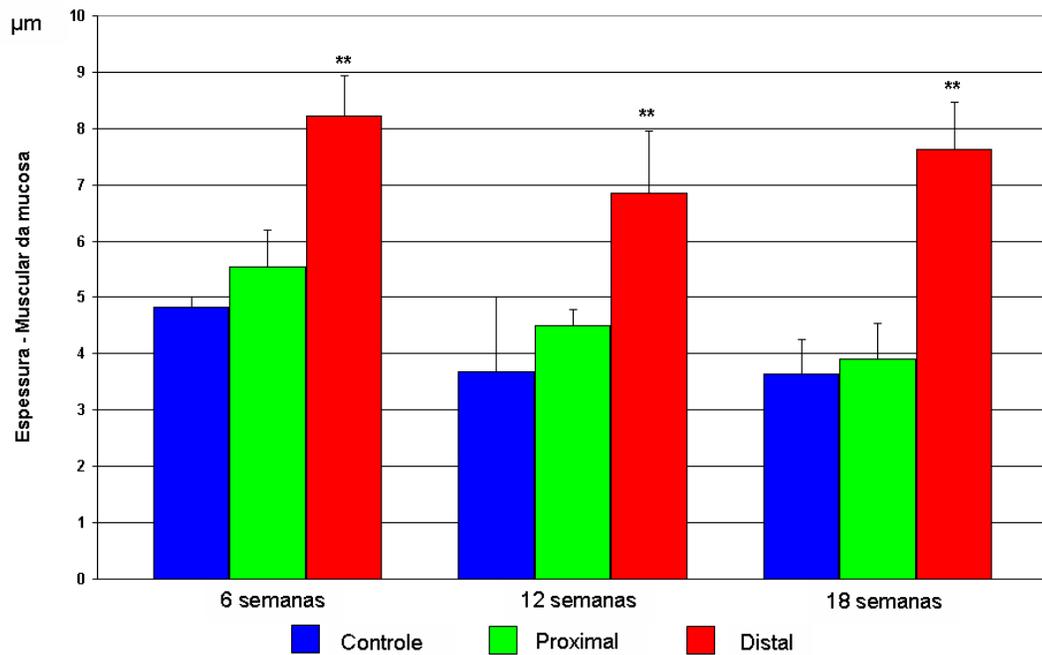
#### 4. RESULTADOS

Os resultados obtidos na comparação da espessura das criptas cólicas revelam que existe significativa redução a partir da sexta semana de exclusão do trânsito intestinal, conforme demonstrada na Figura 10.



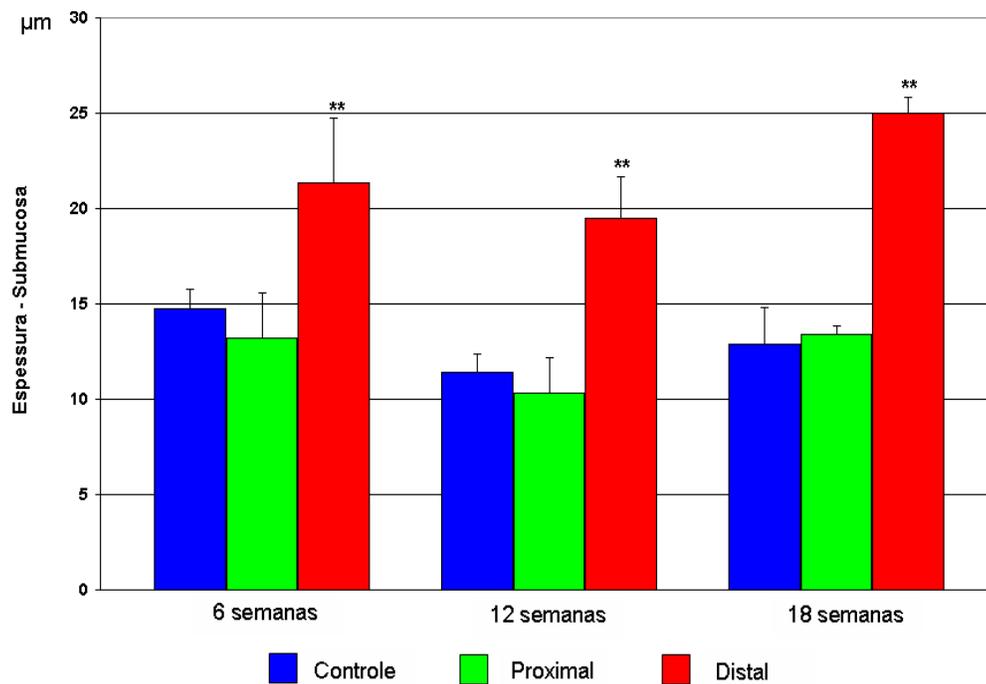
**FIGURA 10** – Espessura das criptas da mucosa cólica comparando os subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão. \*\* significativo (distal x controle e proximal). Teste t de student.

Nossos resultados obtidos através da comparação da espessura da camada muscular da mucosa indicam que existe um aumento na espessura ao se comparar segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal, conforme a Figura 11.



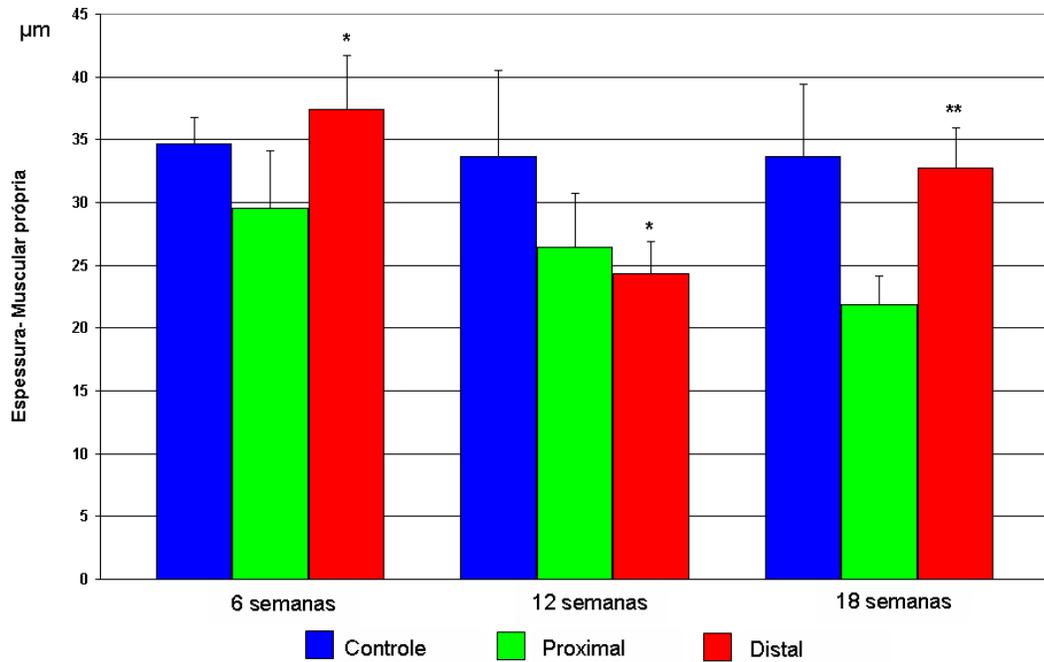
**FIGURA 11** – Espessura da camada muscular da mucosa comparando os subgrupos controle e experimento (cóloons proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão. \*\* significante (distal x controle e proximal). Teste t de student.

A Figura 12 revela aumento da camada submucosa ao se comparar segmentos com e sem trânsito intestinal, e que atinge seu maior valor após 18 semanas.



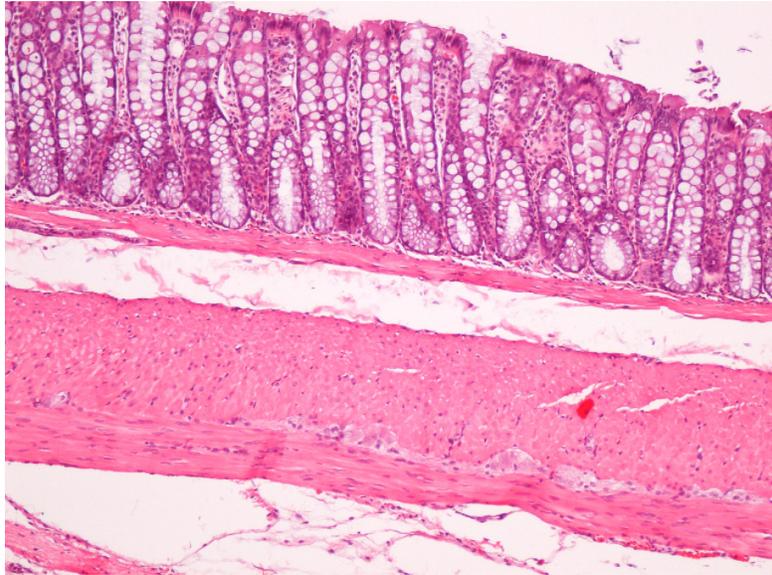
**FIGURA 12** – Espessura da camada submucosa comparando os subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão.

Nossos resultados mostram que a camada muscular própria do segmento excluído de trânsito tem sua espessura reduzida após 12 semanas, retornando aos valores encontrados em seis semanas, após 18 semanas de exclusão, conforme figura 13.

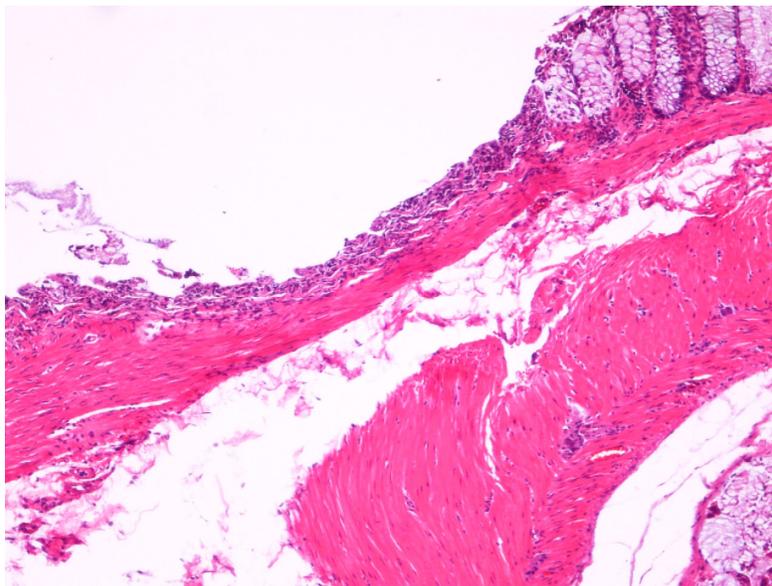


**FIGURA 13** – Espessura da camada muscular própria comparando os subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão. \* significante (distal x proximal); \*\* significante (distal x controle e proximal). Teste t de student.

As Figuras 14 e 15 mostram a superfície mucosa cólica em segmentos providos e desprovidos de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal.

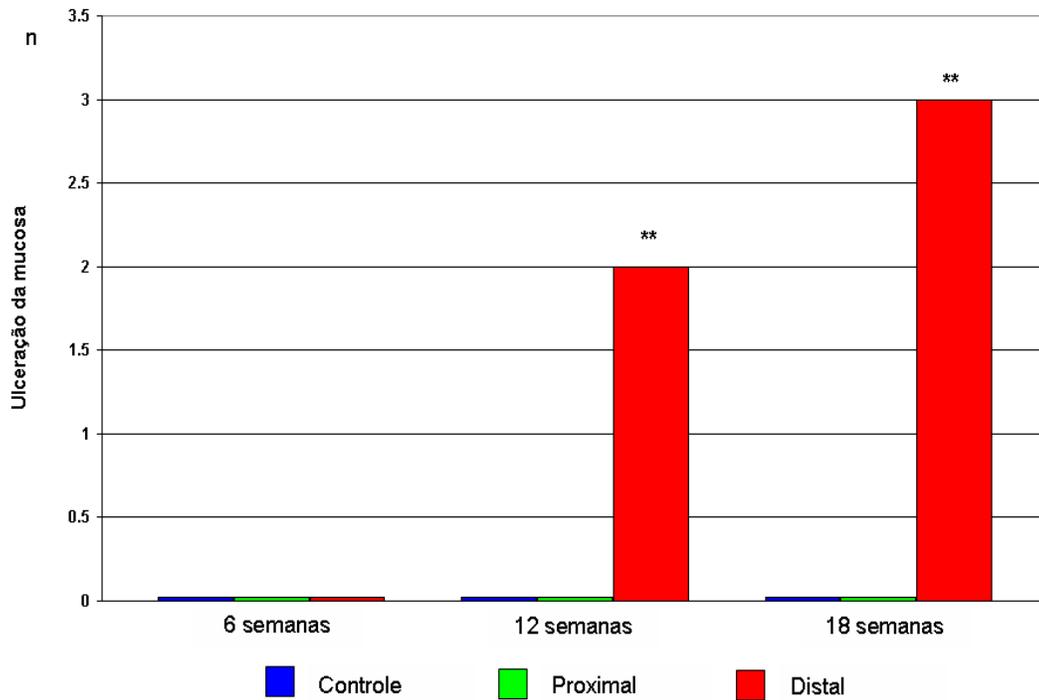


**FIGURA 14** – Superfície mucosa cólica no cólon provido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal. (H.E.100x).



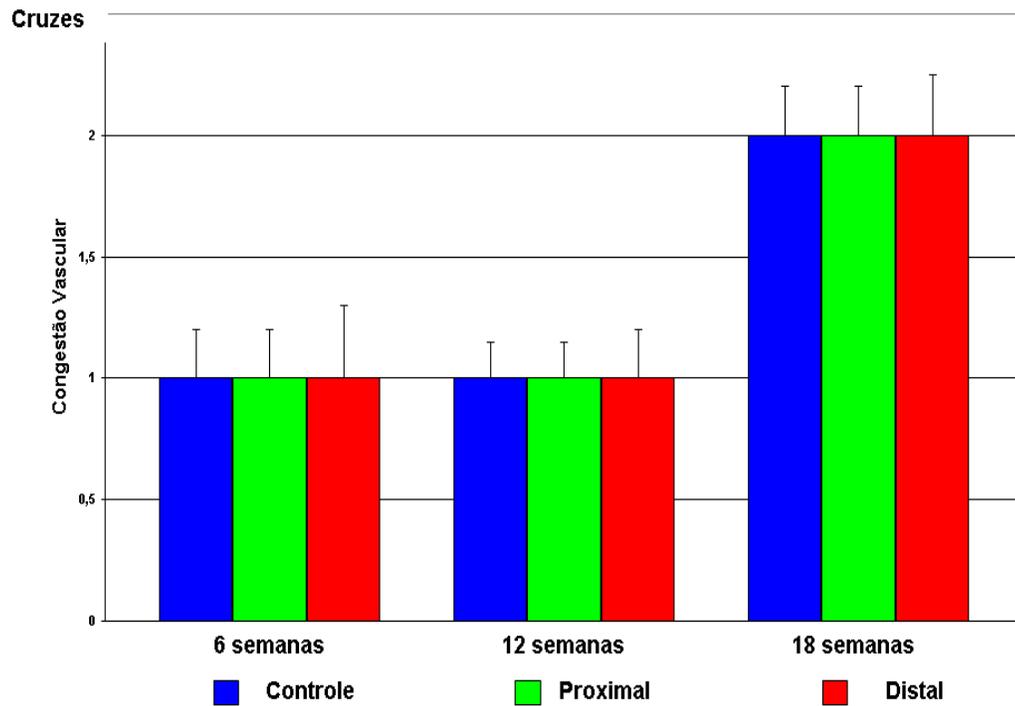
**FIGURA 15** – Superfície mucosa cólica no cólon desprovido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal. (H.E.100x)

Os dados apresentados na Figura 16 permitem verificar que após 12 semanas de exclusão de trânsito intestinal existe aumento no número de erosões e ulcerações na mucosa.



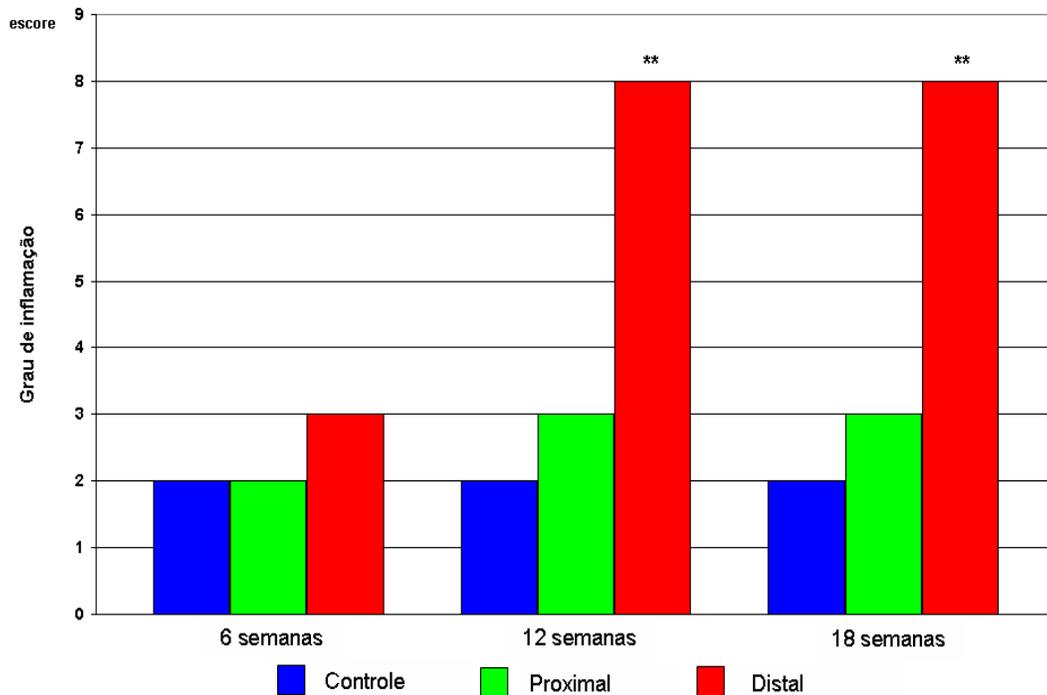
**FIGURA 16** – Ulcerações da mucosa cólica comparando os subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão. \*\* significante (distal x controle e proximal). Teste de Mann-Whitney.

Através da comparação exibida na Figura 17, é possível observar que não existe aumento da congestão vascular ao se comparar segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal.



**FIGURA 17** – Congestão vascular na camada submucosa comparando os subgrupos controle e experimento (cóloons proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão. Teste de Mann-Whitney.

A Figura 18 mostra, em mediana, maior atividade inflamatória no cólon desprovido de trânsito intestinal após 12 e 18 semanas.



**FIGURA 18** – Escore inflamatório comparando os subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão. \*\* significativa (distal x controle e proximal). Teste de Mann-Whitney.

**Tabela 1.** Variância no comprimento das criptas da mucosa cólica, nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, em relação aos diferentes tempos de exclusão considerados no estudo

<b>Colon sem trânsito intestinal</b>					
<b>Media ± D.P.(µm)</b>					
	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>	<b>Grupo C</b>	<b>N.K.</b>	<b>p</b>
<b>Comprimento das criptas da mucosa cólica</b>				A – B	< 0,01*
	20,75 ± 1,12	17,21 ± 1,50	19,16 ± 1,35	A – C	< 0,05*
				B – C	< 0,01*

D.P. = Desvio Padrão; µm = micrometros; Teste ANOVA: p= 0,00006; N.K. = Pós-teste de Newman-Keuls; \* significância

A Tabela 1 mostra a variância dos valores encontrados nos valores médios mensurados do comprimento das criptas da mucosa cólica, nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, em relação aos diferentes tempos de exclusão considerados.

A Tabela 2 mostra a variância dos valores encontrados nos valores médios mensurados na camada muscular da mucosa, nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, em relação aos diferentes tempos de exclusão considerados.

**Tabela 2.** Variância na espessura da camada muscular da mucosa, nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, em relação aos diferentes tempos de exclusão considerados no estudo

<b>Cólon sem trânsito intestinal</b>					
<b>Média ± D.P.(µm)</b>					
	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>	<b>Grupo C</b>	<b>N.K.</b>	<b>p</b>
<b>Espessura da camada muscular da mucosa</b>				A – B	< 0.01*
	8,22 ± 0,72	6,86 ± 1,09	7,63 ± 0,84	A – C	> 0.05
				B – C	> 0.05

D.P. = Desvio Padrão; µm = micrometros; ANOVA: p= 0,008; N.K. = Pós-teste de Newman-Keuls; \* significância

A Tabela 3 mostra a variância dos valores encontrados nos valores médios mensurados da espessura da camada submucosa, nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, em relação aos diferentes tempos de exclusão considerados.

**Tabela 3.** Variância na espessura da camada submucosa, nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, em relação aos diferentes tempos de exclusão considerados no estudo

	Cólon sem trânsito intestinal			N.K.	p
	Media ± D.P.(µm)				
	Grupo A	Grupo B	Grupo C		
<b>Espessura da camada submucosa</b>				A – B	> 0,05
	21,37 ± 3,37	19,50 ± 2,16	24,97 ± 0,88	A – C	< 0,01*
				B – C	< 0,01*

D.P. = Desvio Padrão; µm = micrometros; ANOVA p= 0,002; N.K. = Pós-teste de Newman-Keuls; \* significância

A Tabela 4 mostra a variância dos valores encontrados nos valores médios mensurados na camada muscular própria, nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, em relação aos diferentes tempos de exclusão considerados.

**Tabela 4.** Variância na espessura da camada muscular própria, nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, em relação aos diferentes tempos de exclusão considerados no estudo

	Cólon sem trânsito intestinal			N.K.	p
	Media ± D.P.(µm)				
	Grupo A	Grupo B	Grupo C		
<b>Espessura da camada muscular própria</b>				A – B	< 0,01*
	37,44 ± 4,36	24,32 ± 2,57	33,73 ± 5,78	A – C	> 0,05
				B – C	< 0,01*

D.P. = Desvio Padrão; µm = micrometros; ANOVA p= 0,00001; N.K. = Pós-teste de Newman-Keuls; \* significância

A Tabela 5 mostra a correlação existente entre as variáveis estudadas e o período de tempo do estudo nos segmentos sem trânsito intestinal, onde é possível verificar que as espessuras das camadas submucosa e muscular própria apresentam correlação com o tempo de exclusão.

**Tabela 5.** Correlação entre medidas morfométricas e o período de tempo nos segmentos sem trânsito intestinal

	<b>Cólon sem trânsito intestinal</b>	
	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>Comprimento das criptas da mucosa</b>	-0,337	0,06
<b>Espessura da muscular da mucosa</b>	-0,235	0,21
<b>Espessura da submucosa</b>	0,460	0,01*
<b>Espessura da muscular própria</b>	-0,372	0,04*

Teste de correlação Pearson; r = coeficiente de Pearson; \* significância

A tabela 6 mostra a correlação existente entre as demais variáveis estudadas e o período de tempo do estudo nos segmentos sem trânsito intestinal.

**Tabela 6.** Características morfológicas e o período de tempo nos segmentos sem trânsito intestinal

	<b>Cólon sem trânsito intestinal</b>	
	<b>rs</b>	<b>p</b>
<b>Ulceração da mucosa</b>	0,412	0,02*
<b>Congestão vascular da submucosa</b>	0,410	0,04*
<b>Células caliciformes</b>	0,386	0,03*
<b>Infiltrado inflamatório</b>	0,470	0,009*
<b>Gradação inflamatória</b>	0,362	0,04*

Teste de correlação Spearman; rs = coeficiente de Spearman; \* significância

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 QUANTO AO MÉTODO

#### 5.1.1 O ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO

O rato é o mamífero mais utilizado em pesquisas experimentais. É um roedor da família *Muridae*, podendo ser da espécie *Rattus rattus*, que é o rato do telhado e da espécie *Rattus norvegicus*. A principal diferença entre as duas espécies é o tamanho da cauda. O *Rattus rattus* possui a cauda maior que o corpo, com uma finalidade preênsil enquanto o *Rattus norvegicus* tem a cauda menor que o corpo. A principal espécie utilizada nas pesquisas é o *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, um rato albino que nasce com peso variando entre quatro e seis gramas, sem pêlo, de olhos e orelhas fechadas e sem dentes. Atingem a maturidade sexual por volta dos 60 dias de idade e procriam com rapidez. Desde o século passado, o papel deste animal na medicina mudou de portador de doenças contagiosas a uma importante ferramenta para o desenvolvimento da medicina e, em especial dos produtos farmacêuticos. A caracterização da linhagem Wistar foi publicada precocemente, estimulando sua utilização na pesquisa biomédica. Atualmente os ratos são os animais mais utilizados em pesquisas de testes biológicos, porque são fáceis de obter e manusear. Como são animais de pequeno porte são econômicos aos laboratórios, sendo possível avaliar os efeitos de quantidades mínimas de drogas experimentais, uma avaliação mais difícil e onerosa quando se utiliza animais de grande porte. O manuseio constante faz com que eles se tornem dóceis e fáceis de controlar. Diante destas características optamos no presente estudo pela utilização desta espécie e linhagem.

Utilizamos apenas animais pertencentes ao gênero masculino com o objetivo de eliminar quaisquer variações significantes com relação ao reparo anatômico adotado na padronização do local, no cólon esquerdo, onde seria realizada a derivação intestinal (placa de Peyer). Estudos vêm demonstrando a existência de diferenças na localização da placa de Peyer ao compararem-se animais pertencentes

a diferentes gêneros (Priolli et al., 2008). Da mesma forma o emprego de animais do gênero masculino minimiza os efeitos das mudanças fisiológicas que ocorrem durante o ciclo hormonal das fêmeas, que poderiam interferir nos resultados.

Durante todo o período do experimento os animais foram mantidos em gaiolas individuais até a data do sacrifício, permanecendo em ambiente com temperatura variando entre 20°C e 24°C, umidade relativa do ar entre 40% e 60%, com exposição à luz durante 12 horas/dia. Estes cuidados favoreceram a diminuição do estresse aos animais que se mostravam, invariavelmente, colaboradores, fáceis de manusear desde que tratados com delicadeza e quando suas gaiolas são mantidas limpas e o silêncio preservado.

Os poucos estudos analisando a CE em modelos experimentais também adotaram o rato como animal de experimentação (Keli et al., 1997; Biondo-Simões et al., 2000; Lopes-Paulo et al., 2000; Pinto Júnior et al., 2007). Embora a maioria dos autores proponha que o animal apresenta paralelismo no desenvolvimento da CE com o que ocorre no homem, outros acreditam que o rato não representa um bom animal de experimentação para o estudo da CE, pois a frequência com que desenvolvem doença inflamatória intestinal é muito baixa e as lesões histológicas encontradas são discretas nos segmentos com exclusão fecal (Biondo-Simões et al., 2000). Entretanto para outros autores, no rato, o modelo experimental de CE determina modificações histológicas e bacteriológicas comparáveis com as descritas nos seres humanos com pequenas diferenças histológicas (Keli et al., 1997). No presente estudo, pode-se verificar que o rato revelou-se um animal de experimentação adequado para se estudar a CE, pois, além do fácil manejo e resistência ao procedimento cirúrgico, desenvolveu alterações histológicas compatíveis com a CE que foram relacionadas aos diferentes tempos de derivação do trânsito intestinal propostos.

### 5.1.2 O PRÉ-OPERATÓRIO

Optamos por iniciar o jejum 12 horas antes do procedimento, exceto a oferta de água, com intuito de reduzir o conteúdo fecal no interior do cólon, o que além de facilitar a manipulação intestinal, possibilitou menor necessidade de limpeza mecânica com solução fisiológica para eliminação de resíduos fecais presentes. O acondicionamento dos animais em gaiolas individuais com identificação (número do animal e grupo experimental) para o acompanhamento pós-operatório, assim como as anotações em ficha individualizada, tornou possível o controle adequado das características das fezes, consumo de ração e aspectos relacionados à ferida cirúrgica e estoma. O alojamento individual também evitou que um animal agredisse o estoma do outro, fato observado durante a elaboração de grupo piloto para padronização das etapas experimentais desenvolvidas no presente estudo.

Revisando a literatura recente, a maioria dos autores não faz menção em relação aos cuidados dispensados no preparo pré-operatório (Keli et al., 1997; Biondo-Simões et al., 2000; Lopes-Paulo et al., 2000; Pinto Júnior et al., 2007). Um dos estudos experimentais relata que os animais foram isolados uma semana antes do procedimento cirúrgico em gaiolas individuais, porém não adotou o regime de jejum pré-operatório empregado em nossa pesquisa (Keli et al., 1997). Acreditamos que o jejum, iniciado 12 horas antes do procedimento cirúrgico, reduz a possibilidade de início da colite relacionada à privação de nutrientes, que poderia ocorrer ao adotar-se período de jejum mais prolongado. Da mesma forma, não observamos qualquer tipo de complicação relacionada à oferta de dieta 12 horas antes da cirurgia. De modo semelhante ao anteriormente proposto, optamos pelo fornecimento de ração padronizada e água (Keli et al., 1997) nos dias que antecederam a intervenção cirúrgica. Desta forma, foi possível o controle das excretas de cada roedor diminuindo as chances de se selecionar para o experimento, animal com qualquer tipo de doença intestinal prévia. Durante o período pré-operatório não observamos diarreia ou outro

sinal que sugerisse complicações gastrintestinais e doenças inflamatórias em nenhum animal selecionado.

### **5.1.3 O AGENTE ANESTÉSICO E A TÉCNICA CIRÚRGICA**

Utilizamos como agente anestésico a xilazina 2% associada ao cloridrato de quetamina na dose de 0,1ml/100g, administradas por via intraperitoneal. Em estudo semelhante, foi utilizado o éter inalatório como agente anestésico, porém, os autores descrevem complicações pulmonares que levaram à morte de um animal durante o procedimento cirúrgico (Keli et al., 1997). No grupo piloto idealizado para a padronização técnica do presente estudo, quando utilizávamos a anestesia inalatória com éter, pudemos notar maior incidência de depressão respiratória que culminou com a perda de três animais. Outros autores, apesar de utilizarem anestesia inalatória com éter etílico, não encontraram complicações, mas também não expressam quaisquer benefícios relacionados ao veículo anestésico empregado (Biondo-Simões et al., 2000). Um estudo experimental empregou a anestesia geral intraperitoneal com thiopental na dose de 50 mg/kg de peso, sem relato de complicação relacionada à droga (Lopes-Paulo, 2002). A via de administração adotada e as drogas empregadas no presente estudo foram bem toleradas por todos os animais, sendo a recuperação anestésica pós-operatória rápida e sem complicações relacionadas.

Após a anestesia, os ratos foram restringidos em mesa operatória, submetidos à tricotomia da região abdominal e degermação com PVPI. Não obstante não encontrarmos referências quanto ao emprego da degermação cutânea, acreditamos que quando realizada, traz benefícios relacionados aos cuidados pós-operatórios, pois não registramos nenhum caso de infecção da ferida operatória, mesmo sem ter sido adotado qualquer tipo de cuidado adicional (curativos, antibioticoterapia, etc).

Procedeu-se a laparotomia mediana infra-umbilical longitudinal de três cm de extensão para a identificação da porção retossigmoideana do intestino grosso. A extensão e a localização da incisão na parede abdominal permitiram, com facilidade, a

localização do cólon esquerdo, a identificação da placa de Peyer - o reparo anatômico adotado para a secção do cólon - bem como a confecção dos estomas proximal e distal.

A colostomia proximal e a fístula mucosa distal foram realizadas no hipocôndrio e fossa ilíaca esquerda, respectivamente, para evitar que o animal pudesse alcançar o estoma com a boca o que poderia ocasionar complicações pós-operatórias. Da mesma forma, a confecção de dois estomas terminais separados por uma distância adequada evitou a migração de material fecal da colostomia proximal para a fístula mucosa distal, o que poderia gerar possível nutrição para o cólon desfuncionalizado. Ao realizar-se uma colostomia em alça a completa exclusão fecal, em algumas oportunidades, pode não ser alcançada. Acreditamos que esta opção foi válida à medida que não encontramos em nenhum animal, quando do sacrifício e abertura do cólon excluído a presença de material fecal. A técnica empregada para fixação cutânea da colostomia e da fístula mucosa assegurou boa coaptação das bordas do estoma à pele e não observamos, em nenhum animal necrose ou deiscência da fixação da colostomia. Da mesma forma a síntese da parede abdominal em dois planos, respeitando o peritônio e aponeurose também foi adequada não ocorrendo casos de deiscência da parede abdominal ou evisceração.

Acreditamos que a limpeza mecânica do cólon excluído, em modelos experimentais propostos para CE, é uma etapa fundamental e imprescindível para assegurar a completa eliminação de todo conteúdo fecal residual no segmento cólico a ser excluído. A limpeza mecânica do segmento excluído de trânsito em modelos experimentais de CE já havia sido proposta (Margarido et al., 2003). Todavia, em nenhum dos estudos experimentais de CE existentes na literatura menciona que tal cuidado tenha sido tomado. No presente estudo, o segmento distal do intestino grosso seccionado foi cateterizado com sonda de polivinil 12 F fixada por ligadura com fio de algodão 3-0 e irrigada com soro fisiológico 0,9%, até que o efluente drenado pelo

ânus do animal não mais apresentasse saída de material fecal. Dessa forma podíamos assegurar a inexistência de resíduos fecais que, em mantendo o fornecimento energético ao segmento excluído de trânsito, poderiam alterar os resultados encontrados. Outros autores que elaboraram modelos experimentais para o estudo de CE não realizaram a limpeza mecânica do cólon antes da confecção da fístula mucosa (Keli et al., 1997, Biondo-Simões et al., 2000, Lopes-Paulo et al., 2000). É importante ressaltar que a presença de conteúdo fecal residual no segmento intestinal excluído altera os resultados encontrados, pois as fezes continuam servindo de substrato energético para a porção do cólon excluído de trânsito intestinal evitando o surgimento da CE. Sendo assim, os estudos que não efetuaram a limpeza mecânica prévia no segmento excluído de trânsito, e que não encontraram alterações histológicas compatíveis com desenvolvimento da CE, provavelmente, encontraram resultados irreais consequentes à presença do substrato energético (fezes) que mantinha a nutrição da parede cólica. Revisando a literatura, verificamos que apenas um único estudo experimental descreve este cuidado (Kissmeyer-Nielsen et al., 1994).

Para determinar o ponto no qual seria realizada a secção cólica para confecção dos estomas, adotamos a placa de Peyer como reparo anatômico. Outros estudos realizaram a colostomia em local determinado pela introdução de cateter graduado por via anal, marcando a distância para confeccionar a colostomia (Kissmeyer-Nielsen et al. 1994, Lopes-Paulo, 2002). A introdução de cateter via anal, em algumas oportunidades provoca traumatismos a mucosa reto-cólica levando ao aparecimento de soluções de continuidade na mucosa, que determinando quebra da barreira epitelial permitem a translocação de bactérias para a submucosa estéril, e o conseqüente surgimento de inflamação local, o que poderia interferir na interpretação das alterações histológicas pelo patologista. A placa de Peyer é estrutura singular localizada à altura da transição retossigmoideana no rato. Foi descrita em nosso meio, pela primeira vez em 1947, como estrutura linfóide na região terminal do intestino dos

ratos (Junqueira et al., 1947). Encontra-se anteriormente ao epidídimo, em machos, ou ao útero, em fêmeas. Pela facilidade de sua localização, já que aparece sempre como área de conformação ovalada, esbranquiçada, ligeiramente espessada, localizada na parede anterior do cólon contra-lateral à linha de inserção do mesentério e mais cranialmente à reflexão peritoneal, permite que a medida das distâncias intracavitárias seja mais facilmente obtida quando comparada à mesma medida aferida com outro reparo anatômico (Priolli et al., 2008). Desta forma, a adoção da placa de Peyer como reparo anatômico para o ponto de escolha da secção cólica, em detrimento à reflexão peritoneal, reduziu a extensão da incisão cirúrgica e o tempo necessário para as medidas intracavitárias. Da mesma forma, contribuiu para a redução do tempo operatório e do tempo anestésico, garantindo a sobrevivência dos animais submetidos a procedimentos cirúrgicos extensos e complexos, nem sempre bem tolerados. Em nenhuma oportunidade houve a necessidade da infusão de doses complementares de anestésico. Sua identificação foi feita em todos os animais com facilidade e o auxílio do paquímetro foi útil para estabelecer o ponto exato padronizado para secção do cólon esquerdo.

A ferida operatória não recebeu nenhum tipo de cuidado adicional no período pós-operatório. Nenhum dos animais evoluiu com deiscência, infecção de ferida cirúrgica, ou qualquer outro tipo de complicação. Tanto o estoma proximal quanto o distal mantiveram-se com aspecto normal, com pele saudável e sem presença de prolapsos ou infecções.

#### **5.1.4 O TEMPO DE EXCLUSÃO**

A maioria dos estudos publicados avaliando a CE foi realizado a partir de espécimes retirados de doentes, portadores de exclusão fecal realizada por diferentes enfermidades e com diferentes tempos de exclusão intestinal. Assim sendo, não é possível comparar os diferentes aspectos relacionados à doença bem como quantificar o tempo necessário para o seu desenvolvimento. De modo semelhante, revisando os

poucos estudos experimentais em modelos de CE verificamos variação entre os autores com relação ao tempo ideal para promover a exclusão intestinal (Keli et al., 1997, Biondo-Simões et al., 2000, Lopes-Paulo et al., 2002, Pinto Júnior et al., 2007). Esta falta de uniformidade dificulta a comparação dos resultados encontrados pelos diferentes estudos. Alguns excluíram o trânsito fecal por uma, duas, quatro e doze semanas e adotaram como grupo controle animais sacrificados logo no início do experimento. (Kissmeyer-Nielsen et al., 1994). Outros adotaram dois grupos experimentais, sacrificados com seis e 17 semanas (Keli et al., 1997). Estes autores adotaram como grupo controle fragmentos cólicos obtidos do segmento provido de trânsito no início do experimento. Outro estudo utilizou dois grupos experimentais, sacrificando no início do experimento alguns animais e retirando destes uma porção do cólon para análise comparativa com o segundo grupo, sacrificado somente após quatro semanas (Lopes-Paulo, 2002). Encontramos ainda outro estudo que adotou quatro períodos de exclusão com sacrifício após uma, duas, quatro e oito semanas, porém diferente dos demais, adotando como controle, espécimes obtidos do cólon provido de trânsito dos mesmos animais (Biondo-Simões et al., 2000). Percebe-se, portanto que, não existe um consenso entre os autores com relação ao tempo de exclusão para obter espécimes, bem como a forma de se obter um grupo controle ideal. Acreditamos que a evolução ponderal que o animal apresenta durante os diferentes tempos de exclusão faz com que exista crescimento das diferentes camadas da parede cólica. Qualquer estudo morfométrico comparativo entre grupos experimentais com diferentes tempos de exclusão poderia, portanto, sofrer a interferência do ganho ponderal, tornando os resultados difíceis de serem comparados. Foi por esta razão que propusemos três grupos experimentais adotando como controle, espécimes retirados do cólon com trânsito preservado do mesmo animal. Desta forma comparávamos dois segmentos cólicos obtidos do mesmo animal, portanto sem a interferência do ganho ponderal ao longo do tempo de exclusão. Preocupando-se com a questão da inflamação sistêmica possivelmente gerada pela

exclusão do trânsito intestinal que pudesse produzir alterações na mucosa cólica proximal, tomou-se o cuidado de comparar as características analisadas no cólon proximal e no grupo controle, onde não se verificou qualquer diferença significativa.

Em nosso estudo, optamos por excluir o trânsito fecal por seis, 12 e 18 semanas. Com esta padronização foi possível descrever alterações histológicas nos segmentos desprovidos de trânsito de todos os animais, independente do tempo de exclusão, o que permite concluir que independente do tempo de exclusão adotado existe o surgimento da CE.

## **5.2 - QUANTO AOS RESULTADOS**

A CE é um processo inflamatório que acomete os segmentos do cólon e reto desprovidos de trânsito intestinal (Glotzer et al., 1981; Keli et al., 1997). A doença apresenta quadro clínico variado e a maioria dos doentes evolui de maneira assintomática, estimando-se que 30 a 50% se tornem sintomáticos à medida que progride o tempo de exclusão. Os enfermos sintomáticos queixam-se de dor retal, eliminação de sangue e muco nas fezes, tenesmo, febre baixa e, mais raramente, fístulas. O exame endoscópico do segmento excluído de trânsito identifica a doença em todos os enfermos em período que varia de três a 36 meses (Glotzer et al., 1981; Keli et al., 1997).

Os AGCC, representados pelo butirato, acetato e propionato, são formados a partir da fermentação de fibras vegetais dietéticas e carboidratos pelas bactérias anaeróbicas existentes na luz intestinal (*Clostridium sp.*, *Eubacterium sp.*, *Fusobacterium sp.*), e representam a principal fonte de energia para os colonócitos (Roediger et al., 1980; Soergel et al., 1994; Jørgensen et al., 1997) respondendo por aproximadamente 80% das necessidades energéticas da mucosa cólica (Roediger, 1990). Em segmentos derivados do cólon, a ausência do bolo fecal impede a formação dos AGCC, bem como sua absorção e utilização pelas células epiteliais. Os AGCC determinam maior fluxo sanguíneo para a parede intestinal, pela diminuição da

resistência das arteríolas do cólon e reto, promovem aderência entre os colonócitos, aumentam a absorção de sódio e água, estimulam o crescimento normal das células do epitélio cólico, influenciam a motilidade cólica e favorecem a cicatrização de lesões da parede intestinal (Mortensen et al., 1991; Kissmeyer-Nielsen et al., 1994; Pinto et al., 1999). Os AGCC exercem papel protetor no desenvolvimento de neoplasias, em virtude de sua ação antiproliferativa interferir no processo de diferenciação celular favorecendo a apoptose (Velasques et al., 1997). Nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, a glutamina, substrato energético secundário para essas células, fornecida principalmente pelo suprimento sanguíneo passa a ser primordial, podendo ser utilizada preferencialmente à glicose como fonte energética (Roediger, 1982).

O diagnóstico da CE é feito pelo exame histopatológico de fragmentos da mucosa cólica obtidos durante exames endoscópicos. À endoscopia, a mucosa do cólon excluso pode apresentar desde aspecto macroscopicamente normal até graus diferentes de inflamação com eritema, friabilidade, erosões com sangramentos espontâneos, edema ou pólipos inflamatórios (Giardiello et al., 1995; Edwards et al., 1999). Nos casos mais graves ocorre formação de úlceras aftóides praticamente indistinguíveis daquelas encontradas nas doenças inflamatórias intestinais (Korelits et al., 1985). Tais aspectos, sobretudo naqueles enfermos submetidos às derivações intestinais decorrentes de complicações de doenças inflamatórias intestinais, torna problemático o diagnóstico diferencial entre crises de exacerbação da doença inflamatória pré-existente ou desenvolvimento da CE, dificultando a indicação de restabelecimento do trânsito intestinal (Kiely et al., 2001).

A partir de sua descrição inicial, estudos vêm demonstrando os principais aspectos clínicos, endoscópicos e terapêuticos relacionados à CE (Glotzer et al., 1981; Geraghty e Talbot, 1991; Giardiello et al., 1995, Habr-Gama et al., 1997; Edwards et al., 1999, Kiely et al., 2001; Barreto Neto et al., 2002). Todavia, as alterações histopatológicas da parede do cólon desprovido de trânsito intestinal ainda

permanecem com aspectos controvertidos (Geraghty e Talbot, 1991; Edwards et al, 1999). Avaliações realizadas em biópsias do cólon excluso demonstram uma variedade de alterações histológicas, não se encontrando padrão característico para a CE (Geraghty e Talbot, 1991). Os achados mais comumente descritos incluem inflamação crônica inespecífica, com ou sem formação de abscesso em criptas, hiperplasia linfóide nodular difusa, criptite, infiltrado de linfócitos e presença de alguns neutrófilos na lâmina própria e depleção de mucina no epitélio mucoso (Lopes-Paulo, 2002). O infiltrado inflamatório é composto principalmente por células plasmáticas com pequeno número de linfócitos, macrófagos e eosinófilos, estando usualmente confinado à mucosa e estendendo-se, mais raramente, à submucosa (Roediger et al., 1990, Geraghty e Talbot, 1991). Úlceras aftóides, abscesso e distorção da arquitetura das criptas e metaplasia das células de Paneth são alterações encontradas nos casos mais graves (Geraghty e Talbot, 1991; Kiely et al., 2001). A maioria dessas alterações regridem completamente após restabelecimento do trânsito intestinal.

O estudo das alterações histopatológicas encontradas na CE geralmente é feito de forma subjetiva, dependendo e variando com a experiência do patologista na análise dos espécimes. A possibilidade do emprego de método de análise de imagem que permita avaliação objetiva na interpretação das alterações, possibilita maior fidedignidade quanto aos resultados obtidos, uniformizando a descrição dos diferentes aspectos histopatológicos. Variáveis passíveis de avaliação quantitativa tais como comprimento das criptas cólicas, espessura da diferentes camadas da parede intestinal, quantidade de células caliciformes, podem ser determinadas objetivamente, possibilitando conclusões mais precisas. A análise de imagem assistida por computador vem sendo utilizada com vários objetivos e apresenta como vantagens, em relação aos métodos convencionais, a avaliação quantitativa das estruturas microscópicas de forma objetiva e rápida (Martinez et al., 2002, Priolli et al., 2003). Poucos estudos avaliaram as alterações inflamatórias na parede cólica de segmentos

intestinais desfuncionalizados por métodos morfométricos de análise (Kissmeyer-Nielsen, 1994, Biondo-Simões et al., 2000; Lopes-Paulo et al., 2002).

### **5.2.1 AS CAMADAS DA MUCOSA CÓLICA**

O comprimento das criptas da mucosa cólica já foi mensurado em seres humanos e animais com CE (Geraghty et al., 1991; Keli et al., 1997). A análise de aspectos histopatológicos encontrados em 15 doentes com CE verificaram que em 53,3% dos casos havia atrofia das criptas intestinais e que em 80% deles encontravam-se distorções na arquitetura normal (Geraghty et al., 1991). Ao estudo de segmentos intestinais de ratos desprovidos de trânsito intestinal por seis e 17 semanas, evidenciou redução significativa na altura das criptas da mucosa cólica no segmento intestinal excluído de trânsito, relacionando tal redução ao tempo de exclusão (Keli et al., 1997). A partir de medidas executadas com o auxílio de programa de análise de imagem assistida por computador, pode-se verificar significativa redução na altura das criptas nos segmentos cólicos de ratos desprovidos de trânsito intestinal (Lopes-Paulo et al., 2002). Constataram ainda que, nos segmentos sem trânsito intestinal, o volume parcial da mucosa era significativamente menor no grupo derivado, quando comparado ao grupo controle. Em outro estudo, os autores verificaram que havia significativa redução de peso da mucosa cólica: 10% após uma semana, 21% após duas semanas, 37% após quatro semanas e 31% após 12 semanas de exclusão de trânsito intestinal (Kissmeyer-Nielsen et al., 1994). Ao relacionarem a atrofia da mucosa à da lâmina própria e à muscular da mucosa verificaram redução de 41% do peso no epitélio após quatro semanas e, 48% após 12 semanas. Foi descrito que a atrofia da camada mucosa é significativa após duas semanas de derivação, alcançando um pico após quatro semanas, quando, a partir de então, se estabiliza (Roediger, 1990). Entretanto, cabe lembrar que em nenhum destes estudos é possível assegurar a ausência de conteúdo fecal no cólon excluído, pois não foi descrita a limpeza mecânica antes da confecção da derivação.

No presente estudo a limpeza mecânica foi sempre realizada e encontrou-se redução significativa no comprimento das criptas da mucosa cólica ao se comparar segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal, independente do tempo de exclusão. Demonstrou-se que no cólon desprovido de trânsito após seis semanas de exclusão, havia significativa redução no comprimento das criptas cólicas que alcançava seu menor valor após 12 semanas. Nos animais submetidos à exclusão de trânsito por 18 semanas, apesar do comprimento das criptas aumentarem, permaneciam ainda com valores inferiores aos encontrados nos animais com seis semanas de exclusão. Não foi possível mostrar correlação significativa entre o tempo de exclusão e a redução nos valores das criptas. Talvez este fato decorra da progressiva recuperação do comprimento das criptas nos animais com 18 semanas de exclusão, que pode ser secundário ao aumento da congestão vascular nos animais submetidos a 18 semanas de exclusão. A congestão vascular pode aumentar o fornecimento de glutamina ao segmento excluído, determinando uma recuperação parcial do comprimento das criptas cólicas. Estudos vêm propondo a irrigação do cólon excluído com soluções ricas em AGCC ou a reconstrução do trânsito intestinal precoce, que podem reverter significativamente a atrofia das criptas cólicas. (Neut et al., 1995; Kiely et al., 2001; Oliveira-Neto et al., 2004, Nassri et al., 2008).

Verificou-se um aumento na espessura da camada muscular da mucosa ao se comparar segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal, independente do tempo de exclusão considerado. Demonstrou-se que nos segmentos excluídos de trânsito havia, entretanto, significativa redução na espessura da camada muscular da mucosa, ao comparar os animais submetidos à exclusão por seis e 12 semanas, quando a partir de então a espessura da camada estabilizava-se. Não se encontrou correlação entre o tempo de exclusão e a espessura da camada muscular da mucosa. Nossos achados encontram-se de acordo com estudo semelhante que, mensurando o

peso da camada muscular da mucosa encontrou redução de 34% após 12 semanas de derivação (Kissmeyer-Nielsen et al., 1994).

Estudando o peso da camada submucosa, pesquisadores não encontraram variações de peso em segmentos desprovidos de trânsito intestinal (Kissmeyer-Nielsen et al., 1994). Em contraposição, analisando o volume da submucosa verificou-se aumento de volume significativo no grupo submetido à derivação do trânsito intestinal quando comparado ao grupo controle (Lopes-Paulo, 2002). Da mesma forma, outros estudos sobre os aspectos histopatológicos da colite pós-derivação no homem, descreveram um possível aumento do tecido conjuntivo na submucosa, que poderia estar relacionado a este aumento (Ma et al., 1990). Tais achados corroboram com nossos resultados, pois no presente estudo verificou-se, ao comparar segmentos com e sem trânsito intestinal, que ocorria aumento significativo na espessura da camada submucosa no segmento desprovido de trânsito, que se apresentava relacionado ao tempo de exclusão, atingindo seu maior valor após 18 semanas.

Estudando a espessura da camada muscular própria em segmentos de cólon providos e desprovidos de trânsito, autores descreveram aumento significativo nos segmentos excluído de trânsito intestinal (Violi et al., 1998). Porém de modo distinto, outro experimento identificou a redução de até 48% na espessura da camada muscular própria, nos segmentos excluídos de trânsito intestinal quando comparados aos segmentos onde o trânsito encontrava-se preservado (Kissmeyer-Nielsen et al., 1994). No presente estudo durante a remoção dos espécimes verificou-se, macroscopicamente, que o cólon desprovido de trânsito se apresentava contraído e com redução do seu diâmetro e comprimento longitudinal. Esta constatação foi mais evidente nos animais com 18 semanas de derivação de trânsito intestinal. Ao se comparar segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal, verificou-se que a camada muscular própria do segmento excluído de trânsito reduzia sua espessura após 12 semanas, retornando a valores próximos aos encontrados com seis semanas,

após 18 semanas de exclusão. Constatou-se que a variação na espessura da camada muscular no segmento sem trânsito intestinal apresentava-se inversamente relacionada ao tempo de exclusão. É possível que esta regressão da espessura da camada muscular se deva à redução macroscópica dos segmentos desprovidos de trânsito.

### **5.2.2 EROSÕES E ULCERAÇÕES DA MUCOSA INTESTINAL**

Um dos aspectos endoscópicos mais evidentes na CE é a presença de erosões e ulcerações da mucosa intestinal, que podem facilitar a migração de antígenos intraluminares para a corrente sangüínea. Autores acreditam que a absorção de antígenos pela mucosa ulcerada do cólon excluído possa levar à síntese de anticorpos anti-mucosa cólica, desencadeando alterações inflamatórias no cólon provido de trânsito intestinal, semelhantes às encontradas na colite ulcerativa (Lim et al., 1999). Estudos experimentais vêm demonstrando que modificações na arquitetura normal da mucosa cólica, em segmentos desprovidos de trânsito, podem ocasionar alterações na barreira intestinal, apesar desta alteração não aumentar necessariamente a translocação bacteriana (Pinto Júnior et al., 2007). Estudos em humanos demonstram a presença de alterações da mucosa intestinal em 100% dos doentes estudados, relacionando-as ao tempo de exclusão (Glutzer et al., 1981). Todavia, outros autores só encontraram lesões na mucosa cólica em 76% e 53,3% dos casos (Geraghty et al., 1991; Orsay et al., 1993). Estudos experimentais encontraram modificações na superfície epitelial nos segmentos excluídos somente em animais submetidos a 17 semanas de exclusão de trânsito, sem contudo, haver relação significativa com o tempo de exclusão (Keli et al., 1997). A presença de úlceras superficiais foram descritas em 31,43% dos segmentos intestinais estudados, referindo comprometimento apenas da camada mucosa, que não se encontravam relacionadas ao tempo de exclusão (Biondo-Simões et al., 2000). Apesar da integridade da mucosa cólica não ser considerado um achado frequente na CE em ratos, no presente estudo

foi possível verificar que após 12 semanas de exclusão houve aumento no número de erosões e ulcerações da mucosa cólica que se encontrava relacionada ao tempo de exclusão de trânsito intestinal. Em três animais, submetidos à derivação por 18 semanas, identificou-se formação de úlceras profundas que atingiam a muscular da mucosa. Os diferentes achados na literatura podem ser explicados pelos diferentes tempos de exclusão e metodologia de análise considerada.

### **5.2.3 A CONGESTÃO VASCULAR**

A presença de congestão vascular na lâmina própria é considerada como sinal sugestivo de inflamação (Keli et al., 1997). Não obstante a quantificação da congestão vascular ser difícil de mensurar, sua identificação pode reforçar a presença de inflamação. Estudo experimental demonstrou que em segmentos do cólon desprovidos de trânsito intestinal existe aumento significativo na congestão de vasos da submucosa quando comparado aos segmentos com trânsito preservado (Keli et al., 1997). Aumento significativo do volume parcial da submucosa foi constatado no segmento do cólon desprovido de trânsito intestinal, atribuindo este achado a possível aumento de tecido conjuntivo e congestão vascular na submucosa (Lopez-Paulo et al. 2002). Diferente disso, em estudo semelhante não foi encontrado variação no peso da camada submucosa em segmentos desprovidos de trânsito (Kissmeyer-Nielsen et al., 1994). No presente estudo, verificou-se ao comparar segmentos com e sem trânsito intestinal, que ocorria aumento significativo na espessura da camada submucosa no segmento desprovido de trânsito, que se apresentava relacionado ao tempo de exclusão, atingindo seu maior valor após 18 semanas. Não se encontrou aumento da congestão vascular da submucosa quando se comparou segmentos providos e desprovidos de trânsito. Todavia, a congestão vascular da submucosa se encontrava relacionada ao tempo de exclusão, à presença de infiltrado inflamatório e ao aumento de espessura da camada submucosa.

#### 5.2.4 AS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS

A infiltração de células inflamatórias na lâmina própria é um achado frequente na CE. A quantificação do infiltrado inflamatório da lâmina própria é passível de ceticismo, pelo fato de existir na mucosa cólica normal algum grau de infiltrado (Keli et al., 1997). Com o objetivo de diminuir a subjetividade desta interpretação alguns autores propuseram a análise quantitativa e qualitativa das células presentes no infiltrado inflamatório (Jenkins et al., 1988). No presente estudo optou-se por considerar-se de forma conjunta variáveis normalmente consideradas na caracterização do processo inflamatório. Ao adotar a escala de graduação, analisando conjuntamente as principais alterações encontradas no processo inflamatório, foi possível observar maior atividade inflamatória no cólon desprovido de trânsito, após 12 e 18 semanas de exclusão. Verificou-se ainda que a graduação inflamatória e o grau de inflamação encontravam-se relacionadas ao tempo de exclusão de trânsito intestinal.

A CE é enfermidade que apresenta sintomatologia incapacitante para o doente submetido à derivação intestinal, muitas vezes tornando-o recluso e afastando-o do convívio social (Roe et al., 1993). Ao considerar que a indicação de cirurgias de desvio de trânsito intestinal vem aumentando progressivamente como consequência da incidência cada vez maior do câncer e dos traumatismos abdominais, uma parcela cada vez maior da população estará sujeita ao desenvolvimento da CE. Soma-se a este fato estudos demonstrando que somente a metade dos doentes portadores de estomias tem seu trânsito intestinal restabelecido (Habr-Gama et al., 1997). A possibilidade de conhecer todas as alterações histológicas envolvidas na CE, e de estudar objetivamente a melhora do padrão histológico da CE após diferentes estratégias medicamentosas, torna importante o melhor conhecimento das alterações histológicas encontradas na doença. Assim sendo, acreditamos que o presente estudo vem ao encontro destas aspirações.

## **6. CONCLUSÕES**

Os resultados do presente estudo nas condições experimentais em que foi realizado permitem concluir que:

1. O modelo experimental proposto mostrou-se válido para o desenvolvimento da colite de exclusão em ratos.

2. Existe redução na altura das criptas cólicas da mucosa ao comparar os segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal.

3. Ocorre aumento da espessura da camada muscular da mucosa ao comparar os segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal, independente do tempo de exclusão fecal.

4. Existe aumento na espessura da camada submucosa ao comparar os segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal, independente do tempo de exclusão fecal.

5. Ocorre aumento na espessura da camada muscular própria ao comparar os segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal, após seis e 18 semanas de exclusão fecal.

6. Existe a formação de úlceras mucosas nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal relacionadas ao tempo de exclusão.

7. Não se encontrou aumento da congestão vascular da submucosa ao comparar segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal.

8. Existe maior atividade inflamatória nos segmentos excluídos de trânsito fecal que se encontra relacionada ao tempo de exclusão.

9. A presença de ulcerações da mucosa, congestão vascular, infiltrado inflamatório e graduação inflamatória foram variáveis relacionadas ao tempo de exclusão intestinal.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasakoor F, Mahon C, Boulos PB. Diversion colitis in sigmoid neovagina. *Colorectal Dis.*6(4):290-1, 2004.

Barreto Neto, P.F.; Morais, D.C.R.; Tavares, G.A.; Bispo, D.J.S.; Souza Júnior, J.M.M. Trauma Colorretal: Estudo retrospectivo. **Rev bras Coloproct** , 22(3):170-4, 2002.

Biondo-Simões, M.L.P.; Greca, F.H.; Abicalaffe, M.D.; Colnaghi, M.C.; Mattos e Silva, E.; Yamasaki, E.S.; Smaniotto, G. Colite do cólon exclusivo: modelo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, 15(supl 3):7-11, 2000.

Desrayaud F, Valvin V, Marcato N, Combes R, Bouscavel AM, Goubeyre N. Sigmoid neo-vaginal inflammation. Haemorrhagic rectocolitis or diversion colitis? *Presse Med.* 32(30):1417-8, 2003.

Drut R, Drut RM. Hyperplasia of lymphoglandular complexes in colon segments in Hirschsprung's disease: a form of diversion colitis. *Pediatr Pathol.*12(4):575-81, 1992.

Edwards, C.M.; George, B.; Warren, B. Diversion colitis – new light through old windows. **Histopathology**, 34(1):1-5, 1999.

Ferguson CM, Siegel RJ. A prospective evaluation of diversion colitis. *Am Surg.*57(1):46-9, 1991.

Geraghty, J.M.; Talbot, I.C. Diversion colitis: histological features in the colon and rectum after defunctioning colostomy. **Gut**, 32(9):1020-3, 1991.

Giardiello, F.M.; Lazenby, A.J.; Bayless, T.M. The new colitides: collagenous, lymphocytic, and diversion colitis. **Gastroenterology Clinics of North America**, 24 (3):717-29, 1995.

Glotzer, D.J.; Glick, M.E.; Goldman, H. Proctitis following diversion of fecal stream.

**Gastroenterology**, 80(3):438-41, 1981.

Habr-Gama, A.; Teixeira, M.G.; Vieira, M.J.F.; Miléu, L.F.; Laurino Neto, R.; Pinotti, H.W. Operação de Hartmann e suas conseqüências. **Rev bras Coloproct**, 17(1):5-10, 1997.

Hage JJ, Karim RB, Asscheman H, Bloemena E, Cuesta MA. Unfavorable long-term results of rectosigmoid neocolpopoiesis. *Plast Reconstr Surg*.95(5):842-8, 1995.

Jenkins, D.; Goodall, A.; Drew, K.; Scot, B.B. What is colitis? Statistical approach to distinguishing clinically important inflammatory change in rectal biopsy specimens. **J Clin Pathol**, 41(1):72-9, 1988.

Jørgensen JR, Clausen MR, Mortensen PB. Oxidation of short and medium chain C2-C8 fatty acids in Sprague-Dawley rat colonocytes. *Gut*.40(3):400-5, 1997.

Junqueira, L.C.U.; Martins, E.O. Aparelho Digestivo. In: Junqueira, L.C.U.; Martins, E.O. Atlas de anatomia microscópica do rato. 1ed. São Paulo: Tipografia Rossolillo;. **Publicação da Universidade de São Paulo**. p 40-56, 1947.

Keli, E.; Bouchoucha, M.; Devroede, G.; Carnot, F.; Ohrant T.; Cugnenc, P.H. Diversion-related experimental colitis in rats. **Dis Colon Rectum**, 40(2):222-8, 1997.

Kiely, E.M.; Ajayi, N.A.; Wheele, R.A.; Malone, M. Diversion procto-colitis: response to treatment with short-chain fatty acids. **Journal of Pediatric Surgery**,36(10):1514-17, 2001.

Kissmeyer-Nielsen, P.; Christensen, H.; Laurberg, S. Diverting colostomy induces mucosal and muscular atrophy in rat distal colon. **Gut**, 35(9):1275-81, 1994.

Komorowski RA. Histologic spectrum of diversion colitis. *Am J Sur Pathol*.14(6):548-54, 1990.

Korelitz, B.I.; Cheskin, L.J.; Sommers, S.C. The fate of the rectal segment after diversion of the fecal stream in Crohn's disease: its implication for surgical management. **J Clin Gastroenterol**, 7(1):37-43, 1985.

Lim, A.G.; Langmead, F.L.; Feakins, R.M.; Rampton, D.S. Diversion colitis: a trigger for ulcerative colitis in the in-stream colon. **Gut**, 44(2):279-82, 1999.

Lopes-Paulo F. Emprego da estereologia em pesquisas colorretais. *Rev bras Coloproct*.22(2):73-6, 2002.

Lopes-Paulo, F. Alterações estruturais na mucosa do cólon derivado - Estudo estereológico experimental em ratos. **Rev bras Coloproct**, 22(3):164-9, 2002.

MA, C.K.; Gottlieb, C.; Haas, P.A. Diversion colitis: A clinicopathologic study of 21 cases. **Human Pathology**, 21(4):429-36, 1990.

Margarido, N.F.; Nassri, C.G.G.; Nasri, A.B.; Rotta, C.M. Modelo experimental em ratos de colite por exclusão. **Rev Col Bras Cir**, 30(supl.1)179, 2003.

Martinez, C.A.R.; Waisberg, J.; Palma, R.T.; Silva, F.Z.; Cimerman, G.; Goffi F.S. Morphometric study of gastric mucosa in dogs submitted to proximal gastric vagotomy, splenectomy or proximal gastric vagotomy associated with splenectomy. **Acta Cir Bras**,17(5): 289-98,2002.

Martinez CAR, Nonose R, Pereira JA, Spadari APP, Máximo FR, Margarido NF, Priolli DG. Tissue expression of sulfomucins and sialomucins in colonic mucosa of intestinal segments with and without fecal stream. Experimental study in rats. *Acta Cir Bras*. No prelo, 2008.

Martinez CAR, Nonose R, Margarido NF, Spadari APP, Pereira JA, Priolli DG, Máximo FR. Quantificação da expressão de mucinas na mucosa cólica de segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos. *Rev bras Coloproct.*28(supl.1):47-8, 2008.

Mortensen, F.V.; Hesso, I.; Brike, H.; Korsgaard, N.; Nielsen, H. Microcirculatory and trophic effects of short chain fatty acids in the human rectum after Hartmann's procedure. **Br J Surg**, 78(10):1208-11, 1991.

Murray, F.E.; Michael, J.O.B.; Desmond, H.B.; Susan, M.K.; Thomas, J.L. Diversion colitis. Pathologic findings in a resected sigmoid colon and rectum. **Gastroenterology**, 93(6):1404-8, 1987.

Nassri, C.G.G.; Nassri, A.B.; Favero, E.; Rotta, C.M.; Martinez, C.A.R; Margarido. N.F. Influência da irrigação de soluções nutricionais no colo excluído de trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos. **Rev Bras Coloproct**, 2008;28(3): 306-14.

Neut, C.; Guillemot, F.; Gower-Rousseau, C.; Biron, N.; Cortot, A.; Colombel, J.F. Treatment of diversion colitis with short-chain fatty acids. Bacteriological study. **Gastroenterol Clin Biol**, 19(11):871-5, 1995.

Nonose R, Spadari APP, Priolli DG, Máximo FR, Pereira JA, Martinez CAR. Tissue quantification of neutral and acid mucins in the mucosa of the colon with and without fecal stream: Experimental study in rats. *Acta Cir Bras*. No prelo, 2009.

Oliveira-Neto, J.P.; Aguilar-Nascimento, J.E. Intraluminal irrigations with fibers improves inflammation and atrophy in diversion colitis. **Nutrition**, 20(2):197-9, 2004.

Ordein JJ, Di Lorenzo C, Flores A, Hyman PE. Diversion colitis in children with severe gastrointestinal motility disorders. *Am J Gastroenterol.*87(1):88-90, 1992.

Orsay, C.P.; Kim, D.O.; Pearl, R.K.; Abcarian, H. Diversion colitis in patients scheduled for colostomy closure. **Dis Colon Rectum**,36(4):366-7, 1993.

Pearce, N.W.; Scott, S.D.; Karran, S.J. Timing and method of reversal of Hartmann's procedure. **Brit J Surg**, 79(8):839-41, 1992.

Pinto, A.; Fidalgo, P.; Cravo, M.; Midões, J.; Chaves, P.; Rosa, J.; Brito, M.A.; Leitão, C.N. Short chain fatty acids are effective in short-term treatment of chronic radiation proctites: randomized double-blind, controlled trial. **Dis Colon Rectum**, 42(6):788-95, 1999.

Pinto Júnior, F.E.L.; Brandt, C.T.; Medeiros, A.C.; Oliveira, A.J.F.; Jerônimo, S.M.; Brito H.M.F. Bacterial translocation in rats nonfunctioning diverted distal colon. **Acta Cir Bras**, 22(3):195-201, 2007.

Priolli, D.G.; Margarido, N.F.; Martinez, C.A.R.; Rotta, C.M.; Stephani, S.M. Edema quantification by computerized morphometry as an evaluation parameter for the resistance of colon anastomoses. **Acta Cir Bras**, 18(5):398-406, 2003.

Priolli, D.G.; Martinez, C.A.R.; Martinez, N.P.; Silva, P.L.E.; Pereira, J.A.; Margarido, N.F.; Máximo, F.R.; Spadari, A.P.P. A reflexão peritonial é o melhor reparo anatômico na cirurgia experimental colorretal em ratos? **Rev bras Coloproct**, 28 (supl.1):52,TLE-018, 2008.

Roe, A.M.; Warren, A.J.M.; Brodribb, C.B. Diversion colitis and involution of the defunctioned anorectum. **Gut**, 34(3):382-5, 1993.

Roediger WE. Anaerobic bacteria, the colon and colitis. *Aust N Z J Surg*.50(1):73-5, 1980.

Roediger, W.E. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. **Gastroenterology**, 83(2):424-9, 1982.

Roediger, W.E. The starved colon – diminished mucosal nutrition, diminished absorption, and colitis. **Dis Colon Rectum**, 33(10):858-62, 1990.

Soergel KH. Colonic fermentation: metabolic and clinical implications. *Clin Investig.*72(10):742-8, 1994.

Sousa MV, Priolli DG, Portes AV, Cardinali IA, Pereira JA, Martinez CAR. Evaluation by computerized morphometry of histopathological alterations of the colon wall in segments with and without intestinal transit in rats. *Acta Cir Bras.*23(5):417-24, 2008.

Syed HA, Malone PS, Hitchcock RJ. Diversion colitis in children with colovaginoplasty. *BJU Int.*87(9):857-60, 2001.

Toolenaar TA, Freundt I, Huikeshoven FJ, Drogendijk AC, Jeekel H, Chadha-Ajwani S. The occurrence of diversion colitis in patients with a sigmoid neovagina. *Hum Pathol.*24(8):846-9, 1993.

Velazquez, O.C.; Lederer, H.M.; Rombeau, J.L. Butyrate and colonocyte. Production, absorption, metabolism and therapeutic implications. **Adv Exp Med Biol**, 427:123-134, 1997.

Violi, V.; Cobianchi, F.; Adami, M.; Torri, T.; Ferraro, G.; Roncoroni, L. Human defunctionalized colon: a histopathological and pharmacological study of muscularis propria in resection specimens. **Dig Dis Sci**, 43(3):616-23, 1998.

Yeong ML, Bethwaite PB, Prasad J, Isbister WH. Lymphoid follicular hyperplasia – a distinctive feature of diversion colitis. *Histopathology.*19(1):55-61, 1991.

## ANEXO 1

**Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**



Bragança Paulista, 22 de Novembro 2007.

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**Projeto de Pesquisa:** "Avaliação da correlação entre as alterações histológicas, histoquímicas, expressão tecidual da proteína p53 e o dano oxidativo do DNA nas células da mucosa cólica de ratos submetidos à colite de exclusão".

**Autor(es):** Dr. Carlos Augusto Real Martinez; Dr. Marcelo Lima Ribeiro; Ms. Denise G Priolli; Ms. Carlos Alves Fontes de Souza; Ms. José Aires Pereira.

**Instituição:** Universidade São Francisco

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, em reunião ordinária realizada no dia 22 de Novembro de 2007, analisou o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

**Parecer:** Aprovado

Atenciosamente,

**José Pedrazzoli Júnior**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825

CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Ars CEP 13045-270 (19) 3779-3300

CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933

**ANEXO II – Médias das variáveis estudadas, obtidas através da morfometria computadorizada, considerando os grupos e subgrupos (experimental e controle) e o tempo de estudo.**

<b>ESPESSURA DAS CRIPTAS CÓLICAS</b>			
	<b>Seis semanas</b>	<b>12 semanas</b>	<b>18 Semanas</b>
<b>Grupo controle</b>	28,47 $\mu\text{m}$	26,9 $\mu\text{m}$	24,85 $\mu\text{m}$
<b>Com Trânsito Intestinal</b>	29,95 $\mu\text{m}$	26,26 $\mu\text{m}$	26,12 $\mu\text{m}$
<b>Sem Trânsito Intestinal</b>	20,75 $\mu\text{m}$	17,21 $\mu\text{m}$	19,16 $\mu\text{m}$

<b>ESPESSURA DA SUBMUCOSA</b>			
	<b>Seis semanas</b>	<b>12 semanas</b>	<b>18 Semanas</b>
<b>Grupo controle</b>	14,72 $\mu\text{m}$	11,42 $\mu\text{m}$	12,9 $\mu\text{m}$
<b>Com Trânsito Intestinal</b>	13,23 $\mu\text{m}$	10,29 $\mu\text{m}$	13,4 $\mu\text{m}$
<b>Sem Trânsito Intestinal</b>	21,37 $\mu\text{m}$	19,5 $\mu\text{m}$	24,97 $\mu\text{m}$

<b>MÉDIA DOS VALORES DA ESPESSURA DA MUSCULAR DA MUCOSA</b>			
	<b>Seis semanas</b>	<b>12 semanas</b>	<b>18 Semanas</b>
<b>Grupo controle</b>	4,83 $\mu\text{m}$	3,69 $\mu\text{m}$	3,63 $\mu\text{m}$
<b>Com Trânsito Intestinal</b>	5,54 $\mu\text{m}$	4,5 $\mu\text{m}$	3,91 $\mu\text{m}$
<b>Sem Trânsito Intestinal</b>	8,22 $\mu\text{m}$	6,86 $\mu\text{m}$	7,63 $\mu\text{m}$

<b>MÉDIA DOS VALORES DA ESPESSURA DA MUSCULAR PRÓPRIA</b>			
	<b>Seis semanas</b>	<b>12 semanas</b>	<b>18 Semanas</b>
<b>Grupo controle</b>	34,68 $\mu\text{m}$	33,66 $\mu\text{m}$	33,63 $\mu\text{m}$
<b>Com Trânsito Intestinal</b>	29,55 $\mu\text{m}$	26,41 $\mu\text{m}$	21,83 $\mu\text{m}$
<b>Sem Trânsito Intestinal</b>	37,44 $\mu\text{m}$	24,32 $\mu\text{m}$	32,73 $\mu\text{m}$

$\mu\text{m}$  = micrômetros