

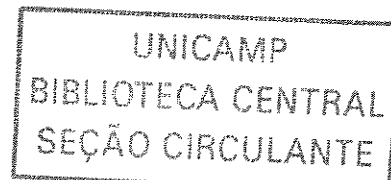
MARCIA ALESSANDRA CAVALARO PEREIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS PLEXOS MIOENTÉRICOS E DO
TRÂNSITO INTESTINAL EM RATOS SUBMETIDOS A LESÃO
POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO DO TERRITÓRIO DA
ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR**

CAMPINAS

2004

i



MARCIA ALESSANDRA CAVALARO PEREIRA DA SILVA

***AValiação DOS PLEXOS MIOENTÉRICOS E DO
TRÂNSITO INTESTINAL EM RATOS SUBMETIDOS A LESÃO
POR ISQUEMIA E REPERFUSÃO DO TERRITÓRIO DA
ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Cirurgia, área de Cirurgia.*

ORIENTADOR: JOAQUIM MURRAY BUSTORFF-SILVA

CAMPINAS

2004

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

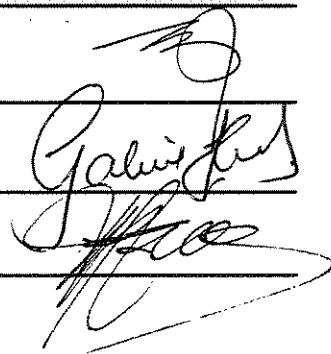
Orientador: Prof. Dr. JOAQUIM MURRAY BUSTORFF SILVA

Membros:

1. Prof. Dr. Joaquim Murray Bustorff Silva

2. Prof. Dr. Gabriel Hessel

3. Prof. Dr. José Lúcio Martins Machado

Handwritten signatures of the exam board members, including Gabriel Hessel and José Lúcio Martins Machado.

Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/08/2004

DEDICATÓRIA

A meus pais, Oclésio e Lucy,

A quem devo tudo o que sou.

A Jodir, meu esposo,

Pelo amor, dedicação e orientação.

Ao nosso filho que vai chegar.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Joaquim Murray Bustorff-Silva, cujo exemplo influenciou minha opção pela Cirurgia Pediátrica, representando um estímulo constante em meu desenvolvimento científico e profissional.

Ao Prof. Dr. Jodir Pereira da Silva, meu companheiro inseparável, pelo apoio, incentivo e amor a mim dedicados durante todo o processo de realização deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Henrique Pereira, Mestre em Cirurgia Pediátrica, pela amizade, exemplo profissional e científico, incentivo e companheirismo.

Aos Drs. Antônio Gonçalves de Oliveira Filho e Marcio Lopes Miranda, por ensinarem o amor à criança e estimular a busca da perfeição técnica.

Aos Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto, Dr. Shoji Myiabara e Dr. Edison Rissato de Oliveira, pelos ensinamentos.

Aos biólogos Willian Adalberto Silva e Ana Cristina de Moraes, e aos funcionários Miguel Luiz Cândido e Waldemir Benedito Costa, do Laboratório de Técnica Cirúrgica e do Biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Campinas, pelo inestimável auxílio durante os procedimentos com os animais.

À bióloga Marta Leonardo, do Departamento de Histologia, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pelo carinho e auxílio na confecção de lâminas para estudo histológico em historesina.

Ao Professor Doutor Norair Salviano dos Reis, pela orientação nas técnicas histológicas e pela amizade.

À Dra. Luciana Rodrigues de Meirelles, doutora em Anatomia Patológica, pelo auxílio no estudo e obtenção de fotos do material histológico.

	<i>Pág.</i>
RESUMO.....	<i>vii</i>
ABSTRACT.....	<i>ix</i>
1 - INTRODUÇÃO.....	11
2 - OBJETIVOS.....	20
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4 - RESULTADOS.....	31
5 - DISCUSSÃO.....	46
6 - CONCLUSÃO.....	52
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
8 - ANEXO.....	58

RESUMO

Alterações histológicas precoces causadas por enterocolite necrosante já foram exaustivamente estudadas em modelos animais. No entanto, poucas informações sobre os efeitos tardios da doença sobre a motilidade intestinal podem ser encontradas na literatura atual.

No presente estudo, trinta e dois ratos Wistar machos recém-desmamados pesando entre 58 e 103 gramas foram distribuídos ao acaso em quatro grupos: Controle (não operados), Sham (laparotomia), Isquemia por 30 minutos (laparotomia e isquemia da artéria mesentérica superior por 30 minutos) e Isquemia por 45 minutos (laparotomia e isquemia da artéria mesentérica superior por 45 minutos). A motilidade intestinal no período pós-operatório foi medida indiretamente através da medida do peso seco do total de fezes obtidas em 24 horas nos 3º, 7º, 14º e 21º dias após a cirurgia. Segmentos de duodeno, jejuno e íleo foram examinados à microscopia de luz para observação de alterações ocorridas nos plexos mioentéricos.

Três semanas após a isquemia, os neurônios dos plexos mioentéricos apresentaram vacuolização citoplasmática, e seus núcleos apresentaram irregularidade no contorno e sinais degenerativos. Houve mudanças significativas na motilidade intestinal nos animais submetidos a 45 minutos de isquemia mesentérica, mas essas mudanças não provocaram alterações significativas no crescimento final dos animais.

Os resultados sugerem que o processo de isquemia-reperfusão intestinal causa danos aos neurônios dos plexos mioentéricos. Nas condições referidas no presente estudo, essas mudanças foram suficientes para induzir alterações na motilidade, mas isso não afetou a função intestinal.

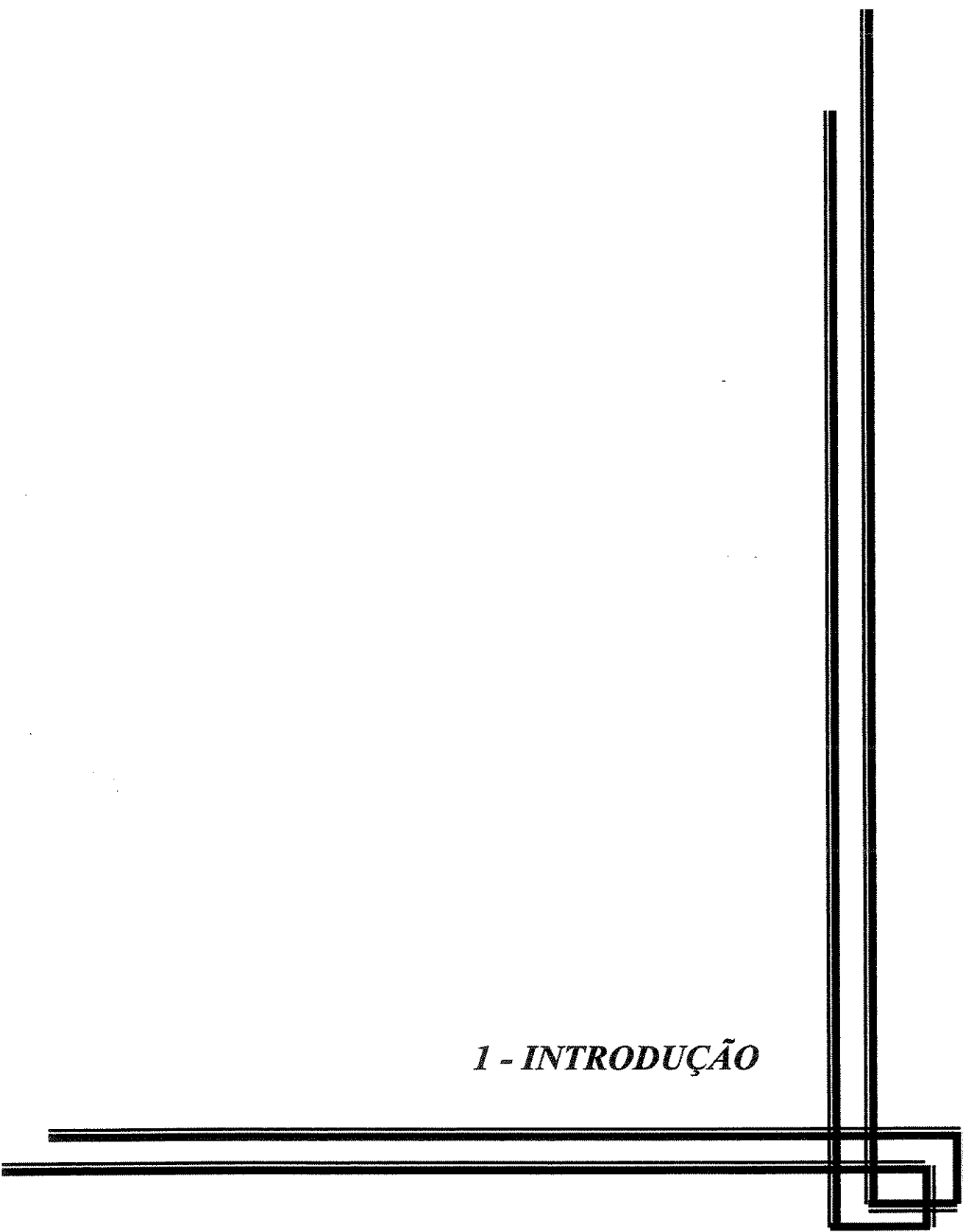
ABSTRACT

Background/Purpose: Early histological changes induced by necrotizing enterocolitis have been extensively studied using animal models. However, information regarding late effects on intestinal motility are lacking. The aim of this study was to investigate the late effects of ischemia-reperfusion on myenteric plexus histology and intestinal motility.

Materials and Methods: Thirty-two post-weaning male mice weighing between 58 and 103g were divided randomly into 4 groups: Control (unoperated), Sham(celiotomy), 30 min Ischemia(celiotomy and superior mesenteric artery ischemia for 30 minutes) and 45 min Ischemia(celiotomy and superior mesenteric artery ischemia for 45 minutes). Postoperative intestinal motility was assessed by weighing total fecal output over 24 hours on the 3rd, 7th, 14th and 21st day after surgery. Segments of duodenum, jejunum and ileum were examined at light microscopy for changes in the myenteric plexus.

Results: At three weeks after ischemia, the myenteric neurons appeared, in light microscopy, spongy or foamy, containing many vacuoles in their cytoplasm. The neuronal nucleus became irregular, with degenerative signs. There were significant changes in intestinal motility in the animal groups submitted to intestinal ischemia, but these changes did not affect the animal overall growth.

Conclusions: The results suggest that intestinal ischemia-reperfusion causes late neuronal damage. Within the conditions of the present study, these changes were sufficient to induce alterations in intestinal motility, but this did not affect intestinal function.



1 - INTRODUÇÃO

Com os avanços ocorridos nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatais nas últimas décadas, bebês prematuros de baixo e muito baixo peso passaram a ter melhor prognóstico, e com isso, várias patologias começaram a surgir e ter maior prevalência, em decorrência da prematuridade. Entre essas doenças, a enterocolite necrosante tornou-se causa significativa de morbi-mortalidade. Hoje em dia, apenas a suspeita clínica de enterocolite necrosante já significa o início imediato de investigações laboratoriais e radiológicas para o esclarecimento e instalação de terapia adequada ao recém-nascido, a qual consiste basicamente na instituição de antibioticoterapia, pausa alimentar, sonda para decompressão gástrica, reposição hidroeletrólítica, drogas vasoativas, e nutrição parenteral. ALBANESE & ROWE (1998) em um capítulo específico dedicado à patologia da enterocolite necrosante descrevem-na como “a emergência cirúrgica mais comum em recém-nascidos, (...) com taxa de mortalidade que supera em muito qualquer outra patologia cirúrgica gastrointestinal em Cirurgia Pediátrica.” No mesmo capítulo, descrevem as complicações que podem acontecer após a ocorrência da doença. Entre as complicações mais comuns encontram-se as estenoses intestinais, onde as áreas intestinais que foram acometidas na fase aguda da doença evoluem com fibrose e diminuição da luz, causando obstrução completa ou parcial do trânsito intestinal. Outra complicação descrita é a síndrome da má-absorção intestinal ou síndrome do intestino curto, que pode advir de vários fatores como, por exemplo, a diminuição do comprimento intestinal (ressecção cirúrgica), depleção enzimática (normalmente deficiência de lactase), hipermotilidade intestinal, hipersecreção gástrica, supercrescimento bacteriano, diminuição do tempo de trânsito intestinal e deficiência de vitamina B12 e sais biliares (quando existe ressecção de íleo terminal). O uso prolongado de nutrição parenteral total pode ocasionar outra complicação freqüente nos recém-nascidos com enterocolite necrosante, a doença colestática, que é caracterizada por aumento sérico da bilirrubina direta, hepatomegalia e níveis elevados de aminotransferases.

POKORNY et al. (1986) relataram uma incidência de enterocolite necrosante entre nascidos vivos de 3:1000, sendo que entre os recém-nascidos de baixo peso esta incidência subiu para 30:1000. Desses pacientes, 31% necessitaram tratamento cirúrgico durante a fase aguda da doença, e 11% dos pacientes tratados clinicamente também

necessitaram cirurgia mais tardiamente, devido a seqüelas tardias (estenoses). Este estudo, porém, não se debruça sobre os achados anátomo-patológicos.

JANIK et al. (1981) descrevem que entre 175 pacientes tratados clinicamente para enterocolite necrosante, vinte evoluíram com estenose entre 1 a 20 meses após a fase aguda da doença. Sete dessas obstruções apresentaram-se no intestino delgado, e dezenove delas no cólon. Os segmentos estenóticos ressecados foram submetidos à análise microscópica, que revelou vários estágios de cicatrização, desde inflamação aguda até fibrose densa, principalmente na camada submucosa. Os autores relatam a presença de células ganglionares nas amostras examinadas, sem, no entanto, descrever as suas condições.

Um dos problemas que se colocam em relação à enterocolite necrosante é se o desenvolvimento pôndero-estatural pós-enterocolite é prejudicado a longo prazo.

Neste sentido, ABBASI et al. (1984) compararam dois grupos de crianças com idade pós-conceptual de um ano, em estudo longitudinal. O primeiro grupo, composto por 22 crianças que sobreviveram ao processo de enterocolite necrosante, foi diagnosticado através de critérios clínicos de disfunção gastrointestinal acompanhados de um ou mais sinais radiológicos (pneumatose intestinal, presença de gás portal, pneumoperitônio, e alças intestinais dilatadas fixas). Neste grupo, além do tratamento clínico com antibioticoterapia, descompressão gástrica com sonda e nutrição parenteral, quatro pacientes necessitaram procedimento cirúrgico como parte do tratamento. Após alta hospitalar, os pacientes retornaram para consulta a cada três meses, quando foram reavaliados quanto à aceitação alimentar, intercorrências clínicas, e exames físico e neurológico. O segundo grupo consistiu de crianças nascidas no mesmo período, com pesos, idade gestacional e escore Apgar de 1 e 5 minutos similares aos do primeiro grupo, mas que não apresentaram enterocolite necrosante. Na idade pós-conceptual de um ano, todas foram submetidas a exames físicos e laboratoriais específicos para avaliação de crescimento, estado nutricional, e função gastrointestinal não tendo sido encontrada nenhuma diferença significativa entre os dois grupos de pacientes. De forma semelhante, YU et al. (1984) realizaram uma correlação entre pacientes nascidos com muito baixo peso que tiveram enterocolite com outros sem a doença que nasceram no mesmo período. De 41 sobreviventes à enterocolite

necrosante, seis (15%) mostravam algum grau de deficiência aos dois anos de idade, corrigidos para prematuridade, comparados a 48 (20%) de 241 sobreviventes de muito baixo peso que não tiveram enterocolite. Não houve nenhuma evidência de disfunção gastrointestinal entre os grupos, apesar de algumas crianças (15%) permanecerem abaixo do percentil 10 tanto para peso quanto para altura.

LADD et al. (1998) avaliaram retrospectivamente crianças sobreviventes a enterocolite necrosante que foram submetidas a tratamento cirúrgico e compararam, a longo prazo, fatores que poderiam afetar seu crescimento. Assim, as taxas de mortalidade variaram inversamente com a idade gestacional e o peso ao nascimento. A ressecção da válvula ileocecal não influenciou no prognóstico e a maior extensão de alças intestinais ressecadas levou a maior necessidade de nutrição parenteral, mas não influenciou no crescimento a longo prazo.

Em estudo realizado em 1990, RICKETTS & JERLES descrevem pacientes operados por enterocolite necrosante, e a taxa de sobrevivência para crianças com peso menor ou igual a 1.000g observada foi 54%, 74% para pacientes com peso entre 1.001g e 1.500g, e 79% no grupo maior que 1.500g. No seguimento a longo prazo, a função gastrointestinal mostrou-se normal em 74% dos pacientes, e em apenas 8% houveram disfunções mais significativas, que influenciaram no ganho ponderal destes pacientes. De modo semelhante, WALSH et al. (1989) compararam pacientes nascidos com muito baixo peso que desenvolveram enterocolite necrosante com outros que não tiveram a doença. Quarenta crianças (48%) sobreviveram até 20 meses de idade pós-conceptual, e de 36 deles foram obtidas informações completas para avaliação de seu desenvolvimento. Os sobreviventes foram subdivididos em quatro grupos de acordo com critérios de gravidade propostos por BELL (1973). Assim, 13 tinham enterocolite necrosante branda (estágio II de Bell) e 23 tinham doença grave (estágio III de Bell). Esses 36 sobreviventes foram comparados com outros 766 recém-nascidos de muito baixo peso sem enterocolite necrosante e, comparados com os pacientes de estágio II aos 20 meses, as crianças com estágio III tiveram valores subnormais de peso corporal mais evidentes (39% X 15%) além de medidas de circunferência craniana também subnormais e mais evidentes (30% X 0%).

Devido à importância clínica desta entidade e à sua alta morbi-mortalidade vários modelos experimentais têm sido utilizados para abordar aspectos da fisiopatologia da enterocolite necrosante. No entanto, poucos estudos avaliam as alterações, provocadas a longo prazo, pelo processo de isquemia-reperfusão intestinal, na motilidade, nos plexos mioentéricos e nas fibras nervosas parassimpáticas da lâmina própria e *muscularis mucosae*.

A relação entre o fluxo sanguíneo da artéria mesentérica superior e a atividade elétrica do segmento intestinal correspondente foi estudada por FIORAMONTI & BENO (1984) através de medidas simultâneas obtidas em cães conscientes. As informações foram obtidas a partir de sensor para medir fluxo eletromagnético e eletrodos transparietais previamente instalados cirurgicamente. O monitoramento contínuo foi realizado durante 24 horas, e os animais foram alimentados uma vez ao dia. Observaram que o fluxo sanguíneo jejunal aumentou após a refeição e diminuiu progressivamente no período pós-prandial (7-12 hs) e então apresentou variações cíclicas associadas com a ocorrência de complexos migratórios mioelétricos nas outras 6 – 10 horas. O fluxo sanguíneo ileal aumentou e manteve-se alto e constante durante o período pós-prandial, e exibiu variações cíclicas associadas aos complexos migratórios mioelétricos mesmo quando o cão foi submetido a jejum durante 48 horas. As variações cíclicas no fluxo sanguíneo foram eliminadas quando o conteúdo intestinal foi drenado com sonda cirurgicamente instalada proximalmente ao segmento estudado. Assim, concluíram que no cão consciente o perfil do fluxo sanguíneo está associado ao perfil motor do mesmo segmento intestinal. Essa associação é relacionada à presença de conteúdo digestivo, provavelmente nutrientes no jejuno e bile no íleo.

O'DONNELL et al. (1997) estudaram o efeito do processo de isquemia-reperfusão na mucosa intestinal de ratos e para isso estabeleceram quatro grupos de estudo, I – Laparotomia de 180 minutos, II - isquemia de 60 minutos e perfusão de 120 minutos, III – mesma manobra, mas mantendo fluxo intraluminal de perfluorocarbono durante o período de isquemia e IV – Processo de isquemia-reperfusão, mantendo fluxo intraluminal de perfluorocarbono durante o período de perfusão. Os autores observaram que o fluxo contínuo com perfluorocarbono durante o período de isquemia ou todo o período de isquemia-reperfusão protege a integridade da mucosa intestinal, mas se realizado durante o

período de reperfusão, piora a lesão tecidual. Assim, os autores sugerem que a perfusão intestinal com perfluorocarbono poderia ser utilizada como nova modalidade de tratamento em pacientes portadores de isquemia intestinal.

No nosso meio, SBRAGIA NETO (1996) desenvolveu modelo experimental para estudo das lesões teciduais no processo de isquemia-reperfusão no intestino de ratos. Para isso, clampeou a artéria mesentérica superior, por diferentes períodos e colheu biópsias em tempos e locais padronizados, para medidas morfométricas do epitélio intestinal, avaliação da quantidade de neutrófilos na lâmina própria e determinação quantitativa de dois marcadores bioquímicos teciduais, o ácido gama aminobutírico e a ortofosfoserina, por meio de cromatografia. O autor concluiu que a intensidade da lesão isquêmica é proporcional ao tempo de isquemia e é sempre menor que a observada durante a reperfusão tecidual; a quantidade de neutrófilos na lâmina própria também é proporcional ao tempo de isquemia e é maior durante o período de reperfusão; os teores de ácido gama aminobutírico e ortofosfoserina aumentam na reperfusão, principalmente aos 10 e 15 minutos em relação aos encontrados aos 20 e 60 minutos de isquemia, respectivamente.

HEBRA et al. (1993) estudaram pela primeira vez os efeitos da hipoperfusão nos complexos migratórios mioelétricos em filhotes de porcos. Para tanto instalaram nos animais eletrodos jejunais, sondas para medir fluxo mesentérico e um cateter pericárdico. Assim, realizaram tamponamento cardíaco, diminuindo em 75% o fluxo da artéria mesentérica superior durante cinco horas, e monitorizaram o ciclo de complexos migratórios mioelétricos continuamente durante isquemia e reperfusão. Durante o período de isquemia, o tempo de ciclo dos complexos migratórios mioelétricos aumentou de 67 para 98 minutos, e a velocidade de propagação dos complexos migratórios mioelétricos caiu de 10 para 4 cm/minuto. Na fase de reperfusão, tanto o tempo de ciclo dos complexos migratórios mioelétricos como a velocidade de propagação dos complexos migratórios mioelétricos não diferiram das medidas basais. A conclusão dos autores é que a mudança demonstrada pode estar relacionada com o supercrescimento e translocação bacteriana durante os períodos de baixa perfusão intestinal.

Em 1994, HEBRA et al. utilizaram o mesmo modelo experimental para testar a hipótese de que complexos migratórios mioelétricos disfuncionais induzidos pelo processo de isquemia e reperfusão intestinal estariam associados com a ocorrência de translocação

bacteriana. Para isso submeteram filhotes de porco à isquemia mesentérica não-oclusiva através de tamponamento cardíaco reversível durante 300 minutos. Culturas de linfonodos obtidas 14 horas após a reperfusão mostraram-se positivas para *Escherichia coli* e/ou *Klebsiella pneumoniae* nos animais submetidos ao processo de isquemia e reperfusão intestinal, sendo negativas para o grupo Sham. Observaram também taxa de 17% de translocação bacteriana para órgãos sólidos e um terço dos animais tiveram bacteremia no grupo submetido ao processo de isquemia e reperfusão intestinal. Como se sabe, durante o processo de isquemia e reperfusão intestinal ocorre alteração da motilidade intestinal, e os autores sugerem que este seja o principal fator no desencadeamento da translocação bacteriana. Estes resultados parecem estar de acordo com os achados de VANTRAPPEN et al., (1977).

Estudos mais recentes, provavelmente preocupados com as seqüelas funcionais da enterocolite necrosante, vêm-se debruçando sobre as alterações de motilidade intestinal que ocorrem entre os sobreviventes dessa entidade.

PIAO et al. (1999) realizaram isquemia ileal segmentar por período de 4 horas e demonstraram, quatro semanas após o procedimento, alterações macroscópicas na área submetida à isquemia (estenose) com dilatação a montante (área não isquemiada), como se observa na Doença de Hirschsprung. Além disso, demonstraram com microscopia óptica e eletrônica realizadas três semanas após a isquemia mesentérica, alterações em neurônios dos plexos mioentéricos que apresentaram-se com muitos vacúolos em seu citoplasma. Na microscopia realizada após 4 semanas do evento isquêmico, o citoplasma neuronal e os feixes nervosos haviam se desintegrado para formar espaços vazios nos plexos mioentéricos. Os núcleos dos neurônios dos plexos mioentéricos lesados pela isquemia não apresentaram sinais imunohistoquímicos de atividade de transcrição do DNA. À microscopia eletrônica, o citoplasma neuronal já revelava sinais degenerativos apenas 1 semana após o processo isquêmico: retículo endoplasmático distendido e mitocôndrias edemaciadas com cristas fragmentadas. As fibras nervosas também mostravam destruição mitocondrial e mudanças degenerativas nos sítios pós-sinápticos. Os resultados sugerem que o processo isquêmico intestinal provoca morte celular tardia.

Baseados no fato de que o óxido nítrico participa na regulação das contrações da musculatura lisa intestinal via neurônios não-adrenérgicos não-colinérgicos (ALEMAYEHU et al. 1994), TAKAHASHI et al. (2001) realizaram um estudo para investigação das alterações da motilidade intestinal em ratos, implantando microtransdutores na serosa do duodeno e jejuno e observando os efeitos de processo de isquemia e reperfusão intestinal a curto prazo, em animais com e sem pré-tratamento com NG-nitro-L-arginina metil Ester (L-NAME), um inibidor da enzima óxido nítrico sintetase. Estes autores observaram alterações na motilidade intestinal durante e após a isquemia intestinal, as quais não ocorreram nos animais que receberam L-NAME.

Enquanto os efeitos da isquemia intestinal transitória sobre a mucosa têm sido bem investigados, menos se sabe sobre seus efeitos na função motora intestinal. HAKGÜDER et al. (2002) realizaram investigação da motilidade e microcirculação intestinal através de estudo experimental desenvolvido em ratos Wistar. Assim distribuíram os animais em quatro grupos: 1- Controle; 2- Grupo Sham; 3- Animais submetidos à isquemia da artéria mesentérica superior por 10 minutos; e 4- Animais submetidos à isquemia da artéria mesentérica superior por 10 minutos com pré-tratamento com alopurinol. O tempo de trânsito intestinal foi aferido através de exames radiológicos seriados obtidos com Raios-X após injeção intragástrica de sulfato de Bário. A microcirculação muscular intestinal foi avaliada determinando-se o número de microvasos perfundidos com carbono marcado. Assim, ficou demonstrado que o processo de isquemia e reperfusão intestinal prolonga o tempo de trânsito intestinal e diminui a microcirculação intestinal significativamente ($P < 0.01$). O pré-tratamento com alopurinol evitou a alteração do tempo de trânsito intestinal e manteve o número de microvasos perfundidos com carbono marcado semelhante ao dos animais do grupo Sham. Concluindo, os efeitos de processo de isquemia-reperfusão após clampeamento da artéria mesentérica superior por 10 minutos sobre a motilidade intestinal podem ser quase neutralizados por pré-tratamento com alopurinol, que atuaria como droga inibidora de radicais superóxidos.

Os efeitos da enterocolite necrosante sobre o sistema nervoso entérico foram estudados por WEDEL et al. (1998) através de procedimentos imuno-histoquímicos utilizando anticorpos para proteínas neuronais e gliais. Assim, fragmentos de íleo e cólon

afetados por enterocolite necrosante na fase aguda foram ressecados e seus plexos ganglionares mioentéricos examinados. Esses estudos revelaram que ocorria uma grande redução das células gliais concomitante com a gradual deterioração das células nervosas, ambos predominando na face antimesentérica da circunferência intestinal, onde as lesões isquêmicas tendem a aparecer primeiro. Os efeitos deletérios mais intensos foram observados nos plexos submucosos internos, dependentes da profundidade da lesão da mucosa. Os plexos destruídos apareceram como “cestos vazios”. Levando-se em conta a anatomia do suprimento vascular intestinal, a topografia característica das lesões neuropatológicas encontradas oferece suporte para investigações de eventos isquêmicos dentro de uma gama de diferentes fatores patogênicos que podem culminar com enterocolite necrosante. As alterações dos plexos mioentéricos demonstradas pelos autores, e seu potencial efeito adverso sobre a motilidade intestinal e interações neuroimunológicas, contribuem para a complexa patogênese da enterocolite necrosante.

Observações obtidas na prática clínica têm confirmado a presença de alterações nos plexos intestinais de crianças que receberam estomias durante o tratamento de um episódio de enterocolite necrosante. No entanto, os dados da literatura não têm sido suficientes para elucidar a importância clínica dessas alterações.

O presente estudo visa investigar as alterações histológicas que ocorrem a curto e médio prazo em animais submetidos a processo de isquemia e reperfusão intestinal, correlacionando-as com eventuais alterações do trânsito intestinal e suas repercussões no seu desenvolvimento pôndero-estatural.

2 - OBJETIVOS

O presente estudo visa:

1. Estudar o efeito tardio da isquemia intestinal sobre os aspectos histológicos dos plexos mioentéricos em ratos submetidos a isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior.
2. Estudar o efeito precoce e tardio da isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior no trânsito intestinal de ratos jovens e sua repercussão no desenvolvimento ponderal dos animais.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - ESCOLHA DO MODELO EXPERIMENTAL

A escolha de ratos Wistar para a realização deste estudo teve por objetivos:

- Facilitar a obtenção de animais logo após o desmame com pesos corporais parecidos.
- Facilitar o procedimento anestésico e controle durante o transoperatório.
- Permitir a observação dos animais por período de até 21 dias no período pós-operatório, em virtude da sua resistência à agressão cirúrgica e poder mantê-los isolados em gaiolas metabólicas.

3.2 - COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS E CRONOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS

Foram utilizados 66 ratos Wistar machos, com 20 dias de vida (logo após o desmame), com peso variando entre 46,2 e 114,9 g (média = 75,6g).

Os animais nasceram no Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas, onde permaneceram até o desmame, no 20º dia de vida. Em seguida, foram transferidos ao Biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Campinas, onde foram mantidos em gaiolas metabólicas durante 4 dias, para ambientalização.

Os animais que sobreviveram até o 21º dia pós-operatório foram submetidos aos seguintes procedimentos:

- **GRUPO CONTROLE:** Constituído por animais submetidos à pesagem no dia inicial e mantidos em gaiolas metabólicas para controle de peso corporal e fecal de 24 horas nos 3º, 7º, 14º e 21º dias após o início do experimento.
- **GRUPO SHAM:** Constituído por animais submetidos à pesagem, anestesia geral, laparotomia e manuseio da artéria mesentérica superior, e fechamento da cavidade abdominal após 45 minutos. Depois disso, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas para controle de peso corporal e fecal de 24 horas nos 3º, 7º, 14º e 21º dias pós-operatórios.

- **GRUPO ISQUEMIA 30 MINUTOS:** Constituído por animais submetidos à pesagem, anestesia geral, laparotomia e clampeamento da artéria mesentérica superior durante 30 minutos, e fechamento da cavidade abdominal após esse procedimento. Depois disso, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas para controle de peso corporal e fecal de 24 horas nos 3º, 7º, 14º e 21º dias pós-operatórios.
- **GRUPO ISQUEMIA 45 MINUTOS:** Constituído por animais submetidos à pesagem, anestesia geral, laparotomia e clampeamento da artéria mesentérica superior durante 45 minutos, e fechamento da cavidade abdominal após esse procedimento. Depois disso, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas para controle de peso corporal e fecal de 24 horas nos 3º, 7º, 14º e 21º dias pós-operatórios.
- **GRUPO ISQUEMIA 60 MINUTOS:** Constituído por animais submetidos à pesagem, anestesia geral, laparotomia e clampeamento da artéria mesentérica superior durante 60 minutos, e fechamento da cavidade abdominal após esse procedimento. Depois disso, o animal sobrevivente foi mantido em gaiola metabólica para controle de peso corporal e fecal de 24 horas nos 3º, 7º, 14º e 21º dias pós-operatórios.

Dos animais sobreviventes foram formados quatro grupos, controle, sham, isquemia 30 minutos e isquemia 45 minutos, com oito animais cada ($n = 8$), tendo-se desconsiderado, para efeito de análise estatística o grupo de isquemia 60 minutos, do qual apenas um animal dentre 26 submetidos à cirurgia sobreviveu.

3.3 - PADRONIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

3.3.1 - Clampeamento da artéria mesentérica superior

Pesagem e identificação do animal (marcação nas orelhas), seguidas de aplicação intraperitoneal de anestésico. As drogas utilizadas foram Xilasina (0,1 mg/Kg) e Quetamina (7.5 mg/Kg) segundo FLECKNELL (1987), que foram complementadas com gotas na cavidade peritoneal quando ocorria superficialização anestésica dos animais.

- a) Imobilização do animal em decúbito dorsal horizontal com abdução dos quatro membros, proporcionando exposição ideal do abdome. Os animais foram mantidos sobre colchão elétrico aquecido a 37° Celsius.
- b) Tricotomia do abdome e antisepsia cutânea, utilizando-se solução alcoólica de polivinil pirrolidona-iodo a 10%, seguidas de colocação de campos estéreis delimitando a região abdominal.
- c) Laparotomia mediana xifo-umbilical por planos.
- d) Afastamento das alças intestinais para identificação e clampeamento (Figura 1) com micro-clampes vasculares da artéria mesentérica superior (durante 30, 45 ou 60 minutos, dependendo do grupo do animal). Durante o tempo de oclusão arterial, as alças intestinais foram reposicionadas e cobertas com gaze, que foi irrigada com soro fisiológico 0.9% morno para evitar ressecamento e maiores perdas hídricas pelo animal.
- e) Decorrido o tempo de oclusão, o micro-clampe foi retirado, observando-se a reperusão intestinal imediata, com algumas áreas sugestivas de sangramento e necrose na luz intestinal (Figura 2).
- f) Sutura do peritônio parietal, planos musculares e aponeurose do músculo reto abdominal com pontos contínuos de polipropileno 4-0. Sutura da pele com pontos contínuos com mesmo fio.
- g) Espera até o despertar do animal e transferência para a gaiola de recuperação anestésica até o dia seguinte, quando os animais foram restituídos às gaiolas metabólicas.
- h) Não foram utilizadas antibioticoprofilaxia ou analgesia pós-operatória.

As gaiolas metabólicas utilizadas ficam em ambiente calmo e fotoperíodos controlados artificialmente (12hs escuro/12hs claro). Além disso, essas gaiolas permitem a oferta de ração e água *ad libitum*, e a coleta de urina e fezes individual dos animais.



Figura 1 - Clampeamento da artéria mesentérica superior.



Figura 2 - Aspecto pós-reperusão intestinal. As setas indicam áreas sugestivas de sangramento e necrose intraluminal.

Os animais foram vistos diariamente, tendo suas gaiolas limpas e renovadas ofertas de água e ração. Foram pesados, e tiveram suas fezes de 24 horas coletadas (deixadas em estufa a 37°C durante 24 horas) e pesadas nos 3º, 7º, 14º e 21º dias pós-operatórios, para monitoramento de forma indireta do trânsito intestinal, como proposto por BUSTORFF-SILVA et al. (1999).

A partir do peso, obteve-se a superfície corporal do animal, utilizando-se a fórmula proposta por WEIHE (1987):

$$\text{Superfície corpórea (cm}^2\text{)} = [9,1 \times \text{peso (g)}]^{0,66}$$

No presente estudo, o método de avaliação do fluxo fecal foi sensibilizado utilizando-se, para fins estatísticos, o peso das fezes normalizado para a superfície corpórea dos animais. Esta normalização foi considerada necessária em vista de o peso inicial dos animais do grupo controle diferir significativamente dos outros grupos.

3.3.2 - Sacrifício dos animais

- a) Pesagem e identificação do animal, canulação de veia caudal e injeção endovenosa de dose letal de Tiopental.
- b) Imobilização do animal em decúbito dorsal horizontal com abdução dos quatro membros, proporcionando exposição ideal do abdome.
- c) Laparotomia mediana xifo-umbilical por planos.
- d) Mobilização das alças intestinais, realizando clampeamento do piloro com pinça Kelly e abertura do íleo terminal junto à válvula íleo-cecal com tesoura. Cateterizado duodeno com abocath 16French, irrigando o intestino com soro fisiológico 0,9%, até limpeza da luz intestinal, que foi então preenchida com formol.

- e) Ligados duodeno com polipropileno 3-0 e íleo com fio de algodão 2-0, para posterior identificação dos cotos. Foi mantida alça levemente distendida com formol para facilitar o manuseio do material durante a fixação e cortes histológicos. Ligadura do meso do delgado com tesoura.
- f) Mantidas alças em frascos com formol durante 24 horas e depois o material foi transferido para solução de álcool 70%.

3.4 - ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

3.4.1 - Macroscopia

Teve por finalidade verificar a presença de áreas de estenose ou de dilatação no segmento intestinal submetido a isquemia.

3.4.2 - Microscopia óptica

Foram realizadas secções transversas seriadas de 5mm, duas do duodeno, duas do jejuno e duas do íleo terminal. Os fragmentos foram progressivamente desidratados com soluções de etanol em concentrações crescentes (70 até 100%), e a seguir incluídos em historesina e cortados com 2 μ m de espessura para confecção de lâminas, que foram coradas com azul de toluidina ou hematoxilina-floxina.

A análise microscópica teve por objetivo avaliar os seguintes parâmetros: presença de infiltrado inflamatório, áreas de necrose e os neurônios dos plexos mioentéricos.

3.4.3 - Métodos Estatísticos

3.4.3.1 - Análise de Variância (ANOVA) com Tukey

A análise de variância, abreviada por ANOVA (“Analysis Of Variance”), é aplicada quando se deseja comparar os diferentes tratamentos de uma pesquisa, baseando-se em cálculos estatísticos da variância. Com base nestes cálculos e na utilização da distribuição “F” de Snedecor, pode-se concluir quando dois ou mais tratamentos diferem significativamente entre si. O uso da análise de variância indica a probabilidade de que a hipótese nula (H_0) seja verdadeira, ou seja, a probabilidade de que nenhuma diferença existe entre quaisquer dos grupos. Se a hipótese H_0 for rejeitada, será o indício de que há diferença devida aos diferentes tratamentos estabelecidos para cada grupo. Essa análise de variância, portanto, informa somente se há ou não diferença estatisticamente significativa entre dois ou mais grupos, mas não indica quais os grupos envolvidos. Para identificar os grupos, deve-se realizar uma comparação entre pares (“pair wise comparison test”), que compara cada grupo com cada um dos outros. O teste utilizado para esse fim neste trabalho foi o teste de Tukey.

3.4.3.2 - Análise de variância bivariada (Two-way ANOVA) para a evolução ponderal

A análise de variância bivariada (Two-way ANOVA), também descrita como análise de variância de dois critérios, fundamenta-se na análise da variância envolvendo dados classificados segundo dois fatores diferentes, determinando como uma resposta é afetada pelas duas diferentes categorias de variáveis.

No presente estudo, o método de avaliação do fluxo fecal foi sensibilizado utilizando-se, para fins estatísticos, o peso das fezes normalizado para a superfície corpórea dos animais. Esta normalização foi considerada necessária em vista de o peso inicial dos animais do grupo controle diferir significativamente dos outros grupos.

4 - RESULTADOS

4.1 - OBSERVAÇÕES REALIZADAS NO PERÍODO PÓS-OPERATÓRIO

O pós-operatório imediato até 16 horas após o procedimento cirúrgico foi o período mais crítico de mortalidade dos animais operados. Assim, do grupo de isquemia de 60 minutos, de 26 ratos operados, 25 morreram (taxa de mortalidade de 96%), enquanto no grupo de isquemia de 45 minutos, 15 animais foram operados e 8 sobreviveram (taxa de mortalidade de 47%). Dentre os 8 animais operados no grupo de isquemia de 30 minutos, a mortalidade foi nula, e no grupo Sham, de 9 animais operados, 1 morreu (taxa de mortalidade de 11%). Foram utilizados 8 animais no grupo Controle que apresentou mortalidade nula.

4.2 - ANÁLISE ANÁTOMO-PATOLÓGICA

4.2.1 - Macroscopia

Apesar de terem sido observadas áreas sugestivas de necrose e sangramento intraluminais logo após o desclampamento da artéria mesentérica superior (Figura 2), não foram observadas alterações macroscópicas significativas, tais como áreas de estenose, dilatação ou fibrose nos grupos de isquemia de 45 e 30 minutos logo após a eutanásia.

4.2.2 - Microscopia óptica

Foram analisadas as secções transversas seriadas de 5mm, duas do duodeno, duas do jejuno e duas do íleo terminal tendo-se observado o mesmo padrão de alterações teciduais nas diferentes porções do intestino delgado num mesmo grupo de animais.

Nas lâminas obtidas a partir dos grupos Controle e Sham foi verificada a estrutura intestinal padrão, constituída pelas seguintes camadas (Figura 3):

- I. Mucosa - na qual se encontram os tecidos epiteliais de revestimento do lúmen, formado por células cilíndricas com bordadura em escova e células caliciformes, e a lâmina própria.
- II. Muscular da mucosa – pouco evidente nos animais estudados.
- III. Submucosa – camada delgada de tecido conjuntivo moderadamente denso, rico em vasos sangüíneos e linfáticos. Nessa camada encontram-se os plexos nervosos de Meissner.
- IV. Muscular - camada constituída por musculatura lisa, subdividida em camada circular interna e camada longitudinal externa. Entre essas duas subcamadas encontram-se os plexos nervosos mioentéricos ou de Auerbach (Figuras 4 e 5).
- V. Serosa – formada por uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo revestida por mesotélio, pouco evidente nas lâminas observadas.

As alterações histológicas mais evidentes observadas nos animais submetidos à isquemia por 30 e 45 minutos concentraram-se em maior ocorrência de infiltrado inflamatório na lâmina própria, progressivamente mais intenso nos animais submetidos a maior tempo de isquemia (figuras 6, 7 e 8). Também foram constatadas alterações citológicas nos neurônios dos plexos mioentéricos, tanto nos de Meissner como nos de Auerbach.

As alterações neuronais consistiram principalmente de progressiva vacuolização citoplasmática, dando impressão de um aumento da relação citoplasma/núcleo (Figura 9). Os contornos nucleares tornam-se mais irregulares nos animais de isquemia de 30 minutos e passam a ser menos nítidos nos animais de isquemia de 45 minutos. O nucléolo, que é bastante evidente nos núcleos dos neurônios dos plexos mioentéricos dos animais dos grupos Controle e Sham, são progressivamente menores ou apresentam-se picnóticos à medida que se eleva o tempo de isquemia (Figuras 10 e 11).

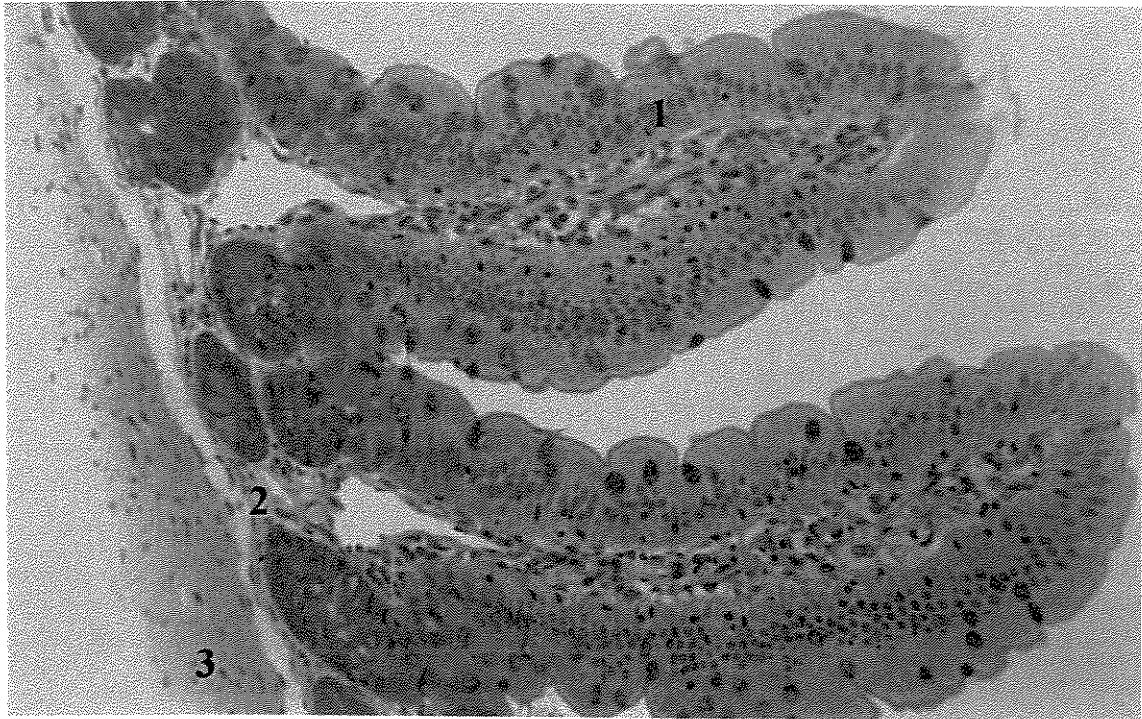


Figura 3 - Fotomicrografia de intestino de animal controle, na qual observam-se as camadas: 1-Mucosa; 2-Submucosa; 3-Muscular. (Hematoxilina-Floxina, 200x).

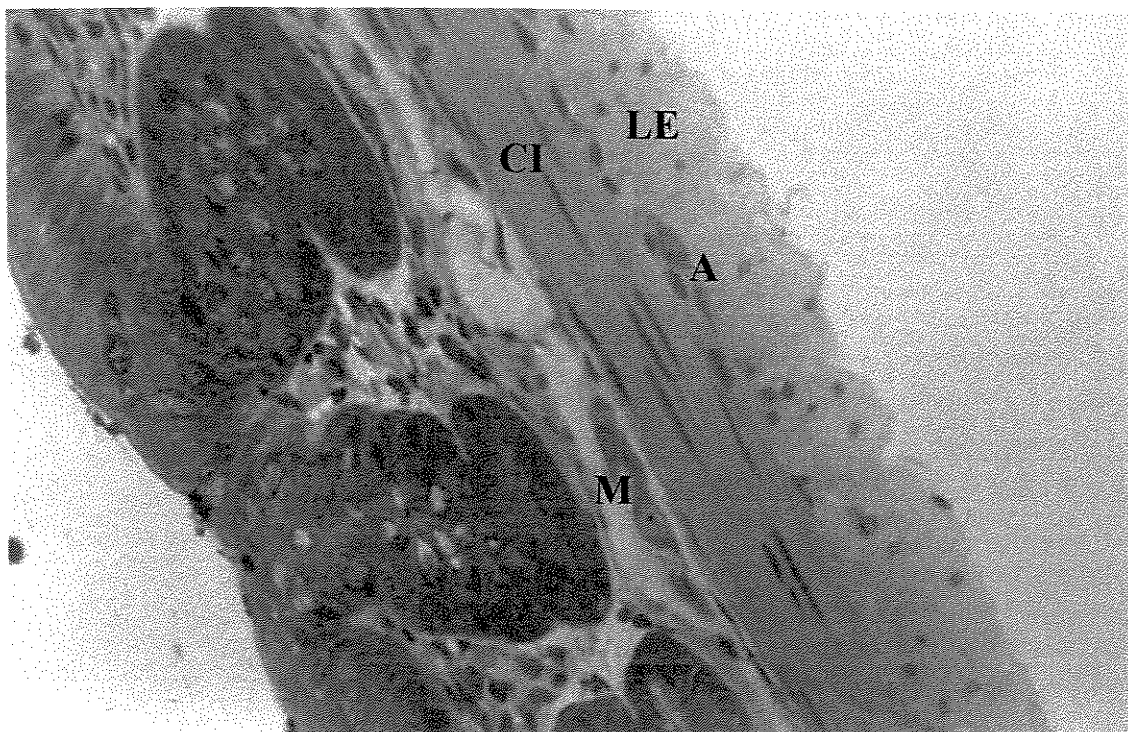


Figura 4 - Fotomicrografia de intestino de animal controle, na qual observam-se as duas camadas musculares, circular interna (CI) e longitudinal externa (LE). Entre as duas localizam-se os plexos mioentéricos de Auerbach (A). Na camada submucosa observam-se os plexos nervosos de Meissner (Hematoxilina-Floxina, 400x).

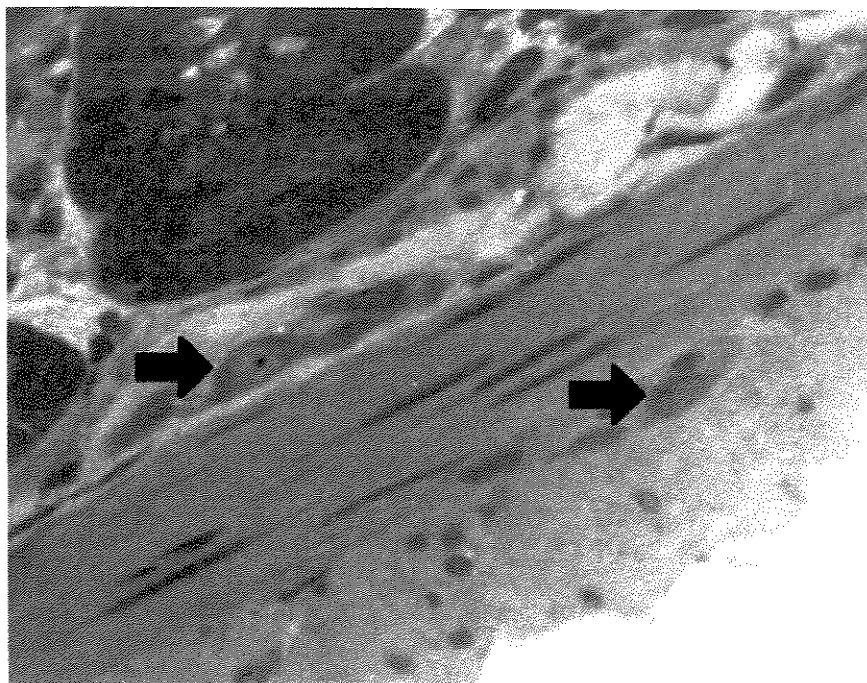


Figura 5 – Detalhe ampliado da Figura 11 para visualização de neurônios de aspecto normal (setas).

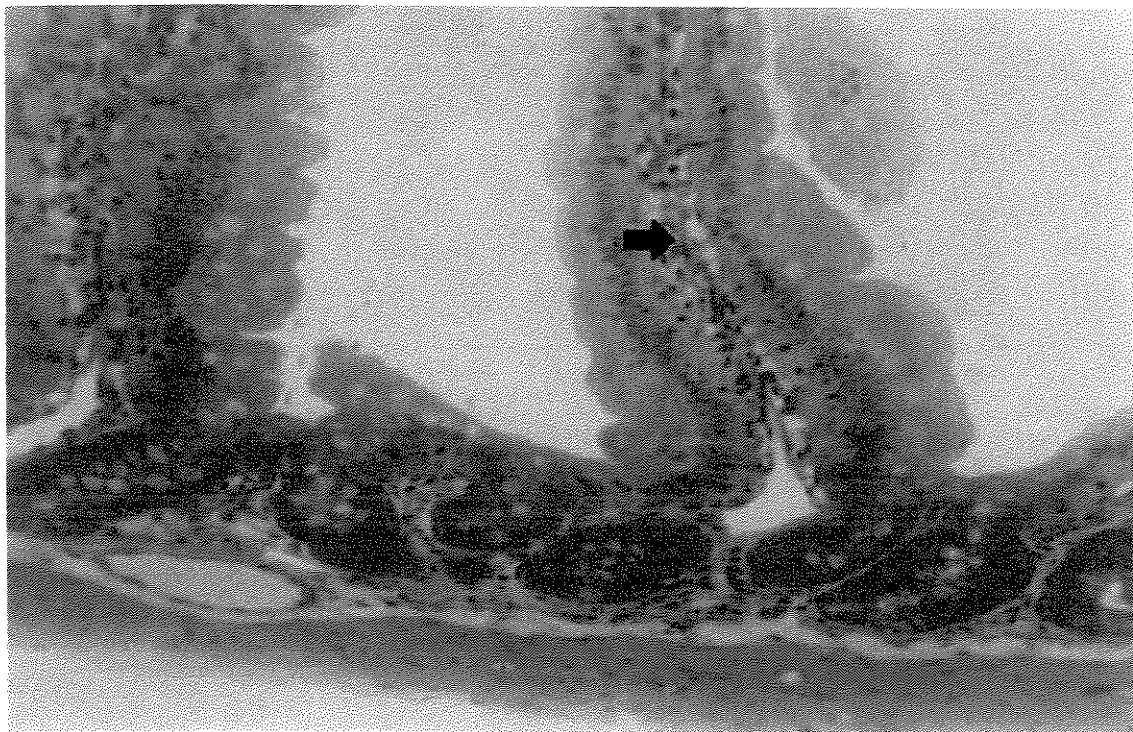


Figura 6 – Fotomicrografia de intestino de animal controle, na qual observa-se a integridade de todas as camadas, com discreto infiltrado inflamatório, dentro dos padrões da normalidade na lâmina própria (seta). (Azul de Toluidina, 200x).



Figura 7 - Fotomicrografia de intestino de animal submetido a 30 minutos de isquemia, na qual observa-se a integridade de todas as camadas, e o maior afluxo de células inflamatórias na lâmina própria (setas). (Azul de Toluidina, 200x).

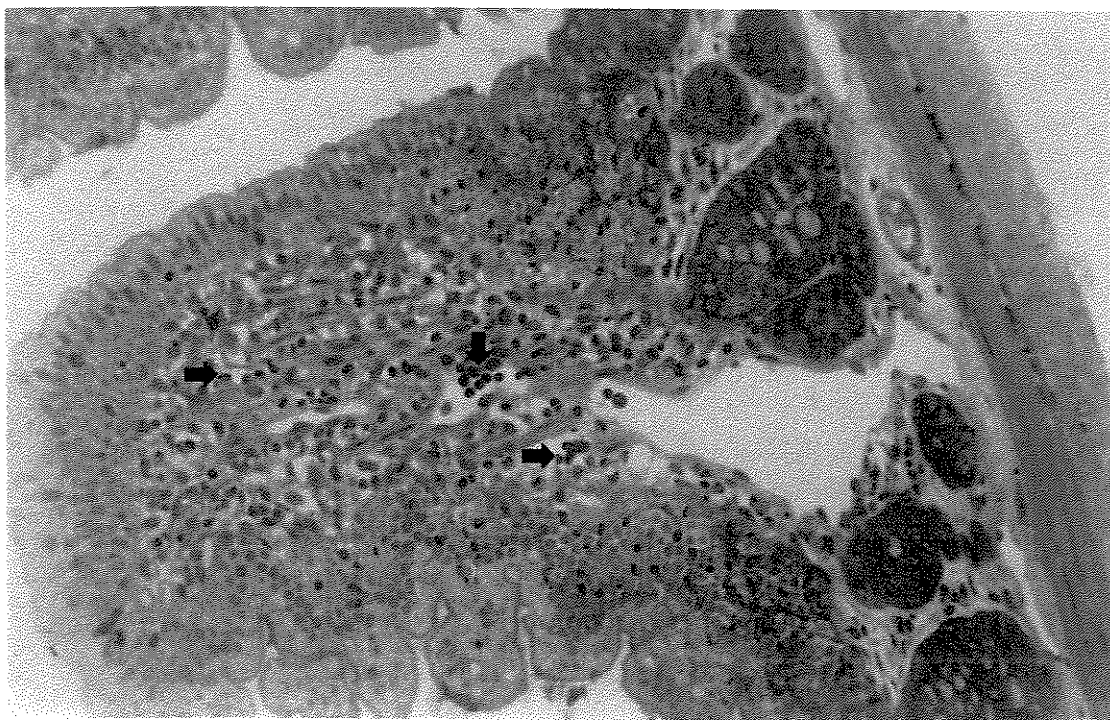


Figura 8 - Fotomicrografia de intestino de animal submetido a 45 minutos de isquemia, na qual nota-se que apesar da integridade de todas as camadas, há infiltrado inflamatório mais intenso na lâmina própria (setas). (Azul de Toluidina, 200x).

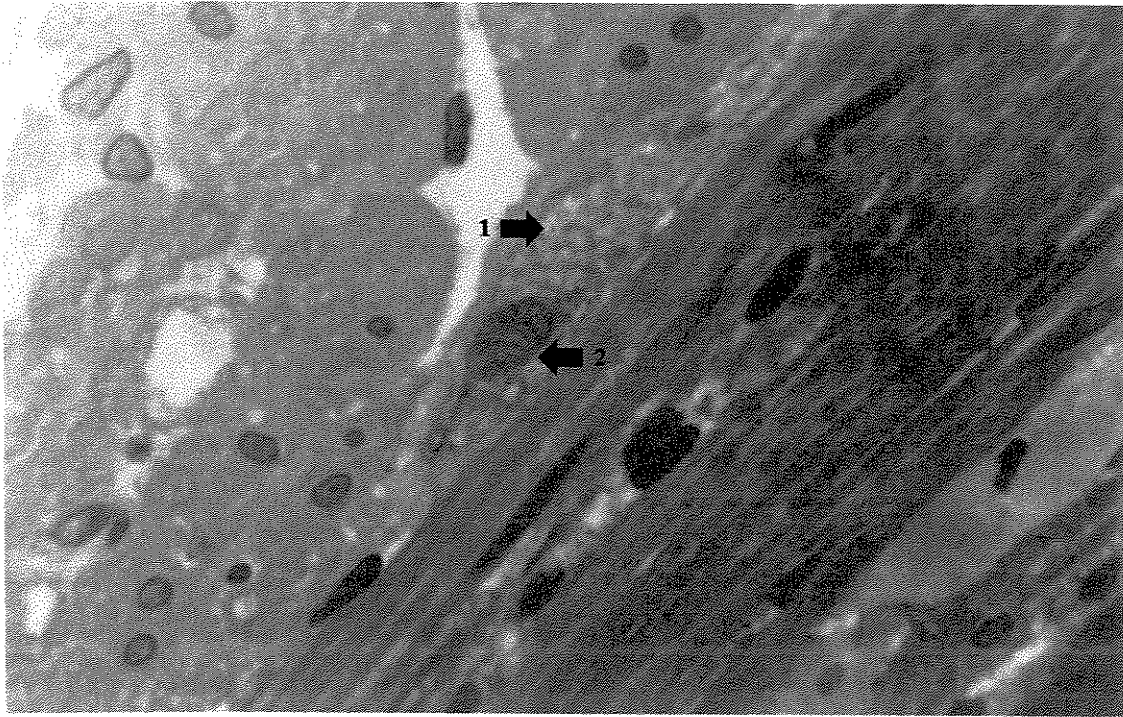


Figura 9 - Fotomicrografia de intestino de animal submetido a 30 minutos de isquemia, detalhando neurônio de plexo mioentérico de Auerbach, cujo citoplasma encontra-se vacuolizado (seta 1), e núcleo de contornos levemente irregulares (seta 2). (Azul de Toluidina, 1000x).

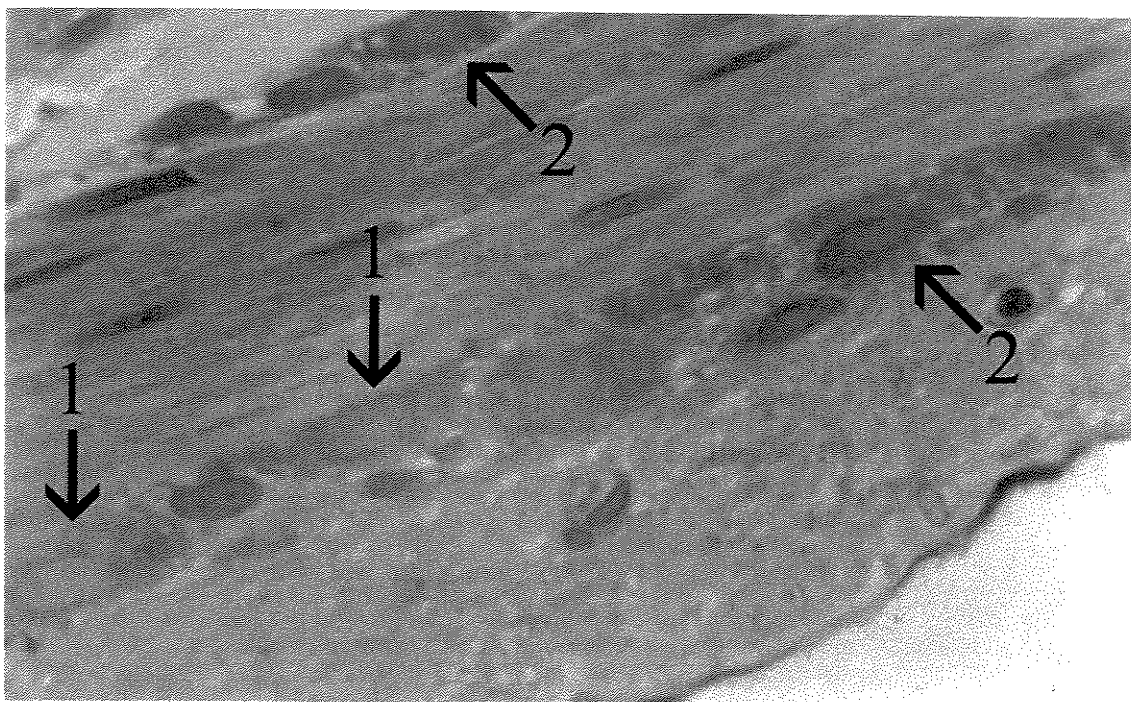


Figura 10 – Neurônios de plexos nervosos de intestino de rato submetido à isquemia mesentérica por 45 minutos, onde constata-se diminuição da basofilia citoplasmática e aumento do volume do pericário, com perda de definição dos limites nucleares (1) e deslocamento do núcleo para a periferia do pericário e vacuolização citoplasmática (2). (HF 1000X).

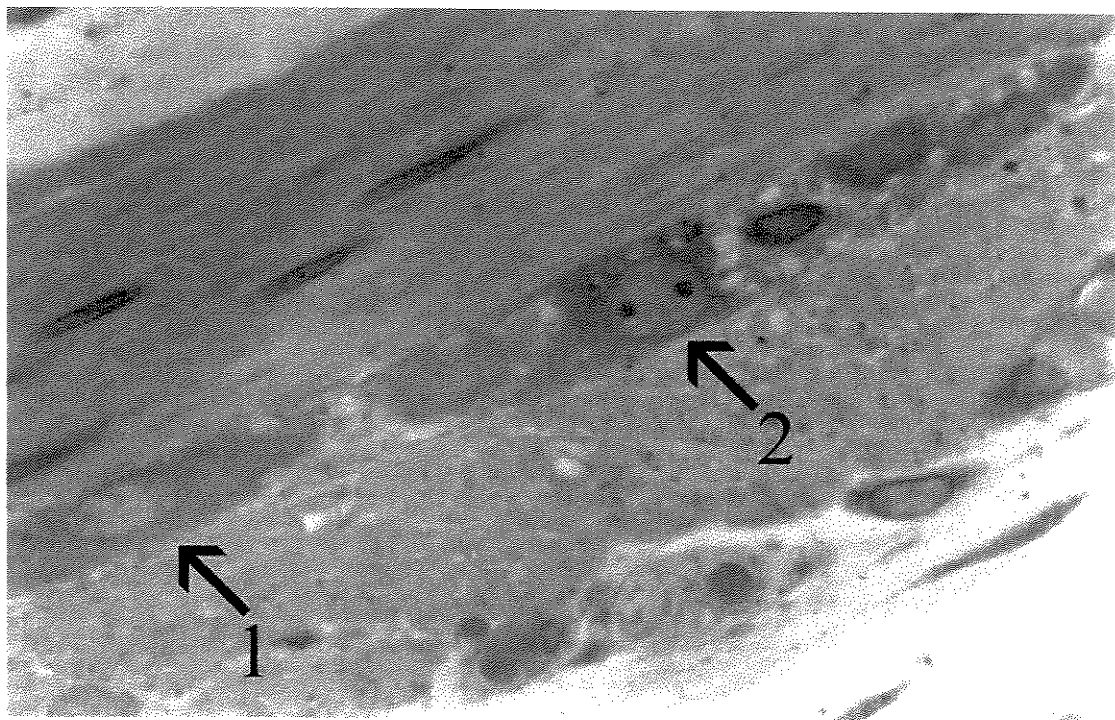


Figura 11 - Neurônios de plexos nervosos de intestino de rato submetido à isquemia mesentérica por 45 minutos, onde observa-se em 1: diminuição da basofilia citoplasmática e aumento do volume do pericário, com perda de definição dos limites nucleares. Em 2: neurônio com intensa basofilia citoplasmática, núcleo de contornos nítidos e presença de dois nucléolos evidentes. (HF 1000X).

4.2 - RESULTADOS FUNCIONAIS

4.2.1 - Evolução ponderal

A evolução ponderal pós-operatória dos diferentes grupos de animais pode ser observada nos gráficos representados na Figura 12, nos quais nota-se que o grupo controle apresentou maior ganho ponderal no período entre os dias 0 e 7, quando comparado a todos os demais grupos. Nos demais períodos, a evolução ponderal foi praticamente a mesma em todos os grupos.

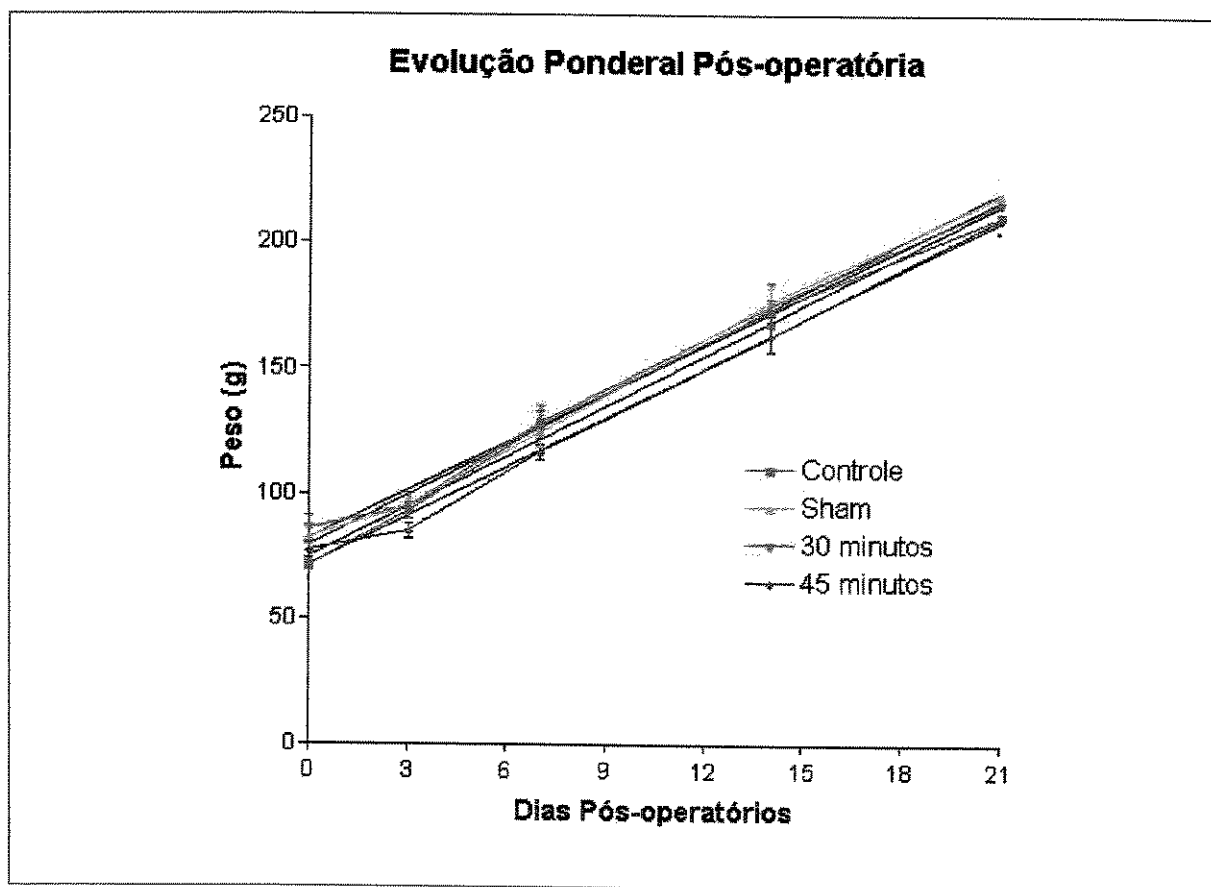


Figura 12 – Gráfico da evolução ponderal pós-operatória dos diferentes grupos em relação ao período de observação.

4.2.2 - Trânsito intestinal

Para a avaliação do trânsito intestinal realizou-se a normalização dos resultados do fluxo fecal para a superfície corporal e a partir da relação entre o peso das fezes colhidas durante 24 horas e a superfície corporal dos respectivos animais nos 3º, 7º, 14º e 21º dias pós-operatórios, correspondentes aos grupos Controle, Sham, Isquemia de 30 minutos e Isquemia de 45 minutos, foram obtidos os gráficos apresentados na Figura 13.

Como observado na Figura 13A, os animais do grupo controle apresentam uma redução significativa do trânsito intestinal no PO14 em relação ao PO3, mas no PO21 observa-se uma recuperação do mesmo. Na Figura 13D, observa-se entre os animais do grupo de isquemia de 45 minutos que houve uma queda progressiva do fluxo fecal nos PO14 e PO21, apresentando-se neste diferença estatisticamente significativa em relação ao PO3 e PO7.

Trânsito Intestinal

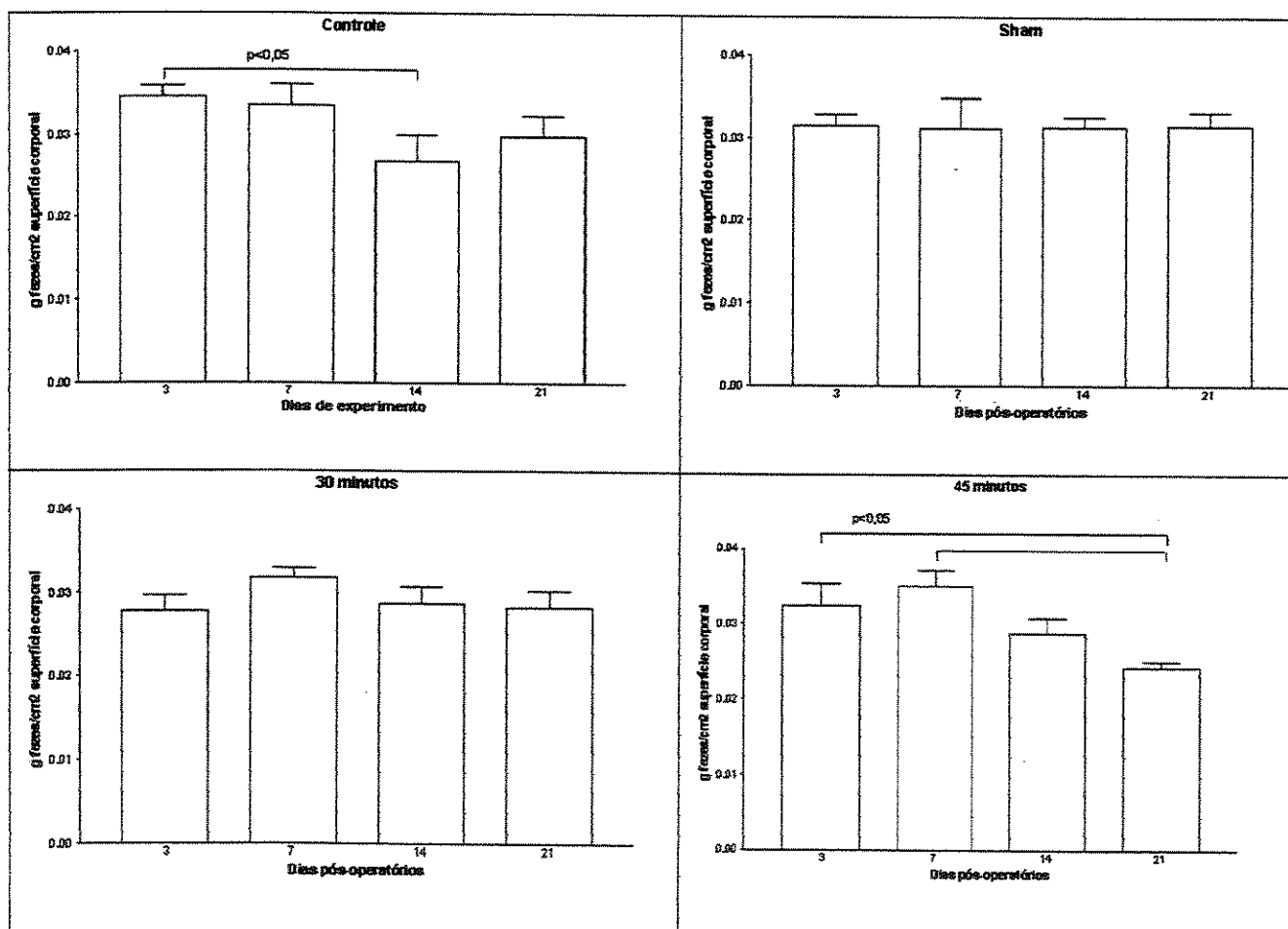


Figura 13 - Gráficos da evolução do trânsito intestinal no 3º, 7º, 14º e 21º dias pós-operatórios.

5 - DISCUSSÃO

Segundo VEJCHAPIPAT et al.(2000), a lesão intestinal causada por processo de isquemia e reperfusão é associada com uma das mais sérias complicações em cirurgia pediátrica, pois é um dos principais fatores envolvidos na gravidade de afecções como enterocolite necrosante, volvo intestinal, intussuscepção e doença inflamatória intestinal. Tais pesquisadores referem que a lesão de reperfusão ocorre após um período variável de isquemia intestinal e exacerba o dano tecidual causado pela hipóxia.

Tal afirmativa pode justificar a elevada taxa de mortalidade observada entre os animais submetidos a 60 e 45 minutos de isquemia mesentérica (96% e 47%, respectivamente). Esses animais foram a óbito nas primeiras horas após o desclameamento da artéria mesentérica superior, e isso provavelmente ocorreu devido à liberação de radicais livres e translocação bacteriana (DEITCH et al., 1990; HEBRA et al., 1994 e SBRAGIA-NETO, 1996). A taxa de mortalidade observada no grupo Sham (11%) deve-se, provavelmente, ao estresse cirúrgico-anestésico a que foram submetidos os animais.

Devido à alta mortalidade observada no grupo de animais submetidos a 60 minutos de clameamento, foram utilizados para análise histológica e de trânsito intestinal apenas os animais submetidos a 30 e 45 minutos de isquemia.

A observação macroscópica das alças revelou, logo após a reperfusão, a presença, na luz intestinal, de áreas sugestivas de hemorragia intraluminal. Em nenhum dos animais ocorreram lesões envolvendo a serosa. Nos animais sobreviventes, avaliados no 21º dia pós-isquemia não foram observadas alterações macroscópicas nas alças intestinais, as quais apresentavam um aspecto normal. Estes resultados diferem das observações de PIAO et al. (1999), os quais relataram a presença de estenose de alças de delgado em ratos observados 4 semanas após isquemia intestinal. No entanto, estes autores utilizaram um tempo de isquemia muito mais prolongado (4 horas), envolvendo segmentos intestinais menos extensos.

Apesar do aspecto aparentemente normal das alças intestinais, o exame microscópico revelou lesões neuronais significativas, tanto nos animais submetidos à isquemia de 30 minutos, como nos de 45 minutos de isquemia. O processo de vacuolização citoplasmática e a perda da definição dos limites nucleares, com a diminuição dos nucléolos são indicadores precisos do processo de degeneração neuronal. Embora alterações

semelhantes já tenham sido descritas por PIAO et al. (1999), os animais utilizados naquele estudo foram submetidos a tempos de isquemia mais prolongados e apresentavam alterações macroscópicas das alças intestinais. WEDEL et al. (1998), utilizando técnica de montagem imunohistoquímica, demonstraram a presença de alterações do sistema nervoso entérico em segmentos intestinais retirados de crianças em fase aguda de enterocolite necrosante.

JANIK et al. (1981) avaliaram os aspectos histológicos das alças em recém-nascidos que evoluíram com estenose após enterocolite necrosante e, embora estes autores descrevam presença de intensa fibrose na submucosa das áreas acometidas, não fazem menção a alterações dos plexos mioentéricos. Nos animais do presente estudo, foi observado infiltrado inflamatório mais intenso na submucosa em relação aos animais controle, mas sem áreas sugestivas de fibrose, sugerindo uma lesão mais leve. Assim, aparentemente, o presente trabalho é o primeiro que descreve alterações tardias dos plexos mioentéricos na ausência de lesões intestinais macroscópicas. Este achado se reveste de importância clínica, na medida em que indica que, alças intestinais que passaram por um processo de isquemia e reperfusão podem apresentar alterações histológicas mesmo com aspecto macroscópico aparentemente normal. Esta observação deve ser levada em conta, por exemplo, quando da programação de fechamento de ileostomias pós-enterocolite necrosante.

O método de avaliação do fluxo fecal para inferir a situação do trânsito intestinal proposto por BUSTORFF-SILVA et al. (1999) mostrou-se de fácil realização, permitindo que o animal pudesse ser monitorizado por semanas sem grandes manipulações. Este modelo foi utilizado previamente como marcador funcional de retorno de trânsito intestinal em animais submetidos a laparotomias, tendo apresentado excelente reprodutibilidade. Os métodos utilizados por outros autores, principalmente “in vitro”, embora avaliem de modo bastante adequado as características fisiológicas da motilidade intestinal, não atentam para as consequências clínicas dessas alterações bioquímicas. A idéia de utilizar o modelo nesta situação teve como objetivo utilizar um parâmetro “clínico” de avaliação da funcionalidade intestinal dos ratos. Este método é barato, não implica na utilização de metodologia complexa ou que envolva radiação e reflete, quando analisado conjuntamente com a evolução ponderal dos animais, o funcionamento global do trato

gastrointestinal dos animais. Além disso, não implica em sacrifício dos animais o que resulta em vantagem adicional, tanto do ponto de vista bioético quanto do ponto de vista econômico. Os resultados mostraram que nos animais submetidos a isquemia intestinal houve uma tendência progressiva a diminuição da produção fecal a partir do 14º dia pós-operatório, mas apenas nos animais submetidos a isquemia de 45 minutos essa diferença foi significativa. No entanto, esta diminuição do volume fecal não se traduziu em alteração da evolução ponderal dos animais, mostrando que, se de alguma forma o trânsito intestinal pode estar alterado, alguns mecanismos compensatórios podem ter sido ativados impedindo uma repercussão maior sobre os aspectos nutricionais do animal. Uma das hipóteses para explicar este fato poderia estar ligada ao achado de algumas células neuronais com citoplasma intensamente basófilo, com núcleos contendo dois nucléolos (Figura 11). Isso normalmente acontece em células com maior atividade metabólica, devido à intensa síntese protéica. Este achado pode indicar que alguns neurônios que sofreram menos com o processo isquêmico podem ter-se tornado “vicariantes”, podendo inclusive vir a inervar um número maior de células musculares (ALBERTS et al. 1989).

Outros autores (HAKGÜDER et al., 2002) realizaram avaliação in-vivo de motilidade utilizando método radiológico, tendo demonstrado lentificação do trânsito intestinal 6hs após a reperfusão da artéria mesentérica superior. Estudos in-vitro demonstraram que 15 minutos de hipóxia são capazes de reduzir a atividade contrátil em 50% (BIELEFELDT & CONKLIN, 1997). HEBRA et al. implantaram eletrodos nas camadas subserosa e intramuscular intestinal de porcos, tendo registrado uma queda na velocidade de propagação dos complexos mio-entéricos de até 60%. UDASSIN et al. (1995) determinaram a motilidade gastro-intestinal após processo de isquemia e reperfusão em ratos introduzindo uma refeição marcada com caloríficos no estômago do animal e medindo a distância percorrida por ela e o tempo decorrido (índice intestinal). Estes trabalhos têm em comum o fato de avaliarem as alterações de motilidade em períodos imediatamente seguintes ao processo de isquemia reperfusão. Nesta fase do processo, as alterações inflamatórias agudas são predominantes e os resultados obtidos por esses autores podem estar apenas confirmando o papel dos mediadores inflamatórios agudos na alteração do trânsito intestinal (BUSTORFF-SILVA et al., 1999; PATIERNO et al., 2004).

No presente trabalho procurou-se avaliar a evolução da motilidade durante a evolução tardia da enterocolite. É verificado na prática clínica que inúmeros pacientes apresentam crises tardias de sub-oclusão intestinal após o tratamento clínico de um episódio de enterocolite necrosante ou então após fechamento de ileostomias, as quais são frequentemente atribuídas a estenose tardia dos segmentos atingidos. No entanto, em algumas crianças nenhuma área de estenose anatômica é encontrada e as crianças recebem um diagnóstico de pseudo-obstrução intestinal (LANGE et al., 2003). É possível que nessas crianças, a degeneração tardia dos plexos mio-entéricos, possa estar associada com outros fatores como por exemplo, ressecções intestinais extensas e presença de aderências intestinais, tornando a sintomatologia mais importante.

Uma outra situação clínica potencialmente complicada refere-se ao achado de alterações nos plexos mio-entéricos em biópsias das bocas de ileostomias realizadas previamente ao seu fechamento. Uma vez que as repercussões clínicas dos achados histológicos não são bem conhecidas, torna-se difícil decidir se a ileostomia deve ser fechada ou mais intestino ressecado. Embora os resultados apresentados no presente trabalho sugiram que as alterações do trânsito intestinal sejam pouco significativas, existem evidências que estas alterações de motilidade são progressivas (fig 13), ocorrendo a partir do 14º dia pós-isquemia e se tornando mais intensas no 21º. É possível que um tempo de observação pós-isquemia mais prolongado revelasse alterações mais profundas e com repercussão “clínica”.

Por outro lado, do ponto de vista ponderal, os resultados do presente estudo confirmam os achados de ABBASI et al. (1984) que não encontraram diferenças significativas na evolução pôndero-estatural entre crianças que tiveram enterocolite, e que foram tratadas clínica ou cirurgicamente com ressecções intestinais, quando comparadas com um grupo de crianças sem enterocolite. Estes autores concluem que, na ausência de síndrome do intestino curto, não existem efeitos a longo prazo sobre o crescimento, estado nutricional e função gastro-intestinal de crianças prematuras que passaram por um episódio de enterocolite no período neonatal.

Desta maneira, embora tenha sido possível demonstrar a presença de alterações neuronais tardias nas alças intestinais submetidas a graus moderados de isquemia-reperfusão, ainda persiste a controvérsia sobre a importância clínica dessas alterações. Novos estudos clínicos e experimentais devem ser realizados para esclarecer estes aspectos do problema.

6 - CONCLUSÃO

À luz dos dados obtidos, podemos concluir que, nas condições experimentais do presente trabalho:

- 1 - Os neurônios dos plexos nervosos intestinais de ratos submetidos à isquemia mesentérica apresentaram, ao 21º dia pós-isquemia, alterações sugestivas de degeneração celular, as quais se encontravam associadas com maior afluxo de infiltrado inflamatório na camada submucosa desses animais.
- 2 - A isquemia intestinal provocada pelo clampeamento da artéria mesentérica superior afetou progressivamente o trânsito intestinal de ratos jovens submetidos a 45 minutos de isquemia mesentérica. Essa alteração foi mais marcada no 21º dia pós-isquemia e não teve repercussão no desenvolvimento ponderal dos animais.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, S.; PEREIRA, G. R.; JOHNSON, L.; STAHL, G. E.; DUARA, S. & WATKINS, J. B.: Long-term assessment of growth, nutritional status, and gastrointestinal function in survivors of necrotizing enterocolitis. **J Pediatr**. 104:550-554. 1984.
- ALBANESE, C. T. & ROWE, M. I. Necrotizing Enterocolitis. In: O'NEILL Jr, J. A.; ROWE, M. A.; GROSFELD, J. L.; FONKALSRUD, E. W. & CORAN, A. G. **Ped Surg**. Missouri: Mosby-Year Book Inc. pp 1297-1320. 1998.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J. D.: **Molecular biology of the cell**. 2ª edição. New York: Garland Publishing Inc. pp 1120-1123. 1989.
- ALEMAYEHU, A.; LOCK, K. R.; COATNEY, R. W & CHOU C.C.: L-NAME, nitric oxide and jejunal motility, blood flow and oxygen uptake in dogs. **Br. J Pharmacol**. 111:205-212. 1994.
- BELL, M. J.; KOSLOSKE, A. M.; BENTON, C. & MARTIN, L. W.: Neonatal enterocolitis in infancy: prevention of perforation. **J Ped Surg**. 8 (5):601-5. 1973.
- BIELEFELDT, K. & CONKLIN, J. L.: Intestinal motility during hypoxia and reoxygenation in vitro. **Dig Dis Sci**. 42(5):878-884. 1997.
- BUSTORFF-SILVA, J. M.; PEREZ, C. A.; ATKINSON, J. B. & RAYBOULD, H. E.: Effects of Intraabdominally Insufflated Carbon Dioxide and Elevated Intraabdominal Pressure on Postoperative Gastrointestinal Transit: an Experimental Study in Mice. **J Ped Surg**, Vol. 34, No 10, pp 1482-1485. 1999.
- DEITCH, E. A.: Bacterial translocation of the gut flora. **J Trauma**. Dec;30(12 Suppl):S184-189. 1990.
- FIORAMONTI, J. & BUENO, L.: Relation between intestinal motility and mesenteric blood flow in the conscious dog. **Am Physiol Soc**, pp. G108-G113. 1984.
- FLECKNELL, P.A. - **Laboratory Animal Anesthesia**, pp. 161/163. Academic Press, Toronto, 1987.
- HAKGÜDER, G.; AKGÜR F.M.; ATES, O.; OLGUNER, M.; AKTUG, T.; OZER, E.: Short-term intestinal ischemia-reperfusion alters intestinal motility that can be preserved by xanthine oxidase inhibition. **Dig Dis Sci**, Vol. 47, N° 6, pp. 1279-1283. 2002.

- HEBRA, A.; BROWN, M. F.; McGEEHIN, K.; BROUSSARD, D. & ROSS III, A. J.: The effects of ischemia and reperfusion on intestinal motility. **J Ped Surg**, 28: 362-366. 1993.
- HEBRA, A.; HONG, J. McGOWAN, K. L.; SMITH, C.; McKERNAN, M. L. & ROSS III, A. J.: Bacterial translocation in mesenteric ischemia-reperfusion injury: is dysfunctional motility the link? **J Ped Surg**, 29: 280-287. 1994.
- JANIK, J. S.; EIN, S. H. & MANCER, K.: Intestinal stricture after necrotizing enterocolitis. **J Ped Surg**, 16:438-443. 1981.
- LADD, A.P.; RESCORLA, F. J.; WEST, K.W., SCHERER, L. R. 3rd; ENGUM, S. A. & GROSFELD, J. L.: Long-term follow-up after bowel resection for necrotizing enterocolitis: factors affecting outcome. **J Ped Surg**, 33(7):967-972. 1998.
- LANGE, A.; FUNCH-JENSEN, P. & SCHIOTZ, P. O.: Gastric dysrhythmia in infants with gastrointestinal diseases measured by epigastric impedance. **Pediatr Gastroenterol Nutr**. 37(3):294-299. 2003.
- O'DONNELL, K. A.; KATY, M. G.; ZHENG, S.; ROSSMAN, J. E. & AZIZKHAN, R. G.: Oxygenated Intraluminal Perfluorocarbon Protects Intestinal Mucosa from Ischemia/Reperfusion Injury. **J Ped Surg**. 32:361-365. 1997.
- PATIERNO, S.; RAYBOULD, H. E. & STERNINI, C.: Abdominal surgir emboces mu opioid receptor endocytosis in enteric neurons of the guinea-pig ileum. **Neuroscience**. 123(1):101-109. 2004.
- PIAO, D.X.; JIANG, H. C.; KOSAKA, M.; SHIBATA, T.; OHTSUKA, A. & MURAKAMI, T.: Cytoplasmic delayed neuronal death in the myenteric plexus of the rat small intestine after ischemia. **Arch. Histol. Cytol.**, Vol. 62, N° 4, pp. 383-392. 1999.
- POKORNY, W. J.; GARCIA-PRATES, J. A. & BARRY, Y. N.: Necrotizing enterocolitis: incidence, operative care, and outcome. **J Ped Surg**, 21:1149-1154. 1986.
- RICKETTS, R. R. & JERLES, M. L.: Neonatal necrotizing enterocolitis: experience with 100 consecutive surgical patients. **World J Surg**. 14(5):600-605. 1990.

SBRAGIA-NETO, L.: Avaliação Histológica e Bioquímica das Lesões de Isquemia e Reperusão. Estudo no Intestino de Ratos Wistar. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 77p. 1996.

TAKAHASHI, A.; TOMOMASA, T.; KANEKO, H.; WATANABE, T.; TABATA, M.; MORIKAWA, H. et al.: Intestinal motility in an In Vivo rat model of intestinal ischemia-reperfusion with special reference to the effects of nitric oxide on the motility changes. **J Ped Gastr Nutr**, 33:283-288. 2001.

UDASSIN, R.; EIMERL, D.; SCHIFFMAN, J.; HASKEL, Y.: Postischemic intestinal motility in rat is inversely correlated to length of ischemia. An in vivo animal model. **Dig Dis Sci**, 40 (5): 1035-1038. 1995.

VANTRAPPEN, G.; JANSSENS, J.; HELLEMANS, J. & GHOOS, Y.: The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine. **J Clin Invest**, 59: 1158-1166. 1977.

VEJCHAPIPAT, P; WILLIAMS, S. R.; SPITZ, L. & PIERRO, A. Intestinal metabolism after ischemia-reperfusion. **J Ped Surg**, 35: 759-764, 2000.

WALSH, M. C.; KLIEGMAN, R. M. & HACK, M.: Severity of necrotizing enterocolitis: influence on outcome at 2 years of age. **Pediatrics**. Nov, 84(5):808-814. 1989.

WEDEL, T.; KRAMMER, H. J.; KUHNEL, W. & SIGGE W.: Alterations of the enteric nervous system in neonatal necrotizing enterocolitis revealed by whole-mount immunohistochemistry. **Pediatr Pathol Lab Med**. 18(1):57-70. 1998.

WEIHE, W. H.: The laboratory rat. In: POOLE, T.B. & ROBINSON, R.: **The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals**. Sexta ed., Longman Scientific & Technical, Inglaterra, pp.309-330. 1987.

YU, V. Y.; JOSEPH, R.; BAJUK, B.; ORGILL, A. & ASTBURY, J.: Necrotizing enterocolitis in very low birthweight infants: a four-year experience. **Aust Paediatr J**. 20(1): 29-33. 1984.

ZIMMERMAN, B. J. & GRANGER, D.N. Reperfusion Injury. **Surg Clin North Am** 72:65-83, 1992.

8 - ANEXO

TABELA DE DADOS

Tratamento	Peso do Rato					Peso das Fezes			
	P0	PO3	PO7	PO14	PO21	PO3	PO7	PO14	PO21
45' I	83,4	88,6	117,0	170,5	211,0	2,1	3,3	3,3	3,5
45' II	82,6	89,7	126,0	176,1	226,0	2,5	3,8	4,1	3,7
45' III	58,3	66,4	101,2	153,4	196,2	3,4	3,7	3,5	3,5
45' IV	85,4	90,8	111,5	149,2	197,0	2,2	2,7	3,6	3,6
45' V	79,4	83,5	118,4	134,2	204,0	3,1	3,4	1,8	3,4
45' VII	75,2	80,2	111,0	162,3	205,0	2,1	2,6	3,6	4,0
45' VIII	73,5	90,0	119,3	170,0	205,0	2,5	3,7	3,9	2,9
45' X	79,7	91,2	128,0	184,8	233,0	2,8	4,7	4,9	3,8
30' I	69,4	74,3	103,0	147,0	178,0	2,4	3,0	3,6	3,0
30' II	94,5	101,3	136,1	176,6	215,0	2,7	3,9	4,3	5,3
30' III	63,9	73,3	101,1	142,0	174,0	2,5	3,2	3,6	4,0
30' IV	99,3	103,5	139,7	192,0	244,0	2,7	3,4	5,1	5,5
30' V	93,4	100,4	133,0	175,4	213,0	1,7	2,8	2,7	4,4
30' VI	77,3	91,0	125,0	168,0	209,4	2,5	3,2	3,1	3,9
30' VII	103,3	118,0	159,0	222,0	272,3	2,4	4,2	4,3	4,9
30' VIII	85,9	100,4	131,0	180,5	219,3	2,2	3,1	3,2	2,8
Sham I	81,6	97,3	132,5	173,5	212,0	2,6	3,3	4,2	5,4
Sham II	83,9	97,0	142,9	204,5	255,0	3,1	4,2	4,4	5,6
Sham III	91,6	99,0	131,4	164,8	207,8	3,0	3,9	4,5	4,6
Sham IV	70,5	81,0	115,1	166,1	177,0	2,6	2,6	3,4	5,0
Sham V	73,1	93,0	132,5	189,4	234,2	3,2	3,7	4,2	4,8
Sham VI	87,2	103,0	87,1	164,4	214,1	2,5	0,9	3,7	3,7
Sham VII	92,4	105,0	139,0	190,9	235,2	2,5	3,1	3,9	4,3
Sham VIII	80,0	86,0	118,0	160,0	217,0	2,3	4,6	4,4	4,4
Controle I	67,8	91,2	107,6	168,3	202,0	3,1	2,5	3,7	4,8
Controle II	72,0	83,0	116,0	157,6	182,0	3,3	4,4	3,7	4,9
Controle III	69,0	85,0	110,0	161,9	198,0	2,4	3,5	3,2	4,6
Controle IV	65,0	83,0	117,0	157,0	197,6	2,9	4,3	5,5	5,0
Controle V	73,7	99,6	139,2	182,0	224,5	3,1	3,5	3,0	3,2
Controle VI	74,7	103,3	148,0	192,3	221,3	3,1	2,9	3,2	3,2
Controle VII	75,4	98,7	140,0	182,5	239,0	2,6	3,3	2,6	3,6
Controle VIII	72,4	102,9	143,1	182,2	219,3	3,1	3,6	2,4	5,3