

ACIMAR GONÇALVES DA CUNHA JÚNIOR

**ESTUDO MORFOLÓGICO DE NOVA MUCOSA
INTESTINAL FORMADA SOBRE RETALHO
HOMÓLOGO DE MATRIZ ACELULAR. MODELO
EXPERIMENTAL EM RATOS.**

BRASÍLIA – DF

2006

ACIMAR GONÇALVES DA CUNHA JÚNIOR

**ESTUDO MORFOLÓGICO DE NOVA MUCOSA
INTESTINAL FORMADA SOBRE RETALHO
HOMÓLOGO DE MATRIZ ACELULAR.
MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS.**

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA À
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA –
FACULDADE DE MEDICINA, PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM CIÊNCIAS MÉDICAS.**

COORDENADOR: Prof. Dr. LEOPOLDO LUIZ DOS SANTOS NETO

ORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. MÉRCIA MARIA BRAGA ROCHA

BRASÍLIA - DF

2006

Gonçalves da Cunha Júnior, Acimar

Estudo morfológico de nova mucosa intestinal formada sobre retalho homólogo de matriz acelular. Modelo experimental em ratos. / Acimar Gonçalves da Cunha Júnior. Brasília: UnB / FM, 2006.

vii, 93 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Mércia Maria Braga Rocha

Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Pós-graduação em Ciências Médicas, 2006.

1. Biomateriais. 2. Bandas de Matriz. 3. Intestino Delgado. 4. Mucosa Intestinal. 5. Ratos *Wistar* – Tese. I. Braga Rocha, Mércia Maria. II. Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Pós-graduação em Ciências Médicas. III. Mestrado.

A meus pais, Acimar e Vera, que possibilitaram a minha jornada rumo à realização do sonho de ser médico.

A meus irmãos, Gleicimar e Welcimar, que colaboraram nessa etapa, sendo mestres e amigos.

A meu sobrinho Caio, presença do amor de Deus em nossas vidas.

A meus amigos, os melhores, Jaisa e Ricardo, companheiros de todas as horas.

Agradecimento Especial

À Prof^a. Dr^a. MÉRCIA MARIA BRAGA ROCHA, pela dedicação e persistência nos ensinamentos do processo de metodologia científica; pelo exemplo de Professora; pela amizade em mais uma etapa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. PAULO TUBINO, pelos ensinamentos de sempre da arte da Cirurgia; pela amizade sincera desde os tempos de aluno.

À Prof^a. Dr^a. ELAINE ALVES, pela admirável didática no ensinamento da metodologia científica e pelo exemplo de Mestre na arte do ensinar.

Aos alunos RAFAEL BUTA e ROBERTA de OLIVEIRA que abdicaram de horas de descanso para prestar inestimável ajuda.

A todos do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, representados na pessoa da Médica Veterinária GABRIELA FARIAS, pelo apoio durante toda a experimentação.

Ao irmão e Mestre WELCIMAR CUNHA, pela disposição no trabalho de laboratório para o processamento de tecidos orgânicos.

À amiga Dr^a. JAISA MOURA, pelo apoio nas diversas etapas do estudo; pelo carinho e estímulo nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. ALBINO MAGALHÃES, pelo interesse e apoio fundamentais na etapa da leitura histológica do material do estudo.

Aos Drs. FERNANDA LORIATO e GUSTAVO TAKANO, pela dedicação no ensinamento do processo de captura de imagens do microscópio.

À Dr^a. MILENE TAKASAGO, pelo apoio na confecção de tabelas e gráficos.

À Dr^a. ANDREA BISCHOFF, pela dedicação e ajuda na confecção do capítulo Abstract.

À Dr^a. MAURÍCIA CAMAROTTA, pelas dicas de mestre que ajudaram muito na formatação do estudo.

Ao Prof. ANDRÉ MOREIRA, mestre em letras, pela dedicação na correção e ensinamento da língua portuguesa.

Ao Dr. SIMÔNIDES BACELAR, pela paciência e disposição na revisão do estudo quanto ao emprego correto dos termos científicos e da língua portuguesa.

À CAROLINA PINGRET, especialista em estatística, que muito ajudou na análise dos resultados do estudo.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	4
3. LITERATURA.....	5
3.1 Neomucosa Intestinal.....	5
3.1.1 Observação do desenvolvimento de nova mucosa.....	5
3.1.2 Neomucosa sobre superfícies serosa e muscular.....	6
3.1.3 Neomucosa sobre materiais protéticos.....	9
3.1.4 Neomucosa sobre outras superfícies.....	10
3.1.5 Fatores que influenciam a formação de neomucosa.....	10
3.2 Biomateriais.....	14
3.3 Engenharia de tecido intestinal.....	17
4. MÉTODOS.....	22
4.1 Amostra.....	22
4.2 Procedimentos.....	23
4.3 Análise Estatística.....	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1 Análise Geral.....	33
5.2 Análise Estatística.....	60
6. DISCUSSÃO.....	66
6.1 Da Amostra.....	66
6.2 Dos Procedimentos.....	67
6.3 Dos Resultados.....	72
7. CONCLUSÃO.....	78
8. REFERÊNCIAS.....	79
NORMAS ADOTADAS.....	91
RESUMO.....	92
ABSTRACT.....	93

1. INTRODUÇÃO

A reconstrução com tecidos nativos é, historicamente, a forma mais utilizada para o restabelecimento do tecido original de um órgão lesado ou mal funcionante. KOBOLD e THAL (1963) foram os pioneiros na demonstração do crescimento de um novo tecido de mucosa duodenal sobre retalho seroso recobrando defeitos duodenais. Em seguida, outros autores avançaram numa série de investigações quanto ao reparo de lesões nos órgãos gastrointestinais, observando reconstrução tecidual com o uso de superfície serosa de órgãos adjacentes (HATAFUKU e THAL, 1964; HIROTA e HARKINS, 1965 e BENDER, SEBOR e ZUIDEMA, 1968).

Outra variedade de estudos experimentais tem focado a engenharia de tecidos na recuperação de órgãos perdidos ou mal funcionantes, com reestruturação celular de, por exemplo, pele (RUSZCZAK, 2003), órgãos geniturinários (SIEVERT e TANAGHO, 2000; PARNIGOTTO, GAMBA, CONCONI e MIDRIO, 2000; WEFER, SEKIDO, SIEVERT, SCHLOTE, NUNES, DAHIYA, JONAS e TANAGHO, 2002 e CAMPODONICO, MICHELAZZI, BENELLI e TONCINI, 2003), parede abdominal (GAMBA, CONCONI, LO PICCOLO, ZARA, SPINAZZI e PARNIGOTTO, 2002; SILVERMAN, LI, HOLTON III, SAWAN e GOLDBERG, 2004 e MA, LI e HU, 2006), sistema cardiovascular (SODIAN, HOERSTRUP, SPERLING, DAEBRITZ, MARTIN, SHOEN, VACANTI e MAYER, 2000) e trato gastrointestinal (CHEN e BEIERLE, 2004 e ROCHA e WHANG, 2004).

O princípio geral de reconstrução tecidual funcional, na engenharia de tecidos, corresponde ao transplante de células sobre materiais biocompatíveis ou à **indução do crescimento celular pelo tecido circundante** sobre esses materiais (KIM, BAEZ e ATALA, 2000). O mesmo princípio é aplicado aos

métodos de recuperação tecidual com o uso de retalhos autólogos ou com materiais protéticos.

Segundo ROCHA e WHANG (2004), algumas variáveis são fundamentais no processo de crescimento do tecido *de novo*: fonte confiável de células, sinais moleculares, propriedades físico-químicas da **superfície de apoio para o crescimento tecidual** e o processo de maturação. Em contraste com os tecidos nativos, os tecidos neoformados, em modelos experimentais, possibilitam a manipulação daquelas variáveis descritas.

Na observação do desenvolvimento de nova mucosa intestinal, aspecto muito importante é a capacidade de regeneração das células intestinais. Contudo, as células não sobreviverão sem um substrato de adesão que permita a interação celular e a presença de fatores de crescimento.

Já foram demonstradas diferentes superfícies de apoio para o desenvolvimento de neomucosa intestinal, como a serosa de colo (BINNINGTON, SIEGEL, KISSANE e TERNBERG, 1973 e GATON, CZERNOBILSKY, KRAUS, MOTOVIC, GLAS, TAUB e MAN, 1980), retalhos musculares pediculados (LILLEMoe, BERRY, HARMON, TAI, WEICHBROD e COGEN, 1982 e ASLAN, BONEVAL, ELPEK, GELEN e MELIKOGLU, 2003) e materiais protéticos (HARMON, WRIGHT, NOEL e COGAN, 1979; WATSON, FRIEDMAN, GRIFFIN, NORTON e MELLICK, 1980 e WATKINS, DENNISON e COLLIN, 1984).

Mais recentemente, os biomateriais têm sido alvo de estudo para o desenvolvimento de novos tecidos (KIM e col., 2000 e ROCHA e WHANG, 2004). Além de fornecerem uma superfície temporária para a orientação do crescimento e organização, também podem prover sinais biológicos necessários para o estabelecimento e a retenção daquele tecido em formação (peptídeos de adesão celular e fatores de crescimento, por exemplo). São classificados em três tipos principais: materiais naturais, **matrizes teciduais acelulares** e polímeros sintéticos.

Matrizes teciduais acelulares são malhas ricas em substâncias de sustentação. Desde que a estrutura protéica (colágeno e elastina) seja bem conservada e normalmente arranjada, as propriedades mecânicas não são significativamente diferentes daquelas de uma matriz extracelular natural, como a submucosa de bexiga (DAHMS, PIECHOTA, DAHIYA, LUE e TANAGHO, 1998) e submucosa de intestino delgado (BADYLAK, 2002).

As matrizes teciduais acelulares tanto podem ser obtidas por processos mecânicos de descamação celular, com remoção das camadas epitelial e de revestimento de um órgão, quanto podem se originar de tratamento detergente-enzimático com remoção de todos os elementos celulares.

A observação do desenvolvimento de tecido intestinal *de novo* sobre biomateriais, especificamente as matrizes acelulares, tem sido relatada principalmente com o uso de submucosa de intestino delgado preparada por remoção celular mecânica (CHEN e BADYLAK, 2001; WANG, WATANABE e TOKI, 2003 e WANG, WATANABE, NODA, YOSHIDA, OYAMA e TOKI, 2005). Ainda, os estudos citados utilizam segmentos intestinais isolados para a interposição do retalho de matriz acelular.

No presente estudo, aplica-se modelo de obtenção da matriz tecidual acelular com base no tratamento detergente-enzimático do intestino delgado de rato e utiliza-se a matriz obtida como superfície de apoio para o desenvolvimento de nova mucosa na continuidade do trânsito intestinal do animal.

2. OBJETIVO

Analisar a morfologia de uma nova mucosa de intestino delgado, formada sobre retalho de matriz tecidual acelular, aposto em segmento intestinal íntegro de ratos.

3. LITERATURA

3.1 – NEOMUCOSA INTESTINAL

3.1.1 – Observação do desenvolvimento de nova mucosa

A necessidade de reparo de lesões intestinais, principalmente as traumáticas, propiciou o desenvolvimento de diferentes técnicas operatórias. O fechamento primário de um grande defeito, 50% ou mais da circunferência da alça intestinal, pode apresentar estenose da luz do intestino ou resultar em sutura sob tensão com conseqüente deiscência. Desenvolveram-se, então, técnicas de reparo utilizando-se as paredes íntegras de órgãos adjacentes ao defeito primário. Assim é que o reparo com superfícies alheias aos segmentos intestinais lesados favoreceu a observação do desenvolvimento de tecido original naquelas superfícies.

KOBOLD e THAL (1963) relataram o reparo de lesões traumáticas do duodeno de cães com serosa jejunal. Fizeram uma abertura na parede antimesentérica do duodeno e utilizaram alça jejunal para cobrir o defeito. Em oito semanas, toda a serosa do jejuno estava coberta por epitélio duodenal semelhante ao duodeno adjacente normal.

Com o objetivo de comparar diferentes técnicas no tratamento das lesões de continuidade do duodeno, ASTARCIOGLU, KOÇDOR, SÖKMEN, KARADEMIR, ÖZER e BORA (2001) observaram que tanto a duodenojejunostomia em “Y” de Roux, quanto o reparo com alça jejunal ou quanto o uso de retalhos de politetrafluoretileno (PTFE) foram superiores à sutura primária do duodeno, em termos de sobrevivência. Descreveram ainda o crescimento de neomucosa sobre a parede serosa do jejuno, começando pelas

margens, com duas semanas de observação; após seis semanas, a superfície serosa estava completamente preenchida por neomucosa duodenal. Também houve crescimento de nova mucosa duodenal sobre a superfície de PTFE, consistindo em epitélio colunar com formação de vilosidades, nos ratos vivos 16 semanas após a operação.

Com o intuito de aplicar a técnica de tamponamento seroso na junção esofagogástrica nos casos de ruptura espontânea do esôfago, HATAFUKU e THAL (1964) e THAL, HATAFUKU e KURTZMAN (1965) relataram rápida cicatrização esofágica, com desenvolvimento de epitélio escamoso em um dos lados do retalho, bem como desenvolvimento de epitélio colunar gástrico no outro lado.

Em 1968, CYWES investigou técnicas do uso de retalhos para cobrir defeitos intestinais ou para alargar a circunferência da cárdia nos casos de acalasia, observando expansão de superfície mucosa.

No Brasil, MENDELSSONH, MAGALHÃES e GOLDENBERG (1998), utilizando a mesma técnica de tamponamento seroso da junção esofagogástrica descrita por THAL e col. (1965), em cães, observaram a cinética do desenvolvimento de nova mucosa sobre a superfície serosa que, precocemente, era substituída por células inflamatórias e formação vascular. No esôfago, o processo de crescimento do novo tecido se completava com duas semanas de período pós-operatório e, no estômago, com quatro semanas.

3.1.2 – Neomucosa sobre superfícies serosa e muscular

A observação experimental do crescimento de nova mucosa sobre outras superfícies, que não o tecido primário, resultou na investigação de técnica potencial de ampliação da superfície intestinal nos casos de intestino curto, caracterizados por decréscimo da área total da mucosa de absorção. Síndrome do intestino curto refere-se à clínica resultante de ressecção intestinal extensa,

seguida de superfície intestinal absorptiva remanescente inadequada e insuficiente para os processos de digestão e absorção de nutrientes, fluidos e eletrólitos. Caracteriza-se, portanto, por mal-absorção e conseqüente mal-nutrição do indivíduo (VANDERHOOF e LANGNAS, 1997).

As primeiras superfícies utilizadas para o crescimento de uma nova mucosa intestinal foram retalhos autólogos de serosa de alças intestinais (peritônio) e retalhos musculares (parede abdominal) ou materiais protéticos como o politetrafluoretileno ou o dacron.

BINNINGTON e col. (1973) recobriram uma incisão feita na parede antimesentérica do jejuno de cães com serosa do colo descendente e observaram desenvolvimento de neomucosa intestinal que cresceu das margens do retalho para o centro. Em seguida, BINNINGTON, SUMMER, LESKER, ALPERS e TERNBERG (1974) mostraram atividade de transporte de aminoácidos na nova mucosa jejunal formada sobre o mesmo modelo experimental descrito anteriormente. Atividades de aminopeptidase, maltase e lactase foram similares na neomucosa quando comparadas ao jejuno normal.

Usando modelo experimental em porcos, BINNINGTON, TUMBLESON e TERNBERG (1975) verificaram que o desenvolvimento de uma nova mucosa jejunal, crescendo sobre retalho seroso de colo, propiciava aumento do ganho ponderal dos animais com intestino curto.

GATON e col. (1980) recobriram defeitos criados no jejuno de 50 cães com a parede do colo adjacente, dividindo os animais em grupos com ou sem ressecção intestinal maciça. Foi observada a formação de uma nova mucosa em quase todos os animais com quatro semanas de período pós-operatório. Estudos histológicos, morfométricos e histoquímicos demonstraram características de mucosa jejunal normal. Relataram ainda estímulo funcional e estrutural mais acentuado na nova mucosa que cresceu nos animais com intestino curto, sugerindo influência dos mecanismos de adaptação do intestino remanescente sobre o desenvolvimento de um novo tecido.

Em coelhos, reparando ferimentos de ceco e colo ascendente com a parede jejunal, FONTES, BANDEIRA, FERREIRA, NIGRO, CAMPOS e SENHORINI JÚNIOR (2000) também observaram o desenvolvimento de mucosa sobre a parede serosa já no sétimo dia pós-operatório.

Com coelhos, LILLEMÖE e col. (1982) utilizaram retalhos de músculo da parede abdominal, com suprimento vascular mantido pela artéria epigástrica inferior, para fechar um defeito criado no íleo terminal. O retalho estava recoberto por neomucosa em quatro semanas e a circunferência da alça intestinal 70% mais larga que o íleo adjacente normal. Em comparação à mucosa ileal normal, a neomucosa apresentou parâmetros eletrofisiológicos semelhantes, resposta à administração de glicose e capacidade de absorção de sais biliares.

Em ratos, SIMÕES, ANDRADE, LOUREIRO, CECCATO, CARDOSO e SANTIS (1995), recobrimo segmento de íleo terminal com retalho axial da parede abdominal, nutrido pela artéria epigástrica superior, demonstraram presença de mucosa normal, com vilosidades maduras, trinta dias depois do experimento.

ASLAN e col. (2003) idealizaram um retalho musculoperitoneal vascularizado pelo omento e anastomosado à parede jejunal de ratos. Observaram significativo aumento da circunferência do segmento intestinal tratado, bem como expansão de nova mucosa jejunal em todos os retalhos, quatro meses depois.

THOMPSON, VANDERHOOF, ANTONSON, NEWLAND e HODGSON (1984), num estudo experimental com coelhos, concluíram que ambos, serosa do colo e parede muscular abdominal, são úteis como suportes para o crescimento de neomucosa funcional. Demonstraram taxa de crescimento da mucosa similar em ambos os grupos, com defeito do íleo terminal recoberto por serosa do colo adjacente ou músculo pediculado da

parede abdominal. Verificaram ainda atividade normal das enzimas da borda em escova para a sucrase, maltase e lactase.

3.1.3 – Neomucosa sobre materiais protéticos

Os estudos iniciais com o uso de materiais protéticos para o crescimento de neomucosa demonstraram insucesso e insatisfação. Em 1979, HARMON e col. usaram dacron para o reparo de defeitos criados no íleo distal de coelhos. O material foi expelido através do lúmen após recuperação da integridade da parede intestinal. WATSON e col. (1980) relataram o uso de tubo de PTFE anastomosado em continuidade com o jejuno e observaram um crescimento mínimo (cinco milímetros) de mucosa intestinal. WATKINS e col. (1984) utilizaram retalhos de dacron para o reparo de 25 cm de lesão de bolsas jejunais isoladas, em cachorros; as próteses foram total ou parcialmente expelidas pelo lúmen intestinal, sem evidência de crescimento de neomucosa, três meses depois da operação.

THOMPSON, KAMPFE, NEWLAND e VANDERHOOF (1986) relataram que materiais protéticos, como o dacron, PTFE e ácido poliglicólico (APG), fornecem suporte para o crescimento de uma mucosa funcional no intestino delgado de coelhos. Contudo, o aumento da área de superfície intestinal foi muito pequeno, uma vez que a neomucosa ocupou apenas 15% do defeito original. Constataram ainda que o uso de tubos protéticos interpostos na continuidade do intestino delgado acarretou grande mortalidade, 80% nas primeiras duas semanas de período pós-operatório, e nenhuma evidência do crescimento de nova mucosa. Chama-se a atenção para este estudo como o primeiro relato do uso de um material sintético absorvível, o APG. THOMPSON e col. (1986), porém, não destacaram nenhuma vantagem com o seu uso.

Numa revisão, CHEN e BEIERLE (2004) afirmaram que materiais não-absorvíveis parecem não ser boa opção para o crescimento tecidual. O tecido regenerado apresenta desarranjo arquitetural e o melhor resultado é uma estrutura tubular estenótica, que pode ser útil somente como superfície de apoio.

3.1.4 – Neomucosa sobre outras superfícies

Outras superfícies foram estudadas para o crescimento de mucosa intestinal e todas apresentaram padrão aceitável de novo tecido formado. EREZ, RODE e CYWES (1992) ressaltaram a capacidade absorviva de fluidos e eletrólitos pelo peritônio parietal, fazendo uma anastomose enteroperitoneal e observando crescimento de neomucosa. BARLAS, GÖKÇORA, EREKUL, DINDAR e YÜCESAN (1992) afirmaram vantagens no uso de membrana amniótica humana para neonatos em risco de perda intestinal, sem arriscar os tecidos próprios. BERMEJO, ALBASINI, EGEA, GARCIA, CARMONA e PARICIO (1993), com o uso de dura-máter liofilizada interposta no intestino de ratas, verificaram crescimento de neomucosa de características semelhantes ao intestino normal, retardo do trânsito intestinal, ligeira melhora da curva ponderal e alta mortalidade com a técnica cirúrgica.

3.1.5 – Fatores que influenciam a formação de neomucosa

Uma série de fatores parece estar relacionada com a formação e o desenvolvimento da nova mucosa. Primeiramente, a natureza da superfície utilizada para o reparo de defeitos no intestino delgado, conforme descrito anteriormente. Outros fatores que podem exercer influência são a localização no trato intestinal do crescimento de nova mucosa, o tamanho do retalho interposto, a presença de conteúdo intraluminal e fatores humorais locais e a concomitância com ressecção intestinal ou não.

Em geral, a grande capacidade de adaptação do íleo e sua habilidade de transportes específicos, refletindo a especialização longitudinal do trato gastrointestinal, parecem permitir uma taxa de formação e crescimento diferenciados para uma nova mucosa sobre retalhos colocados no íleo terminal. THOMPSON, VANDERHOOF, DAVIS e GRANDJEAN (1985) verificaram crescimento de neomucosa mais rápido no íleo do que no jejuno. Recobriram defeitos de cinco centímetros de comprimento na parede antimesentérica do jejuno e íleo de coelhos com a serosa do colo adjacente e, após quatro e oito semanas, constataram uma cobertura mais completa do defeito original do íleo, bem como mucosa funcionalmente melhor. Constataram atividade de transporte de glicose, aminoácidos e sais biliares. Contudo, não houve diferença no tamanho final do defeito ou no aumento do diâmetro do segmento reparado, sugerindo que, com o tempo, o ganho da área de superfície seria similar em ambos os locais, jejuno e íleo.

Considerando que somente pequenos segmentos de intestino delgado podem ser tratados com retalhos, por causa da limitação da quantidade de superfície serosa e aspectos anatômicos que dificultam a técnica, BRAGG e THOMPSON (1986), usando o mesmo modelo experimental em coelhos, apresentaram o resultado de que, recobrando múltiplos pequenos defeitos, dois por cinco centímetros, o crescimento de um novo tecido será mais rápido do que o crescimento tecidual sobre grandes defeitos, com a mesma medida da área de superfície mucosa tratada.

Presume-se que a formação do novo tecido ocorra por proliferação celular nas criptas da mucosa normal adjacente e migração epitelial ao longo do retalho (BRAGG e THOMPSON, 1986). A quantidade de neomucosa obtida pelos retalhos é dependente da taxa de crescimento e contração do defeito inicial que ocorre habitualmente sobre a cicatrização de feridas (BRAGG, THOMPSON, HOLLINGSLED e SAXENA, 1987).

Exposição ao conteúdo intraluminal parece ser tão importante para o crescimento de neomucosa, quanto para a adaptação tecidual do intestino remanescente após ressecção maciça. Em 1986, THOMPSON, TEMPERO, HAUN e VANDERHOOF analisaram a morfologia e a função de nova mucosa sobre superfície serosa do colo, recobrando defeitos no íleo terminal, com a continuidade com o trânsito intestinal e sem esta. Observaram que a neomucosa apresentava melhor desenvolvimento das vilosidades no segmento intestinal íntegro do que no segmento desviado (*bypass*), bem como maior atividade de dissacaridase. Sugeriram a presença de fatores locais, conteúdo intraluminal e fatores humorais, exercendo influência estimulatória sobre o crescimento tecidual.

Outro relato da possível influência do conteúdo intraluminal na regeneração intestinal foi feito por THOMPSON e col. (1985), quando verificaram crescimento diferenciado de neomucosa sobre o jejuno e o íleo. Esse fato pode representar diferenças no conteúdo da luz intestinal, no crescimento intrínseco e na capacidade de adaptação entre aqueles segmentos intestinais.

Com o intuito de verificar a influência de substâncias humorais na regeneração e no crescimento da mucosa intestinal, THOMPSON, SHARP, SAXENA e McCULLAGH (1987) descreveram o efeito da urogastrona, substância estimuladora da síntese de poliaminas, e observaram desenvolvimento mais rápido da nova mucosa bem como menor contração do retalho utilizado, com maior área de superfície medida.

Situação adequada para a avaliação da influência de fatores sistêmicos e locais sobre o crescimento tecidual intestinal encontra-se nos casos de ressecção em grande quantidade do intestino delgado. A enterectomia resulta, usualmente, num período de adaptação do intestino remanescente, com forte estímulo de proliferação celular, observado nas criptas intestinais, assim como aumento na migração celular ao longo das vilosidades.

As alterações estruturais e funcionais no processo de adaptação intestinal, que ocorrem depois de ressecção maciça, têm sido bem demonstradas por diversos autores (CHAVES, SMITH e WILLIAMSON, 1987; IGLESIAS e ZUCOLOTO, 1994; THOMPSON, QUIGLEY e ADRIAN, 1996; THOMPSON e FERGUSON, 2000 e CISLER e BUCHMAN, 2005). Eles concordam quanto à mediação de numerosos fatores na adaptação do intestino remanescente tais como, fatores de crescimento, citocinas, hormônios, secreções gastrointestinais e nutrientes (WAITZBERG, CUKIER, MUCERINO, LOGULO, TORRINHAS e CASTRO, 1999; WONG e WRIGHT, 1999; GU, WU, XIE, JIN e ZHUO, 2001; RIBEIRO, PINTO Jr, MIRANDA, BROMBERG, LOPASSO e IRYA, 2004; WASHIZAWA, GU, GU, OPENO, JONES e ZIEGLER, 2004 e ZEKRI, SRAIRI, BEM AMMAR, JAAFOURA MOHAMED e BEM MANSOUR, 2004).

A aplicação de retalhos ao intestino, concomitantemente à ressecção de mais de 50% dele, resultou no crescimento precoce de neomucosa, quando comparado com a aplicação isolada de retalhos (BRAGG e THOMPSON, 1989). A taxa de produção celular nas criptas e a atividade de ornitina descarboxilase foram significativamente maiores com uma semana de pós-operatório nos animais submetidos à ressecção intestinal. Contudo, os autores concluíram que, embora haja um crescimento mais rápido de neomucosa com a ressecção intestinal, o aumento da área de superfície final não é afetado, por causa da contração do retalho adicionado.

O fato de que o crescimento de neomucosa sobre retalhos não resulta em aumento significativo da área de superfície intestinal, por contração do retalho e relativa escassez de superfície serosa adjacente, levou os autores a iniciarem pesquisas para obter o máximo de aumento da superfície mucosa sobre estruturas tubulares, ganhando, também, aumento no comprimento final do intestino. O tubo intestinal ideal teria funções absorptiva e motora similares àquelas do intestino delgado normal.

THOMPSON (1990) observou que a formação de um túnel do colo adjacente, com molde intraluminal, propicia uma boa opção para o crescimento de nova mucosa, quando comparada a outras técnicas para o mesmo propósito, tais como túneis sem um molde.

Em 1996, utilizando coelhos, SADAY e MIR desenvolveram modelo cirúrgico que combinou alongamento intestinal e crescimento de neomucosa na mesma abordagem. O princípio era uma divisão longitudinal da parede antimesentérica de segmento intestinal isolado e formação de dois tubos intestinais, compartilhando uma parede serosa a qual permitiria a formação de nova mucosa. Houve crescimento completo de neomucosa com oito semanas do período pós-operatório, sem retração dos tubos formados, bem como aumento de duas vezes no comprimento intestinal.

Com uso do mesmo modelo experimental descrito acima, GÜNSAR, VATANSEVER, ARSLAN, SENCAN, MÜFTÜOĞLU, ÖZBILGIN, KAYMAZ e MIR (2004) mostraram expressão imuno-histoquímica de integrina, com grande distribuição na lâmina própria da túnica mucosa formada, que caracterizou maturidade do novo tecido.

3.2 – BIOMATERIAIS

Os biomateriais provêm estrutura tridimensional para o crescimento de um novo tecido. Funcionam como uma matriz extracelular. Idealmente, o biomaterial deve promover interação celular, crescimento e desenvolvimento tecidual. A injeção direta de suspensões celulares sem estrutura de apoio tem difícil controle para a localização e organização das células transplantadas (KIM e col., 2000; CHEN e BEIERLE, 2004). Adicionalmente, as células não sobreviverão sem substrato de adesão. O suporte mecânico dos biomateriais deve ser mantido até que o tecido regenerado tenha integridade mecânica suficiente para a própria manutenção.

Geralmente, o biomaterial selecionado para o suporte de tecido normal completamente reconstruído deve ser degradável e absorvível, sem resultar em processo inflamatório (ROCHA e WHANG, 2004). Tal comportamento deverá evitar o risco de desenvolvimento de resposta do tipo corpo estranho do organismo receptor. BERGSMA, ROZEMA, BOS, ROZENDAAL, JONG, TEPPEMA e JOZIASSE (1995) afirmam que a taxa de degradação e a concentração de produtos degradados nos tecidos circundantes do retalho interposto, formado de ácido polilático, devem estar em níveis toleráveis, para evitar toxicidade.

Outra importante característica que se espera de um biomaterial é aquela que permite alta densidade de células requeridas para a regeneração tecidual, ou seja, uma grande razão entre área de superfície e volume. Segundo KIM e MOONEY (1998), um alto grau de porosidade e tamanhos específicos dos poros promovem crescimento tecidual a partir das células do tecido circundante. Para KIM e col. (2000), quanto menor a densidade, quanto maior o espaço intersticial e quanto mais largo os poros para a infiltração celular, maior a taxa de degradação do biomaterial.

Estudos preliminares mostraram substâncias de adesão celular e fatores de crescimento no microambiente do biomaterial (HYNES, 1992; BARRERA, ZYLSTRA, LANSBURY e LANGER, 1993 e COOK, HRKACH, GAO, JOHNSON, PAJVANI, CANNIZZARO e LANGER, 1997). Esses fatores que promovem a adesão encontram-se presentes no biomaterial ou são incorporados para o controle do comportamento celular.

Três classes de biomateriais têm sido recomendadas para o uso em engenharia de tecidos: materiais naturais (colágeno), matrizes teciduais acelulares (matriz extracelular) e polímeros sintéticos (ácido poliglicólico – APG, ácido polilático – APL e ácido polilático-co-glicólico – APLG). Os materiais naturais e matrizes acelulares têm a vantagem potencial de reconhecimento biológico.

O colágeno é o material natural extraído e purificado obtido de tecidos humano ou animal. É a proteína mais abundante no corpo humano e, quando utilizado em engenharia de tecidos, reconhecidamente menos antigênico, com resposta inflamatória mínima (FURTHMAYR e TIMPL, 1976). Tem sido aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) para aplicações médicas, principalmente na cobertura de feridas e desenvolvimento de pele artificial (PACHENCE, 1996).

O colágeno exibe grande força tênsil e elasticidade, bem como contém seqüências peptídicas (arg-gly-asp, RGD) que permitem interações celulares específicas, incluindo-se fibroblastos (SILVER e PINS, 1992).

A matriz extracelular consiste num complexo tridimensional de proteínas estruturais e funcionais, glicoproteínas e proteoglicanos, indispensável para todos os órgãos e tecidos, sendo suporte natural para a morfogênese, manutenção e reconstrução tecidual após injúria (BADYLAK, 2002). Há reciprocidade dinâmica entre a matriz extracelular e os elementos intracelulares, nucleares e do citoesqueleto (BISSELL, HALL e PARRY, 1982 e BOUDREAU, MYERS e BISSELL, 1995).

A composição e estrutura da matriz extracelular são dependentes da sua localização nos diferentes tecidos e órgãos. O fato é que todas as matrizes provêm suporte estrutural e servem de reservatório para fatores de crescimento e citocinas.

Os polímeros sintéticos, APG, APL e APLG, têm ganhado aplicação médica aprovada pela FDA (KIM e col., 2000); como exemplo, pode-se citar as telas de Vicryl[®] (compostas de APLG) e Dexon[®] (compostas de APG). Os produtos degradados daqueles não são tóxicos, naturalmente metabolizados e normalmente eliminados do organismo na forma de dióxido de carbono e água (FREED, VUNJAK-NOVAKOVIC, BIRON, EAGLES, LESNOY, BARLOW e LANGER, 1994).

A ampla utilização dos biomateriais na engenharia de tecidos possibilitou o desenvolvimento de técnicas especiais, tanto para a reconstrução tecidual em si quanto para o entendimento do complexo mecanismo do crescimento celular, interação com o microambiente e interação intercelular (GRIFFITH e NAUGHTON, 2002).

3.3 – NEOMUCOSA SOBRE BIOMATERIAIS / ENGENHARIA DE TECIDO INTESTINAL

Atualmente, a estratégia fundamental para a engenharia de tecidos se baseia no transplante de células-tronco ou na indução do crescimento de um novo tecido obtido do tecido original que circunda superfícies biodegradáveis, os biomateriais (ROCHA e WHANG, 2004).

Em 1992, EVANS, FLINT, SOMERS, EYDEN e POTTEN descreveram novo método para o isolamento de células epiteliais intestinais. Por processo enzimático, com o uso de dispase e colagenase, os autores obtiveram agregados celulares adquiridos do intestino delgado de ratos com apenas seis dias de vida. Após purificação, aqueles agregados apresentaram estruturas com células epiteliais com integridade da lâmina própria, estruturas que foram designadas organóides intestinais. AVANSINO, CHEN, WOOLMAN, HOAGLAND e STELZNER (2006) definem as unidades organóides epiteliais como sendo agregados de células-tronco e células mesenquimais.

Em seguida, TAIT, FLINT, CAMPBELL e EVANS (1994) inocularam os organóides intestinais no tecido subcutâneo da região dorsal de ratos adultos e, depois de 14 dias do procedimento, observaram desenvolvimento de estruturas semelhantes ao intestino delgado, formadas por uma camada circunferencial de epitélio. A neomucosa ostentou vilosidades e criptas bem formadas e continha todas as linhagens celulares do intestino delgado, isto é, enterócitos, células caliciformes, células de Paneth e células enteroendócrinas.

Apresentaram ainda atividade proliferativa localizada nas criptas, como no intestino delgado pós-natal.

Com o intuito de avaliar o crescimento de neomucosa originada de tecido intestinal desagregado sobre outro sítio que não o tecido subcutâneo, TAIT, EVANS, FLINT e CAMPBELL (1994) reproduziram o mesmo experimento com a inoculação dos organóides intestinais sobre segmento isolado de parede muscular do colo ascendente de ratos sem a mucosa adjacente. Relataram crescimento de neomucosa intestinal, morfológicamente normal, em 76% dos animais utilizados.

A avaliação funcional da neomucosa formada pelo transplante de células-tronco intestinais, sobre sítios ectópicos, revelou atividades enzimáticas da digestão (lactase, sucrase, aminopeptidase e atividade de fosfatase alcalina) e de transporte de glicose, normais (TAIT, PENNY e CAMPBELL, 1995).

Utilizando-se de polímeros sintéticos (APG e APL) como superfícies de apoio para o crescimento de neomucosa, ORGAN, MOONEY, HANSEN, SCHLOO e VACANTI (1992) mostraram que os tubos de polímeros biodegradáveis, semeados por unidades celulares intestinais preparadas de acordo com EVANS e col. (1992), eram recobertos por uma camada de epitélio colunar apresentando unidades celulares dispostas em formação de vilosidades e criptas.

Posteriormente, outros estudos reforçaram o desenvolvimento de neomucosa intestinal sobre polímeros sintéticos implantados no omento de ratos, que mostram integridade da nova mucosa formada (CHOI e VACANTI, 1997; CHOI, RIEGLER, POTHOUKAKIS, KIM, MOONEY, VACANTI e VACANTI, 1998 e KIM, KAIHARA, BENVENUTO, CHOI, KIM, MOONEY, TAYLOR e VACANTI, 1999).

Uma vez que as células epiteliais requerem a presença de células mesenquimais para sua proliferação e sobrevivência *in vitro* (SANDERSON, EZZELL, KEDINGER, ERLANGER, XU, PRINGAULT, LEON-ROBINE,

LOUVARD e WALKER, 1996), no estudo da regeneração tecidual intestinal, faz-se necessária a semeadura de células-tronco sobre superfícies que contenham as propriedades inerentes à interação celular, como as encontradas na matriz extracelular natural.

A matriz extracelular é componente natural, dinâmico e indispensável para a morfogênese, manutenção e reconstrução tecidual após injúria, nos organismos multicelulares (BADYLAK, 2002). As matrizes acelulares, utilizadas como superfície de apoio no desenvolvimento de novo tecido, são ricas em colágeno e gradualmente são degradadas, substituídas e remodeladas por proteínas do tecido mesenquimal extracelular sintetizadas e secretadas por células-tronco transplantadas ou do tecido circunvizinho (KIM e col., 2000). Dentre as inúmeras proteínas relacionadas com a função de adesão, migração e sinalização intracelular, chama-se especial atenção para a fibronectina que parece promover invasão celular em superfícies acelulares e bloquear em superfícies ricamente celularizadas (ARMSTRONG e ARMSTRONG, 2000). Também as integrinas, receptores de moléculas da matriz extracelular, exercem efeito positivo na integração intercelular e desenvolvimento tecidual (YAMADA, PANKOV e CUKIERMAN, 2003).

Com a compreensão da função da matriz extracelular no suporte para o crescimento tecidual, uma variedade de estudos tem descrito a obtenção de matrizes acelulares obtidas de diferentes tecidos como a pele (MIZUNO, TAKEDA e UCHINUMA, 1999; SRIVASTAVA, DeSAGUN, JENNINGS, SETHI, PHUANGSAB, HANUMADASS, REYES e WALTER, 2000; RUSZCZAK, 2003 e CHEN, HO, TSAI e SHEU, 2004), tecido muscular (CONCONI, DE COPPI, BELLINI, ZARA, SABATTI, MARZARO, ZANON, GAMBA, PARNIGOTTO e NUSSDORFER, 2005), tecido cardiovascular (COURTMAN, PEREIRA, KASHEF, McCOMB, LEE e WILSON, 1994), tecido geniturinário (PIECHOTA, GLEASON, DAHMS, DAHIYA, NUNES, LUE e TANAGHO, 1999) e tecido gastrointestinal (BHRANY, BECKSTEAD,

LANG, FARWELL, GIACHELLI e RATNER, 2006). O objetivo é obter superfície de apoio biodegradável e rica em colágeno.

Em 1989, BADYLAK, LANTZ, COFFEY e GEDDES descreveram uma nova técnica para a obtenção da submucosa do intestino delgado, matriz extracelular natural, com remoção mecânica (raspagem) das camadas seromusculares e mucosa do intestino. Outros estudos relataram o uso dessa técnica e aplicação da então matriz acelular formada no crescimento de neomucosa intestinal, tanto em cães quanto em ratos (CHEN e BADYLAK, 2001; WANG e col., 2003; e WANG e col., 2005).

A submucosa de intestino delgado também tem sido utilizada como substrato para engenharia de tecidos em outros sítios, como, por exemplo, reconstrução vascular (SANDUSKY, BADYLAK, MORFF, JOHNSON e LANTZ, 1992 e HILES, BADYLAK, LANTZ, GEDDES KOKINI e MORFF, 1995), ampliação vesical (KROPP, BADYLAK e THOR, 1995 e GRECA, SOUSA FILHO, SILVA, LEONEL, SOCCOL, FERES e LONGHI, 2004) e reconstrução diafragmática (DALLA VECCHIA, ENGUM, KOGON, JENSEN, DAVIS e GROSFELD, 1999).

Diferentes métodos de obtenção da matriz acelular são descritos com base no tratamento detergente-enzimático de um tecido, com remoção química dos componentes celulares, variando a substância enzimática e os sabões utilizados. O resultado final é uma rica rede de colágeno, adequada para o crescimento tecidual.

Na engenharia de tecido intestinal, PARNIGOTTO, MARZARO, ARTUSI, PERRINO e CONCONI (2000) fizeram uso de matriz acelular homóloga, preparada por método detergente-enzimático e obtida da parede gástrica de ratos, para a observação do crescimento de mucosa intestinal num tubo interposto em alça de íleo isolada. HORI, NAKAMURA, MATSUMOTO, KUROKAWA, SATOMI e SHIMIZU (2001) observaram o desenvolvimento

de mucosa do intestino delgado quatro meses depois da interposição do retalho de esponja de colágeno na parede jejunal de cães.

Com o objetivo de observação do crescimento de tecido intestinal e alongamento concomitante, PAHARI, RAMAN, BLOOMENTHAL, COSTA, BRADLEY, BANNER, RASTELLINI e CICALÉSE (2006) descreveram o uso de tubo de *AlloDerm*, matriz acelular derivada da pele humana processada, interposto no jejuno de ratos. Os animais que tiveram o tubo de *AlloDerm* na continuidade do trânsito intestinal, sem a criação de estomas, desenvolveram peritonite e foram descartados; aqueles que tiveram o segmento jejunal isolado permitiram a observação do desenvolvimento intestinal sobre todo o biomaterial com seis meses de período pós-operatório.

Embora a engenharia de tecido intestinal seja um campo de estudo relativamente novo, procura-se o método ideal para a criação de um novo intestino. À medida que se entende a biologia molecular do desenvolvimento tecidual e à medida que se desenvolvem novos biomateriais, mais purificados e menos antigênicos, também se avança no aperfeiçoamento das técnicas operatórias para a introdução desses materiais no organismo vivo.

4. MÉTODOS

4.1 – AMOSTRA

O estudo foi de intervenção experimental, com animais. O protocolo de pesquisa foi submetido à avaliação da Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB), sob o número 4714/2005, sendo aprovado. Desenvolveu-se no laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UnB.

Foram utilizados 28 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), fornecidos pelo Bioagri Laboratórios Ltda., com idades entre 12 e 13 semanas de vida e pesos iniciais entre 300 g e 360 g.

Os animais, durante o experimento, permaneceram alojados no biotério da Faculdade de Medicina da UnB em gaiolas plásticas, forradas com serragem, trocadas em dias alternados. Os animais receberam ração própria para a espécie e água *ad libitum*.

Três animais foram utilizados para a obtenção da matriz acelular, conforme descrito posteriormente. Os outros 25 ratos foram utilizados no experimento, sendo submetidos a procedimento operatório comum a todos. De acordo com o momento da eutanásia, foram distribuídos, aleatoriamente, em três grupos, conforme se indica a seguir.

Grupo 1 – eutanásia com duas semanas do período pós-operatório – 5 animais.

Grupo 2 – eutanásia com quatro semanas do período pós-operatório – 10 animais.

Grupo 3 – eutanásia com oito semanas do período pós-operatório – 10 animais.

Os animais foram considerados controles de si mesmos para a análise dos dados.

4.2 – PROCEDIMENTOS

Para os procedimentos operatórios, todos os animais foram submetidos a jejum pré-operatório de quatro horas. Nas primeiras cinco horas pós-operatórias, foram mantidos aquecidos por calor radiante e receberam água *ad libitum*; depois da sexta hora, iniciou-se a alimentação. Todos os animais foram pesados imediatamente antes do procedimento anestésico-cirúrgico e, posteriormente, uma vez por semana, até o momento da eutanásia.

A anestesia foi realizada pela injeção intramuscular de substância contendo 100 mg/kg de cloridrato de cetamina (ampolas com 50 mg/ml) e 10 mg/kg de cloridrato de xilasina (ampolas com 23 mg/ml).

Os animais foram identificados com perfuradores próprios de cartilagem auricular, após a anestesia para o primeiro procedimento operatório.

A laparotomia e a laparorrafia realizadas em cada animal seguiram os procedimentos básicos da operação:

1. tricotomia da parede anterior do abdome;
2. anti-sepsia com solução de álcool iodado a 2%, com técnica asséptica;
3. abertura longitudinal da parede abdominal, na linha mediana, por planos anatômicos, com quatro centímetros de extensão;
4. realizado o procedimento operatório proposto;
5. síntese da parede abdominal, por planos anatômicos: sutura contínua com pontos festonados do peritônio e aponeurose, com o uso de fio de algodão 000; sutura contínua da pele, usando-se fio de seda 4-0.

Para a eutanásia, os animais foram mantidos em inalação contínua de éter, sob máscara, ainda sob anestesia geral.

4.2.1 – Obtenção da matriz tecidual acelular

Para a formação da matriz acelular, foi utilizado todo o intestino delgado de três ratos. Esses animais foram submetidos ao mesmo procedimento anestésico-operatório descrito anteriormente, com ressecção do jejuno-íleo e eutanásia a seguir.

O intestino delgado ressecado foi aberto na sua parede antimesentérica e lavado com solução salina a 0,9%. Foram obtidos segmentos de três centímetros de comprimento por um centímetro de largura.

Os segmentos de intestino delgado sofreram tratamento detergente-enzimático, de acordo com o proposto por MEEZAN, HJELLE e BRENDEL (1975), conforme ilustra a figura 1. Os retalhos de intestino delgado foram processados em água destilada por duas horas e mantidos em movimento homogêneo constante, com o intuito de se provocar autólise celular; a seguir, foram colocados em suspensão, por uma hora, com o uso de solução de cloreto de sódio a um molar e deoxirribonuclease (DNAase I; Sigma) 2000 unidades para a degradação do ácido deoxirribonucléico (ADN) e para prevenir a aglutinação de componentes nucleares; posteriormente, foram transferidos para outra suspensão, com o uso de deoxicolato de sódio a 4% (Sigma Chemical Co), por duas horas, com o objetivo final de solubilizar as membranas celulares e os componentes intracelulares. Ao final, todos os tecidos foram lavados em água destilada, por três vezes, e estocados, a 4°C, em solução salina fosfatada tamponada, contendo os antibióticos gentamicina e metronidazol.

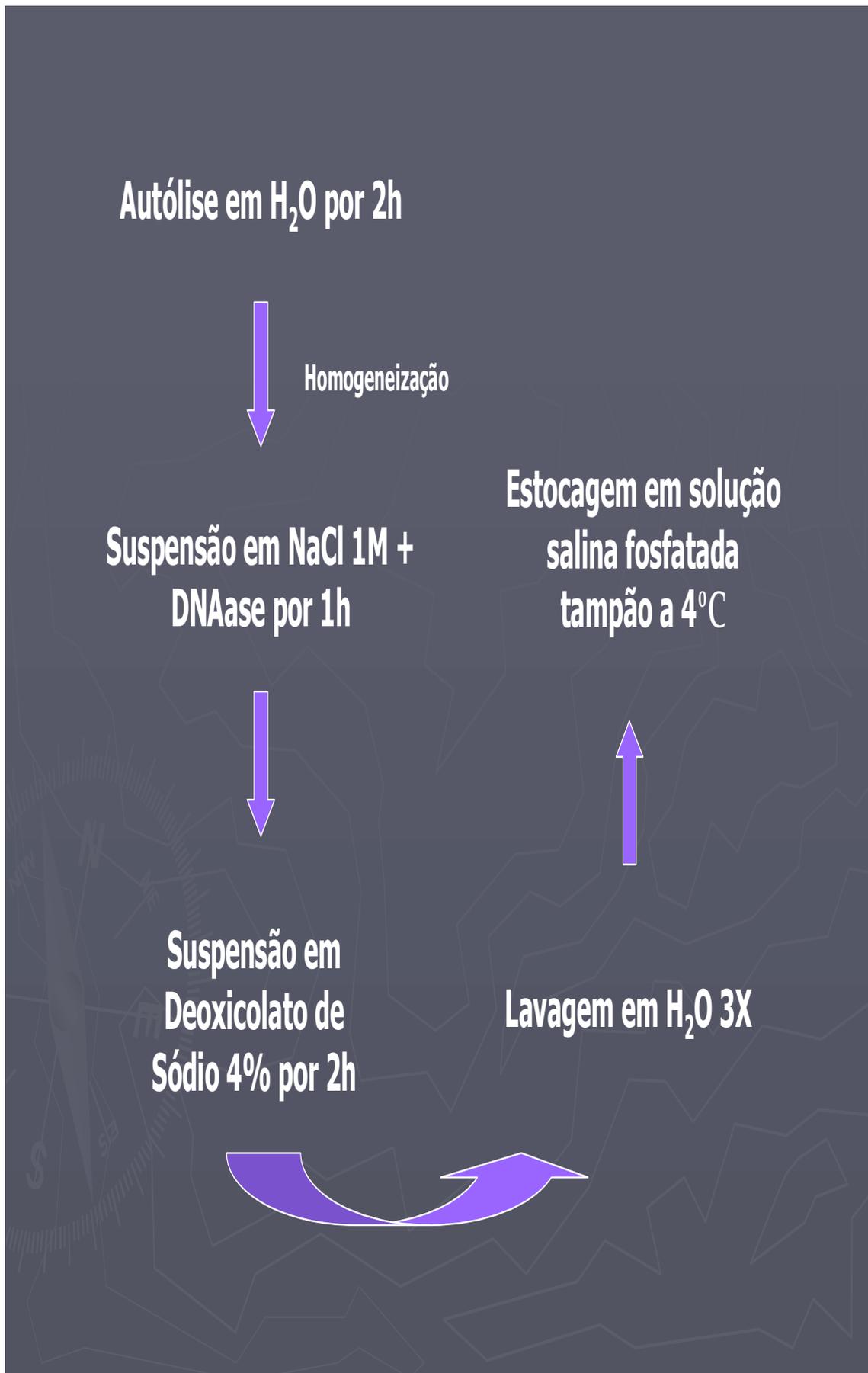


Figura 1 – Etapas na obtenção da matriz tecidual acelular.

4.2.2 – Aposição do retalho de matriz tecidual acelular

Os retalhos de matriz acelular foram apostos em um segmento de íleo terminal, distante aproximadamente cinco centímetros do piloro ileocecal. Foi realizada enterotomia longitudinal na parede antimesentérica do íleo, com o comprimento aproximado da medida do fragmento da matriz, três centímetros (figuras 2 e 3).



Figura 2 – Fotografia mostra a identificação do segmento do íleo terminal, para a aposição do retalho.

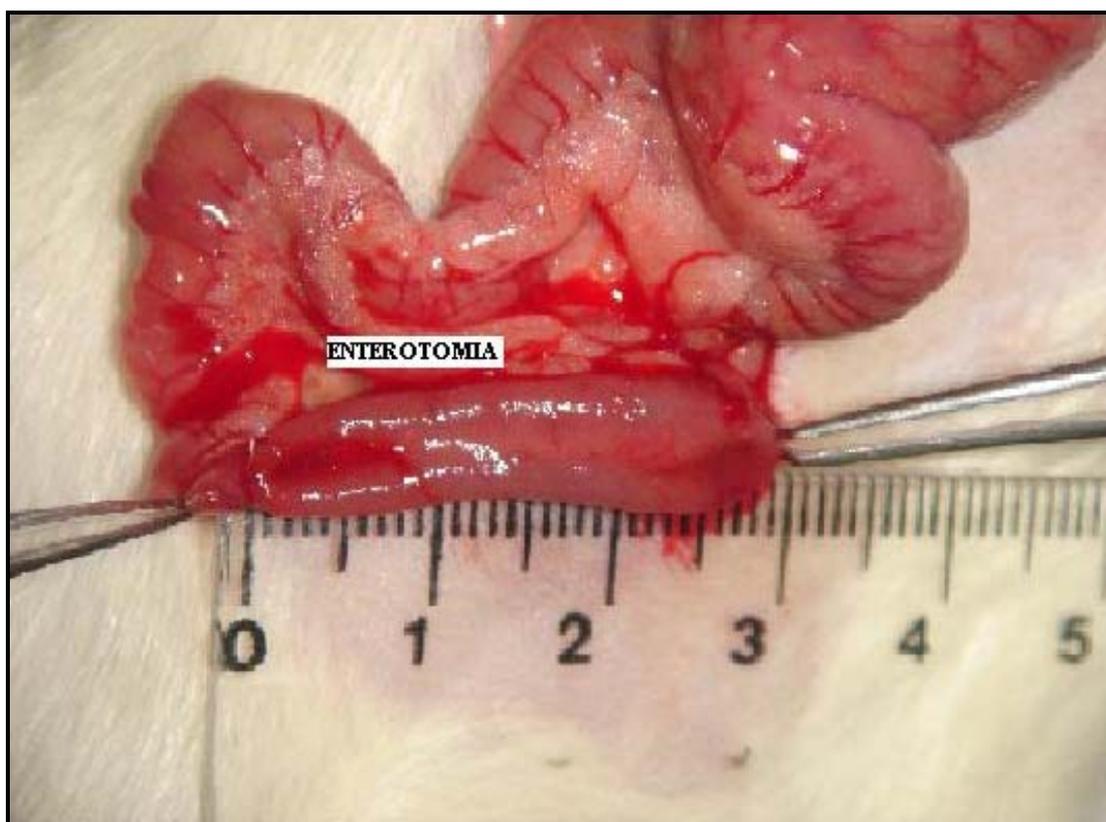


Figura 3 – Fotografia mostra a abertura da parede antimesentérica do íleo terminal (enterotomia).

A anastomose entre o retalho de matriz acelular e o segmento ileal foi feita com o uso de fio não absorvível, monofilamentoso de polipropileno 6-0. A sutura foi contínua em cada borda da enterotomia (figuras 4 e 5). Tomou-se o cuidado de fazer a inversão da mucosa do intestino delgado para dentro do lúmen no momento da anastomose.



Figura 4 – Fotografia do retalho de matriz acelular colocado sobre a enterotomia.

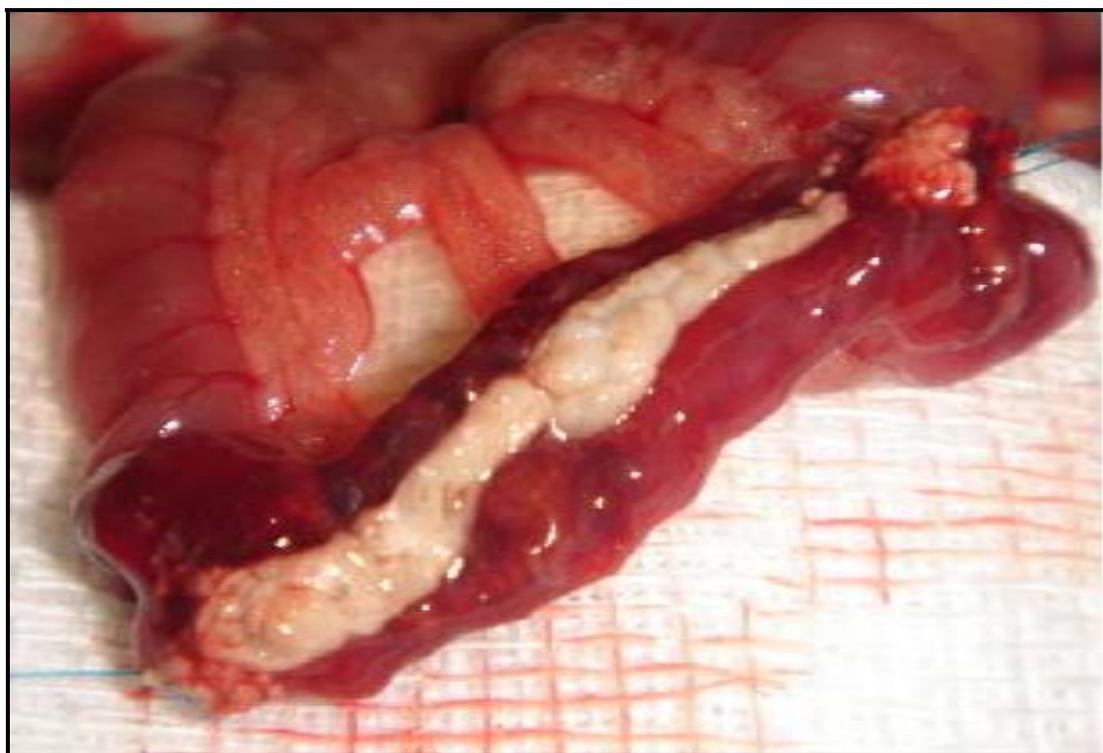


Figura 5 – Fotografia da anastomose final entre o retalho de matriz acelular e o segmento de íleo terminal.

4.2.3 – Operação para a retirada das peças

Com intervalos de duas, quatro e oito semanas pós-operatórias da interposição do retalho de matriz acelular, os ratos foram submetidos a novo procedimento operatório para a retirada das peças, seguindo o mesmo protocolo de intervenção, anestesia e laparotomia, descrito anteriormente. A seguir, os animais foram submetidos à eutanásia.

A peça cirúrgica consistiu do segmento de íleo terminal com retalho apostado, considerando-se margens de ressecção de dois centímetros proximais e dois centímetros distais à área do retalho. Procedeu-se à medida do retalho identificado, com o objetivo de analisar sua retração ao longo do experimento.

Nesse mesmo momento operatório, foi feita a avaliação da presença de aderências entre alças intestinais ou fístulas entéricas.

4.2.4 – Exame histológico

O exame histológico ocorreu no Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília (CAP-HUB). Os segmentos de íleo terminal retirados de cada rato foram abertos na sua parede mesentérica e colocados em solução de formaldeído tamponada a 10%, por período mínimo de 24 horas. As peças foram então processadas pelos métodos usuais de histologia e incluídas em parafina.

Foram obtidos cortes no sentido transversal com espessura de cinco micrômetros (μm). O material foi corado pelo método da hematoxilina-eosina (H.E.) e analisado em microscópio óptico (*Zeiss*, modelo *Axio Skop 2 plus*), equipado com câmera de vídeo e conectado a um computador com processador *Pentium 4 – Intel*.

Amostras dos retalhos de matriz acelular, obtidos do tratamento detergente-enzimático do intestino delgado, conforme descrito acima, também

foram submetidas à avaliação histológica para a confirmação da eficácia do método. As colorações utilizadas foram a hematoxilina-eosina e o vermelho picrossírius-hematoxilina, para a demonstração de fibras colágenas e do tecido de sustentação, como as membranas basais.

4.2.5 – Avaliação morfométrica

As imagens capturadas do microscópio, com aumento óptico de 10 vezes, permitiram a seleção de 10 vilosidades e 10 criptas intestinais, por campo, para a análise morfométrica. Foram aferidas a **altura das vilosidades** e a **profundidade das criptas**, tanto no segmento de neomucosa sobre retalho interposto quanto no segmento intestinal adjacente normal, proximalmente ao retalho. As aferições foram realizadas com o emprego dos programas *Pegasus Capture Studio* e *Axio Vision 3.1* (Carl-Zeiss) e relatadas em micrômetros (μm). A altura das vilosidades foi medida desde o seu ápice até a transição do epitélio em continuidade com as criptas; a profundidade das criptas correspondeu ao restante do epitélio mucoso até a sua base, identificada pelas células de *Paneth* (figura 6).

Procedeu-se também à medida de **superfície das vilosidades intestinais**. A vilosidade foi considerada semelhante à figura geométrica do cone cortado, e a sua superfície foi calculada com o emprego da seguinte fórmula, conforme o proposto por SADAY e MIR (1996):

$$\mu\text{m}^2/\text{vilosidade} = \pi \times (\frac{1}{2}r_1 + \frac{1}{2}r_2) \times \sqrt{h^2 + (\frac{1}{2}r_1 - \frac{1}{2}r_2)^2} + \pi \times (\frac{1}{2}r_2)^2,$$

onde r_1 e r_2 são as medidas da largura da vilosidade na base e no terço superior, respectivamente, e h corresponde à altura (figura 7).



Figura 6 – Fotografia mostra a aferição da altura das vilosidades e a profundidade das criptas intestinais no epitélio normal do segmento de íleo terminal (rato 15). H.E. 10 x.

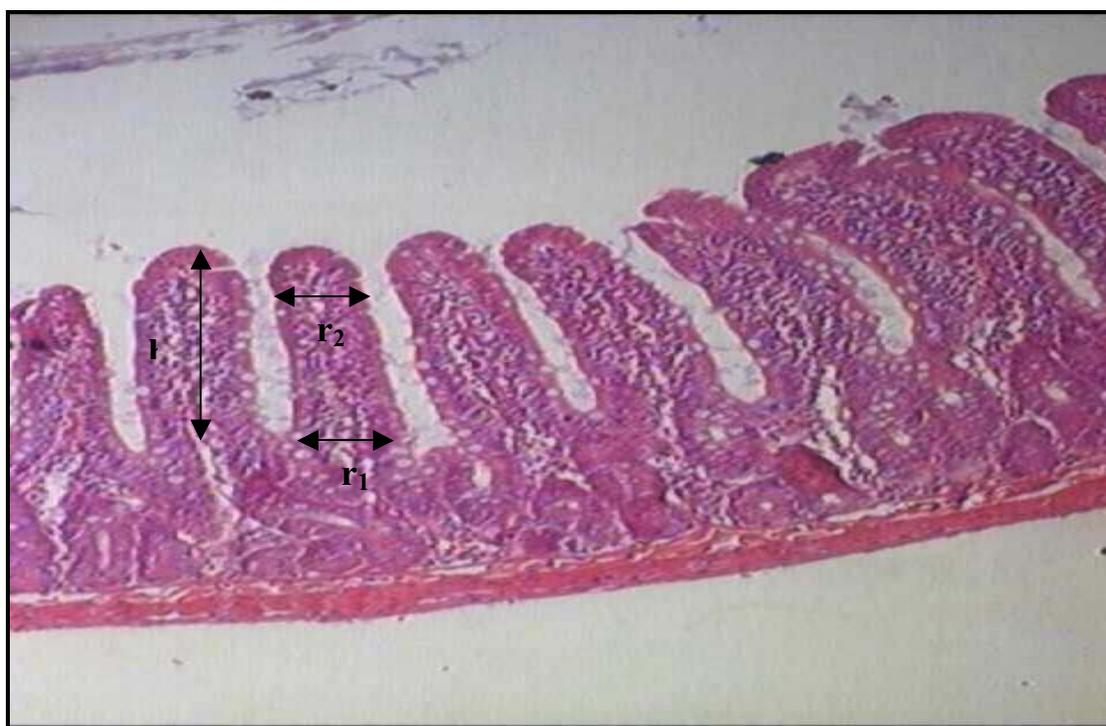


Figura 7 – Fotografia mostra as medidas de altura (h) das vilosidades e dos diâmetros r_1 e r_2 para o cálculo da superfície das vilosidades, no epitélio normal do segmento de íleo terminal (rato 15). H.E. 10 x.

4.3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise das variáveis, altura das vilosidades, superfície das vilosidades e profundidade das criptas intestinais, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), com o cálculo da distribuição F para verificar as discrepâncias entre as médias obtidas nos dois grupos, neomucosa formada e mucosa proximal adjacente.

O teste t de *Student* foi utilizado para a comparação das médias obtidas dos dados da morfometria entre os ratos dos grupos 2 e 3, eutanásia com quatro semanas e eutanásia com oito semanas respectivamente. Foi utilizado para julgar se a possível diferença entre as médias decorre da variabilidade residual, isto é, devido ao acaso, ou da variabilidade dos dados.

O valor alfa (α) do nível de significância para os testes utilizados foi fixado em 5%, admitindo-se um p-valor menor que 0,05 ($p \leq 0,05$) para a rejeição da hipótese de nulidade. Os valores significantes foram assinalados com um asterisco (*) ou em negrito.

A análise estatística foi realizada por profissional especialista independente, com o emprego do programa SAS (*Statistical Analyses System*).

5. RESULTADOS

5.1 – ANÁLISE GERAL

5.1.1 – MATRIZ ACELULAR

Três ratos foram utilizados para a obtenção da matriz acelular. Todo o intestino delgado desses animais recebeu tratamento detergente-enzimático e o resultado final foi um tecido de parede muito fina e transparente, porém resistente à manipulação (figura 8).

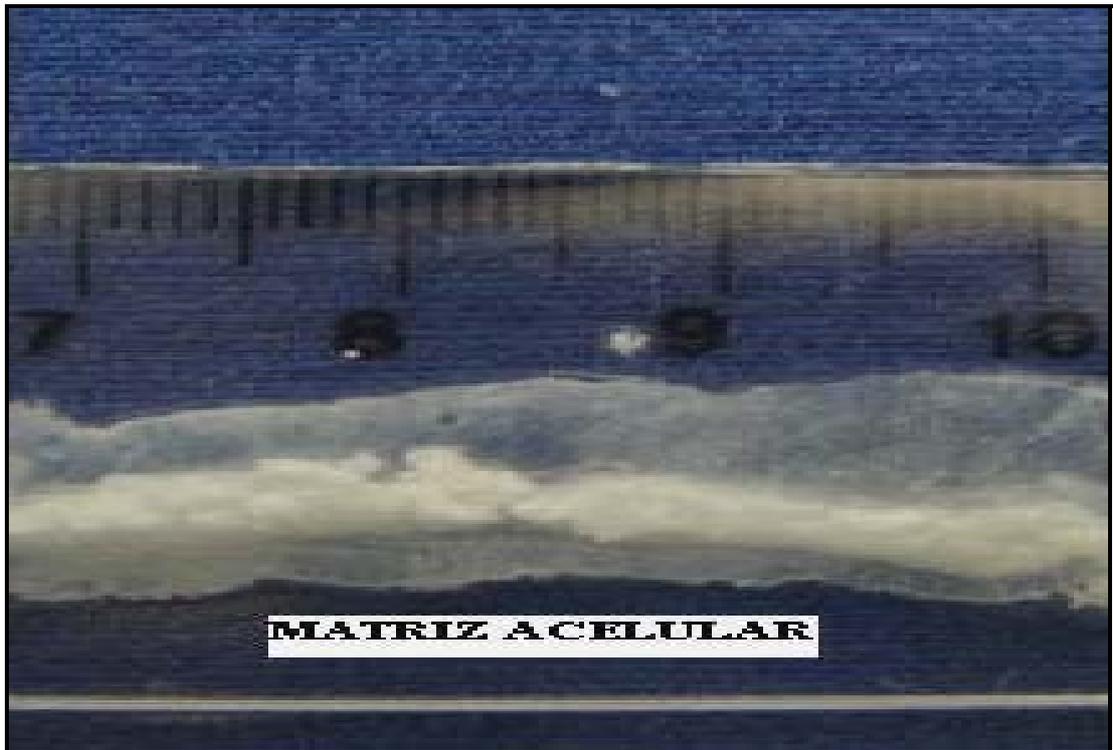


Figura 8 – Fotografia do retalho de íleo terminal depois do tratamento detergente-enzimático para a obtenção da matriz tecidual acelular.

O estudo histológico da matriz tecidual acelular, na coloração pela hematoxilina-eosina, mostrou a presença de tecido conjuntivo frouxo de sustentação desenhando a arquitetura das camadas do intestino delgado, sem nenhuma evidência de componente celular (figura 9). A coloração especial com vermelho picrosírius-hematoxilina mostrou toda a camada submucosa, rica em colágeno, íntegra e as membranas basais do epitélio mucoso intestinal e das camadas musculares. Nenhum núcleo celular foi identificado (figuras 10 e 11).

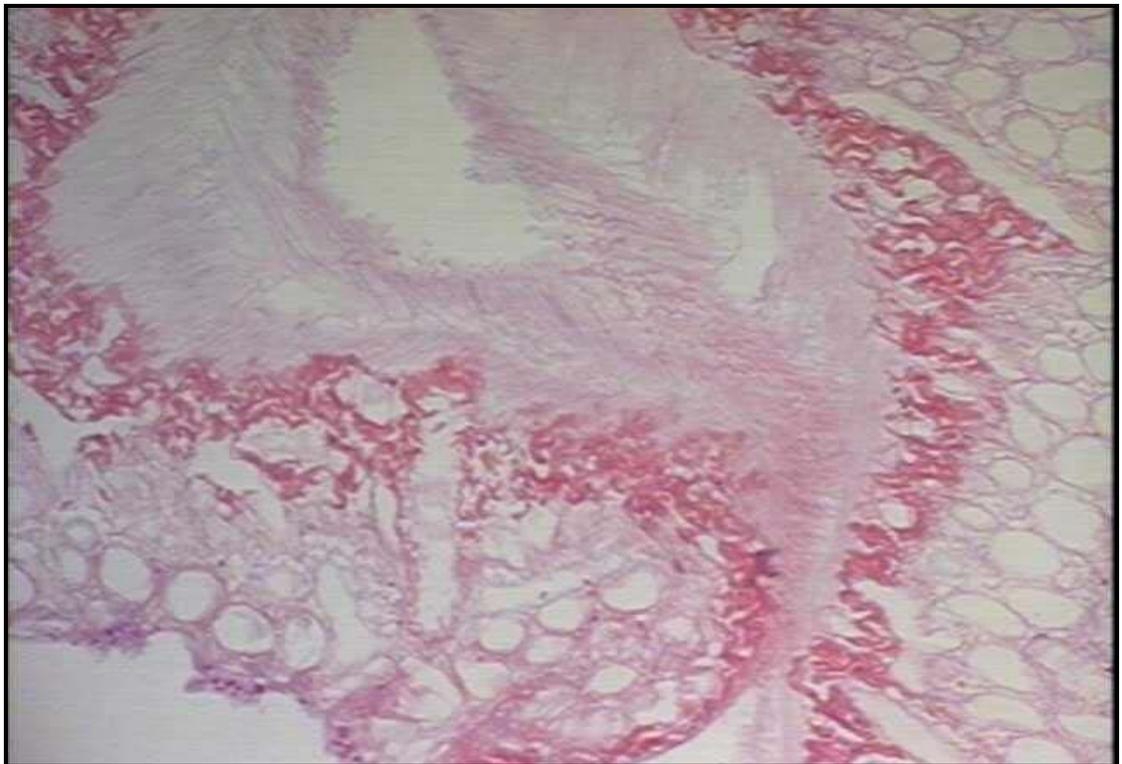


Figura 9 – Microscopia óptica mostra a matriz tecidual acelular obtida após tratamento detergente-enzimático. Em tom rosado, apresentam-se as fibras colágenas e as membranas basais. Não se observam componentes celulares. H.E. 10x.

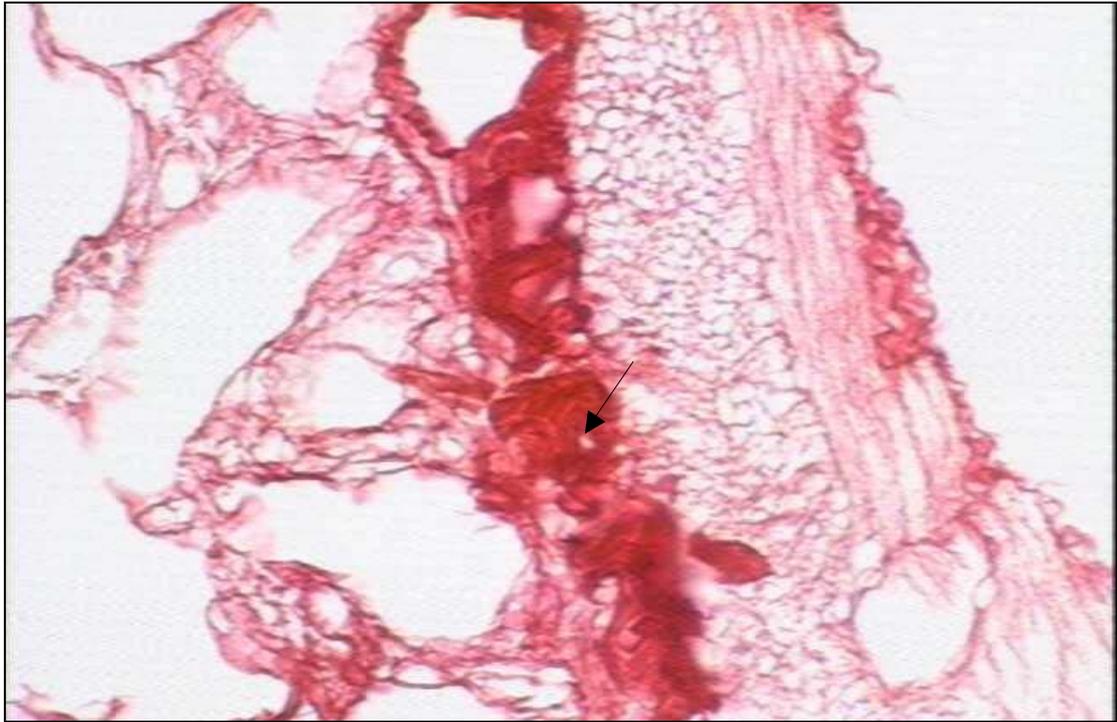


Figura 10 – Microscopia óptica mostra retalho da matriz tecidual acelular. Notar a concentração de fibras colágenas na camada submucosa do intestino delgado (seta). Nenhum núcleo celular é identificado. Vermelho picrosíríus. 20x.

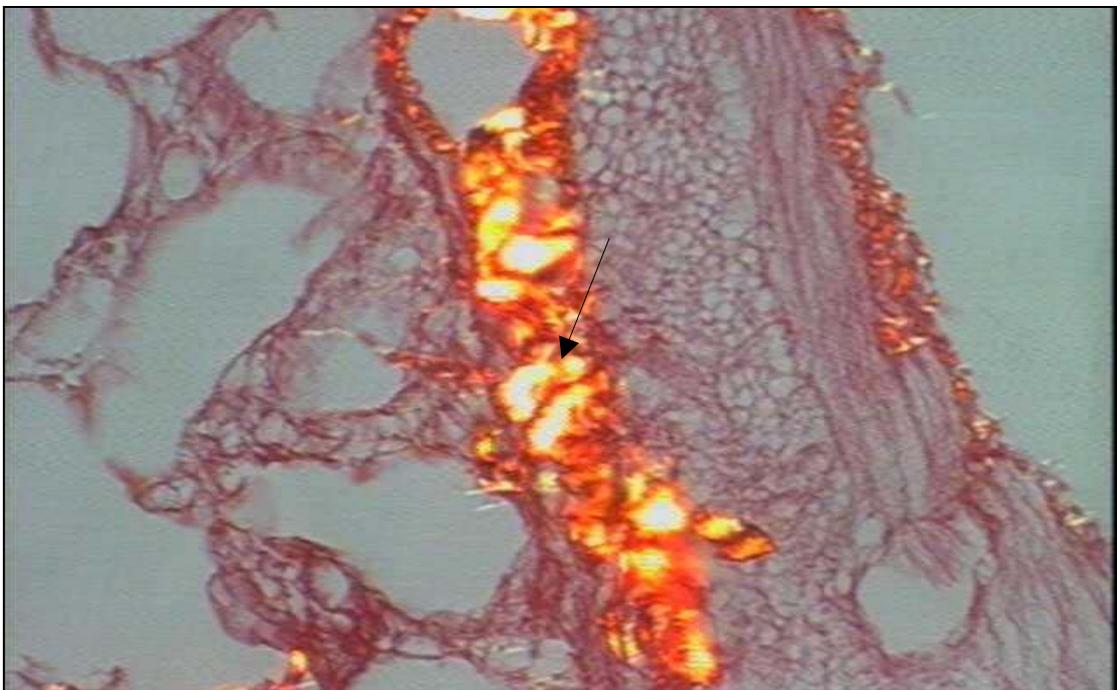


Figura 11 – Microscopia óptica mostra retalho da matriz tecidual acelular com visualização pela luz polarizada. Notar a concentração de fibras colágenas na camada submucosa (seta). Vermelho picrosíríus. 20x.

5.1.2 – NEOMUCOSA INTESTINAL

Vinte e cinco ratos receberam o retalho de matriz acelular e foram distribuídos em três grupos, de acordo com o momento da eutanásia para a verificação do crescimento de nova mucosa intestinal sobre o retalho interposto. Foram cinco ratos no grupo 1, eutanásia com duas semanas, e 10 ratos em cada um dos grupos 2 e 3, eutanásia com quatro e oito semanas respectivamente. Os pesos iniciais dos animais variaram entre 300 g e 360 g. Após o procedimento para a interposição do retalho, os ratos apresentaram curva ponderal ascendente, apesar de pequena queda observada na primeira semana pós-operatória (tabelas 1, 2 e 3 e figura 12).

Tabela 1 – Pesos, em gramas, dos animais do grupo 1 (duas semanas).

<i>Animais</i>	<i>Peso 0</i>	<i>Peso 1</i>	<i>Peso 2</i>
Rato 1	342,25	304,2	356,33
Rato 2	318,78	286,72	349,85
Rato 3	326,45	308,45	329,7
Rato 4	317,06	274,31	333,18
Rato 5	304,85	271,03	315,03

Peso 0 – peso inicial.

Pesos 1 e 2 – pesos nas semanas 1 e 2 pós-operatórias respectivamente.

Tabela 2 – Pesos, em gramas, dos animais do grupo 2 (quatro semanas).

<i>Animais</i>	<i>Peso 0</i>	<i>Peso 1</i>	<i>Peso 2</i>	<i>Peso 3</i>	<i>Peso 4</i>
Rato 6	351,02	315,59	335,59	353,84	387,04
Rato 7	311,96	278,07	340,26	358,57	392,11
Rato 8	347,32	300,81	315,51	347,58	374,5
Rato 9	319,76	290,9	330,88	361,7	387,51
Rato 10	308,25	287,1	352,01	358,39	375,23
Rato 11	345,24	326,2	331,65	351,69	390,18
Rato 12	300,42	268,08	316,19	364,8	366,04
Rato 13	323,89	301,28	324,05	347,64	368,17
Rato 14	304,91	284,87	339,66	372,5	375,57
Rato 15	308,29	294,65	326,09	360,6	378,04

Peso 0 – peso inicial.

Pesos 1 a 4 – pesos nas semanas 1 a 4 cada, do período pós-operatório.

Tabela 3 – Pesos, em gramas, dos animais do grupo 3 (oito semanas).

<i>Animais</i>	<i>Peso 0</i>	<i>Peso 1</i>	<i>Peso 2</i>	<i>Peso 3</i>	<i>Peso 4</i>	<i>Peso 5</i>	<i>Peso 6</i>	<i>Peso 7</i>	<i>Peso 8</i>
Rato 16	320,87	301,34	344,22	382,49	395,17	408,56	411,28	425,67	430,93
Rato 17	358,57	311,84	353,82	376,05	394,84	411,49	420,41	438,11	441,07
Rato 18	332,53	294,54	317,18	319,08	327	341,04	371,62	392,03	402,51
Rato 19	360	326,49	335,72	353,04	387,85	401,53	410,69	424,01	437,98
Rato 20	353,4	348,57	339,1	372,94	396,86	411,35	437,87	439,56	446,17
Rato 21	350,79	314,39	357,95	394,54	408,03	417,18	432,02	456,33	473,18
Rato 22	349,93	314,07	319,4	345,19	380,06	394,63	411,57	439	452,65
Rato 23	318,7	296,91	340,02	387,9	402,74	418,09	442,58	475,86	485,2
Rato 24	357,31	320,41	347,95	396,08	408,36	439,34	452,83	476,16	482,49

Peso 0 – peso inicial.

Pesos 1 a 8 – pesos nas semanas 1 a 8 cada, do período pós-operatório.

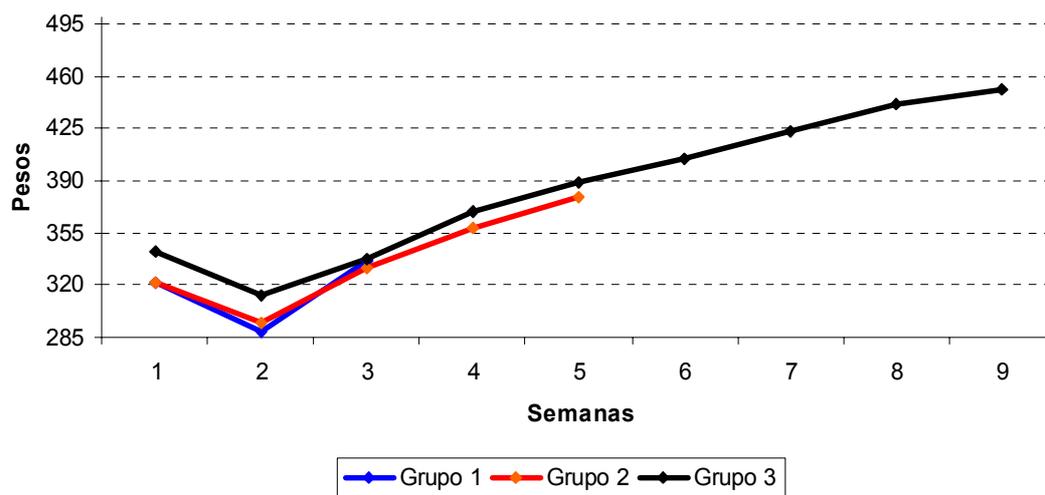


Figura 12 – Gráfico da evolução ponderal dos ratos ao longo do experimento.

Não houve deiscência de anastomose em nenhum dos ratos operados. A presença de aderências entre alças intestinais e com o grande omento foi observada em quase todos os animais, principalmente sobre a área de interposição do retalho. O grau de aderências variou de acordo com o momento da eutanásia.

Para os ratos no grupo 1, o grau de aderências entre as alças foi considerado leve, com facilidade da retirada de segmentos intestinais de sobre o retalho. Houve retração do retalho de 24,5%.

Nos ratos do grupo 2, o grau de aderências entre alças intestinais também foi considerado leve, sem dificuldades no desfazimento das mesmas. Houve retração do retalho de 49,7%.

Já para os ratos do grupo 3, o grau de aderências entre alças foi considerado moderado, com maior dificuldade em seu desfazimento. Houve retração do retalho de 53,5% (figuras 13 e 14).

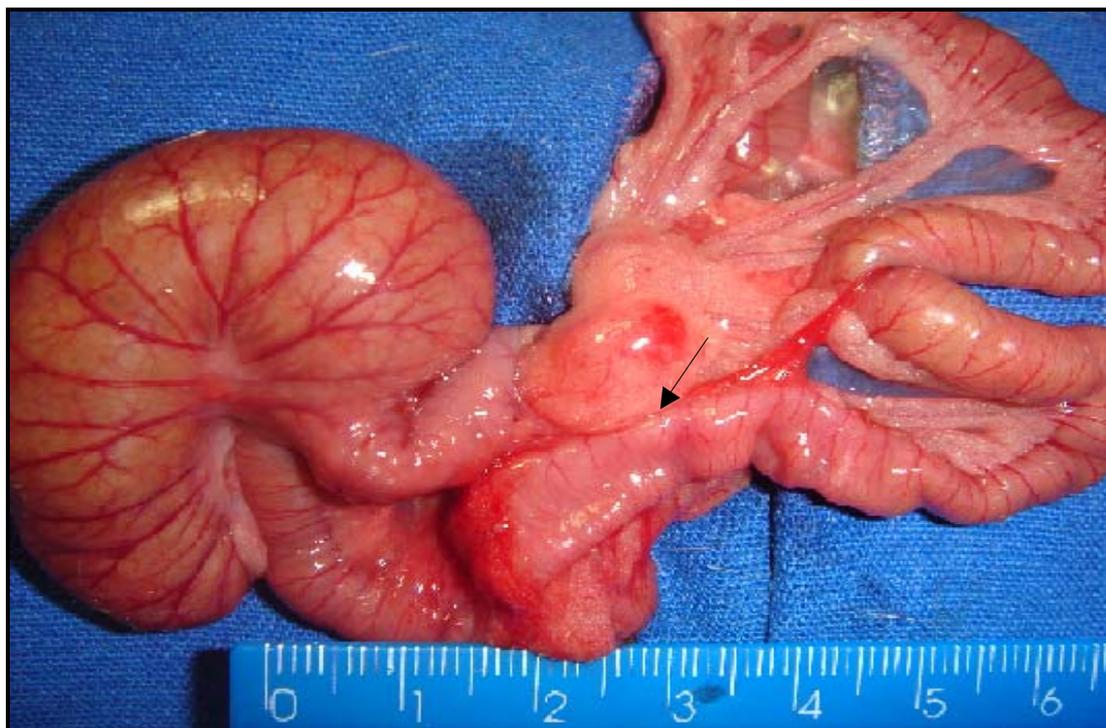


Figura 13 – Fotografia mostra aderências entre alças intestinais no local do retalho (seta) em animal com oito semanas pós-operatórias (rato 25).



Figura 14 – Fotografia mostra a peça operatória do rato 25. Notar o local do retalho, com a retração (seta).

Quanto à observação do crescimento de neomucosa sobre o retalho de matriz tecidual acelular, verificou-se que nos animais do grupo 1, à macroscopia, foi identificada área como se fosse úlcera na mucosa do segmento do íleo terminal, correspondente ao local do retalho, sem crescimento tecidual aparente. Microscopicamente, a matriz acelular apresentou grande infiltrado de células polimorfonucleares em meio às fibras colágenas (figura 15) e capilares neoformados distribuídos perpendicularmente à matriz, com direção da superfície externa do retalho para o lúmen intestinal (figuras 16 e 17). Também foi observado o crescimento de neomucosa nas extremidades do retalho (figuras 18 e 19).

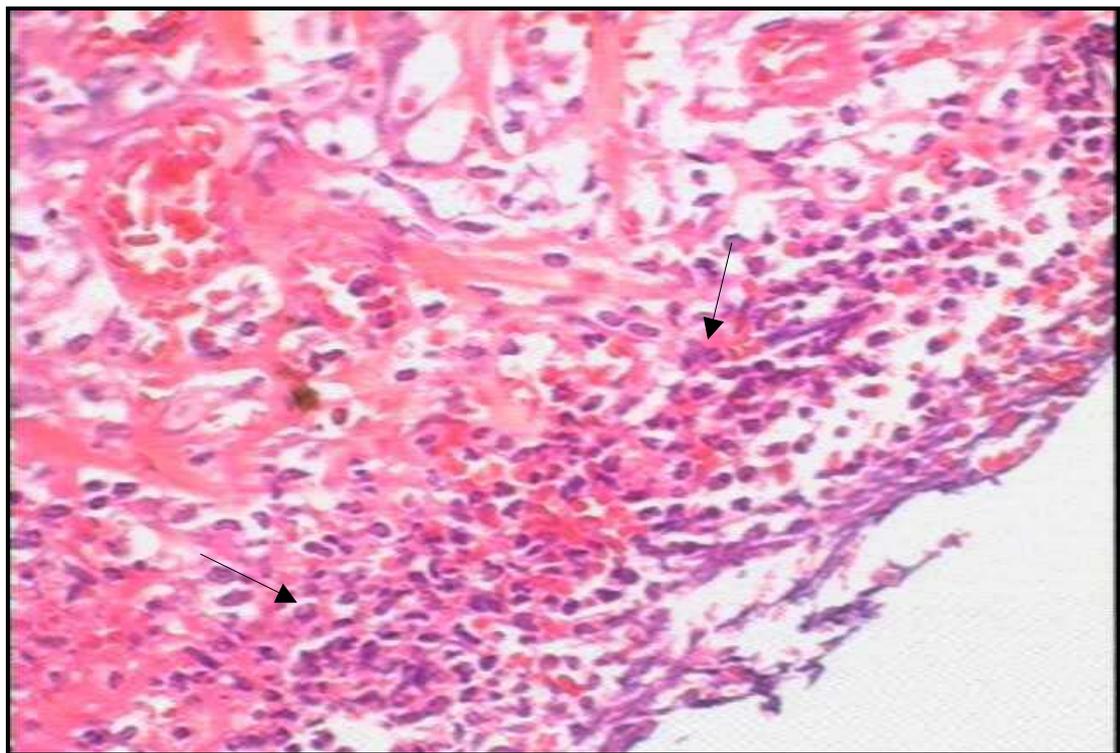


Figura 15 – Microscopia óptica mostra a matriz tecidual acelular com duas semanas de período pós-operatório, infiltrada por células inflamatórias polimorfonucleares (setas) (rato 5). H.E. 20x.

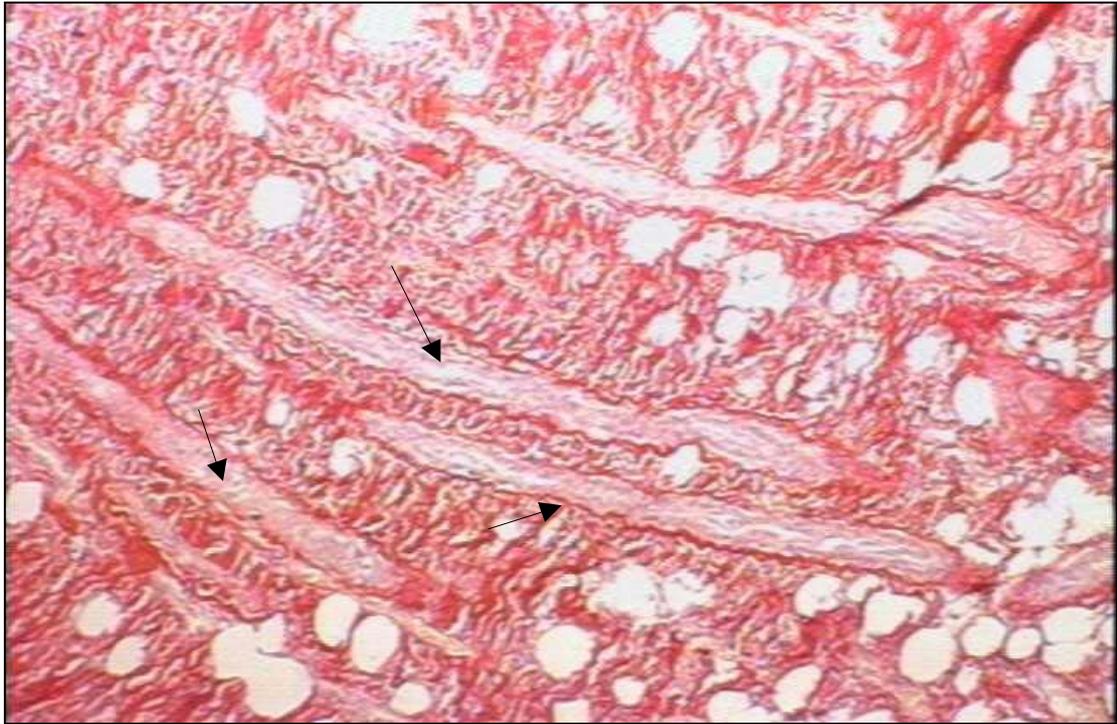


Figura 16 – Microscopia óptica mostra a neovascularização do retalho de matriz tecidual acelular (setas). A disposição dos novos capilares é perpendicular ao retalho e denota invasão da parede externa para o lúmen do intestino. Vermelho picrossírius. 10x.

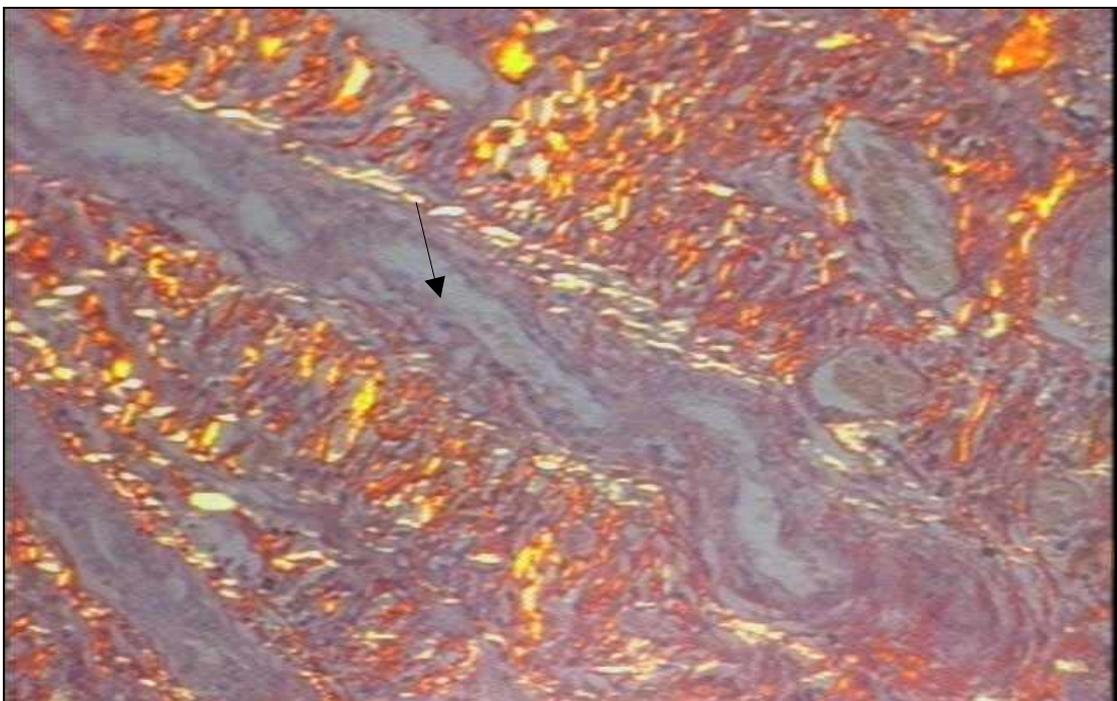


Figura 17 – Microscopia óptica, com luz polarizada, mostra o detalhe do novo capilar (seta) no meio da matriz acelular. Vermelho picrossírius. 20x.

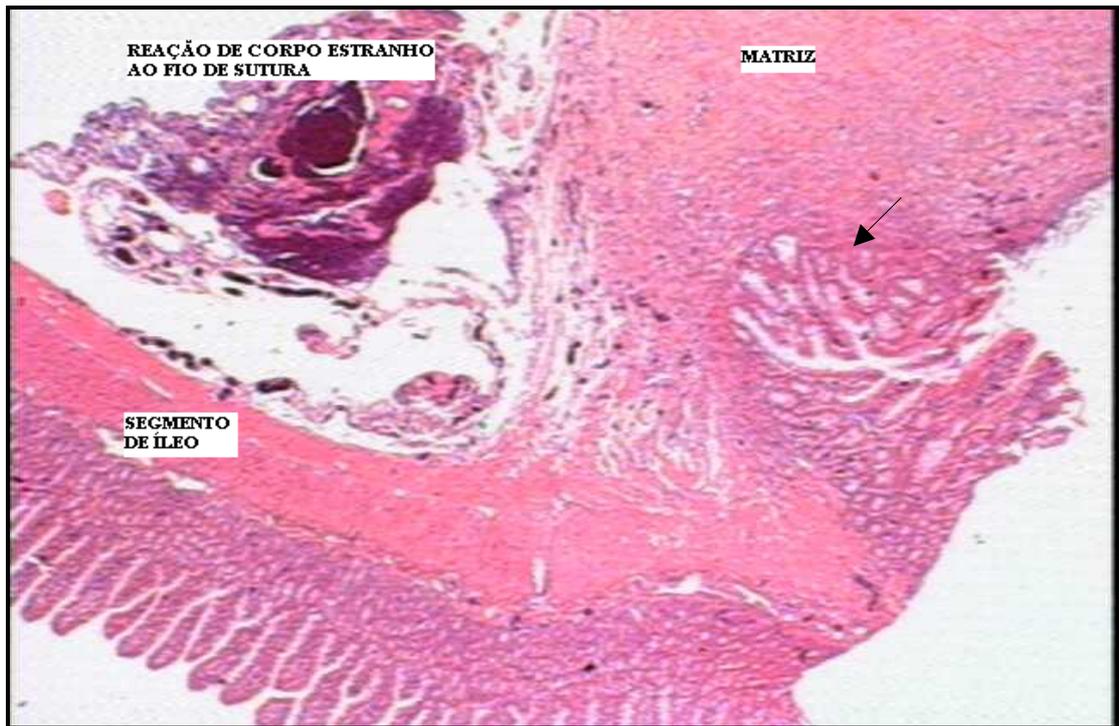


Figura 18 – Microscopia óptica mostra o sítio de anastomose entre o retalho e o segmento de íleo, com a observação do esboço de crescimento de mucosa intestinal da extremidade para o centro da matriz (seta), com duas semanas de período pós-operatório (rato 5). H.E. 2,5x.

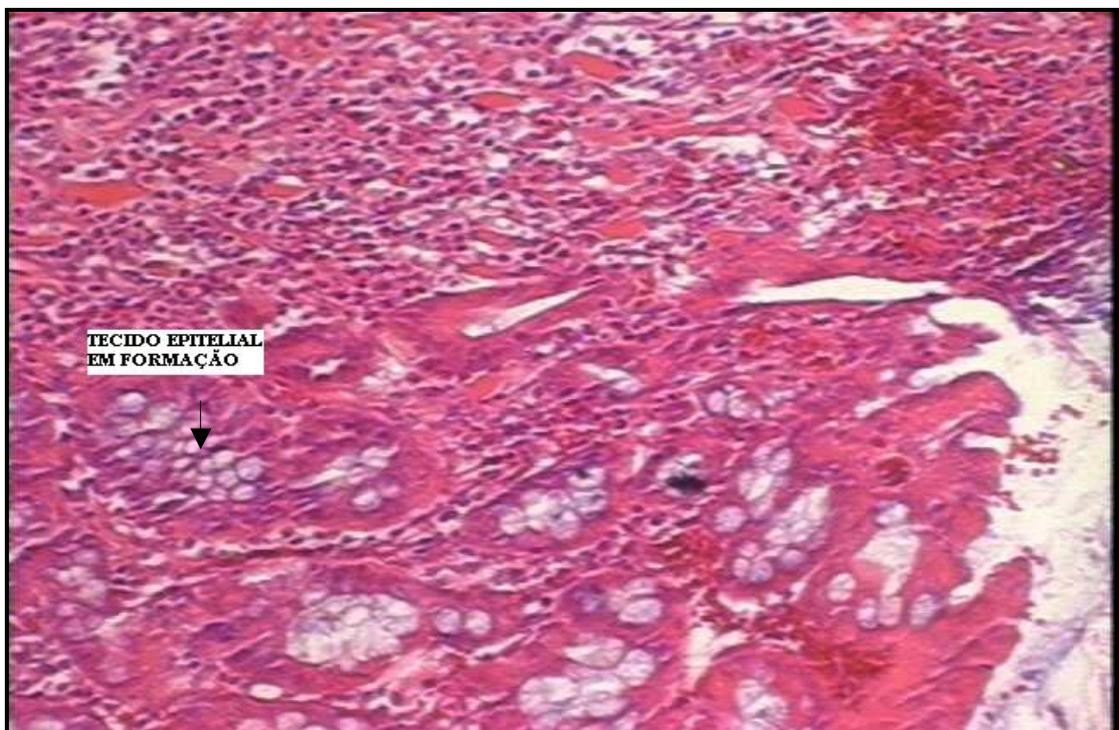


Figura 19 – Microscopia óptica mostra o detalhe do crescimento de neomucosa sobre o retalho de matriz com duas semanas de período pós-operatório (rato 5). H.E. 20x.

Nos animais do grupo 2, à macroscopia, foi identificada pequena área de “úlceras” da mucosa intestinal, no centro do retalho interposto, que denota crescimento tecidual sobre a matriz, com preenchimento de quase todo o retalho (figura 20). À microscopia, observou-se a formação de mucosa intestinal com desenvolvimento de vilosidades e criptas intestinais bem estruturadas (figura 21); a matriz apresentou-se com rearranjo das fibras colágenas sob a nova mucosa em formação (figura 22).



Figura 20 – Fotografia mostra peça obtida com quatro semanas pós-operatórias (rato 15); o retalho apresenta-se recoberto por tecido macroscopicamente semelhante ao tecido adjacente, com pequena área central descoberta (seta).

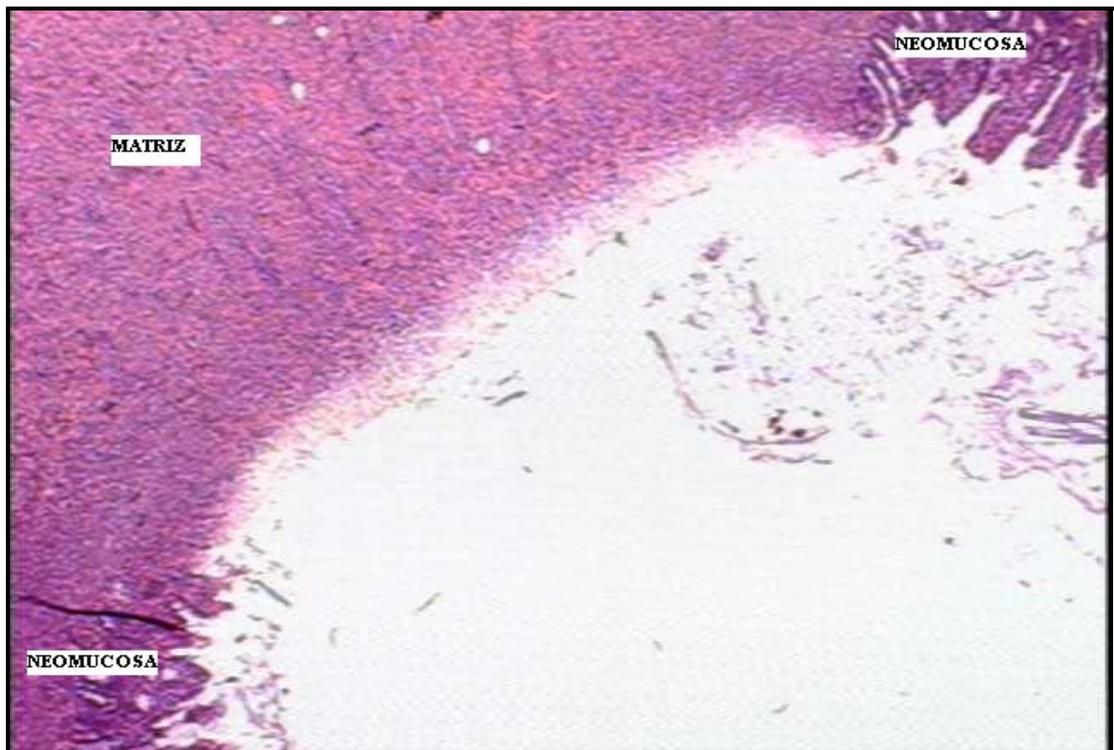


Figura 21 – Microscopia óptica mostra o crescimento de neomucosa a partir das extremidades da anastomose para o centro do retalho, na quarta semana de período pós-operatório (rato 15). H.E. 2,5x.

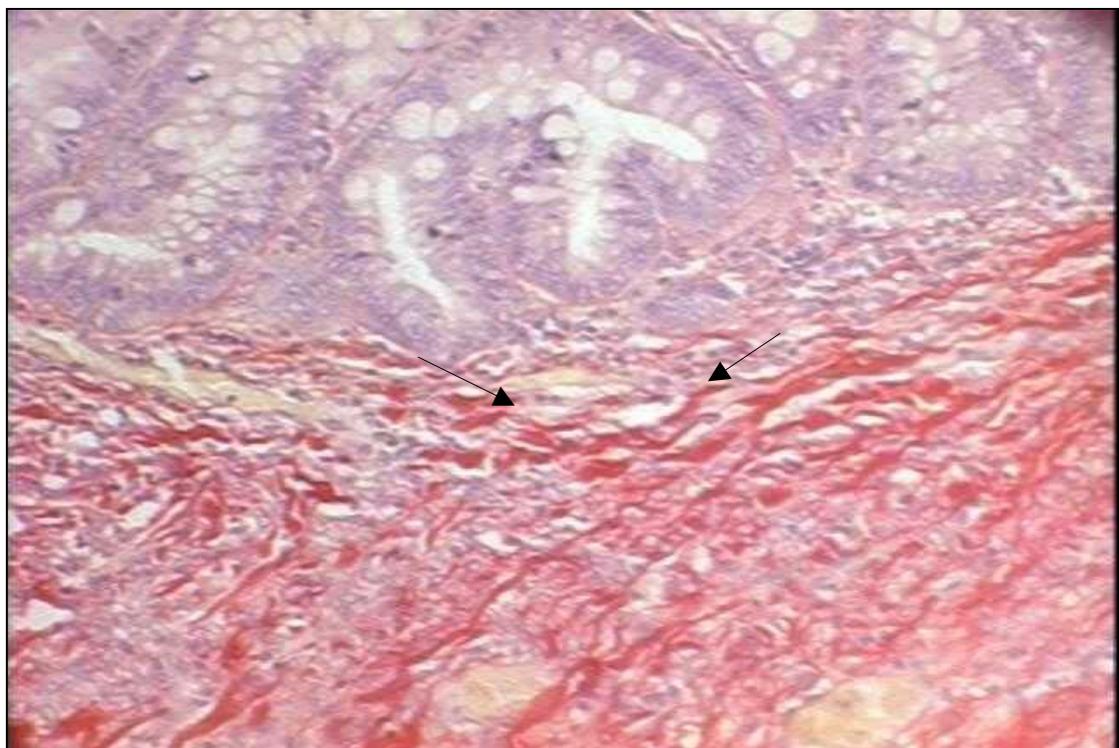


Figura 22 – Microscopia óptica mostra o rearranjo (setas) das fibras de colágeno sob a nova mucosa em formação na matriz acelular. Vermelho picrosírius. 20x.

Nos animais do grupo 3, macroscopicamente toda a superfície interna do retalho estava recoberta por tecido semelhante à mucosa adjacente (figura 23). À microscopia, a neomucosa foi bem formada e revestiu toda a matriz acelular, com presença de todas as células especializadas do epitélio do intestino delgado (figuras 24, 25 e 26); foram observadas, também, figuras de mitose na base das criptas, denotando crescimento celular em atividade (figura 27).

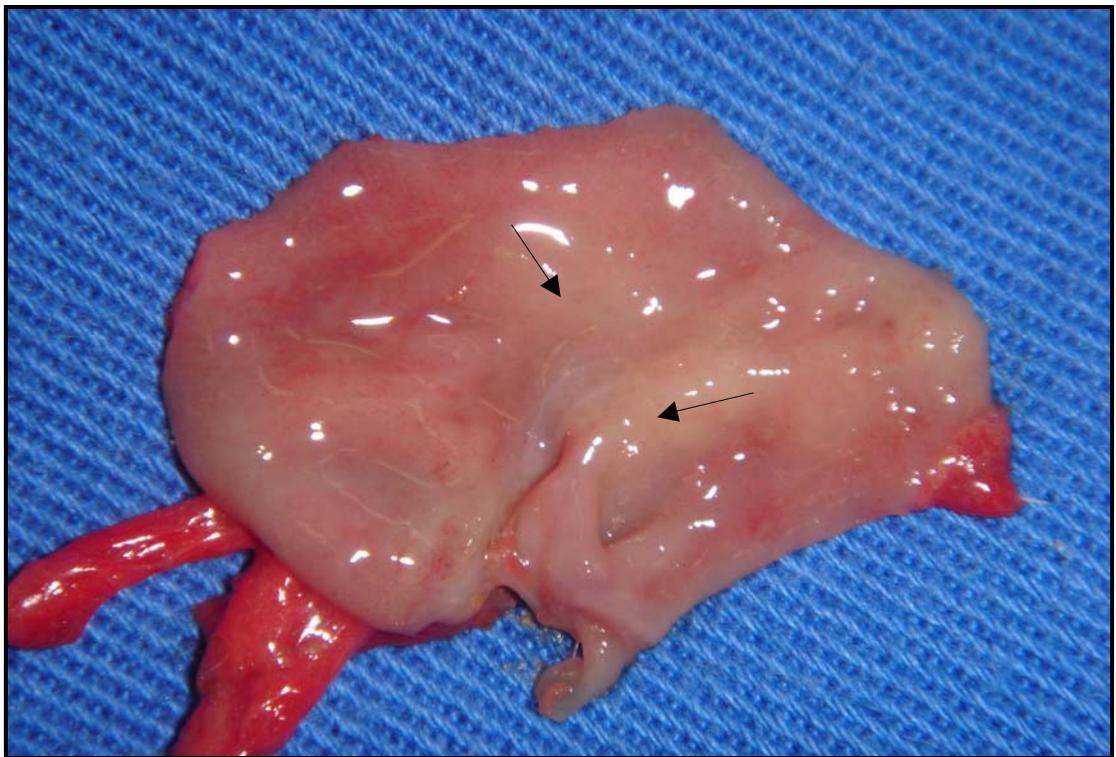


Figura 23 – Fotografia mostra peça obtida com oito semanas pós-operatórias (rato 25); o retalho foi completamente preenchido por tecido mucoso intestinal (setas).

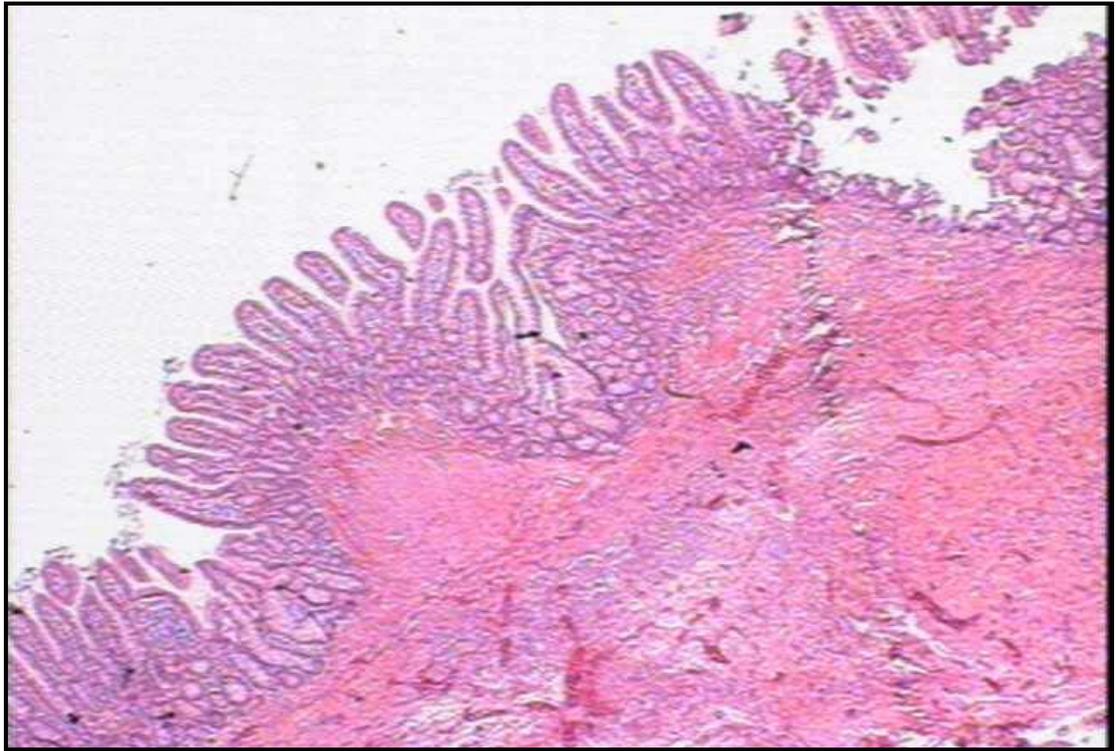


Figura 24 – Microscopia óptica mostra preenchimento completo por neomucosa intestinal de toda a matriz, com oito semanas pós-operatórias (rato 25). H.E. 2,5 x.

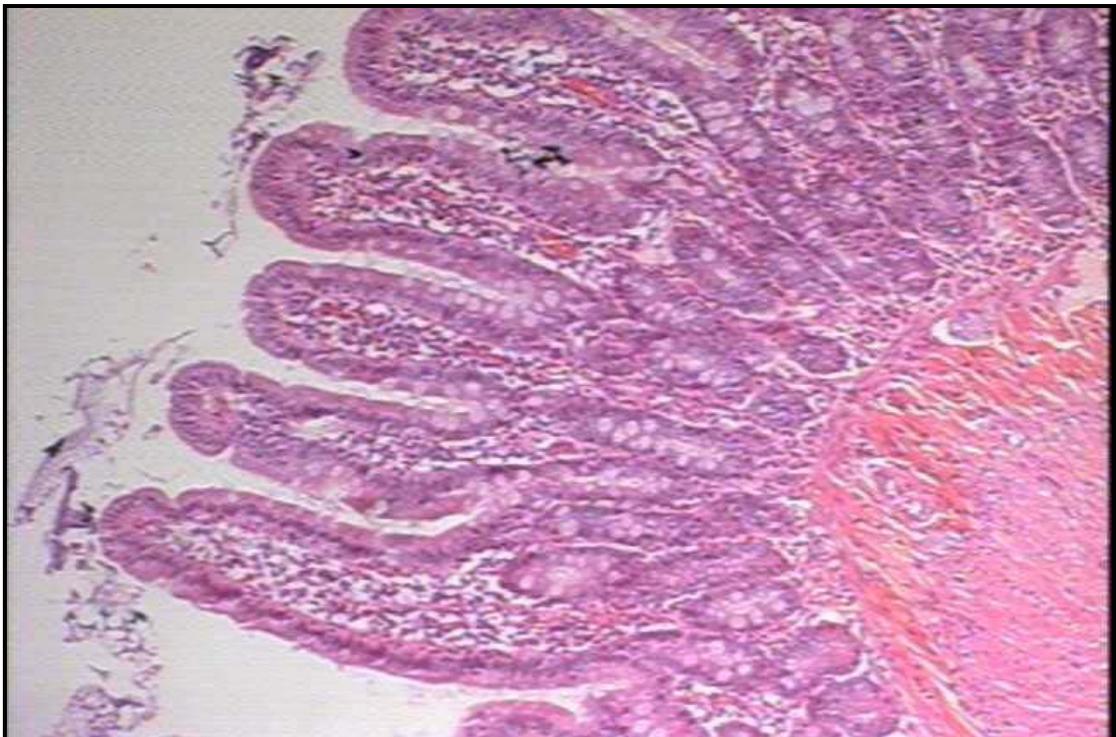


Figura 25 – Microscopia óptica mostra detalhe da neomucosa formada sobre a matriz, com oito semanas pós-operatórias (rato 25). H.E. 10 x.

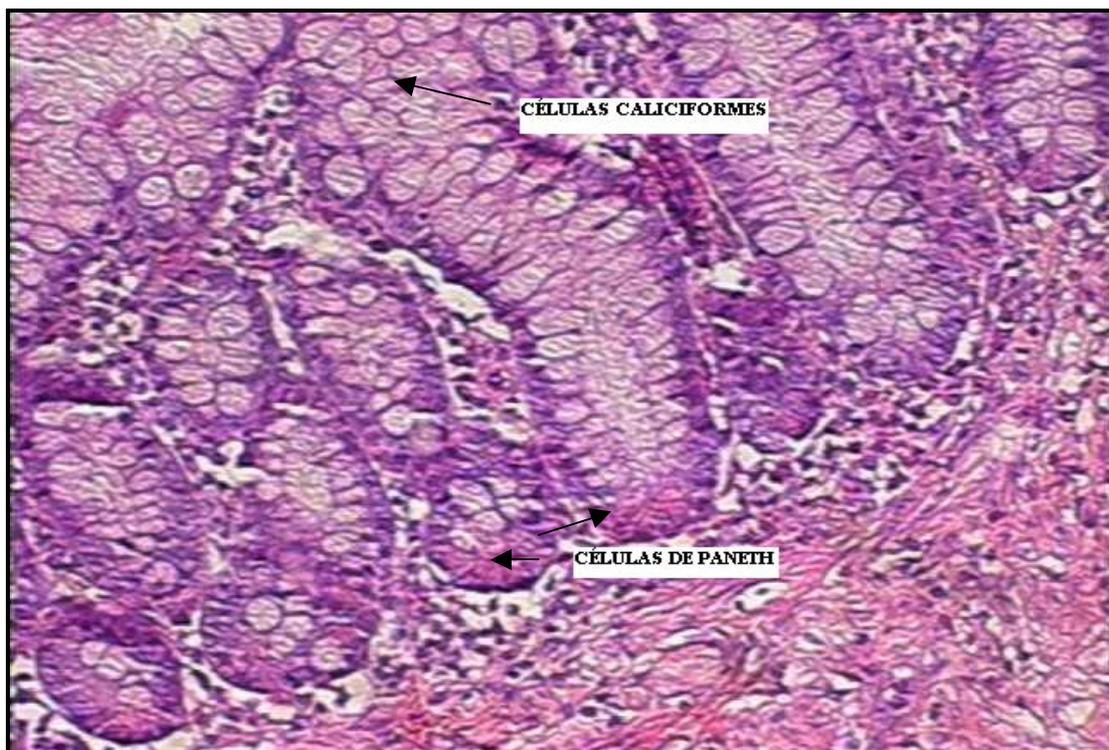


Figura 26 – Microscopia óptica mostra detalhes celulares presentes na neomucosa formada com oito semanas pós-operatórias (rato 25). H.E. 20 x.

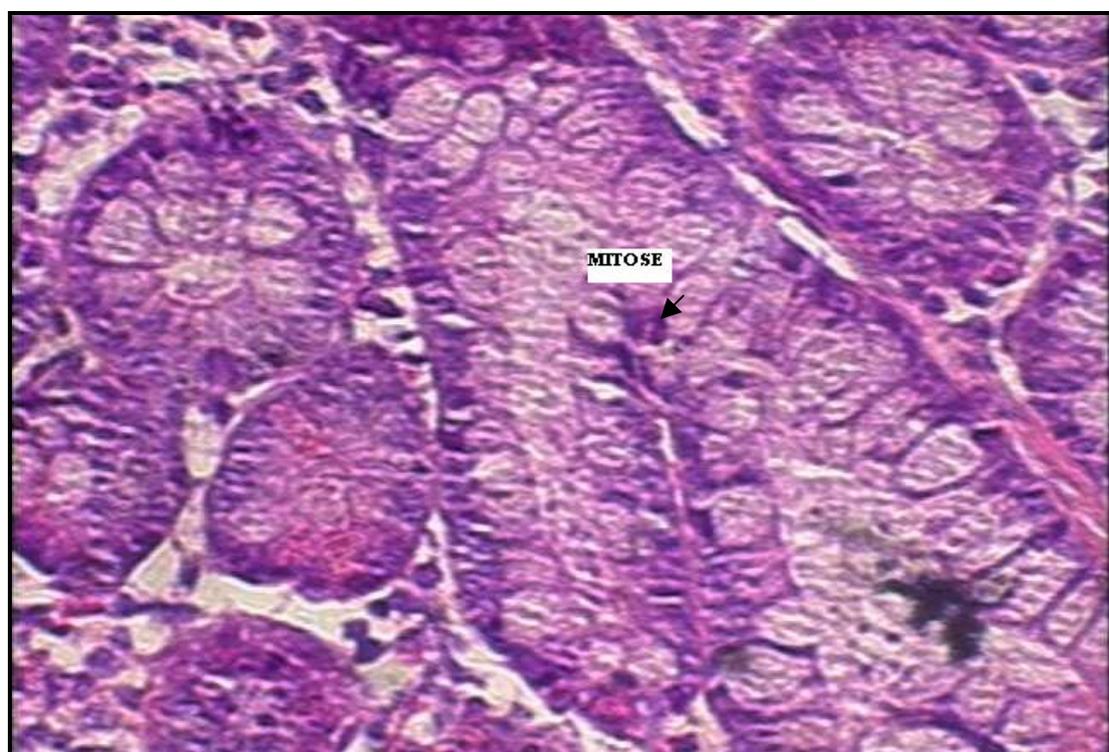


Figura 27 – Microscopia óptica mostra imagem de mitose nas criptas intestinais da neomucosa formada com oito semanas pós-operatórias (rato 25). H.E. 40 x.

Os dados morfométricos obtidos para os grupos 2 e 3, tanto na mucosa adjacente ao retalho interposto quanto na neomucosa, estão apresentados nas tabelas 4 a 9; os resultados da análise estatística se encontram no item seguinte.

Tabela 4a – Altura, em micrômetros (μm), das vilosidades da mucosa adjacente dos ratos do grupo 2.

<i>R6</i>	<i>R7</i>	<i>R8</i>	<i>R9</i>	<i>R10</i>
250,67	268,39	260,41	272,63	264,01
233,55	272,71	269,68	271,68	281,08
246,87	299,63	270,18	258,72	264,02
237,99	278,03	269,95	295,42	278,52
247,02	265,44	260,78	287,22	267,24
280,93	273,06	256,16	266,52	285,75
260,73	285,45	261,37	261,32	287,12
237	272,5	252,42	254,7	257,93
268,32	263,84	275,83	272,66	286,17
263,17	257,13	281,3	259,01	293,7

R: rato.

Tabela 4b – Altura, em micrômetros (μm), das vilosidades da mucosa adjacente dos ratos do grupo 2.

<i>R11</i>	<i>R12</i>	<i>R13</i>	<i>R14</i>	<i>R15</i>
259,74	285,71	264,96	272,78	272,83
283,61	274,34	289,02	272,95	276,48
287,01	265,21	268,94	260,06	269,43
272,95	280,13	266,93	284,29	291,49
267,35	272,01	277,49	262,2	277,27
274,79	262,73	280,02	275,47	282,02
285,14	268,13	268,64	261,8	256,44
273,73	292,33	260,42	275,32	265,23
257,3	277,19	272,82	265,69	288,6
290,18	260,74	262,38	289,71	293,01

R: rato.

Tabela 4c – Altura, em micrômetros (μm), das vilosidades da neomucosa dos ratos do grupo 2.

<i>R6</i>	<i>R7</i>	<i>R8</i>	<i>R9</i>	<i>R10</i>
315,81	297,53	287,28	307,57	306,72
313,04	305,4	295,44	299,81	314,86
350,24	311,71	293,93	299,29	290,32
318,53	300,51	296,02	286,06	285,95
317,08	312,99	317,16	311,95	292,49
298,84	302,54	301,64	302,98	296,31
310,02	295,74	305,13	295,74	306,51
296,39	318,43	291,13	289,17	291,86
322,17	289,31	302,18	319,05	310,91
287,13	309,8	315,92	295,15	287,44

R: rato.

Tabela 4d – Altura, em micrômetros (μm), das vilosidades da neomucosa dos ratos do grupo 2.

<i>R11</i>	<i>R12</i>	<i>R13</i>	<i>R14</i>	<i>R15</i>
299,98	299,32	306,74	293,17	308,5
309,78	309,92	296,32	316,97	299,35
320,53	315,93	300,09	291,01	288,96
292,76	285,09	292,49	304,02	307,42
298,68	294,3	301,21	289,92	298,43
293,49	303,28	297,22	309,47	281,49
282,63	296,6	303,22	297,24	304,65
307,92	291,11	298,55	312,28	293,31
309,85	301,45	318,47	288,42	313,88
287,3	300,93	311,4	285,16	295,72

R: rato.

Tabela 5a – Altura, em micrômetros (μm), das vilosidades da mucosa adjacente dos ratos do grupo 3.

<i>R16</i>	<i>R17</i>	<i>R18</i>	<i>R19</i>	<i>R20</i>
272,11	275,45	285,43	295,52	276,31
245,63	273,3	276,16	294,88	265,34
254,64	264,7	280,74	288,08	257,43
272,96	266,8	295,9	279,74	283,86
267,58	268,32	283,92	270,7	287,05
268,75	275,52	284,12	284,79	275,96
240,44	269,67	280,9	289,19	253,05
248,32	254,32	279,37	272,25	262,56
257,13	270,97	287,18	275,43	259,73
261,29	256,13	285,1	280,21	270,91

R: rato.

Tabela 5b – Altura, em micrômetros (μm), das vilosidades da mucosa adjacente dos ratos do grupo 3.

<i>R21</i>	<i>R22</i>	<i>R23</i>	<i>R24</i>	<i>R25</i>
286,04	265,34	281,61	281,73	262,61
276,72	292,01	294,52	266,05	266,55
267,35	256,11	302,06	274,26	288,13
265,34	291,37	257,69	251,47	286,33
287,73	263,89	275,43	271,79	267,39
278,54	288,48	281,97	276,01	290,19
262,73	258,89	280,79	285,13	271,33
271,35	265,74	262,93	254,71	278,12
280,7	290,83	296,09	260,09	267,08
269,39	276,18	288,34	262,57	293,21

R: rato.

Tabela 5c – Altura, em micrômetros (μm), das vilosidades da neomucosa dos ratos do grupo 3.

<i>R16</i>	<i>R17</i>	<i>R18</i>	<i>R19</i>	<i>R20</i>
417,11	368,3	391,4	411,57	401,84
420,9	362,34	385,3	407,41	411,58
444,73	394,62	389,6	402,55	397,33
389,17	402,85	403,29	397,18	395,17
448,99	415,12	408,42	372,79	405,44
391,73	410,14	401,14	401,65	399,18
487,46	393,86	391,69	399,16	404,19
420,69	414,19	411,03	408,82	409,07
460,12	400,07	398,22	387,27	387,84
452,28	385,19	399,76	392,46	398,16

R: rato.

Tabela 5d – Altura, em micrômetros (μm), das vilosidades da neomucosa dos ratos do grupo 3.

<i>R21</i>	<i>R22</i>	<i>R23</i>	<i>R24</i>	<i>R25</i>
390,05	345,78	402,64	348,16	340,26
401,56	363,55	382,93	359,31	328,96
408,83	340,44	398,01	402	393,02
396,17	353,78	388,17	407,14	391,63
403,61	336,12	400,3	397,09	400,5
374,06	372,93	408,97	391,75	387,94
410,4	360,17	394,35	366,87	333,38
389,28	375,81	388,61	379,54	395,72
400,09	357,03	392,95	387,77	402,5
402,1	348,73	406,23	400,03	405,24

R: rato.

Tabela 6a – Superfície, em micrômetros quadrados (μm^2), das vilosidades da mucosa adjacente dos ratos do grupo 2.

<i>R6</i>	<i>R7</i>	<i>R8</i>	<i>R9</i>	<i>R10</i>
56.879,97	78.053,4	66.220,7	51.085,68	64.605,25
71.860,55	72.729,62	84.694,66	74.651,19	67.378,43
60.427,59	77.338,22	69.014,3	67.307,65	51.221,63
70.941,15	55.702,58	68.380,63	79.113,68	67.429,82
55.496,48	54.095,44	59.795,71	64.811	70.036,37
72.364,13	89.636,4	57.504,57	68.702,52	83.867,6
45.741,67	76.439,48	81.753,41	52.887,65	79.590,77
58.868,6	82.948,92	59.203,66	59.218,67	61.263,61
64.675,83	55.038	70.477,05	72.561,59	88.269,71
61.284,88	52.119,3	56.562,7	59.560,23	85.047,4

R: rato.

Tabela 6b – Superfície, em micrômetros quadrados (μm^2), das vilosidades da mucosa adjacente dos ratos do grupo 2.

<i>R11</i>	<i>R12</i>	<i>R13</i>	<i>R14</i>	<i>R15</i>
68.024,67	78.044,93	59.263,32	64.594,88	88.793,66
83.621,57	79.937,43	84.166,23	85.324,81	86.186,6
89.710,33	80.552,41	79.442,45	77.044,79	71.298,42
69.869,27	87.543,98	77.042,4	89.804,11	88.856,56
74.630,17	79.111,54	77.723,47	82.880,81	81.089,83
67.968,18	71.848,41	81.635,54	88.646,8	86.675,17
86.919,48	68.305,23	78.841,51	71.537,89	62.777,74
77.256,94	69.674,11	72.413,54	73.037,27	51.785,83
78.829,23	75.993,05	83.845,2	60.264,84	79.815,67
77.374,42	77.479,02	83.966,31	70.564,54	79.888,7

R: rato.

Tabela 6c – Superfície, em micrômetros quadrados (μm^2), das vilosidades da neomucosa dos ratos do grupo 2.

<i>R6</i>	<i>R7</i>	<i>R8</i>	<i>R9</i>	<i>R10</i>
89.316,18	75.103,72	74.426,15	95.930,9	74.007,68
86.165,84	81.494,05	87.098,04	92.370,67	84.308,46
77.606,4	74.243,2	73.692,43	71.704,68	84.917,55
63.448,33	81.332,83	74.445,12	87.380,56	77.234,93
82.488,26	54.487,08	85.627,85	94.563,18	96.394,27
70.485,5	73.158,44	70.943,58	59.751,04	77.617,2
82.848,15	68.194,26	88.870,3	79.349,6	81.516,27
61.402,11	70.730,88	72.099,23	88.749,68	75.615,31
85.474,89	71.501,66	84.715,85	83.305,33	72.937,48
84.891,49	77.629,03	93.404,43	73.874,99	88.725,35

R: rato.

Tabela 6d – Superfície, em micrômetros quadrados (μm^2), das vilosidades da neomucosa dos ratos do grupo 2.

<i>R11</i>	<i>R12</i>	<i>R13</i>	<i>R14</i>	<i>R15</i>
83.772,86	88.461,7	82.936,04	79.492,94	78.215,24
90.293,32	93.220,38	79.254,08	99.374,47	71.816
79.431,98	78.726,96	64.246,68	74.538,06	91.648,1
90.398,47	88.050,58	81.060,29	89.239,27	86.347,82
82.973,74	70.474,27	78.945,96	81.098,86	81.004,37
76.919,24	78.341,33	87.953,16	79.961,31	76.607,42
67.956,99	93.316,35	71.316,3	85.695,75	77.721,98
73.478,58	77.468,84	92.697,48	98.065,39	85.389,81
80.528,27	76.989,01	86.130,37	78.839,94	67.739,19
66.415,91	89.365,63	80.627,39	84.648,39	69.272,01

R: rato.

Tabela 7a – Superfície, em micrômetros quadrados (μm^2), das vilosidades da mucosa adjacente dos ratos do grupo 3.

<i>R16</i>	<i>R17</i>	<i>R18</i>	<i>R19</i>	<i>R20</i>
67.287,32	61.256,82	67.065,33	52.416,15	67.795,19
69.248,47	72.337,76	67.678,49	74.849,59	63.089,45
74.898,66	54.925,76	80.558,98	63.427,2	65.792,72
79.860,92	85.623,53	70.384,17	63.166,47	68.705,94
60.189,58	93.429,73	85.680,15	68.594,8	63.147,55
71.008,61	64.218,71	77.698,13	66.907,7	75.009,07
55.334,03	71.164,45	69.560,02	68.981,48	43.344,72
63.181,35	72.159,33	83.919,07	63.414,72	66.490,56
66.869,2	80.348,32	68.271,81	65.827,3	68.758,31
54.067,44	64.560,73	55.267,07	49.768,89	64.297,63

R: rato.

Tabela 7b – Superfície, em micrômetros quadrados (μm^2), das vilosidades da mucosa adjacente dos ratos do grupo 3.

<i>R21</i>	<i>R22</i>	<i>R23</i>	<i>R24</i>	<i>R25</i>
77.858,9	73.795,98	97.390,82	48.621,4	67.319,49
60.246,73	74.393,9	78.558,61	44.893,21	72.470,99
80.067,29	65.419,12	85.584,78	58.896,78	75.539,1
65.512,92	97.928,22	65.399,55	38.316,21	79.500,33
70.145,56	80.128,48	72.323,59	57.138,17	72.024,62
55.355,92	48.485,75	69.802,57	53.028,41	87.964,89
85.307,76	67.203,27	80.230,55	45.373,48	79.592,93
62.249	57.912,86	68.320,16	61.861,55	73.785,37
72.731,23	86.731,93	98.443,11	76.964,74	84.790,79
57.000,38	72.837,3	78.418,7	57.134,3	79.615,18

R: rato.

Tabela 7c – Superfície, em micrômetros quadrados (μm^2), das vilosidades da neomucosa dos ratos do grupo 3.

<i>R16</i>	<i>R17</i>	<i>R18</i>	<i>R19</i>	<i>R20</i>
143.183,4	133.397,7	127.174,1	126.696,7	158.237,4
163.312,6	140.644,6	126.726,7	155.509,3	159.752,6
132.290,7	139.084,4	121.628,9	153.258,6	153.946,2
122.332,9	140.402	131.685,7	169.972,6	124.754,8
150.882,3	159.024	149.710,1	128.617,5	159.527,6
137.709,1	119.787,7	113.442,4	118.587,2	138.272,4
167.384,5	134.777,2	128.600,1	138.911	129.359
121.310,6	139.124	141.538,1	145.824,8	167.093,2
147.502	128.331,5	130.145,1	126.866	129.444
149.295,7	117.223,6	139.533,2	126.564	131.405,2

R: rato.

Tabela 7d – Superfície, em micrômetros quadrados (μm^2), das vilosidades da neomucosa dos ratos do grupo 3.

<i>R21</i>	<i>R22</i>	<i>R23</i>	<i>R24</i>	<i>R25</i>
124.476,8	125.719,2	128.346,7	124.647,4	157.643,3
142.301,1	142.980,8	128.582,3	119.438,5	142.842,8
145.341,5	114.598	147.145,1	125.889,7	139.388,6
126.386,2	124.357,8	125.145,5	147.055,8	142.090,3
183.989,7	127.358	202.879,7	135.077,2	177.525,8
144.002,2	139.180,5	155.752,7	138.909,2	142.322
148.099,1	126.970,6	131.555,8	129.784,3	133.780,2
123.562,7	125.054,9	134.664,4	130.299,3	166.044,9
139.426,1	113.680,9	134.303,4	124.631	130.494,1
131.756,9	118.605,6	126.975,7	129.665,8	147.681,7

R: rato.

Tabela 8a – Profundidade, em micrômetros (μm), das criptas intestinais da mucosa adjacente dos ratos do grupo 2.

<i>R6</i>	<i>R7</i>	<i>R8</i>	<i>R9</i>	<i>R10</i>
138,14	148,55	176,17	164,63	181,95
158,97	175,21	183,41	179,06	169,33
153,58	150,04	157,3	197,01	196,06
151,35	172,8	171,87	170,4	197,23
130,16	169,83	155,65	175,07	179,04
145,8	164,38	169,16	168,17	167,76
135,46	160,15	190,86	183,59	169,27
159,02	158,39	170,14	187,45	158,24
162,33	159,96	188,03	191,59	182,45
147,76	166,08	157,11	153,18	160,22

R: rato.

Tabela 8b – Profundidade, em micrômetros (μm), das criptas intestinais da mucosa adjacente dos ratos do grupo 2.

<i>R11</i>	<i>R12</i>	<i>R13</i>	<i>R14</i>	<i>R15</i>
172,8	175,6	169,75	194,28	187,96
175,86	180,92	193,5	170,01	169,87
170,84	182,03	178,55	169,08	173,16
161,79	167,86	179,72	161,23	195,6
181,61	181,66	180,07	175,89	179,23
165,84	165,78	183,72	182,85	189,49
184,87	189,82	180,92	170,3	172,74
193,45	172,22	160,06	172,42	183,85
152,39	160,37	179,41	169,35	168,03
159,9	171,04	162,31	180,3	165,67

R: rato.

Tabela 8c – Profundidade, em micrômetros (μm), das criptas intestinais da neomucosa dos ratos do grupo 2.

<i>R6</i>	<i>R7</i>	<i>R8</i>	<i>R9</i>	<i>R10</i>
199,78	193,52	196,32	196,19	187,13
171,37	201,99	192,91	203,88	196,2
185,81	181,85	200,27	197,09	201,35
192,64	192,62	201,59	201,47	204,5
208,63	191,38	190,68	188,44	190,61
174,25	204,12	195,29	191,37	192,19
193,44	199,85	186,66	206,16	186,87
204,65	180,03	200,44	195,72	197,06
201,07	200,98	194,87	199,07	200,97
194,82	187,13	183,92	196,98	189,1

R: rato.

Tabela 8d – Profundidade, em micrômetros (μm), das criptas intestinais da neomucosa dos ratos do grupo 2.

<i>R11</i>	<i>R12</i>	<i>R13</i>	<i>R14</i>	<i>R15</i>
185,14	191,12	195,6	200,57	203,46
200,82	183,4	203,9	196,36	178,59
196,4	200,96	178,31	203,78	185,41
192,25	194,26	199,63	188,77	192,66
203,02	186,84	172,54	195,02	201,16
181,56	181,36	182,74	189,6	197,64
178,35	196,26	194,8	190,89	189,41
194,74	201,49	188,28	193,56	200,1
200,09	203,89	192,85	198,39	196,08
183,57	187,2	206,87	183,58	183,47

R: rato.

Tabela 9a – Profundidade, em micrômetros (μm), das criptas intestinais da mucosa adjacente dos ratos do grupo 3.

<i>R16</i>	<i>R17</i>	<i>R18</i>	<i>R19</i>	<i>R20</i>
127,73	138,29	173,28	153,7	151,01
148,64	140,03	178,61	159,35	154,27
131,68	134,65	170,58	168,92	156,71
143,3	140,08	176,93	158,82	142,38
130,47	144,85	169,27	166,34	162,5
136,88	147,31	160,64	163,27	153,06
133,17	145,28	166,32	165,41	144,14
139,41	136,19	162,89	170,12	153,99
140,03	132,84	171,22	162,07	165,16
142,15	142,3	174,18	160,87	150,87

R: rato.

Tabela 9b – Profundidade, em micrômetros (μm), das criptas intestinais da mucosa adjacente dos ratos do grupo 3.

<i>R21</i>	<i>R22</i>	<i>R23</i>	<i>R24</i>	<i>R25</i>
175,02	166,4	182,39	160,42	179,98
165,89	173,17	162,73	158,41	181,64
157,1	197,55	169,74	156,09	186,84
154,95	130,13	171,05	162,28	173,66
153,81	149,55	151,02	162,22	172,63
151,93	152,38	165,92	177,75	183,85
157,47	164,6	170,21	161,73	165,14
150,82	181,05	163,72	168,82	184,79
166,93	177,91	153,79	164,47	162,19
172,86	158,12	181,75	152,18	170,07

R: rato.

Tabela 9c – Profundidade, em micrômetros (μm), das criptas intestinais da neomucosa dos ratos do grupo 3.

<i>R16</i>	<i>R17</i>	<i>R18</i>	<i>R19</i>	<i>R20</i>
226,09	191,77	194,09	199,78	196,15
164,08	202,99	186,06	197,13	199,7
191,01	212,13	188,44	186,79	211,05
213,03	203,05	195,1	199,54	208,43
228,01	201,28	182,59	206,33	193,62
201,64	225,86	187,34	210,6	217,66
184,36	195,88	195,12	196,31	199,51
207,58	209,12	203,66	207,66	202,83
209,03	198,74	208,82	200,31	197,85
217,91	213,01	201,84	185,29	205,11

R: rato.

Tabela 9d – Profundidade, em micrômetros (μm), das criptas intestinais da neomucosa dos ratos do grupo 3.

<i>R21</i>	<i>R22</i>	<i>R23</i>	<i>R24</i>	<i>R25</i>
188,49	150,6	194,61	200,57	150,66
204,83	132,8	198,26	192,71	146,36
189,34	156,8	192,71	197,93	183,91
208,75	169,32	205,43	188,53	172,11
202,19	164,66	204,11	174,23	169,2
180,75	151,18	189,16	202,26	183,04
198,21	162,29	184,14	185,33	192,23
199,63	151,84	200,09	198,83	178,19
198,81	147,38	187,91	182,81	197,3
200,92	135,62	192,17	204,7	203,04

R: rato.

5.2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Quanto à altura das vilosidades (tabela 10), para os animais do grupo 2 foram obtidos valores entre 233,6 μm e 299,6 μm (média: 270,8 μm) para a mucosa adjacente, e entre 281,5 μm e 350,2 μm (média: 301,8 μm) para a neomucosa. Os valores obtidos no grupo 3 foram, respectivamente, de 240,4 μm a 302,1 μm (média: 274 μm) e de 329 μm a 487,5 μm (média: 393,6 μm).

Em relação à superfície das vilosidades (tabela 11), os valores obtidos no grupo 2 foram de 45.741,7 μm^2 a 89.804,1 μm^2 (média: 72.167,6 μm^2) para a mucosa adjacente, e de 54.487,1 μm^2 a 99.374,5 μm^2 (média: 80.260,5 μm^2) para a neomucosa. No grupo 3 foram, respectivamente, de 38.316,2 μm^2 a 98.443,1 μm^2 (média: 69.124,6 μm^2) e de 113.442,4 μm^2 a 202.879,7 μm^2 (média: 138.082 μm^2).

Referentes à profundidade das criptas (tabela 12), os valores obtidos no grupo 2 foram de 130,2 μm a 197,2 μm (média: 171,3 μm) para a mucosa adjacente, e de 171,4 μm a 208,6 μm (média: 193,5 μm) para a neomucosa. No grupo 3 foram, respectivamente, de 127,7 μm a 197,6 μm (média: 159,6 μm) e de 132,8 μm a 228 μm (média: 192,1 μm).

A análise de variância foi utilizada para a comparação das médias das medidas de altura das vilosidades, superfície das vilosidades e profundidade das criptas intestinais, verificando se existe diferença estatística significativa entre as medidas para a mucosa adjacente e a neomucosa.

Tabela 10 – Altura média das vilosidades intestinais para os grupos 2 (quatro semanas) e 3 (oito semanas).

	Grupos	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
2	Neomucosa	301,8*	11,2	281,5	350,2
2	Mucosa adjacente	270,8	13,0	233,6	299,6
3	Neomucosa	393,6*	25,4	329,0	487,5
3	Mucosa adjacente	274,0	12,9	240,4	302,1

* p-valor < 0,001 (ANOVA – análise de variância).

Tabela 11 – Superfície média das vilosidades intestinais para os grupos 2 (quatro semanas) e 3 (oito semanas).

	Grupos	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
2	Neomucosa	80260,5*	8816,2	54487,1	99374,5
2	Mucosa adjacente	72167,6	11036,3	45741,7	89804,1
3	Neomucosa	138082,0*	15882,9	113442,4	202879,7
3	Mucosa adjacente	69124,6	11859,3	38316,2	98443,1

* p-valor < 0,001 (ANOVA – análise de variância).

Tabela 12 – Profundidade média das criptas intestinais para os grupos 2 (quatro semanas) e 3 (oito semanas).

	Grupos	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
2	Neomucosa	193,5*	8,1	171,4	208,6
2	Mucosa adjacente	171,3	13,9	130,2	197,2
3	Neomucosa	192,1*	19,0	132,8	228,0
3	Mucosa adjacente	159,6	14,8	127,7	197,6

* p-valor < 0,001 (ANOVA – análise de variância).

Em ambos os grupos 2 e 3, verificou-se diferença estatística significativa entre os valores morfométricos para a neomucosa e mucosa adjacente normal, sendo que:

1. a neomucosa apresenta altura das vilosidades estatisticamente maior do que a mucosa adjacente, com p-valor menor que 0,0001;
2. a neomucosa apresenta superfície das vilosidades estatisticamente maior do que a mucosa adjacente, com p-valor menor que 0,0001;
3. a neomucosa apresenta profundidade das criptas estatisticamente maior do que a mucosa adjacente, com p-valor menor que 0,0001.

O teste da análise de variância também permitiu a comparação das medidas entre os grupos 2 e 3 para as mesmas variáveis, verificando-se que:

1. a altura das vilosidades na neomucosa do grupo 3 (oito semanas) é estatisticamente maior do que na neomucosa do grupo 2 (quatro semanas), com p-valor menor que 0,0001 (figura 28);

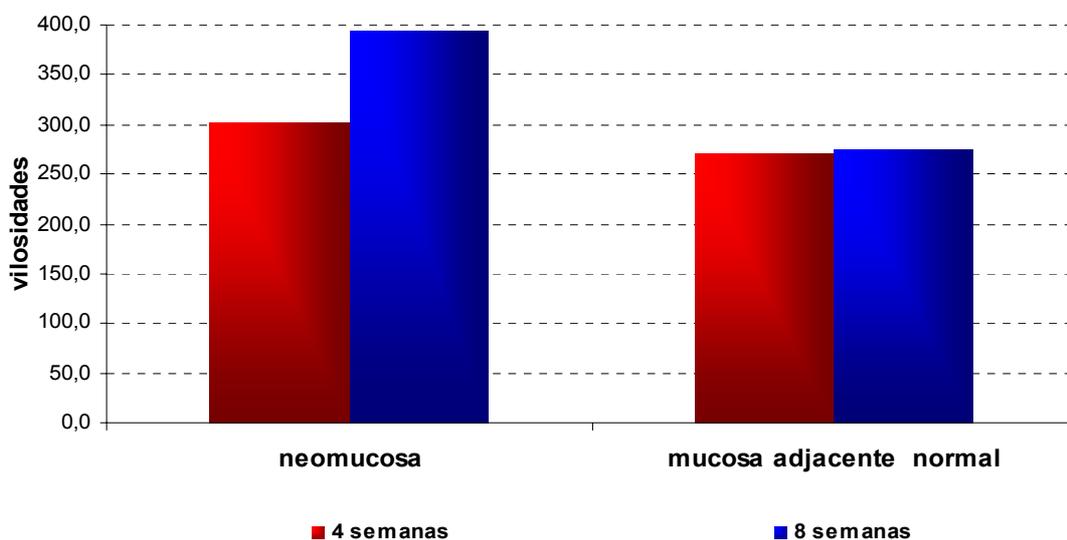


Figura 28 – Gráfico de barras que representam as médias das alturas das vilosidades intestinais, tanto da neomucosa quanto da mucosa adjacente, nas diferentes semanas da eutanásia.

2. a superfície das vilosidades na neomucosa do grupo 3 (oito semanas) é estatisticamente maior do que na neomucosa do grupo 2 (quatro semanas), com p-valor menor que 0,0001 (figura 29);

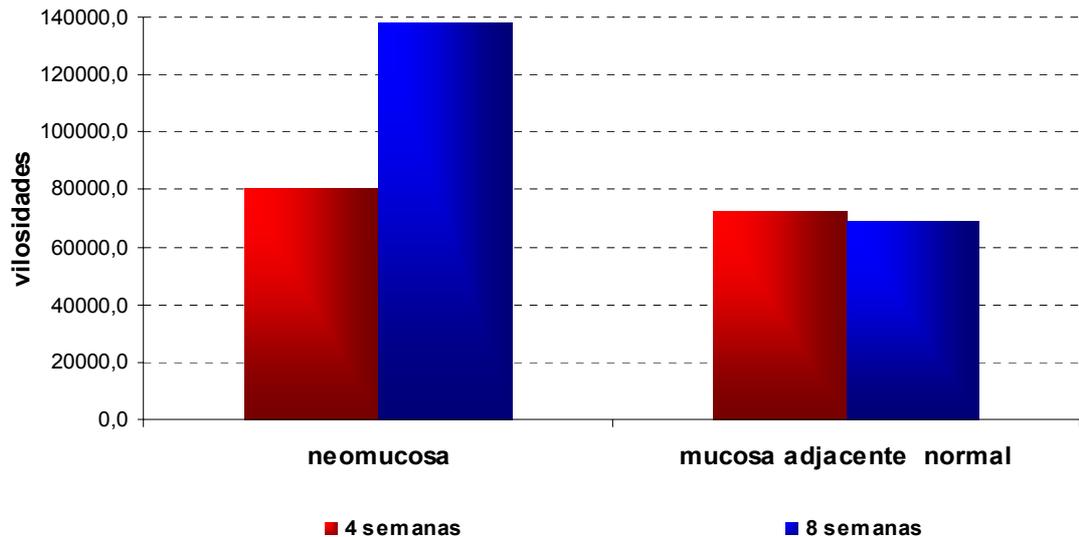


Figura 29 – Gráfico de barras que representam as médias das superfícies das vilosidades intestinais, tanto da neomucosa quanto da mucosa adjacente, nas diferentes semanas de eutanásia.

3. a profundidade das criptas na neomucosa do grupo 3 (oito semanas) é semelhante à neomucosa do grupo 2 (quatro semanas), com p-valor igual a 0,05 (figura 30).

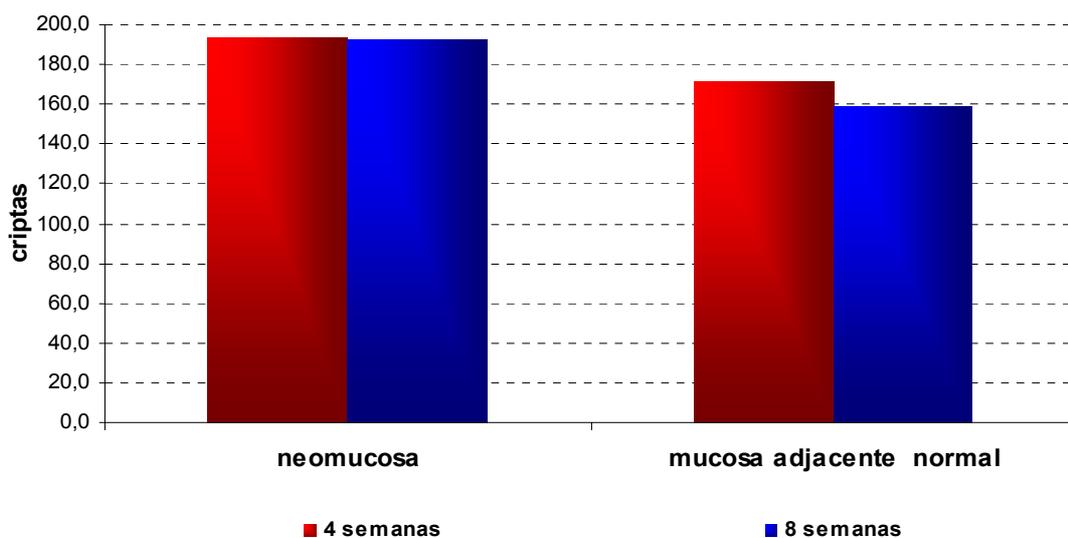


Figura 30 – Gráfico de barras que representam as médias das profundidades das criptas intestinais, tanto da neomucosa quanto da mucosa adjacente, nas diferentes semanas de eutanásia.

Para verificar onde ocorreu a diferença entre os grupos 2 e 3, baseado nos mesmos valores de altura e superfície das vilosidades e profundidade das criptas, o teste t de *Student* foi empregado (tabelas 13, 14 e 15) e demonstrou que:

1. a altura e a superfície das vilosidades na neomucosa do grupo 3 são estatisticamente maiores do que na neomucosa do grupo 2, com p-valor menor que 0,0001;
2. a profundidade das criptas não apresenta diferença estatística significativa entre os grupos 2 e 3, com p-valor igual a 0,483;
3. a altura e a superfície das vilosidades na mucosa adjacente não apresenta diferença estatística significativa entre os grupos 2 e 3, com p-valor igual a 0,1801 e 0,0778, respectivamente;
4. a profundidade das criptas na mucosa adjacente do grupo 3 é estatisticamente menor do que na mucosa adjacente do grupo 2, com p-valor menor que 0,0001;

5. a altura e a superfície das vilosidades e a profundidade das criptas são estatisticamente maiores na neomucosa de ambos os grupos, quando comparada à mucosa adjacente, com p-valor menor que 0,0001.

Tabela 13 – Comparação das médias das alturas das vilosidades intestinais, pós-teste t de *Student*.

<i>Tecido analisado por período</i>	<i>p-valor</i>
Neomucosa (4 e 8 semanas)	<,0001
Mucosa adjacente (4 e 8 semanas)	0,1801
Neomucosa e mucosa adjacente - 4 semanas	<,0001
Neomucosa e mucosa adjacente - 8 semanas	<,0001

Tabela 14 – Comparação das médias das superfícies das vilosidades intestinais, pós-teste t de *Student*.

<i>Tecido analisado por período</i>	<i>p-valor</i>
Neomucosa (4 e 8 semanas)	<,0001
Mucosa adjacente (4 e 8 semanas)	0,0778
Neomucosa e mucosa adjacente - 4 semanas	<,0001
Neomucosa e mucosa adjacente- 8 semanas	<,0001

Tabela 15 – Comparação das médias das profundidades das criptas intestinais, pós-teste t de *Student*.

<i>Tecido analisado por período</i>	<i>p-valor</i>
Neomucosa (4 e 8 semanas)	0,483
Mucosa adjacente (4 e 8 semanas)	<,0001
Neomucosa e mucosa adjacente - 4 semanas	<,0001
Neomucosa e mucosa adjacente - 8 semanas	<,0001

6. DISCUSSÃO

6.1 – DA AMOSTRA

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*) por serem animais de pequeno porte, padronizáveis para o uso em laboratório e por serem modelos experimentais empregados em diversos estudos da regeneração tecidual intestinal.

O tamanho da amostra foi adequado e satisfatório para a análise, já que o material do experimento foi considerado de pouca variabilidade: os animais foram do mesmo sexo, machos, apresentaram idades muito próximas, de 12 a 13 semanas, e pesos aproximados, de 300 g a 360 g. Ainda, a revisão da literatura revelou o pequeno número de animais utilizados para a observação do crescimento de neomucosa intestinal, sendo a resposta considerada de pouca variância entre os estudos (EREZ e col., 1992; BERMEJO e col., 1993; SIMÕES e col., 1995; PARNIGOTTO e col., 2000; WANG e col., 2003; GÜNSAR e col., 2004; WANG e col., 2005 e STELZNER e CHEN, 2006).

Também, o modelo experimental com ratos permite boa observação do desenvolvimento tecidual de nova mucosa intestinal num período de tempo relativamente curto, quatro semanas no mínimo, como relatam os estudos de PARNIGOTTO e col. (2000), WANG e col. (2003) e WANG e col. (2005). Com oito semanas pós-operatórias, as superfícies utilizadas para a regeneração intestinal estão completamente recobertas por novo epitélio mucoso. Outros modelos animais necessitam mais tempo de espera para a observação do completo preenchimento da superfície de sustentação com neomucosa intestinal, sendo de até 20 semanas para os coelhos, como descrevem BARLAS e col. (1992), e de até 12 semanas para os cães, segundo relato de CHEN e BADYLAK (2001).

6.2 – DOS PROCEDIMENTOS

6.2.1 – Da matriz acelular

O presente estudo utilizou técnica detergente-enzimática para a obtenção da matriz acelular, conforme proposto por MEEZAN e col (1975) e sugerido no preparo de tecido gastrointestinal por PARNIGOTTO e col. (2000). O método mostrou-se muito eficaz, sendo verificado o desenvolvimento de um tecido rico numa malha de colágeno e sem nenhum conteúdo celular, como demonstrado pela coloração especial pelo vermelho picrossírius. MEEZAN e col. (1975) foram os pioneiros no desenvolvimento do tratamento detergente-enzimático de tecidos para a obtenção de membranas basais, mantendo sua ultra-estrutura funcional e propriedades físico-químicas, inclusive quanto à composição de carboidratos e aminoácidos.

A obtenção de matriz acelular tem por princípio que o produto final seja uma malha de colágeno e de outras proteínas de sustentação, aproximando-se o máximo possível da matriz extracelular natural dos organismos multicelulares. Trata-se do desenvolvimento de uma superfície de apoio com ambiente favorável, que retenha as propriedades físico-químicas adequadas para a regeneração tecidual (BADYLAK, 2002; YAMADA e col., 2003 e ROCHA e WHANG, 2004).

BOROJEVIC (1999) afirma que “a auto-organização de um sistema extremamente complexo, tal como a matriz extracelular, pode manter a memória de períodos precedentes na própria organização, a qual pode, subseqüentemente, ser determinante para a constituição de unidades multicelulares funcionais”.

Neste estudo, foram utilizados segmentos de intestino delgado de ratos para a obtenção da matriz acelular. Os órgãos, tratados com o detergente

deoxicolato de sódio, em soluções a 4%, tiveram suas membranas celulares solubilizadas. Uma vez que o conteúdo de ADN extravasado tende a formar um gel viscoso ao redor dos tecidos durante o tratamento com o deoxicolato, uma autólise celular prévia em água destilada, seguida de tratamento com deoxirribonuclease, foi necessária para a prevenção da aglutinação dos restos celulares em contato com o detergente. O resultado final foi uma superfície de apoio com resistência para a fixação sobre o intestino delgado de outros ratos.

PARNIGOTTO e col. (2000) utilizaram o mesmo método de obtenção da matriz acelular descrito anteriormente, porém com o tratamento de tecido gástrico. Relataram que todo o procedimento teve que ser repetido por três vezes. No presente estudo, a seqüência de tratamento detergente-enzimático dos tecidos foi feita apenas por uma vez, já que o intestino delgado tem parede muito mais fina que o estômago. Outra vantagem do uso de intestino delgado foi a utilização de apenas três animais para processar a matriz acelular usada em 25 ratos.

Outros estudos (CHEN e BADYLAK, 2001; WANG e col., 2003 e WANG e col., 2005) têm descrito a utilização da submucosa do intestino delgado, matriz extracelular natural, obtida pela remoção mecânica das camadas seromuscular e mucosa, conforme descrito por BADYLAK e col. (1989). A técnica parece apresentar a desvantagem de ser procedimento delicado, com obtenção de camadas extremamente finas de tecido acelular, necessitando a formação de retalhos com várias camadas sobrepostas para a interposição no trato intestinal.

No presente trabalho, a matriz obtida, com o tratamento detergente-enzimático, mostrou-se resistente e permitiu a anastomose com o intestino delgado sem esgarçamento e com o uso de camada única para a aposição.

6.2.2 – Da operação

A escolha do segmento de íleo terminal para a aposição do retalho de matriz acelular foi determinada pelo conhecimento sobre as diferenças fisiológicas especializadas entre jejuno e íleo, conforme relataram THOMPSON e col. (1985). Eles verificaram crescimento diferenciado de neomucosa ao longo do intestino delgado, sendo mais rápido o crescimento tecidual sobre retalhos aplicados ao íleo terminal. Esse fato pode representar diferenças no conteúdo da luz intestinal, fatores humorais locais, crescimento intrínseco e capacidade adaptativa entre aqueles segmentos intestinais.

Neste trabalho, a aposição do retalho de matriz acelular foi feita na continuidade do segmento intestinal escolhido, sem desvio do trânsito intraluminal e sem criação de estomas. O objetivo foi o de verificar a formação de nova mucosa intestinal no órgão em plena função. Segundo THOMPSON e col. (1986), que observaram haver melhor desenvolvimento das vilosidades da neomucosa em retalhos interpostos no segmento intestinal íntegro do que no segmento desviado, a exposição ao conteúdo intraluminal parece ser importante para o crescimento de neomucosa.

Os estudos de PARNIGOTTO e col. (2000) e de WANG e col. (2003 e 2005) também indicaram crescimento de nova mucosa sobre tecidos acelulares interpostos no íleo, porém com alças isoladas do trânsito intestinal.

CHEN e BADYLAK (2001) descreveram técnica semelhante da aposição de matriz acelular, recobrando defeitos do intestino delgado, com fixação, porém, do grande omento sobre os retalhos, para minimizar e conter potenciais deiscências da anastomose. No presente trabalho, não foi utilizado o grande omento e nem alças intestinais para proteger as anastomoses. A matriz acelular foi avaliada isoladamente, ou seja, sem fatores adjuvantes de neovascularização.

Quanto ao tamanho dos retalhos, foram obtidos fragmentos de matriz acelular de três centímetros de comprimento por um centímetro de largura, após o tratamento detergente-enzimático de todo o intestino delgado. A utilização de retalhos não muito grandes foi devida ao fato de que o crescimento de neomucosa intestinal é mais eficiente sobre pequenas lesões quando comparado a lesões maiores, ou melhor, a observação do crescimento de um novo tecido será mais rápida sobre pequenos defeitos do que aquela sobre grandes defeitos (BRAGG e THOMPSON, 1986).

Uma vez que o estudo teve por objetivo a verificação do crescimento de neomucosa na continuidade do trânsito intestinal, os retalhos de matriz acelular não foram tubulizados porque, como foi descrito por CHEN e BADYLAK (2001) e PAHARI e col. (2006), as tentativas de interposição de tubos de matriz acelular no intestino delgado não desviado resultam em complicações graves, com deiscências de anastomoses e desenvolvimento de peritonite. Outros estudos fazem a interposição de tubos de matriz acelular com os segmentos intestinais isolados por dois estomas nas extremidades, diminuindo o risco de complicações (PARNIGOTTO e col., 2000; WANG e col., 2003 e WANG e col., 2005).

As anastomoses entre os retalhos de matriz acelular e a parede do íleo terminal foram feitas com o uso de fio monofilamentar de polipropileno 6-0, para permitir menor manipulação dos tecidos, uma vez que os fragmentos de matriz acelular são muito finos e delicados, e os fios monofilamentares deslizam mais facilmente e causam menor trauma. O uso de fio inabsorvível também permitiu identificação mais fácil dos retalhos apostos, no momento da segunda operação, para a retirada das peças para a avaliação histológica.

A fixação dos tempos para a eutanásia em duas, quatro e oito semanas de período pós-operatório foi baseada na literatura, com a observação do crescimento de neomucosa já a partir da segunda semana de aposição dos retalhos de matriz acelular (PARNIGOTTO e col., 2000; WANG e col., 2003 e

WANG e col., 2005), ou mesmo com o uso de outras superfícies como, por exemplo, o tecido muscular (SIMÕES e col., 1995 e ASLAN e col., 2003) e dura-máter (BERMEJO e col., 1993).

6.2.3 – Do exame histológico e da avaliação morfométrica

Todo o material foi corado pelo método da hematoxilina-eosina e foi considerado suficiente e adequado para a verificação das alterações sobre a matriz acelular ao longo do tempo, bem como para a observação do crescimento de nova mucosa intestinal. A coloração H.E. permitiu tanto a identificação da arquitetura das vilosidades intestinais, quanto dos componentes celulares específicos da mucosa intestinal, como as células caliciformes e enterócitos ao longo do epitélio colunar simples das vilosidades e as células de Paneth, formando agregados na base das criptas intestinais ou glândulas de Lieberkuhn.

Para a análise da matriz acelular também foi utilizada a coloração pelo vermelho picrossírius, técnica histoquímica específica para a detecção e quantificação de fibras colágenas. Quando examinadas através de luz polarizada, as fibras colágenas largas são alaranjadas e as mais finas, incluindo as fibras reticulares, aparecem verdes. De acordo com JUNQUEIRA, BIGNOLAS e BRENTANI (1979), a birrefringência, à luz polarizada, é altamente específica para o colágeno. A aplicação do vermelho picrossírius revelou a integridade das fibras colágenas na matriz tecidual acelular, bem como permitiu a análise delas ao longo do período de observação depois da interposição da matriz no intestino delgado, sendo observada a organização do colágeno na nova camada submucosa em formação.

O estudo morfométrico aplicado, altura das vilosidades e profundidade das criptas, permitiu uma avaliação quantitativa do estado da mucosa intestinal. É um método amplamente utilizado em pesquisas em que a morfometria é necessária, tendo a desvantagem de que a análise ocorre num plano

bidimensional. Para complementar o estudo morfométrico, optou-se pelo cálculo da superfície das vilosidades intestinais, descrito por SADAY e MIR (1996). Os autores relataram o emprego de uma fórmula matemática para o cálculo da superfície da vilosidade, que forneceu mais informações quanto ao desenvolvimento da mucosa.

6.3 – DOS RESULTADOS

Apesar das aderências que foram observadas em todos os animais, por ocasião da aposição do retalho de matriz acelular, não houve deiscências de anastomoses nem a formação de fístulas durante a observação no período de duas a oito semanas depois da operação. Algumas particularidades podem explicar a não-ocorrência de complicações maiores no presente estudo como o tipo e a forma do retalho interposto.

Primeiramente, a matriz utilizada, desenvolvida a partir da totalidade da parede do intestino delgado de ratos, mostrou-se resistente quanto à anastomose ao intestino de outros ratos. O modelo seromuscular proporcionou maior quantidade de tecido colágeno de sustentação para a aposição, uma vez que toda a matriz extracelular de todas as camadas do intestino, inclusive a membrana basal do epitélio mucoso, conforme foi mostrado pela coloração com o vermelho picrossírius, foi preservada após o preparo detergente-enzimático. Este fato é contrário aos resultados de CHEN e BADYLAK (2001), WANG e col. (2003) e WANG e col. (2005), em que os autores aplicaram matrizes acelulares compostas somente de fibras colágenas da camada submucosa do intestino delgado e tiveram 13,5%, 10% e 10%, respectivamente, de deiscência da anastomose, com o desenvolvimento de peritonite.

A forma do retalho apostado, quer dizer, o uso de um retalho aberto e anastomosado a uma região da parede do intestino delgado, e não-tubulizado e inserido entre duas extremidades do intestino, também pode explicar a não-

ocorrência de deiscências. Os trabalhos que relatam o uso de material tubulizado (CHEN e BADYLAK, 2001 e PAHARI col., 2006) descrevem complicações graves como a peritonite ou a estenose dos tubos de matriz, quando na continuidade do trânsito intestinal. Também é descrita a necessidade do uso de moldes de látex nos tubos para que não ocorra estenose precoce do tecido (THOMPSON, 1990).

Este trabalho também não evidenciou rejeição da matriz acelular e corroborou os dados da literatura. Algumas explicações recaem sobre o fato de ter sido utilizado material homólogo à amostra, conforme havia descrito PARNIGOTTO e col. (2000) e por ser a matriz relativamente isenta de substâncias antigênicas, uma vez que todos os componentes celulares são eliminados com o processamento do intestino delgado restando apenas o colágeno, substância reconhecidamente menos antigênica e com resposta inflamatória mínima (FURTHMAYR e TIMPL, 1976).

Essa característica da resposta inflamatória mínima do colágeno permite maior aceitação da aposição do retalho a outros organismos, além de seu remodelamento, depois da sua inserção. ALLMAN, MCPHERSON e BADYLAK (2001) afirmam que a matriz extracelular do intestino delgado, rica em colágenos dos tipos I e III (BADYLAK, 2002), determina resposta imunitária restrita à via do complexo de histocompatibilidade H2 (CHP), com alelos da Classe II fracamente reconhecidos em combinação com antígenos do colágeno, sem a produção, portanto, de células T-auxiliadoras ativadas em número suficiente para uma resposta imunitária.

Outra explicação para a não-ocorrência de rejeição do retalho foi feita por VANDERREST e GARRONE (1991); já que o colágeno manteve sua seqüência peptídica inalterada no curso da evolução das espécies animais, as fontes de matrizes ricas em colágenos, usadas no reparo tecidual, são materiais de baixo potencial antigênico.

O presente trabalho expôs a cinética do desenvolvimento de nova mucosa intestinal sobre a matriz acelular. No material obtido em duas semanas após a operação, a observação do infiltrado de células inflamatórias e de células fibroblásticas mostra um preparo inicial daquela matriz para a invasão das células epiteliais intestinais.

Após a adesão de células inflamatórias e fibroblastos, parece ocorrer a produção de citocinas e fatores de crescimento que irão preparar o ambiente para o recebimento de células especiais e posterior interação intercelular, enriquecendo a matriz com novas proteínas de sustentação e adesão, como o colágeno tipo VI e a fibronectina e lubrificação da matriz com a interposição do gel de glicosaminoglicanos (BADYLAK, 2002).

Novos capilares sangüíneos foram observados na superfície da matriz acelular, já com duas semanas do período pós-operatório. Notou-se uma disposição, dos novos vasos sangüíneos, perpendicular à superfície da matriz, com direção até a luz intestinal. Parece ter ocorrido uma invasão de células endoteliais oriundas da camada serosa do intestino adjacente e do grande omento que, eventualmente, encontrava-se recobrando o retalho interposto. BADYLAK, RECORD, LINDBERG, HODDE e PARK (1998) descreveram a adesão, proliferação e crescimento tridimensional de estruturas tubulares semelhantes a vasos sangüíneos sobre matriz acelular formada pela submucosa do intestino delgado. A invasão celular endotelial e posterior organização vascular são dependentes da presença de fibronectina, responsável pela estabilização do processo de regeneração (BADYDLAK, LIANG, RECORD, TULLIUS e HODDE, 1999 e ARMSTRONG e ARMSTRONG, 2000).

Uma vez que a matriz acelular permite a revascularização, ela provê um microambiente viável para a invasão de outras células especializadas, no sentido de regenerar um novo tecido semelhante ao adjacente.

Tanto nos animais com duas semanas, quanto naqueles com quatro semanas após a intervenção cirúrgica, observou-se penetração das células

epiteliais a partir da extremidade da matriz. Com duas semanas, observou-se a formação de estruturas semelhantes às vilosidades intestinais, com camada única de células epiteliais. Presume-se que a formação do novo tecido ocorra por proliferação celular nas criptas da mucosa normal adjacente e migração epitelial ao longo do retalho desde suas extremidades (BRAGG e THOMPSON, 1986).

Com oito semanas no período pós-operatório toda a superfície interna da matriz estava recoberta por mucosa intestinal semelhante à mucosa adjacente. À microscopia, revelaram-se vilosidades e criptas intestinais bem estruturadas e com diferenciação celular organizada ao longo do epitélio intestinal. O resto da matriz apresentou reorganização das fibras colágenas, e mesmo com a delimitação da submucosa intestinal. Esses achados estão de acordo com os relatos de PARNIGOTTO e col. (2000), WANG e col. (2003), GÜNSAR e col. (2004), WANG e col. (2005) e STELZNER e CHEN (2006).

O estudo morfométrico da nova mucosa intestinal, formada com quatro e oito semanas pós-operatórias, revelou hipertrofia das vilosidades e das criptas intestinais quando comparadas à mucosa adjacente normal, com altura e superfície das vilosidades e profundidade das criptas estatisticamente maiores. Parece ocorrer maior estímulo proliferativo do epitélio intestinal por influência de fatores locais da luz do intestino (THOMPSON e col., 1985 e THOMPSON e col., 1986). Uma vez que o retalho encontra-se na presença do trânsito intestinal normal, isso explicaria a hipertrofia observada no estudo. Outros autores, PARNIGOTTO e col. (2000), WANG e col. (2003), GÜNSAR e col. (2004) e WANG e col. (2005), descrevem uma neomucosa menor que a mucosa adjacente, porém funcionalmente semelhante. Ao longo de várias semanas, acima de 12, relatam uma semelhança morfométrica com a mucosa normal. Contudo, todos esses autores verificaram o crescimento de neomucosa em segmentos intestinais isolados, o que, como foi discutido, predispõe a formação de mucosa intestinal hipotrófica.

As diferenças morfométricas também foram observadas quando comparadas as neomucosas com quatro e oito semanas pós-operatórias, sendo a neomucosa com oito semanas estatisticamente maior em relação aos parâmetros altura e superfície das vilosidades. Credita-se tal diferença à progressão do desenvolvimento ao longo do tempo, com exposição aos fatores de crescimento que vão apresentando maior resposta positiva sobre as novas células epiteliais em replicação e maturação. Esse fato parece resultar de uma memória celular transmitida às células da regeneração tecidual quanto à sua capacidade de replicação (POTTEN e MORRIS, 1988).

Concomitantemente à observação do crescimento de neomucosa ao longo das semanas, houve contração progressiva do retalho apostado, sendo de 24,5% com duas semanas, 49,7% com quatro semanas e alcançando 53,5% com oito semanas no período pós-operatório. A maioria dos autores concorda quanto ao percentual de contração do retalho apostado, com a média de 50% às oito semanas de observação (BERMEJO e col., 1993, WANG e col., 2003 e WANG e col., 2005). CHEN e BADYLAK (2001) descreveram uma contração aproximada dos retalhos de 35% nas primeiras duas semanas do período pós-operatório; com 16 semanas, a área havia contraído 50% do original e com 12 meses, 80%. Segundo esses autores, a matriz formada por uma rede de colágeno será reintegrada na parede do órgão e não se verificará mais o local tratado com um retalho, três meses após.

Assim, a quantidade de neomucosa obtida por retalhos será dependente da taxa de crescimento do novo tecido e da contração do defeito inicial que ocorre usualmente sobre a cicatrização de feridas (BRAGG e col., 1987). Contudo, essa redução de aproximadamente metade da superfície inicial do retalho se traduz em menor aumento da área da superfície de absorção intestinal requerida e configura limitação para a técnica.

Na engenharia de tecido intestinal, o aspecto mais desafiador está no desenvolvimento de atividade peristáltica do intestino regenerado,

principalmente quando se utilizam segmentos tubulizados de matriz acelular. Essa fisiologia dependerá do desenvolvimento muscular liso e da reinervação.

O presente trabalho não demonstrou o crescimento ou desenvolvimento de células musculares lisas, e muito menos a sua disposição nas camadas muscular circular e longitudinal. O estudo atual não foi além de oito semanas de observação, pois teve como objetivo, apenas, analisar a possibilidade do modelo do desenvolvimento e do crescimento de nova mucosa intestinal sobre matriz acelular.

Apesar de PARNIGOTTO e col. (2000) descreverem a presença de células musculares lisas já na terceira semana após a interposição dos retalhos, CHEN e BADYLAK (2001), WANG e col. (2003) e WANG e col. (2005) observaram o crescimento de tecido muscular a partir de 12 semanas de pós-operatório. Nesses trabalhos, o tempo de observação do crescimento tecidual vai até 48 semanas do pós-operatório para a interposição da matriz acelular. Duas são as teorias para a explicação da regeneração muscular: a possibilidade do desenvolvimento a partir de células-tronco do intestino do hospedeiro ou a partir da produção pelos pericitos que acompanham as células endoteliais que invadem o retalho (SANDUSKY e cols., 1992).

Os resultados do presente estudo indicam que ocorre o desenvolvimento de nova mucosa do intestino delgado sobre matriz acelular, e que há mais crescimento quando comparado à mucosa adjacente do intestino normal. Essa constatação tem o potencial de ser alternativa satisfatória nos estudos da substituição do intestino doente. Ainda mais, o uso da matriz acelular, derivada do intestino delgado com todas as suas camadas, permite a regeneração tecidual sobre material mais resistente que a simples camada submucosa do intestino e com a característica de ser biodegradável.

Estudos adicionais serão necessários para a análise dos aspectos funcionais do novo tecido intestinal quanto à função absorptiva da mucosa e regeneração muscular e nervosa.

7. CONCLUSÃO

Nas condições em que foi realizado o presente estudo, conclui-se que: há formação de nova mucosa intestinal sobre retalhos de matriz acelular, apostos em segmento intestinal íntegro de ratos; a neomucosa apresenta histologia e morfologia semelhantes à mucosa intestinal normal.

8. REFERÊNCIAS

- Allman AJ, Mcpherson TB, Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a TH2-restricted immune response. *Transplantation* 2001;71:1631-40.
- Armstrong PB, Armstrong MT. Intercellular invasion and the organizational stability of tissues: a role for fibronectin. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470:9-20.
- Aslan A, Boneval C, Elpek O, Gelen T, Melikoglu M. Omentum pediculed musculo-peritoneal flap (OPMP) for growing intestinal neomucosa in a rat model. *Swiss Med Wkly* 2003;133:392-7.
- Astarcioğlu H, Koçdor MA, Sökmen S, Karademir S, Özer E, Bora S. Comparison of different surgical repairs in the treatment of experimental duodenal injuries. *Am J Surg* 2001;181:309-12.
- Avansino JR, Chen DC, Woolman JD, Hoagland VD, Stelzner M. Engraftment of mucosal stem cells into murine jejunum is dependent on optimal dose of cells. *J Surg Res* 2006;132:74-9.
- Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:377-83.
- Badylak SF, Lantz G, Coffey A, Geddes LA. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J Surg Res* 1989;47:74-80.
- Badylak SF, Liang A, Record R, Tullius R, Hodde J. Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold. *Biomaterials* 1999;20:2257-63.
- Badylak SF, Record R, Lindberg K, Hodde J, Park K. Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. *J Biomater Sci* 1998;9:863-78.

- Barlas M, Gökçora H, Erekuş S, Dindar H, Yücesan S. Human amniotic membrane as a intestinal patch for neomucosal growth in the rabbit model. *J Pediatr Surg* 1992;27:597-601.
- Barrera DA, Zylstra E, Lansbury PT, Langer R. Synthesis and RGD peptide modification of a new biodegradable copolymer: poly(lactic acid-co-lysine). *J Am Chem Soc* 1993;115:11010-11.
- Bender HW, Sebor J, Zuidema GD. Serosal patch grafting for closure of posterior duodenal defects. *Am J Surg* 1968;115:103-7.
- Bergsma JE, Rozema FR, Bos RRM, Rozendaal AWM, Jong WH, Teppema JS, Joziase CAP. Biocompatibility and degradation mechanism of predegraded and non-degraded poly(lactide) implants: an animal study. *Mater Med* 1995;6:715-24.
- Bermejo JPH, Albasini JLA, Egea AM, Garcia PLM, Carmona GZ, Paricio PP. Neoformación de mucosa intestinal sobre parches de duramadre. Aplicación en el tratamiento quirúrgico del síndrome de intestino corto. Estudio experimental en ratas. *Cir Pediatr* 1993;6:133-6.
- Bhrany AD, Beckstead BL, Lang TC, Farwell DG, Giachelli CM, Ratner BD. Development of an esophagus acellular matrix tissue scaffold. *Tissue Eng* 2006;12:319-30.
- Binnington HB, Siegel BA, Kissane JM, Ternberg JL. A technique to increase jejunal mucosa surface area. *J Pediatr Surg* 1973;8:765-9.
- Binnington HB, Summer H, Lesker P, Alpers D, Ternberg JL. Functional characteristics of surgically induced jejunal neomucosa. *Surgery* 1974;75:805-10.
- Binnington HB, Tumbleson ME, Ternberg JL. Use of jejunal neomucosa in the treatment of the short gut syndrome in pigs. *J Pediatr Surg* 1975;10:617-21.
- Bissell MJ, Hall HG, Parry G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* 1982;99:31-68.

- Borojevic R. Extracellular matrix: understanding the complexity. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:497-9.
- Boudreau N, Myers C, Bissell MJ. From lamini to lamin: regulation of tissue-specific gene expression by the EGM. *Trends Cell Biol* 1995;5:1-4.
- Bragg LE, Thompson JS. The influence of serosal patch size on the growth of small intestinal neomucosa. *J Surg Res* 1986;40:426-31.
- Bragg LE, Thompson JS, Hollingsed TC, Saxena SK. Contraction of serosa patched intestinal defects. *Curr Surg* 1987;44:388-91.
- Bragg LE, Thompson JS. The influence of intestinal resection on the growth of intestinal neomucosa. *J Surg Res* 1989;46:306-10.
- Campodonico F, Michelazzi A, Benelli R, Toncini C. Simple method for in vitro bladder urothelium regeneration on a heterologous acellular matrix. *Pediatr Surg Int* 2003;19:415-6.
- Chaves M, Smith MW, Williamson CN. Increased activity of digestive enzymes in ileal enterocytes adapting to proximal small bowel resection. *Gut* 1987;28:981-7.
- Chen MK, Badylak SF. Small bowel tissue engineering using small intestinal submucosa as a scaffold. *J Surg Res* 2001;99:352-8.
- Chen MK, Beierle EA. Animal models for intestinal tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25:1675-81.
- Chen RN, Ho HO, Tsai YT, Sheu MT. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials* 2004;25:2679-86.
- Choi RS, Riegler M, Pothoulakis C, Kim BS, Mooney D, Vacanti M, Vacanti JP. Studies of brush border enzymes, basement membrane components, and electrophysiology of tissue-engineered neointestine. *J Pediatr Surg* 1998;33:991-7.

- Choi RS, Vacanti JP. Preliminary studies of tissue-engineered intestine using isolated epithelial organoid units on tubular synthetic biodegradable scaffolds. *Transplant Proc* 1997;29:848-51.
- Cisler JJ, Buchman AL. Intestinal adaptation in short bowel syndrome. *J Investig Med* 2005;53:402-13.
- Conconi MT, De Coppi P, Bellini S, Zara G, Sabatti M, Marzaro M, Zanon GF, Gamba PG, Parnigotto PP, Nussdorfer GG. Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair. *Biomaterials* 2005;26:2567-74.
- Cook AD, Hrkach JS, Gao NN, Johnson IM, Pajvani UB, Cannizzaro SM, Langer R. Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *J Biomed Mater Res* 1997;35:513-23.
- Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, McComb D, Lee JM, Wilson GJ. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J Biome Mater Res* 1994;28:655-66.
- Cywes S. The surgical management of massive bowel resection. *J Pediatr Surg* 1968;3:740-8.
- Dahms SE, Piechota HJ, Dahiya R, Lue TF, Tanagho EA. Composition and biochemical properties of the bladder acellular matrix graft: comparative analysis in rat, pig and human. *Int Braz J Urol* 1998;82:411-9.
- Dalla Vecchia L, Engum S, Kogon B, Jensen E, Davis M, Grosfeld J. Evaluation of small intestine submucosa and acellular dermis as diaphragmatic prostheses. *J Pediatr Surg* 1999;34:167-71.
- Erez I, Rode H, Cywes S. Enteroperitoneal anastomosis for short bowel syndrome. *Harefuah* 1992;123:5-8. Abstract.

- Evans GS, Flint N, Somers AS, Eyden B, Potten CS. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *J Cell Sci* 1992;101:219-31.
- Fontes CE, Bandeira COP, Ferreira MV, Nigro AJT, Campos LF, Senhorini Júnior S. Estudo comparativo do tratamento de ferimento de colon de coelho com reparo seroso da parede de jejunum e sutura primária. *Acta Cir Bras* 2000;15(1) Disponível em: <http://www.scielo.br/acb> .
- Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy EC, Barlow SK, Langer R. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology* 1994;12:689-93.
- Freud E, Eshet R. Insights from animal models for growing intestinal neomucosa with serosal patching – a still untapped technique for the treatment of short bowel syndrome. *Lab Anim* 2001;35:180-7.
- Furthmayr H, Timpl R. Immunochemistry of collagens and procollagens. *Int Rev Connect Tissue Res* 1976;7:61-5.
- Gamba PG, Conconi MT, Lo Piccolo R, Zara G, Spinazzi R, Parnigotto PP. Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix. *Pediatr Surg Int* 2002;18:327-31.
- Gaton E, Czernobilsky B, Kraus L, Motovic A, Glas I, Taub Y, Man B. The neomucosa and its surroundings after jejunoserosal patching in dogs. *J Surg Res* 1980;29:451-65.
- Greca FH, Sousa Filho ZA, Silva APG, Leonel IS, Soccol AT, Feres AN, Longhi P. Utilização da submucosa de intestino delgado porcino como retalho para aumento da capacidade vesical em cães. *Acta Cir Bras* 2004;19:670-6.
- Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering – current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002;295:1009-13.

- Gu Y, Wu ZH, Xie JX, Jin DY, Zhuo HC. Effects of growth hormone (rhGH) and glutamine supplemented parenteral nutrition on intestinal adaptation in short bowel rats. *Clin Nutr* 2001;20:159-66.
- Günsar C, Vatansever HS, Arslan OA, Sencan A, Müftüoğlu S, Özbilgin K, Kaymaz F, Mir E. The maturity of intestinal neomucosa: Integrin expression and ultrastructural aspects. *J Pediatr Surg* 2004;39:1368-75.
- Harmon JW, Wright JA, Noel J, Cogan M. Fate of Dacron prostheses in the small bowel of rabbits. *Surg Forum* 1979;30:365-6.
- Hatafuku T, Thal AP. The use of the onlay gastric patch with experimental perforations of the distal esophagus. *Surgery* 1964;56:556-60.
- Hiles MC, Badylak SF, Lantz GC, Geddes LA, Kokini K, Morff RJ. Mechanical properties of xenogeneic small intestinal submucosa when used as an aortic graft in the dog. *J Biomed Mater Res* 1995;29:883-92.
- Hirota K, Harkins HN. Intestinal covering method for gastrointestinal defects: experimental study. *Surgery* 1965;58:1013-20.
- Hori Y, Nakamura T, Matsumoto K, Kurokawa Y, Satomi S, Shimizu Y. Tissue engineering of the small intestine by acellular collagen sponge scaffold grafting. *Int J Artif Organs* 2001;24:50-4.
- Hynes RO. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
- Iglesias ACRG, Zucoloto S. Proliferação celular do epitélio intestinal: mecanismos de adaptação e controle após ressecção extensa do intestino delgado. *Medicina, Ribeirão Preto* 1994;27:303-9.
- Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447-55.
- Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol* 2000;18:2-9.

- Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 1998;16:224-30.
- Kim SS, Kaihara S, Benvenuto MS, Choi RS, Kim BS, Mooney DJ, Taylor GA, Vacanti JP. Regenerative signals for intestinal epithelial organoid units transplanted on biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering of small intestine. *Transplantation* 1999;67:227-33.
- Kobold EE, Thal AP. A simple method for management of experimental wounds of the duodenum. *Surg Gynecol Obstet* 1963;116:340-4.
- Kropp JP, Badylak SF, Thor KB. Regenerative bladder augmentation: a review of the initial preclinical studies with porcine small intestinal submucosa. *Muscle Matrix and Bladder Funct* 1995;755:229-35.
- Lillemoie KD, Berry WR, Harmon JW, Tai YH, Weichbrod RH, Cogen MA. Use of vascularized abdominal wall pedicle flaps to grow small bowel neomucosa. *Surgery* 1982;91:293-300.
- Ma SZ, Li XH, Hu J. Acellular extracellular matrix for inguinal hernia repair. *Hernia* 2006;10:229-31.
- Meezan E, Hjelle JT, Brendel K. A simple, versatile, non disruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. *Life Sci* 1975;17:1721-32.
- Mendelssonh P, Magalhães A, Goldenberg S. Serosal patch of the gastroesophageal junction. An experimental study in dogs. *Acta Cir Bras* 1998;13(3) Disponível em: <http://www.scielo.br/acb> .
- Mizuno H, Takeda A, Uchinuma E. Creation of na acellular dermal matrix from frozen skin. *Aesth Plast Surg* 1999;23:316-22.
- Organ GM, Mooney DJ, Hansen LK, Schloo B, Vacanti JP. Transplantation of enterocytes utilizing polymer-cell constructs to produce a neointestine. *Transplant Proc* 1992;24:3009-11.
- Pachence JM. Collagen-based devices for soft tissue repair. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 1996;33:35-40.

- Pahari MP, Raman A, Bloomenthal A, Costa MA, Bradley SP, Banner B, Rastellini C, Cicalese L. A novel approach for intestinal elongation using acellular dermal matrix: an experimental study in rats. *Transplant Proc* 2006;38:1849-50.
- Parnigotto PP, Gamba PG, Conconi MT, Midrio P. Experimental defect in rabbit urethra repaired with acellular aortic matrix. *Urol Res* 2000;28:46-51.
- Parnigotto PP, Marzaro M, Artusi T, Perrino G, Conconi MT. Short bowel syndrome: experimental approach to increase intestinal surface in rats by gastric homologous acellular matrix. *J Ped Surg* 2000;35:1304-8.
- Piechota HJ, Gleason CA, Dahms SE, Dahiya R, Nunes LS, Lue TF, Tanagho EA. Bladder acellular matrix graft: in vivo functional properties of the regenerated rat bladder. *Urol Res* 1999;27:206-13.
- Potten CS, Morris RJ. Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl* 1988;10:45-62.
- Ribeiro SR, Pinto Jr PE, Miranda AC, Bromberg SH, Lopasso FP, Irya K. Weight loss and morphometric study of intestinal mucosa in rats after massive intestinal resection. Influence of glutamine-enriched diet. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2004;59:349-56.
- Rocha FG, Whang EE. Intestinal tissue engineering: from regenerative medicine to model systems. *J Surg Res* 2004;120:320-5.
- Ruszczak Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1595-611.
- Saday C, Mir E. A surgical model to increase the intestinal absorptive surface: intestinal lengthening and growing neomucosa in the same approach. *J Surg Res* 1996;62:184-91.
- Sanderson IR, Ezzell RM, Kedinger M, Erlanger M, Xu ZX, Pringault E, Leon-Robine S, Louvard D, Walker WA. Human fetal enterocytes in vitro:

- modulation of the phenotype by extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7717-20.
- Sandusky GE, Badylak SF, Morff RJ, Johnson WD, Lantz G. Histologic findings after in vivo placement of small intestine submucosal vascular grafts and saphenous vein grafts in the carotid artery in dogs. *Am J Pathol* 1992;140:317-24.
- Sievert KD, Tanagho EA. Organ-specific acellular matrix for reconstruction of the urinary tract. *World J Urol* 2000;18:19-25.
- Silver FH, Pins G. Cell growth on collagen: a review of tissue engineering using scaffolds containing extracellular matrix. *J Long-term Effects Med Implants* 1992;2:67-80.
- Silverman RP, Li EN, Holton III LH, Sawan KT, Goldberg NH. Ventral hernia repair using allogenic acellular dermal matrix in a swine model. *Hernia* 2004;8:336-42.
- Simões JC, Andrade DAS, Loureiro ALRS, Ceccato VP, Cardoso MB, Santis PMB. Uso de retalho axial de parede abdominal para crescimento de neomucosa do intestino delgado: estudo experimental em ratos. *Rev Med Parana* 1995;52:11-3.
- Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Daebritz SH, Martin DP, Shoen FJ, Vacanti JP, Mayer JE. Tissue engineering of heart valves: in vitro experiences. *Ann Thorac Surg* 2000;70:140-5.
- Srivastava A, DeSagun EZ, Jennings LJ, Sethi S, Phuangsab A, Hanumadass M, Reyes HM, Walter RJ. Use of porcine acellular dermal matrix as a dermal substitute in rates. *Ann Surg* 2000;233:400-8.
- Stelzner M, Chen DC. To make a new intestinal mucosa. *Rejuvenation Res* 2006;9:20-5.
- Tait IS, Evans GS, Flint N, Campbell FC. Colonic mucosal replacement by syngeneic small intestinal stem cell transplantation. *Am J Surg* 1994;167:67-72.

- Tait IS, Flint N, Campbell FC, Evans GS. Generation of neomucosa in vivo by transplantation of dissociated postnatal small intestinal epithelium. *Differentiation* 1994;56:91-100.
- Tait IS, Penny JI, Campbell FC. Does neomucosa induced by small bowel stem cell transplantation have adequate function? *Am J Surg* 1995;169:120-5.
- Thal AP, Hatafuku T, Kurtzman MD. A new method for reconstruction of the esophagogastric junction. *Surg Gynecol Obstet* 1965;120:1225-31.
- Thompson JS. Neomucosal growth in serosa lined intestinal tunnels. *J Surg Res* 1990;49:1-7.
- Thompson JS, Ferguson DC. Effect of the distal remnant on ileal adaptation. *J Gastrites Surg* 2000;4:430-4.
- Thompson JS, Kampfe PW, Newland JR, Vanderhoof JA. Growth of intestinal neomucosa on prosthetic materials. *J Surg Res* 1986;41:484-92.
- Thompson JS, Quigley EM, Adrian TE. Factors affecting outcome following proximal and distal intestinal resection in the dog. An examination of the relative roles of mucosal adaptation, motility, luminal factors, and enteric peptides. *Dig Dis Sci* 1996;44:63-74.
- Thompson JS, Sharp JG, Saxena SK e McCullagh KG. Stimulation of neomucosal growth by systemic urogastrone. *J Surg Res* 1987;42:402-10.
- Thompson JS, Tempero MA, Haun JL, Vanderhoof JA. The importance of luminal factors in neomucosal growth. *J Surg Res* 1986;40:126-32.
- Thompson JS, Vanderhoof JA, Antonson DL, Newland JR, Hodgson PE. Comparison of techniques for growing small bowel neomucosa. *J Surg Res* 1984;36:401-6.
- Thompson JS, Vanderhoof JA, Davis SJ, Grandjean CJ. Effect of intestinal location on growth and function of neomucosa. *J Surg Res* 1985;39:68-75.
- Vanderhoof JA, Langnas AN. Short-bowel syndrome in children and adults. *Gastroenterology* 1997;113:1767-78.

- Vanderrest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J* 1991;5:2814-23.
- Waitzberg DL, Cukier C, Mucerino DR, Logulo AF, Torrinhas RSM, Castro I. Small bowel adaptation with growth hormone and glutamine after massive resection of rat's small bowel. *Nutr Hosp* 1999;14:81-90.
- Wang ZQ, Watanabe Y, Noda T, Yoshida A, Oyama T, Toki A. Morphologic evaluation of regenerated small bowel by small intestinal submucosa. *J Pediatr Surg* 2005;40:1898-902.
- Wang ZQ, Watanabe Y, Toki A. Experimental assessment of small intestinal submucosa as a small bowel graft in a rat model. *J Pediatr Surg* 2003;38:1596-601.
- Washizawa N, Gu LH, Gu L, Openo KP, Jones DP, Ziegler TR. Comparative effects of glucagons-like peptide-2 (GLP-2), growth hormone (GH), and keratinocyte growth factor (KGF) on markers of gut adaptation after massive small bowel resection in rats. *J Parent Ent Nutr* 2004;28:399-409.
- Watkins RM, Dennison AR, Collin J. The effect of Dacron implants on small intestinal function. *Gastroenterology* 1984;86:1294-7.
- Watson LC, Friedman HI, Griffin DG, Norton LW, Mellick PW. Small bowel neomucosa. *J Surg Res* 1980;28:280-91.
- Wefer J, Sekido N, Sievert KD, Schlote N, Nunes L, Dahiya R, Jonas U, Tanagho EA. Homologous acellular matrix graft for vaginal repair in rats: a pilot study for a new reconstructive approach. *World J Urol* 2002;20:260-3.
- Wong WM, Wright NA. Epidermal growth factor, epidermal growth factor receptors, intestinal growth and adaptation. *J Parent Ent Nutr* 1999;23:83-8.
- Yamada KM, Pankov R, Cukierman E. Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:959-66.

Zekri S, Srairi R, Bem Ammar A, Jaafoura Mohamed H, Bem Mansour A.
Vitamin A effects on morphometric adaptation after extensive small
bowel resection in the rat. Tunis Med 2004;82:1026-31.

NORMAS ADOTADAS

- Goldenberg S. Orientação normativa para elaboração e difusão de trabalhos de pesquisa. In: Goldenberg S, Guimarães CA, Castro AA, editors. Elaboração e apresentação de comunicação científica. São Paulo: 2002-2006. Disponível em: <http://www.metodologia.org> .
- International Anatomical Nomenclature Committee, editors. Nomina histologica. 2a ed. New York: Ithaca; 1983.
- Sociedade Brasileira de Anatomia, editors. Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. 1ª ed. São Paulo: Manole; 2001.
- Spector N. Manual para a redação de teses, projetos de pesquisa e artigos científicos. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

RESUMO

Objetivo: Há desenvolvimento e crescimento de nova mucosa intestinal sobre diferentes superfícies de apoio. Os biomateriais, principalmente as matrizes acelulares, constituem estruturas ricas em proteínas de sustentação, como o colágeno, e permitem o desenvolvimento de neomucosa do intestino delgado. O objetivo do presente estudo foi analisar a morfologia de neomucosa do intestino delgado formada sobre retalho de matriz tecidual acelular.

Métodos: Vinte e oito ratos machos Wistar foram utilizados no estudo. Três animais forneceram o intestino delgado para a obtenção da matriz acelular. Aleatoriamente, os outros 25 animais foram distribuídos em três grupos: eutanásia com duas semanas – cinco ratos; eutanásia com quatro semanas – dez ratos; e eutanásia com oito semanas pós-operatórias – dez ratos. A matriz acelular foi obtida do tratamento detergente-enzimático de segmentos de intestino delgado, com deoxicolato de sódio 4% e deoxirribonuclease. Os retalhos de matriz acelular foram interpostos na parede antimesentérica do íleo terminal. Foram analisados os dados morfométricos da mucosa adjacente normal do íleo e da nova mucosa em desenvolvimento.

Resultados: Com oito semanas de período pós-operatório, todo o retalho estava preenchido por nova mucosa. A neomucosa apresentou valores morfométricos estatisticamente maiores que a mucosa adjacente.

Conclusão: A neomucosa intestinal formada sobre matriz acelular obtida pelo tratamento detergente-enzimático do intestino delgado de ratos é semelhante à mucosa normal adjacente.

1. Biomateriais. 2. Bandas de Matriz. 3. Intestino Delgado. 4. Mucosa Intestinal. 5. Ratos *Wistar*.

ABSTRACT

Background / Purpose: New intestinal mucosa can grow and be developed at different scaffolds. The acellular matrix is made off rich sustain protein and it allows the development of small bowel neomucosa. The purpose of this study was to analyze the morphology of the small bowel neomucosa at the acellular matrix tissue graft.

Methods: Twenty-eight Wistar male rats were enrolled in the study. The small bowel of three animals was used to obtain the acellular matrix. Twenty five other animals were randomly assigned in three groups according to the time of post-operative euthanasia. In five rats the euthanasia happened at two weeks, in ten rats at four weeks and in ten rats at eight weeks. The acellular matrix was extracted from a detergent-enzymatic process at small bowel segments with sodium deoxycholate at 4% and deoxyribonuclease. The acellular matrix grafts were interposed at the terminal ileum antimesenteric wall. The morphometric characteristics of adjacent normal ileum mucosa and the developmental neomucosa were analyzed.

Results: After eight weeks post operatory, all grafts were filled with new mucosa. The neomucosa showed morphometric values statistically bigger than the adjacent mucosa.

Conclusion: The intestinal neomucosa developed under acellular matrix, which is obtained by a detergent-enzymatic process of the small bowel in rats, is quite normal as the adjacent intestinal neomucosa.