VICTOR EDMOND SEID

**Avaliação clínica e funcional do
autotransplante anorretal em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Programa: Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Dr. Flávio Henrique Ferreira Galvão

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Seid, Victor Edmond
Avaliação clínica e funcional do autotransplante anorretal em ratos / Victor
Edmond Seid. -- São Paulo, 2012.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Flávio Henrique Ferreira Galvão.

Descritores: 1.Transplante 2.Esfíncter anal 3.Modelos animais 4.Ratos

USP/FM/DBD-317/12

Dedicatória

Dedicada a minha amada família,
minha esposa Renata e meus filhos
André e Alice, que me deram todo
o apoio e inspiração para a
confecção deste trabalho.

Agradecimientos

Ao Dr. Flavio Henrique Ferreira Galvão, mentor desta linha de pesquisa, por todas as tardes e noites de trabalho, pelas dicas e discussões e pela grande orientação que me deu na confecção deste trabalho.

Ao Professor Doutor Luis Carneiro D'Albuquerque, pelo carinho, amizade, apoio e incentivo. Sem o seu apoio eu não teria a oportunidade de fazer parte desta linha de pesquisa e do grupo do LIM 37, que tanto me orgulho hoje.

Ao Professor Doutor Ivan Ceconello pela oportunidade de trabalhar e desenvolver pesquisa na Disciplina de Coloproctologia, e pelo apoio tanto na área técnica quanto pessoal.

Ao Professor Doutor Sergio Carlos Nahas, grande incentivador da “geração mais jovem” da Coloproctologia do HCFMUSP, pela liberdade de trabalho, amizade e pelo constante incentivo.

Ao Professor Doutor Eleazar Chaib, pela oportunidade de trabalhar no LIM 37 e pela amizade.

Ao Daniel Waisberg, acadêmico do quinto e sexto ano no período de confecção deste trabalho, meu grande amigo e braço direito nesta empreitada.

Ao Dr. Marcus Vinicius Castro, matemático especialista em estatística, pelo capricho e detalhamento no estudo estatístico desta tese.

Ao Departamento de Anatomia Patológica da FMUSP, por colaborar na análise histológica deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fabio Pinatel Lopasso, pela ajuda na adaptação do equipamento de manometria.

Ao Dr. Afonso Henrique da Silva e Sousa Jr., pelos inestimáveis conselhos e ensinamentos.

Ao Dr. Paulo Rodrigues, grande conhecedor da estrutura do assoalho pélvico, e que contribuiu de forma decisiva para a conclusão deste trabalho.

À equipe do LIM 37, que tratou de maneira espetacular os saudosos ratos que fizeram parte deste trabalho.

À bibliotecária Marta, que sempre me atendeu com carinho e um sorriso no rosto. Muito obrigado por tudo!

Às funcionárias Mirtes, Fabiana e Vilma, pela paciência e por todas as orientações neste período tão intenso que é a pós-graduação.

Ao Dr. Sergio Eduardo Alonso Araújo, meu grande amigo, uma mente privilegiada, que me deu grande força para a realização deste momento.

Aos Drs. Vinícius Rocha Santos, Rodrigo Bronze de Martino e Wellington Andraus, pelo apoio e pelas horas de descontração nos árduos dias de trabalho.

Ao pessoal da segurança da FMUSP, por me deixarem trabalhar nos finais de semana, quando a faculdade está fechada.

Aos meus pais, irmãos, tios e avós pelo incentivo e admiração incondicional desde a época de acadêmico.

A minha amada esposa Renata, que sempre esteve ao meu lado, e cuja força de me fazer feliz é diretamente proporcional a sua doçura e paz de espírito.

Ao meu filho André, por quem tenho um amor imensurável, e mesmo sendo um bebê, inspirou-me e me ajudou, acordando pontualmente às 6h30min desde que nasceu.

À FMUSP, por ter me acolhido desde o ano de 1992, quando passei no vestibular.

NORMATIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adotado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de gráficos	
Lista de tabelas	
Resumo	
<i>Summary</i>	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Desenho do experimento	17
3.2 Preparo pré-operatório	19
3.3 Técnica cirúrgica	19
3.4 Pós-operatório	24
3.5 Avaliação clínica	25
3.6 Manometria anorretal	27
3.7 Histologia	30
3.8 Análise dos dados	31
4 RESULTADOS	34
4.1 Sobrevida	36
4.2 Óbitos	37
4.2.1 Óbitos por grupo	37
4.3 Tempo de cirurgia	38
4.4 Peso	39
4.5 Comportamento	40
4.6 Aspecto abdominal	41
4.7 Aspecto anal	42
4.8 Aspecto das fezes	43
4.9 Histologia	44
4.9.1 Infiltrado parietal	44
4.9.2 Nível do infiltrado	45
4.10 Padrão manométrico normal	46
4.10.1 Medidas de pressões antes e depois do procedimento	51
4.10.1.1 Perfil de comparação dos grupos 1, 3 e 4	51
4.10.2 Perfil dos quatro grupos	57
5 DISCUSSÃO	60
5.1 Parâmetros clínicos	64
5.2 Resultado funcional e parâmetros manométricos	70
5.3 Parâmetros histológicos	81
6 CONCLUSÕES	83
7 ANEXOS	85
8 REFERÊNCIAS	97

Listas

ABREVIATURAS E SINONÍMIAS

APR	- amputação abdomino-perineal de reto
cm	- centímetros
cmH ₂ O	- centímetros de água
cols.	- colaboradores
D	- dia de acompanhamento
DII	- doença inflamatória intestinal
EAA	- esfíncter anal artificial
EEA	- esfíncter externo do ânus
EIA	- esfíncter interno do ânus
HC-FMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
kg	- quilograma
LIM	- laboratório de investigação médica
mbar	- milibar (equivalente a 1,01 cmH ₂ O)
mg	- miligrama
mL	- mililitros
mmHg	- milímetros de mercúrio
PO	- pós-operatório
PVPI	- iodo povidona
RIRA	- reflexo inibitório reto-anal
SNS	- neuroestimulação sacral
<i>soiling</i>	- sujar as vestes

FIGURAS

Figura 1 -	Esquema de distribuição dos animais	18
Figura 2 -	Dissecção perineal do segmento retal, sem preservação de nervos ou vasos	20
Figura 3 -	A - Mobilização do segmento anorretal e exposição do pedículo dos vasos mesentéricos inferiores (seta). B – Notar a emergência da artéria mesentérica inferior (seta) próxima à saída das artérias ilíacas comuns (cabeça de seta). Ao , aorta abdominal	21
Figura 4 -	A - Isquemia e secção colônica, simulando procedimento de transplante. B - Aspecto do segmento anorretal após realização de anastomose término-terminal (seta).....	22
Figura 5 -	Aspecto final da incisão perineal após maturação do segmento anorretal para seu local de origem no grupo de transplante ortotópico	22
Figura 6 -	A - Incisão da “anustomia” realizada na fossa ilíaca esquerda de animal submetido ao transplante heterotópico. B - Exteriorização do segmento anorretal. C – aspecto final da “anustomia” no 14º dia de pós-operatório	23
Figura 7 -	Esquema de cronograma de acompanhamento dos animais	25
Figura 8 -	A – Equipamento utilizado para realização de manometria acoplado a um reservatório de água destilada; computador equipado com software específico que capta e armazena os valores de pressão fornecidos. B – Cateter do aparelho . A seta aponta para o eletrodo com quatro canais radiais.....	27
Figura 9 -	Introdução do cateter no segmento anorretal do animal (A) o eletrodo posicionado junto à borda anal, na área de maior pressão do esfíncter (B). O animal anestesiado e posicionado em decúbito lateral durante todo o procedimento (C)	28
Figura 10 -	A - Inserção do cateter para realização de manometria no grupo heterotópico. B – Eletrodo locado na área de maior pressão do esfíncter anal	29

Figura 11 -	Perfil médio de evolução do peso (em gramas)	39
Figura 12 -	Perfil médio de evolução do escore de Comportamento	40
Figura 13 -	Perfil médio de evolução do escore de Abdômen	41
Figura 14 -	Perfil médio de evolução do escore de Aspecto anal	42
Figura 15 -	Perfil médio de evolução do escore de Fezes	43
Figura 16 -	Média $\pm$ um Desvio Padrão para Infiltrado parietal	44
Figura 17 -	Média $\pm$ um Desvio Padrão para Nível do Infiltrado	45
Figura 18 -	Boxplot das Pressões Média e Máxima do padrão normal em cmH ₂ O. Os valores forma divididos em quatro grupos (quartis). A caixa desenhada inicia-se no 1º quartil e termina no 3º, contendo 50% dos dados centrais. O risco no meio da caixa é a mediana. O ponto vermelho representa a média	47
Figura 19 -	Histograma da Pressão Média do padrão normal com a curva Normal em azul. (nas ordenadas temos a frequência de ocorrência das diversas pressões, e nas abscissas os valores de pressão em cmH ₂ O)	48
Figura 20 -	Histograma da Pressão Máxima do padrão normal com curva Normal em azul. (nas ordenadas temos a frequência de ocorrência das diversas pressões, e nas abscissas os valores de pressão em cmH ₂ O)	49
Figuras 21 e 22 -	Representação gráfica do Teste Kolmogorov Smirnov e Anderson Darling demonstrando tendência de distribuição Normal dos valores de pressão observados nos histogramas, segundo a linha azul (pontos vermelhos representam os valores de pressão em cmH ₂ O)	50
Figura 23 -	Perfil médio de evolução da pressão Média nos três grupos (em cmH ₂ O)	52
Figura 24 -	Perfil médio de evolução da pressão Máxima, semelhante a análise das pressões Médias (em cmH ₂ O) nos três grupos	53

Figura 25 -	Exemplo de curva manométrica de um animal do grupo ortotópico. As curvas de cor preta representam eletrodo locado às 12 horas, as de cor verde, às 3 horas, as de cor rosa às 6hs e as de cor azul às 9hs. Em relação ao pré-operatório de padrão normal (A), nota-se no pós-operatório imediato diminuição da pressão anal (B), com progressiva recuperação no 7º e 14º dias de pós-operatório (C e D, respectivamente).....	54
Figura 26 -	Exemplo de curva manométrica de um animal do grupo SHAM. As curvas de cor preta representam eletrodo locado às 12 horas, as de cor verde, às 3 horas, as de cor rosa às 6hs e as de cor azul às 9hs. Em relação ao pré-operatório de padrão normal (A), nota-se no pós-operatório imediato leve diminuição de pressão anal (B), com recuperação no 7º dia de pós-operatório (C) e manutenção no 14º dia de pós-operatório (D).....	55
Figura 27 -	Exemplo de curva manométrica de um animal do grupo Controle. As curvas de cor preta representam eletrodo locado às 12 horas, as de cor verde, às 3 horas, as de cor rosa às 6hs e as de cor azul às 9hs. Notam-se curvas semelhantes no pré-operatório de padrão normal (A), 7º (B) e 14º dias de pós-operatório (C).....	56
Figura 28 -	Perfil médio de evolução da pressão Média (em cmH ₂ O) nos quatro grupos.....	57
Figura 29 -	Perfil médio de evolução da pressão Máxima (em cmH ₂ O) nos quatro grupos.....	58
Figura 30 -	Exemplo de curva manométrica de um mesmo animal do grupo heterotópico. As curvas de cor preta representam eletrodo locado às 12 horas, as de cor verde, às 3 horas, as de cor rosa às 6hs e as de cor azul às 9hs. Em relação ao pré-operatório (A), nota-se diminuição de pressão anal no 14º dia de pós-operatório (B)	59

TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição das causas de óbitos	36
Tabela 2 -	Distribuição dos óbitos por grupo	37
Tabela 3 -	Médias para o tempo de cirurgia (em minutos)	38
Tabela 4 -	Medidas das manometrias para padrão Normal (pressões em cmH ₂ O).....	46
Tabela 5 -	Análise de Variância Multivariada para Peso. O nível descritivo <0,05 mostra que existe diferença entre os tempos nos grupos e na composição tempo/grupo	86
Tabela 6 -	Comparação múltipla pelo método de Tukey para Peso. Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA.....	86
Tabela 7 -	Análise de Variância Multivariada para escore de Comportamento. O nível descritivo <0,05 mostra que existe diferença nos grupos, nos tempos e na composição tempo/grupo.....	87
Tabela 8 -	Comparação múltipla pelo método de Tukey para escore de Comportamento. Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA.....	87
Tabela 9 -	Análise de Variância Multivariada para escore de Abdômen. O nível descritivo <0,05 mostra que existe diferença nos grupos, nos tempos e na composição tempo/grupo	88
Tabela 10 -	Comparação múltipla pelo método de Tukey para escore de Abdômen. Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA.....	88
Tabela 11 -	Análise de Variância Multivariada para escore de Aspecto anal. O nível descritivo <0,05 mostra que existe diferença nos grupos, nos tempos e na composição tempo/grupo	89

Tabela 12 - Comparação múltipla pelo método de Tukey para escore de Aspecto anal. Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA.....	89
Tabela 13 - Análise de Variância Multivariada para escore de Fezes. O nível descritivo <0,05 mostra que existe diferença nos grupos, nos tempos e na composição tempo/grupo	90
Tabela 14 - Comparação múltipla pelo método de Tukey para escore de Fezes. Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA.....	90
Tabela 15 - Análise de Variância para Infiltrado parietal. O nível descritivo <0,05 mostra diferença entre os grupos.....	91
Tabela 16 - Comparação múltipla de Tukey para Infiltrado parietal. Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo responsável pela diferença verificada no ANOVA.....	91
Tabela 17 - Análise de Variância para Nível do Infiltrado. Análise de Variância para Infiltrado parietal. O nível descritivo >0,05 mostra que não há diferença entre os grupos	92
Tabela 18 - Análise de Variância Multivariada para Pressão Média (grupos 1, 3 e 4). O nível descritivo <0,05 mostra que existe diferença nos grupos, nos tempos e na composição tempo/grupo	93
Tabela 19 - Comparação múltipla pelo método de Tukey para Pressão Média grupos 1, 3 e 4). Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo responsável pela diferença verificada no ANOVA.....	93
Tabela 20 - Análise de Variância Multivariada para Pressão Máxima (grupos 1, 3 e 4). O nível descritivo <0,05 mostra que existe diferença nos grupos, nos tempos e na composição tempo/grupo	94
Tabela 21 - Comparação múltipla pelo método de Tukey para Pressão Máxima (grupos 1, 3 e 4). Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA	94
Tabela 22 - Análise de Variância para Pressão Média (quatro grupos). O nível descritivo <0,05 mostra que existe diferença nos grupos e nos tempos	95

Tabela 23 -	Comparação múltipla pelo método de Tukey para Pressão Média (quatro grupos). Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA	95
Tabela 24 -	Comparação múltipla pelo método de Tukey para Pressão Máxima (quatro grupos). Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA	96
Tabela 25 -	Análise de Variância para Pressão Máxima (quatro grupos). O nível descritivo <0,05 mostra que existe diferença nos grupos e nos tempos.....	96

Resumo

Seid VE. *Avaliação clínica e funcional do autotransplante anorretal em ratos*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2012.

Introdução: A perda da função esfínteriana anal e a colostomia definitiva são condições socialmente incapacitantes, com grande impacto social e econômico. Não há tratamento satisfatório para estas duas condições e o transplante anorretal surge como uma alternativa para a perda da função ou do esfínter anal propriamente dito. **Objetivo:** apresentar modelo experimental de autotransplante anorretal em ratos, avaliar os seus resultados clínicos e funcionais **Método:** 55 ratos Wistar foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de estudo: I – autotransplante anorretal ortotópico (n=13); II - autotransplante heterotópico (n=14); III - SHAM - ratos submetidos a laparotomia e incisão perianal (n=13); IV - Controle - ratos não operados (n=15). Os animais foram avaliados com parâmetros clínicos e manométricos. Os parâmetros clínicos de avaliação foram: peso, comportamento, aspecto das fezes, aspecto anal e aspecto abdominal. Os dados de avaliação clínica foram protocolados no dia do procedimento (D0), segundo dia pós-operatório (D2), sétimo (D7) e décimo quarto dias (D14). Exceto peso, todos os demais foram avaliados por escores pré-estabelecidos. A manometria foi usada para determinação das pressões Médias e Máximas, e realizadas no pré-operatório imediato (D0 pré), logo após o procedimento (D0 pós), no D7 e no D14. O grupo II teve avaliação manométrica apenas no D0 pré e D14. As manometrias de ratos normais foram analisadas separadamente, para determinação do perfil funcional anorretal normal. Foram também comparados os grupos I, III e IV em todos os momentos, e os quatro grupos nos momentos D0 pré e D14. Os animais foram sacrificados após 14 dias e o segmento anorretal foi analisado histologicamente. **Resultados:** ocorreram nove óbitos pós operatórios, 5 no grupo II e 4 no grupo I. Todos os parâmetro clínicos mostraram tendência de piora no pós-operatório precoce nos grupos transplantados. Porém, houve equiparação entre os grupos ao final do estudo. A anatomia patológica demonstrou histologia análoga entre os grupos transplantados e os controles após 14 dias. As manometrias em ratos normais tiveram média de pressões Médias de $33,7 \pm 12,6$ cmH₂O, e de pressões Máximas de $61,2 \pm 19$ cmH₂O. Na comparação entre os grupos I, III e IV, no D0 pós existiu queda significativa das pressões nos grupos I e III, diferentes do IV ($p < 0,05$). No D7 observou-se recuperação de atividade manométrica do grupo I, porém estatisticamente inferior ao grupo Controle. No D14 os grupos foram estatisticamente semelhantes. Na comparação dos quatro grupos houve queda pressórica significativa no grupo II, que diferiu dos grupos controle ($p < 0,05$). O grupo I não diferiu dos controles nem do grupo II no D14. **Conclusões:** 1. O modelo experimental proposto de autotransplante anorretal ortotópico e heterotópico em ratos é factível. 2. A evolução clínica e funcional do transplante anorretal demonstrou perda da função imediatamente após o transplante, com recuperação ao longo de 14 dias. 3. O transplante heterotópico teve resultados precoces piores que o ortotópico.

Descritores: 1. Transplante 2. Esfínter anal 3. Modelos animais 4. Ratos

Summary

Seid VE. *Clinical and functional evaluation of anorectal autotransplantation in rats* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

Introduction: The loss of anal sphincter function and permanent colostomy are disabling conditions with great social and economic impact. There is no satisfactory treatment for either of these conditions and anorectal transplantation offers an alternative to the loss of function or the loss of the anal sphincter itself. **Aim:** To present an experimental model of anorectal autotransplantation in rats to assess the clinical and functional results. **Method:** 55 Wistar rats were divided randomly into four study groups: I - orthotopic anorectal autotransplantation (n=13), II - Heterotopic autotransplantation (n=14), III – SHAM - Laparotomy and perianal incision (n=13), IV - Control – non-operated rats (n=15). The animals were evaluated with clinical and manometric parameters. The clinical parameters of evaluation were: weight, behavior, appearance of stools, appearance of the anus and abdominal distension. Clinical trial data was collected on the day of the procedure (D0) and the second (D2), seventh (D7) and fourteenth (D14) post-operative days. All parameters, except for weight, were evaluated by pre-established scores. Manometry was used to determine the Mean and Maximum pressures, and performed immediately before (D0 pre), immediately after the procedure (D0 post), and on D7 and D14. Group II had manometric evaluation only on D0 pre and D14. The manometries of the non-operated rats were analyzed separately to determine a normal anorectal functional profile. Groups I, III and IV were also compared at all evaluation times and all four groups on D0 pre and D14. The animals were sacrificed after 14 days and the anorectal segment was examined histologically. **Results:** There were nine post-operative deaths, 5 in group II and 4 in group I. All clinical parameters showed a worsening trend in the early postoperative evaluation in the transplant groups. However, at the end of the study there were no significant differences between the groups. The histology of the transplanted groups and the control groups was similar after 14 days. The manometries in normal rats had an average of 33.7 ± 12.6 cmH₂O Mean pressure, and average Maximum pressure of 61.2 ± 19 cmH₂O. In the analysis of groups I, III and IV, a significant drop of pressure in groups I and III occurred at D0 post compared to group IV ($p < 0.05$). Functional recovery of Group I was noted in D7, but statistically lower than the Control group. The three groups were statistically similar at D14. In the comparison of the four groups there was a significant pressure fall in Group II, which differed from the control groups ($p < 0.05$). Group I did not differ from the controls or Group II in D14. **Conclusions:** 1. The proposed experimental orthotopic and heterotopic anorectal autotransplantation model in rats is feasible. 2. The clinical and functional outcomes demonstrated loss of function immediately after transplantation, with recovery over the course of 14 days. 3. The Heterotopic transplantation had worse early results than the orthotopic method.

Keywords: 1. Transplant 2. Anal sphincter 3. Animal Models 4. Rats

1 Introdução

A capacidade de evacuar fisiologicamente pela via anal é condição determinante de boa qualidade de vida e bom convívio social. A eliminação de flatus sem controle, ou a perda inadvertida de fezes por disfunção anorretal é situação incapacitante, com grande impacto socioeconômico e na qualidade de vida de seus portadores ^{1,2}.

Outra condição complexa é a colostomia definitiva. Muitos doentes a recusam, mesmo sabendo que existe risco de morte em casos de tratamento de câncer. Outros aceitam a colostomia, mas sofrem consequências socioeconômicas e familiares similares aos portadores de incontinência fecal.

A prevalência da incontinência fecal ainda é pouco conhecida. Nos Estados Unidos varia de 2,3 a 24% em indivíduos acima de 40 anos, com índices crescentes entre os idosos ³⁻⁸. Estes dados provavelmente são subestimados, pois muitos portadores desta afecção não relatam sua condição a seus médicos por vergonha ou constrangimento. No Brasil, os dados sobre incontinência são desconhecidos, porém estima-se que a incidência acompanhe a dos países ocidentais desenvolvidos.

Acredita-se que nos Estados Unidos os custos com fraldas adultas usadas em pacientes incontinentes cheguem a 400 milhões de dólares por ano, e o impacto econômico com cuidados e tratamentos seja da ordem de 16 a 26 bilhões de dólares por ano. Esses valores mostram o quão

importante é este tema e o impacto desta doença nos sistemas de saúde no mundo ⁹.

A continência fecal depende de uma complexa série de respostas neurais e reflexos colônicos e retais, como estado mental, volume e consistência das fezes, trânsito colônico, distensibilidade retal, sensibilidade anorretal e reflexos anorretais. Porém, a função adequada do esfíncter anal representa o principal fator determinante da continência ¹⁰.

O esfíncter interno do ânus (EIA), que é um espessamento da musculatura própria do reto distal, devido a características miogênicas e propriedades adrenérgicas extrínsecas próprias, constitui uma barreira natural para a perda involuntária de fezes. O EIA é responsável por 50-85% do tônus anal de repouso, sendo o esfíncter externo do ânus (EEA) e os coxins hemorroidários responsáveis pelos 15% restantes ^{11,12}.

O EEA, o músculo puborretal e outros músculos da estrutura pélvica formam uma unidade complexa de músculos esqueléticos innervados pelos nervos pudendos e retais inferiores denominada complexo muscular elevador do ânus. O EEA e a musculatura do assoalho pélvico participam da manutenção do tônus anal de repouso através de um arco reflexo envolvendo os receptores de estiramento do músculo elevador do ânus, e do esfíncter anal vindos de neurônios aferentes dirigidos à cauda equina, e neurônios motores eferentes dirigidos para a musculatura. O EEA, que é um músculo estriado, porém com parte de suas fibras de controle involuntário, e o músculo levantador do ânus têm uma predominância de fibras musculares tipo I, que os tornam adaptados à atividade tônica ¹³.

A lesão do EIA leva à incontinência fecal passiva (perda de fezes sem a consciência do paciente), enquanto a lesão do EEA resulta na urgência evacuatória devido à incapacidade do paciente de suprimir a defecação ¹³. A complexidade do aparelho esfinteriano e as características únicas da musculatura envolvida tornam a substituição do esfíncter anal por outro músculo esquelético ou por qualquer mecanismo artificial extremamente difícil.

As principais causas de incontinência fecal são: lesões sustentadas da musculatura esfinteriana e/ou nervos relacionados. Estas lesões podem ocorrer durante procedimentos cirúrgicos, nos partos pela via vaginal e no trauma perineal complexo. Outras causas são: lesões de nervos periféricos associadas a doenças sistêmicas, afecções isquêmicas ou degenerativas do sistema nervoso central, lesões ou deficiências congênitas de medula espinhal, retite actínica, doença inflamatória intestinal (DII), além da idade avançada e constipação crônica ^{4,14-21}.

Estudos mostram que cirurgias orificiais, tais como esfínterectomia lateral (para tratamento de fissura crônica), fistulotomia ou fistulectomia e hemorroidectomia evoluem com incontinência fecal em número variável de pacientes. Khubchandani e Reed descreveram incontinência a *flatus* e *soiling* em 35 % e 22%, respectivamente, no seguimento de longo prazo de paciente submetidos à esfínterectomia lateral ²². Porém, outros autores apresentaram índices de incontinência menores em suas séries, gerando controvérsia ²³⁻²⁸.

As cirurgias de fistula são os procedimentos anorretais que mais evoluem para incontinência fecal ²⁹. Por outro lado, as cirurgias para tratamento da doença hemorroidária raramente têm este desfecho ³⁰.

A incontinência fecal secundária ao trauma obstétrico tem sido vastamente estudada nas ultimas décadas, colocando cada vez mais o mecanismo de parto vaginal como importante causa de incontinência fecal. O parto fórceps, o trabalho de parto prolongado, e a laceração do esfíncter anal são fatores de risco para incontinência ³¹⁻³³. Por outro lado, a cesariana feita após o início de trabalho de parto, especialmente no trabalho de parto prolongado, não parece proteger contra a incontinência fecal, devido ao potencial de lesão dos nervos pudendos por estiramento ³³.

O tratamento da incontinência fecal está ligado diretamente a sua gravidade, sendo que algumas causas têm tratamento específico. Do ponto de vista terapêutico, a caracterização e classificação da incontinência baseada em parâmetros clínicos deve sempre ser complementada com a propedêutica armada, que ajuda a avaliar de forma mais clara tanto o aparelho esfincteriano, quanto a parte neurológica e a função do reto ³⁴⁻³⁶.

A manometria anorretal é um dos instrumentos mais importantes na avaliação da incontinência fecal, e oferece informações a respeito das pressões anais de repouso, de contração e do reflexo inibitório retoanal (RIRA). A pressão basal de repouso reflete a função do esfíncter interno do ânus (EIA), e a pressão máxima de repouso se refere à atividade involuntária do esfíncter externo do ânus (EEA), com aproximadamente 15% de fibras musculares com atividade involuntária. A pressão de contração

denota o componente voluntário do EEA e da musculatura do assoalho pélvico ³⁵.

Indivíduos continentes geralmente têm pressão basal máxima acima de 35mmHg e pressão de contração acima de 90mmHg ³⁷. A insuflação de um balão dentro do reto com solução salina, até que a evacuação deste balão seja inevitável, faz parte do exame e serve para determinação do RIRA, da capacidade e da sensibilidade retais. O ultrassom endoanal, a determinação do tempo de latência motora do nervo podendo, e a ressonância magnética são outros componentes auxiliares no diagnóstico ^{34,38-40}.

No entanto, mesmo com o grande arsenal de possibilidades na área de diagnóstico, o tratamento da incontinência fecal é extremamente difícil e tem mostrado resultados pouco animadores a longo prazo, especialmente em casos mais graves, o que abre espaço para o surgimento de novas opções de tratamento ⁴¹.

O uso de agentes formadores de massa, anticolinérgicos, opioides, antidepressivos e outras drogas são eficazes apenas na minoria dos casos de incontinência leve, ou como medidas adicionais a outros tipos de tratamento ^{42,43}. Outras medidas terapêuticas que surtem algum efeito para casos menos graves são os plugs e o biofeedback, sendo este último muito aplicado também como medida complementar ao tratamento cirúrgico ⁴⁴⁻⁴⁶.

A esfinteroplastia, ou reparação do esfíncter anal, é a técnica de escolha clássica para o reparo esfinteriano. Desde 1940, a técnica originalmente descrita por Parks e McPartlin ⁴⁷ ganhou ampla aceitação

como tratamento cirúrgico de primeira linha em casos de defeito parcial da musculatura esfinteriana. Porém, estudos de longo prazo mostram queda crescente nas taxas de sucesso da operação, de tal forma que após cinco anos raramente encontramos taxas superiores a 40% de sucesso ⁴⁸⁻⁵⁰.

Nas formas mais graves de incontinência fecal existem outras opções mais complexas de tratamento, como a construção de um “neo esfíncter” em torno do canal anal com o músculo grácil ou graciloplastia, descrita por Pickrell e cols. em 1952 ⁵¹. Os resultados deste procedimento são decepcionantes, principalmente porque o músculo grácil é um músculo voluntário e, portanto, não permite uma contração sustentada, e evolui rapidamente para fadiga ^{52,53}. Além disso, o procedimento tem morbidade elevada, e a obstrução evacuatória geralmente se torna um problema significativo, muitas vezes levando à necessidade de enemas para exoneração fecal.

As maiores séries da literatura com o emprego desta técnica são casuísticas que não têm mais de 20 casos, com bons resultados observados somente no seguimento de curto prazo ^{51,54,55}.

A estimulação elétrica associada a graciloplastia (graciloplastia dinâmica), teoricamente, poderia dar ao músculo grácil transposto as propriedades necessárias para funcionar como um esfíncter, porém, na prática, os resultados ainda são decepcionantes ^{56,57}. A técnica é complexa, dispendiosa e depende de um eletroestimulador específico que tem vida útil limitada. Além disso, existem muitas complicações, como a não contração

adequada do músculo transposto, complicações infecciosas, problemas técnicos com o estimulador, rotura de tendão muscular e constipação^{58,59}.

Estudos recentes da graciloplastia dinâmica demonstram taxas de sucesso não superiores a 45% em dois anos, com maior taxa de sucesso no primeiro ano e complicações importantes em torno de 40%, muitas delas de tratamento cirúrgico^{60,61}. Esta técnica também é usada como uma forma de construção de “neo esfíncter” em pacientes portadores de colostomia terminal definitiva, com a taxa de insucesso ainda maior^{62,63}.

Outro tratamento da incontinência fecal grave é o implante de esfíncter anal artificial (EAA)⁶⁴. Esta técnica representa uma alternativa ao uso da graciloplastia, sendo menos invasivo, mas igualmente dispendioso^{65,66}. A melhora da continência fecal a longo prazo, em pacientes com incontinência fecal grave, é de aproximadamente 50%. No entanto, o implante de material sintético na região anorretal é susceptível a um risco elevado de infecção com explante da prótese⁶⁷.

Por fim, baseada no sucesso para tratamento da incontinência urinária, a neuroestimulação sacral (SNS) tem sido adaptada para o tratamento da incontinência fecal grave⁶⁸. Nesta técnica, as raízes nervosas sacrais são estimuladas eletricamente, determinando melhora da contratilidade da musculatura do esfíncter anal⁶⁹. Porém, estudo prospectivo recente mostrou resultados subótimos em número significativo de pacientes no seguimento de longo prazo, destacando-se o explante do equipamento em 17,6% e a falha de funcionamento em 49,4%, dor pélvica crônica e o custo elevado de aplicação e manutenção⁷⁰.

Além da falência funcional do esfíncter anal, existem outras doenças que culminam com a perda do esfíncter e levam, conseqüentemente, à colostomia definitiva. Nas duas últimas décadas houve avanço significativo no tratamento cirúrgico do câncer do reto baixo e doença inflamatória intestinal (DII), que são algumas das maiores causas de indicação de colostomia definitiva, gerando maior proporção de tratamentos com preservação esfíncteriana ⁷¹⁻⁷⁹. No entanto, muitos pacientes acabam necessitando de estoma definitivo, sendo que a incidência da amputação de reto (APR) para câncer retal ainda varia de 30% a 52%, em algumas casuísticas ⁸⁰⁻⁸².

Recentemente novas técnicas cirúrgicas trouxeram a possibilidade de converter colostomias terminais em colostomias perineais continentes, através da utilização de um “neo esfíncter” com o músculo grácil ou implante de esfíncter artificial. Esta alternativa é empregada de forma restrita devido aos resultados funcionais bastante discutíveis ^{83,84}.

Em resumo, tanto o tratamento da incontinência fecal quanto a solução para perda do esfíncter anal ainda estão longe do ideal. Assim, o transplante do segmento anorretal surge como uma nova opção terapêutica atraente para o tratamento tanto da falência funcional do esfíncter anal como da perda do aparelho esfíncteriano.

O transplante de órgãos com objetivo de melhorar a qualidade de vida, e não somente com objetivo de salvar vidas, é um conceito relativamente recente. Relatos de casos de sucesso em transplantes de laringe, membros e face trouxeram qualidade de vida próxima do normal

para indivíduos com grandes limitações sociais e econômicas. O sucesso destes transplantes modificou conceitos e impôs um novo paradigma para o transplante de órgãos⁸⁵⁻⁸⁷. Desta forma, a indicação do transplante anorretal poderia contemplar pacientes com incontinência fecal grave e com estoma definitivo.

Uma indicação especialmente interessante seria para pacientes portadores de DII (principalmente Doença de Crohn) com destruição do aparelho esfinteriano pela doença. Nestes pacientes a preocupação com a imunossupressão seria minimizada, pois faz parte do tratamento da doença de base. O relato do grupo da Universidade de Pittsburg, de 2010, coloca o transplante de intestino, incluindo o cólon em monobloco, como uma opção de tratamento para pacientes com Doença de Crohn e falência intestinal. Neste relato, os autores destacam a técnica de anastomose do enxerto no plano interesfinteriano do canal anal, com bom resultado funcional e melhora nutricional do paciente⁸⁸.

Com relação a indicação do transplante anorretal para colostomia definitiva, devemos lembrar que grande parte dos portadores são operados em decorrência de câncer. Entretanto, as mudanças na forma do tratamento do câncer do reto, com terapia neoadjuvante e excisão total do mesorreto, diminuíram a taxa de recorrência local de aproximadamente 20% para 1,7 a 5%^{89,90}. Sendo assim, podemos pensar em transplante anorretal também para pacientes selecionados operados por neoplasia, como ocorre em outros órgãos⁹¹⁻⁹³.

O primeiro relato de transplante anorretal data de 1901. John D. Rushmore relatou o sucesso do tratamento de um açougueiro, vítima de trauma perineal complexo, o qual foi submetido a diversos procedimentos sem sucesso para tentar tratar dor perineal associada a sangramento e incontinência fecal. Dr. Rushmore, com um procedimento em dois tempos, posicionou o reto e o ânus 4 a 5 polegadas posteriormente a sua posição original, levando a uma melhora sintomática e na qualidade de vida do paciente ⁹⁴. Este procedimento não foi repetido por outros autores, tampouco ganhou destaque no meio científico, de tal forma que o transplante do segmento anorretal caiu no esquecimento.

Todavia, quase cem anos após o relato de Rushmore, a ideia de realizar o transplante anorretal ressurgiu, desta vez em modelo experimental. A técnica do transplante anorretal com anastomose de nervo podendo, artéria e veia mesentérica inferior em modelo porcino foi descrita por O'Bichere e cols., em 2000 ⁹⁵. Os autores relataram de forma brilhante o transplante do segmento anorretal em quatro porcos que receberam o enxerto de quatro porcas. O procedimento, com uso de anestesia geral, consistiu na retirada do segmento anorretal das porcas, com a manutenção do feixe neurovascular do nervo podendo, seguida de fechamento perineal e substituição do segmento anorretal original dos receptores pelo enxerto.

Foram estudadas as seguintes variáveis: duração de cada etapa do transplante, tempo de isquemia, dimensões das estruturas anastomosadas e viabilidade do enxerto pós-operatório. Os animais foram sacrificados após 24

horas, o estado do enxerto foi observado e os tecidos foram encaminhados para avaliação histológica.

Apesar do pioneirismo, o pequeno número de animais incluídos no estudo e a falta de resultados evolutivos a longo prazo limitaram esse trabalho a descrição de uma técnica experimental de transplante anorretal ⁹⁵. Mesmo assim, o primeiro passo estava dado, com a demonstração da viabilidade técnica do procedimento. Contudo, a pesquisa deste tipo de transplante não foi continuada, e outros modelos experimentais relacionados ao tema não seriam encontrados na literatura pelos próximos nove anos.

Em nosso meio, o interesse pelo transplante anorretal surgiu a partir de experiências com o transplante intestinal. Em 2006, Galvão e cols. descreveram modelo de transplante experimental combinado de intestino delgado e cólon em ratos, com anastomose porto-portal com uso de um cuff ⁹⁶. Este modelo estimulou o desenvolvimento de outros experimentos que contemplassem o estudo do transplante do intestino grosso em seu segmento distal, incluindo o esfíncter anal. Isso culminou na descrição pelo nosso grupo, em 2009, de um modelo inédito de transplante autólogo anorretal em ratos.

Sem a interferência da rejeição tecidual, neste estudo foi feita a comparação da evolução clínica de ratos submetidos ao autotransplante anorretal de forma ortotópica e heterotópica, com ratos colostomizados, sendo esta publicação o ponto de partida para o estudo atual ⁹⁷. Todavia, o modelo de autotransplante descrito por nosso grupo na ocasião não representava realmente um transplante, visto que não contemplou

isquemia/reperfusão do segmento transplantado, tampouco secção e anastomose intestinal. Nossa proposta no presente estudo foi oferecer um modelo experimental de autotransplante do segmento anorretal em ratos, com isquemia/reperfusão e secção/anastomose intestinal. Além disso, visando uma avaliação funcional complementar mais objetiva, idealizamos incorporar ao método o uso da manometria anorretal, que permitiria a obtenção de informações acerca do aparelho esfinteriano, com a avaliação objetiva das pressões do esfíncter anal^{98,99}.

2 Objetivos

Apresentar modelo experimental de autotransplante anorretal em ratos e avaliar os seus resultados clínicos e funcionais.

3 Material e Métodos

Este estudo foi realizado no Laboratório LIM 37, da Disciplina de Transplante de Fígado e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, respeitando as normas internacionais de Pesquisa Científica com Animais de Laboratório (*International Council for Laboratory Animal Science*). O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da FMUSP.

Foram adquiridos Ratos Wistar (*Rattus norvegicus mammalia*) machos provenientes do biotério central de nossa instituição, ficando estes animais armazenados e sob os cuidados do nosso laboratório por período de uma semana, para adaptação e verificação de sanidade.

3.1 DESENHO DO EXPERIMENTO

Foram estudados 55 ratos Wistar com variação de peso de 230 a 280 gramas. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo 1 - transplante anorretal autólogo ortotópico; Grupo 2 - transplante autólogo anorretal heterotópico; Grupo 3 - SHAM - ratos submetidos à operação simulada, ou seja, apenas laparotomia sem secção, ressecção ou procedimentos de isquemia; Grupo 4 - grupo Controle - ratos não operados. (Figura 1).

Figura 1 - Esquema de distribuição dos animais

O sorteio dos animais era feito no laboratório, de tal forma que não havia como prever em que grupo cada animal seria alocado.

Após a cirurgia, os ratos foram mantidos sob observação por um período de 14 dias. Neste período, foram obtidas informações de parâmetros clínicos desses ratos de acordo com os dados estabelecidos em protocolo, a ser detalhado a seguir, bem como realizada a avaliação funcional com o uso de manometria anorretal.

Passados 14 dias, os ratos foram sacrificados de acordo com as normas éticas que regiram este procedimento, e o enxerto foi submetido a exame histológico.

3.2 PREPARO PRÉ-OPERATÓRIO

Antes do procedimento propriamente dito, os animais foram submetidos à inspeção anal e manometria anorretal. Todos os ratos passaram pelo mesmo tipo de preparo pré-operatório, independentemente do grupo randomizado. Esta preparação consistiu em 24 horas de jejum, limpeza e pesagem do animal.

Os animais foram submetidos à anestesia com a administração subcutânea de Ketamina (1 mg/kg), antissepsia da área cirúrgica com PVPI tópico e colocação de campos estéreis, sem antibioticoprofilaxia. Todos os ratos foram operados pelo mesmo cirurgião.

3.3 TÉCNICA CIRÚRGICA

A seguir descreveremos o procedimento cirúrgico específico de cada grupo.

Grupo 1: o procedimento para este grupo iniciou-se com a abordagem da região do períneo com incisão circunferencial na pele perianal e dissecação cranial do reto, preservando-se o máximo de tecido periretal, mas sem a preocupação de preservação dos vasos retais inferiores, e sem identificação dos feixes ou ramos terminais do nervo pudendo. (Figura 2)

Figura 2 - Dissecção perineal do segmento retal, sem preservação de nervos ou vasos.

Posteriormente, foi realizada incisão mediana abdominal, com dissecção cuidadosa da porção distal do intestino grosso no sentido caudal, com a preservação do pedículo vascular proveniente da aorta, que equivale aos vasos mesentéricos inferiores.

O passo seguinte foi a liberação completa do reto distal, e sua introdução em conjunto com o ânus para dentro da cavidade abdominal, ficando o esfíncter anal e o reto completamente dissecados e irrigados pelo pedículo vascular mesentérico inferior. (Figura 3 A e B)

Figura 3 - **A** – Mobilização do segmento anorretal e exposição do pedículo dos vasos mesentéricos inferiores (seta). **B** – Notar a emergência da artéria mesentérica inferior (seta) próxima à saída das artérias ilíacas comuns (cabeça de seta). **Ao** – aorta abdominal

Partiu-se então para o pinçamento do pedículo vascular por 15 minutos, associado à secção do intestino a 4 cm da borda anal, em local correspondente à bifurcação da artéria mesentérica inferior, com anastomose imediata deste segmento intestinal, simulando o que ocorreria em um transplante autólogo (isquemia/reperfusão quente e anastomose intestinal) (Figura 4 A e B). Esta anastomose foi realizada com técnica microcirúrgica, utilizando um microscópio binocular auxiliar, com aumento de dez vezes, e sutura em pontos separados de prolene 6.0.

Figura 4 - **A** – Isquemia e secção colônica, simulando procedimento de transplante. **B** – Aspecto do segmento anorretal após realização de anastomose término-terminal (seta)

Após esses procedimentos, o esfíncter anal foi enxertado em seu local original, ou seja, de volta ao períneo, sendo maturado na pele com pontos separados de polipropileno 5.0. (Figura 5)

Em seguida, realizamos o fechamento da parede abdominal em dois planos de sutura contínua (músculo e pele).

Figura 5 - Aspecto final da incisão perineal após maturação do segmento anorretal para seu local de origem no grupo de transplante ortotópico

Grupo 2: os animais deste grupo foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico daqueles do grupo 1 até o momento do clampeamento vascular e secção/anastomose intestinal. Porém, neste grupo, foi realizada uma incisão circunferencial na pele da fossa ilíaca esquerda da parede abdominal através da qual foi exteriorizado o esfíncter anal tal qual um estoma. (Figura 6 A, B e C)

Figura 6 - **A** – Incisão da “anustomia” realizada na fossa ilíaca esquerda de animal submetido ao transplante heterotópico. **B** – Exteriorização do segmento anorretal. **C** – Aspecto final da “anustomia” no 14º dia de pós-operatório

A maturação do esfíncter na parede abdominal ocorreu da mesma forma que a maturação do períneo, e a parede abdominal foi fechada da mesma forma que no grupo 1. O períneo foi fechado com pontos separados de polipropileno 5.0 (pele).

Grupo 3 (SHAM): os animais deste grupo foram submetidos a laparotomia, manipulação das vísceras abdominais e sutura da parede abdominal, sem

isquemia ou anastomose intestinal. No entanto, o abdome destes ratos foi mantido aberto pelo tempo equivalente aos demais grupos operados.

Grupo 4: os animais deste grupo não foram operados.

3.4 PÓS-OPERATÓRIO

Após a cirurgia, os animais dos grupos 1 e 3 foram novamente submetidos a manometria anorretal. Todos os animais foram mantidos no pós-operatório imediato em observação por 30 minutos em local aquecido até a recuperação da anestesia. Em seguida, foram colocados em gaiolas individuais com ração padrão e água *ad libitum*.

Nos dias subsequentes, realizamos o acompanhamento de todos os animais com atenção ao peso, ao comportamento, ao aspecto das fezes e à aparência abdominal, inspeção anal e manometria anorretal. Estes procedimentos foram repetidos em dias programados até o décimo quarto dia após a operação (dia do sacrifício dos animais) (Figura 7). Os dados coletados foram submetidos à análise estatística.

Figura 7 - Esquema de cronograma de acompanhamento dos animais

Após o sacrifício dos animais, os enxertos foram examinados histologicamente, a fim de demonstrar o padrão de reação inflamatória local e de vascularização do enxerto.

3.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os parâmetros clínicos de avaliação foram:

Peso - os ratos foram pesados em balança de precisão, com o peso medido em gramas.

Comportamento - o comportamento dos ratos foi avaliado de acordo com a seguinte pontuação:

- 0 - rato tranquilo, com pilosidade normal, sem secreção facial;
- 1 - piloereção leve;
- 2 - piloereção acentuada e agressividade;
- 3 - piloereção acentuada associada à conjuntivite e postura curvada.

Aspecto abdominal - os parâmetros para a avaliação do abdome foram de acordo com o escore abaixo:

- 0 - Normal;
- 1 - distensão leve;
- 2 - distensão moderada;
- 3 - distensão grave.

Aspecto anal - classificado segundo escore:

- 0 – normal;
- 1 - isquemia leve (borda do ânus isquêmica e mucosa normal);
- 2 - isquemia moderada (isquemia de borda anal e mucosa);
- 3 - isquemia grave (necrose).

Aspecto das fezes - obedeceu à seguinte pontuação:

- 0 - fezes normais;
- 1 - fezes pastosas;
- 2 - diarreia.

3.6 MANOMETRIA ANORRETAL

A manometria anorretal foi realizada utilizando-se um equipamento específico (Dynamed®: sistema de infusão DUAL®, São Paulo, SP), com cateter de quatro canais, infusão contínua de água sob pressão calibrada de 0,4 mbar (recomendação do fabricante), e captação concomitante da pressão transmitida nestes quatro canais. Este sistema foi ligado a um dispositivo acoplado a um computador, com software específico para a captura de curvas de medidas de pressão em cmH₂O (Proctomaster® versão 6.0) (Figura 8 A e B).

Figura 8 - **A** - Equipamento utilizado para realização de manometria acoplado a um reservatório de água destilada; computador equipado com software específico que capta e armazena os valores de pressão fornecidos. **B** - **Cateter do aparelho.** A seta aponta para o eletrodo com quatro canais radiais

Este procedimento foi realizado antes da operação e nos ratos não operados. Também foi realizado no período pós-operatório imediato dos ratos dos grupos 1 e 3, no sétimo dia e no décimo quarto dia de observação pós-operatória nos grupos 1, 3 e 4. (Figura 9 A, B e C)

Figura 9 - Introdução do cateter no segmento anorretal do animal (**A**) o eletrodo posicionado junto à borda anal, na área de maior pressão do esfíncter (**B**). O animal anestesiado e posicionado em decúbito lateral durante todo o procedimento (**C**)

No grupo 2, a manometria foi realizada no pré-operatório e somente no décimo quarto dia pós-operatório. Isto ocorreu devido à experiência anterior em um estudo piloto, no qual foi evidenciada a morte de ratos causada por perfuração intestinal relacionada a introdução do cateter de manometria e ao acotovelamento da alça intestinal que ocorre no momento em que esta é exteriorizada e maturada na parede abdominal. Este acotovelamento demonstrou ser um obstáculo à passagem da extremidade distal do cateter, que invariavelmente traumatizava e perfurava a parede intestinal. (Figura 10 A e B)

Figura 10 - A - Inserção do cateter para realização de manometria no grupo heterotópico. **B** - Eletrodo locado na área de maior pressão do esfíncter anal

Com relação à técnica de realização da manometria, o eletrodo foi introduzido no canal anal de cada animal com técnica padronizada. Todos os animais fizeram manometria em decúbito lateral direito sob anestesia com ketamina. Nos procedimentos feitos durante o período de acompanhamento a dose aplicada foi igual a usada para o procedimento cirúrgico.

Depois de identificar a área de maior pressão do canal anal, o cateter era fixado para evitar a interferência do examinador nas curvas de pressão (pressão dos dedos), sempre com o cuidado de manter o direcionamento uniforme dos canais radiais de medida de pressão no canal anal em todas as manometrias, ou seja, o canal que media as pressões na posição anterior do canal anal sempre era colocado nesta posição e assim sucessivamente com os demais canais.

Em cada procedimento manométrico, as curvas de pressão foram capturadas no sistema de quatro canais e gravadas continuamente durante

10 minutos. Período no qual o animal era mantido anestesiado. Os dados foram armazenados e submetidos à análise estatística.

3.7 HISTOLOGIA

Após o período de observação com a coleta dos dados de evolução clínica e funcional (14 dias), os animais em estudo foram sacrificados com anestesia padrão e técnica de exsanguinação (anestesia seguida da secção da aorta).

Todos os ratos que completaram o período de observação tiveram o esfíncter extirpado e enviado para análise histológica, com pele e tecido subcutâneo locais, além dos três centímetros distais do reto.

O material extirpado foi conservado em solução de formol a 10%, fixado em parafina e submetido à avaliação histológica com secção longitudinal e transversal, e coloração hematoxilina - eosina.

Os parâmetros adotados para avaliação histológica foram: 1- o grau de infiltrado inflamatório; e 2- sua profundidade na parede.

A pontuação para o grau de infiltração foi leve, moderada e intensa, de acordo com o patologista que avaliou as peças sem saber a que grupo pertencia o espécime.

Com relação à profundidade de infiltração, o parâmetro adotado foi a distribuição natural das camadas da parede intestinal.

Realizou-se autópsia em todos os casos de óbito para esclarecimento de sua causa.

3.8 ANÁLISE DOS DADOS

A avaliação de cada uma das variáveis foi realizada com a utilização de testes específicos. Na análise específica dos óbitos, encontramos a sua distribuição nos diversos grupos e descrevemos as causas principais. Para comparar os quatro grupos foram utilizados o teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher.

Comparamos o tempo médio de cirurgia entre os grupos Ortotópico, Heterotópico e Sham, utilizando análise de variância para um fator e o teste Tukey de comparações para discriminar a diferença.

Na avaliação dos parâmetros clínicos, descrevemos a média e o desvio-padrão para cada variável nos momentos D0, D2, D7 e D14, comparando estas medidas com a ANOVA para medidas repetidas ou análise de variância multivariada para um fator, dependendo do número de variáveis analisadas nos vários momentos. As diferenças encontradas nesta análise foram discriminadas utilizando-se o teste de Tukey de comparações múltiplas. Estes mesmos testes foram aplicados nas análises comparativas de manometrias.

Para verificar a correlação entre as variáveis e as mortes, foram utilizados os parâmetros encontrados em D0. Nesta análise foi usado o teste t student.

Com relação aos dados manométricos, para caracterizar o padrão normal de pressão na manometria em ratos não operados, foram utilizadas as medidas do grupo Controle realizadas nos momentos D0, D7 e D14, e as medidas de D0 pré de todos os demais grupos.

A caracterização da manometria normal padrão foi feita utilizando o cálculo dos valores médios, medianos e desvio padrão das pressões Médias e Máximas obtidas no cálculo integrado das pressões dos quatro canais para cada grupo. A partir desses dados, construímos gráficos Box-plot e histogramas, que permitiram a verificação da distribuição das pressões em diferentes momentos em todos os grupos.

Os testes de Kolmogorov Smirnov e Anderson Darling foram utilizados para verificar se houve distribuição normal dos valores pressóricos nos histogramas.

Para verificar a influência dos diversos procedimentos realizados, observamos a evolução manométrica dos grupos 1, 3 e 4, considerando que o grupo 2 teve a manometria realizada somente no pré-operatório e no décimo quarto dia pós-operatório. Para incluir o segundo grupo foi realizada uma análise separada, comparando os valores de pressão no pré-operatório D0 e D14 para todos os grupos.

Todas as análises foram realizadas com o software *Statistical Package for the Social Sciences* (v.18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA,

2009). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo para todos os dados verificados.

A seguir, apresentaremos os resultados, e no anexo 1 estão as tabelas com os testes ANOVA e Tukey utilizados nas diversas comparações realizadas no estudo.

4 Resultados

Dos 55 animais divididos nos quatro grupos propostos, nove morreram (16,3%), sendo a grande maioria destes óbitos ocorridos nos primeiros dias de avaliação.

A proporção de animais nos diversos grupos foi similar, com 13 ratos no grupo 1, 14 no grupo 2, 13 no grupo 3 e 15 no grupo 4.

4.1 SOBREVIDA

Não houve óbitos no pós-operatório imediato. Nenhum animal foi sacrificado por perda de peso ou qualquer desfecho considerado desfavorável. Um total de 7 ratos morreu durante a realização do estudo devido a complicações pós-operatórias, 2 (13,3%) no grupo ortotópico (obstrução urinária e obstrução intestinal) e 5 (33,3%) no grupo heterotópico. As causas de óbito são apresentadas na tabela 1.

Todos os óbitos ocorreram entre o 1º e 2º dia de pós-operatório. Além dos óbitos relatados, dois outros ratos do grupo ortotópico morreram durante preparo anestésico nas avaliações do 2º e 7º PO, totalizando nove óbitos no experimento. Não houve relação de nenhuma variável estudada com os óbitos de forma independente.

Tabela 1 - Distribuição das causas de óbitos

Causa	Número	Percentual
Obstrução Intestinal	3	33,3
Anestesia	2	22,2
Obstrução Urinária	2	22,2
Trombose Mesentérica	1	11,1
Indeterminada	1	11,1
Total	9	100,0

4.2 ÓBITOS

4.2.1 Óbitos por grupos

Estudamos o número de óbitos por grupo. Na tabela 2 podemos verificar que eles se concentraram nos grupos Ortotópico e Heterotópico, e que os grupos Sham e Controle apresentaram mortalidade nula. Houve diferença estatística entre os grupos transplantados e os grupos Sham e Controle ($p < 0,05$).

Não houve diferença estatística entre os grupos Ortotópico e Heterotópico ($p=0,999$). Porém, é importante relatar que no grupo Ortotópico, dos quatro óbitos apenas um deles foi decorrente de obstrução intestinal, sendo os demais de causa anestésica e urinária, enquanto no grupo Heterotópico a grande maioria dos óbitos foram decorrentes de complicações cirúrgicas.

Tabela 2 - Distribuição dos óbitos por grupo

Grupo	Óbitos	Percentual
Ortotópico	4	33,3%
Heterotópico	5	35,7%
Sham	0	0,0%
Controle	0	0,0%

4.3 TEMPO DE CIRURGIA

Na tabela 3 temos as médias e desvios padrão para os três grupos. O procedimento no grupo Ortotópico levou tempo médio de $43,8 \pm 8,4$ minutos, e no Heterotópico de $44,3 \pm 4,5$ minutos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,97$).

Tabela 3 - Médias para o tempo de cirurgia (em minutos)

Grupo	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Ortotópico	43,8	8,4	43	31	64
Heterotópico	44,3	4,5	45	36	51
Sham	38,7	3,9	40	30	51

4.4 PESO

Na Figura 11 encontramos o perfil médio de evolução do ganho de peso dos grupos, com médias e desvios padrão. Por eles notamos:

- Nos grupos Ortotópico e Heterotópico percebeu-se tendência de perda de peso em D2 com recuperação em D7 e D14 ($p>0,05$);
- Nos grupos Sham e Controle notamos ganho progressivo de peso.

	D0	D2	D7	D14
Ortotópico	261,7±29,8	255,4 ±30,1	278,8 ±36,2	319,5 ±40,7
Heterotópico	259,0±27,4	259,0 ±27,4	259,0 ±27,4	259,0 ±27,4
Sham	245,3 ±25,8	245,3 ±25,8	245,3 ±25,8	245,3 ±25,8
Controle	251,2 ±22,3	251,2 ±22,3	251,2 ±22,3	251,2 ±22,3

Figura 11 - Perfil médio de evolução do peso (em gramas)

4.5 COMPORTAMENTO

Na Figura 12 temos o perfil médio de evolução dos escores de Comportamento com médias e desvios padrão. Por eles notamos:

- O grupo Controle não teve mudança significativa de comportamento ao longo do tempo;
- Os grupos Ortotópico, Heterotópico e Sham, apresentaram aumento do estresse no momento D2 e posterior queda em D7 e D14, sendo o grupo Heterotópico o que apresentou maior pico;
- Nos momentos D0 e D14 não houve diferença estatística entre os grupos.

	D0	D2	D7	D14
Ortotópico	0,3 ± 0,5	1,0 ± 0,5	0,8 ± 0,5	0,3 ± 0,5
Heterotópico	0,0 (0,0)	1,5 ± 0,7	1,2 ± 0,7	0,6 ± 0,7
Sham	0,0 (0,0)	0,8 ± 0,7	0,7 ± 0,6	0,2 ± 0,4
Controle	0,0 (0,0)	0,1 ± 0,3	0,3 ± 0,5	0,1 ± 0,3

D2 – Controle < Heterotópico, Ortotópico e SHAM ($p < 0,05$)

SHAM < Heterotópico ($p < 0,05$);

D7 – Controle < Heterotópico ($p < 0,05$)

Figura 12 - Perfil médio de evolução do escore de Comportamento

4.6 ASPECTO ABDOMINAL

Na Figura 13 temos o perfil médio de evolução dos escores de distensão abdominal (escore de Abdômen) com médias e desvios padrão.

Por eles notamos:

- Nos grupos Ortotópico e Heterotópico percebeu-se um aumento de escore no momento D2, com queda em D7 e D14, sendo que o grupo Heterotópico foi o único diferente dos controles;
- No momento D14 todos os ratos do grupo Ortotópico voltaram a ter escore 0 e todos os grupos são estatisticamente semelhantes.

	D0	D2	D7	D14
Ortotópico	0,0 (0,0)	0,4 ± 0,5	0,1 ± 0,4	0,0 (0,0)
Heterotópico	0,0 (0,0)	0,8 ± 1,0	0,3 ± 0,5	0,2 ± 0,4
Sham	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Controle	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)

D2 – Controle = SHAM < Heterotópico (p<0,05)

Figura 13 - Perfil médio de evolução do escore de Abdômen

4.7 ASPECTO ANAL

Na figura 14 apresentamos a evolução do Aspecto anal, com as médias e desvios padrão dos escores. Por eles notamos:

- Nos grupos Ortotópico e Heterotópico percebeu-se maior isquemia no momento D2, com recuperação em D7 e D14, sendo o grupo Heterotópico o de maior pico de escore;
- No momento D14 o grupo Heterotópico manteve-se diferente dos grupos controles e do grupo Ortotópico.

	D0	D2	D7	D14
Ortotópico	0,0 (0,0)	0,8 ± 0,7	0,4 ± 0,5	0,0 (0,0)
Heterotópico	0,1 ± 0,3	1,8 ± 0,9	1,1 ± 1,1	0,7 ± 1,0
Sham	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)
Controle	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)

D2 – Controle=SHAM < Ortotópico ($p<0,05$) < Heterotópico ($p<0,05$)

D7 – Controle = SHAM < Heterotópico ($p<0,05$)

D14 - Controle = SHAM = Ortotópico < Heterotópico ($p<0,05$)

Figura 14 - Perfil médio de evolução do escore de Aspecto anal

4.8 ASPECTO DAS FEZES

Na figura 15 temos a evolução do escore de Fezes dos grupos, com as médias e desvios padrão. Por eles notamos:

- Os perfis dos grupos Ortotópico, Heterotópico e Sham foram parecidos, percebeu-se um aumento de escore no momento D2, com queda em D7 e D14, sendo o grupo Heterotópico o com maior pico.

	D0	D2	D7	D14
Ortotópico	0,0 (0,0)	0,6 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0,1 ± 0,4
Heterotópico	0,0 (0,0)	0,9 ± 0,6	0,8 ± 0,4	0,3 ± 0,5
Sham	0,0 (0,0)	0,4 ± 0,7	0,1 ± 0,3	0,0 (0,0)
Controle	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,1 ± 0,3	0,0 (0,0)

D2 – Controle = SHAM < Heterotópico ($p < 0,05$)

Figura 15 - Perfil médio de evolução do escore de Fezes

4.9 HISTOLOGIA

Comparamos o escore de Infiltrado Parietal e o Nível do Infiltrado entre os quatro grupos.

4.9.1 Infiltrado parietal

Na Figura 16 estão médias e desvios padrão dos escores para os quatro grupos. Por eles pudemos observar uma média mais baixa para o grupo Controle, seguido do Sham, em comparação com os demais.

	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Ortotópico	1,3	0,5	1	1	2
Heterotópico	1,4	0,5	1	1	2
Sham	1,0	0,4	1	0	2
Controle	0,3	0,5	0	0	1

Ortotópico=Heterotópico=Sham > Controle ($p<0,05$)

Figura 16 - Média $\pm$ um Desvio Padrão para Infiltrado Parietal

4.9.2 Nível do Infiltrado

Na Figura 17 estão médias e desvios padrão dos escores para os quatro grupos. Por eles, observamos que não houve diferença estatística entre os grupos.

	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Ortotópico	0,8	0,7	1	0	2
Heterotópico	0,9	0,9	1	0	2
Sham	0,6	0,8	0	0	2
Controle	0,0	0,0	0	0	0

Figura 17 - Média $\pm$ um Desvio Padrão para Nível do Infiltrado

4.10 PADRÃO MANOMÉTRICO NORMAL

Na tabela 4 temos as medidas manométricas para as pressões Média e Máxima. Na figura 18 temos um Box-plot, e nas figuras 19 e 20 os histogramas representando a distribuição das pressões. Por eles podemos observar que a distribuição das pressões apresenta variação de 10 a 65 cmH₂O para a Pressão Média e de 23 a 99 cm H₂O para a Pressão Máxima, em um intervalo de confiança de 95% da população (assumindo distribuição Normal confirmada estatisticamente – figuras 21 e 22).

Tabela 4 - Medidas das manometrias para padrão Normal (pressões em cm H₂O)

	Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	IC _{95%}
Pressão Média	33,7	12,6	33,6	10,8	66,5	(8,4 ; 58,9)
Pressão Máxima	61,2	19,0	58,2	23,2	99,3	(23,1 ; 99,3)

Figura 18 - Boxplot das Pressões Média e Máxima do padrão normal em cmH_2O . Os valores foram divididos em quatro grupos (quartis). A caixa desenhada inicia-se no 1º quartil e termina no 3º, contendo 50% dos dados centrais. O risco no meio da caixa é a mediana. O ponto vermelho representa a média

Figura 19 - Histograma da Pressão Média do padrão normal com a curva Normal em azul (nas ordenadas temos a frequência de ocorrência das diversas pressões, e nas abscissas os valores de pressão em cmH₂O)

Figura 20 - Histograma da Pressão Máxima do padrão normal com curva Normal em azul (nas ordenadas temos a frequência de ocorrência das diversas pressões, e nas abscissas os valores de pressão em cmH₂O)

Figuras 21 e 22 - Representação gráfica do Teste Kolmogorov Smirnov e Anderson Darling demonstrando tendência de distribuição Normal dos valores de pressão observados nos histogramas, segundo a linha azul (pontos vermelhos representam os valores de pressão em cmH_2O)

4.10.1 Medidas de pressões antes e depois do procedimento

4.10.1.1 Perfil de comparação dos grupos 1,3 e 4

Em primeira análise, comparamos a evolução dos grupos 1, 3 e 4 nos momentos D0 pré-operatório, D0 pós-operatório, D7 e D14.

Nas figuras 23 e 24 temos a evolução das pressões Médias e Máximas dos grupos, com as médias e desvios padrão.

A análise estatística dos dados de pressão Média mostraram os seguintes resultados:

- No grupo Ortotópico houve queda acentuada nos níveis pressóricos do momento D0 pré para o D0 pós ($p<0,05$), com elevação em D7 e D14;
- No grupo Sham notamos perfil semelhante ao grupo Ortotópico, porém menos acentuado, ou seja, a queda no momento D0 pós foi menor, porém com diferença significativa em comparação com o grupo Controle ($p<0,05$);
- Houve diferença significativa entre o momento D0 pós do grupo Sham e do grupo Ortotópico ($p<0,05$);
- O grupo Controle não apresentou oscilação significativa das médias de pressão Média;
- No momento D7 o grupo Sham não apresentou diferença em comparação com o grupo Controle ($p>0,05$), porém o grupo Ortotópico manteve-se significativamente diferente ao Controle ($p<0,05$).

	Pressão Média				Pressão Máxima			
	D0pré	D0pós	D7	D14	D0pré	D0pós	D7	D14
Ortotópico	31,4 ±13,1	1,6 ±13,1	14,9 ±13,9	23,7 ±12,2	58,3 ±18,8	6,3 ±18,8	36,1 ±18,6	50,2 ±19,8
Sham	34,9 ±14,3	21,6 ±5,4	29,9 ±9,9	33,1 ±10,5	64,5 ±22,6	46,5 ±10,7	58,3 ±15,3	66,6 ±24,6
Controle	40,7 ±13,1	40,7 ±13,1	33,8 ±13,9	33,5 ±12,2	70,2 ±18,8	70,2 ±18,8	60,5 ±18,6	61,9 ±19,8

D0 pós – Controle > SHAM ($p < 0,05$) > Ortotópico ($p < 0,05$)

D7 – Controle > Ortotópico ($p < 0,05$) ; Controle = SHAM ; Ortotópico = SHAM

Figura 23 - Perfil médio de evolução da pressão Média nos três grupos (em cmH₂O)

Para análise das pressões Máximas, seguimos o mesmo padrão de análise e observamos que a comparação entre os grupos seguiu o padrão observado nas pressões Médias.

Figura 24 - Perfil médio de evolução da pressão Máxima, semelhante a análise das pressões Médias (em cmH₂O)

Nas Figuras 25, 26 e 27 estão as representações gráficas das curvas de pressão dos grupos Ortotópico, Sham e Controle, respectivamente.

Figura 25 - Exemplo de curva manométrica de um animal do grupo ortotópico. As curvas de cor preta representam eletrodo locado às 12 horas, as de cor verde, às 3 horas, as de cor rosa às 6 horas e as de cor azul às 9 horas. Em relação ao pré-operatório de padrão normal (A), nota-se no pós-operatório imediato diminuição da pressão anal (B), com progressiva recuperação no 7º e 14º dias de pós-operatório (C e D, respectivamente)

Figura 26 - Exemplo de curva manométrica de um animal do grupo SHAM. As curvas de cor preta representam eletrodo locado às 12 horas, as de cor verde, às 3 horas, as de cor rosa às 6 horas e as de cor azul às 9 horas. Em relação ao pré-operatório de padrão normal (A), nota-se no pós-operatório imediato leve diminuição de pressão anal (B), com recuperação no 7^o dia de pós-operatório (C) e manutenção no 14^o dia de pós-operatório (D)

Figura 27 - Exemplo de curva manométrica de um animal do grupo Controle. As curvas de cor preta representam eletrodo locado às 12 horas, as de cor verde, às 3 horas, as de cor rosa às 6 horas e as de cor azul às 9 horas. Notam-se curvas semelhantes no pré-operatório de padrão normal (A), 7^o (B) e 14^o dias de pós-operatório (C)

4.10.2 Perfil dos quatro grupos

Realizamos também a comparação entre os quatro grupos, levando em conta os dados manométricos pré-operatórios e do final do estudo (momento D14). Nas figuras 28 e 29 temos as médias e desvios padrão das pressões Máxima e Média para os quatro grupos. A análise estatística dos dados mostrou os seguintes resultados:

- Para a Pressão Média e Máxima temos diferença entre o grupo Heterotópico e os grupos controles, porém o grupo Ortotópico não diferiu dos controles nem do Heterotópico.

	Pressão Média		Pressão Máxima	
	D0-pré	D14	D0-pré	D14
Ortotópico	31,4 ±13,1	23,7 ±12,2	58,3 ±18,8	50,2 ±19,8
Heterotópico	26,9 ±10,9	8,6 ±6,8	50,8 ±19,4	30,7 ±15,5
Sham	34,9 ±14,3	33,1 ±10,5	64,5 ±22,6	66,6 ±24,6
Controle	40,7 ±13,1	33,5 ±12,2	70,2 ±18,8	61,9 ±19,8

D14 - Heterotópico < Controle = SHAM = Ortotópico

Figura 28 - Perfil médio de evolução da pressão Média (em cmH₂O)

Figura 29 - Perfil médio de evolução da pressão Máxima (em cmH₂O)

Na Figura 30 está a representação gráfica das curvas de pressão do grupo Heterotópico.

Figura 30 - Exemplo de curva manométrica de um mesmo animal do grupo heterotópico. As curvas de cor preta representam eletrodo locado às 12 horas, as de cor verde, às 3 horas, as de cor rosa às 6 horas e as de cor azul às 9 horas. Em relação ao pré-operatório (A), nota-se diminuição de pressão anal no 14º dia de pós-operatório (B)

5 Discussão

O transplante de tecidos compostos visando melhoria da qualidade de vida, como o de laringe e de face, foram recentemente relatados em seres humanos, mostrando grande potencial de elevar o padrão de vida do indivíduo e reinserí-lo no convívio social ^{100,101}. Pomahac & Aflaki enfatizaram a necessidade do trabalho multidisciplinar no sucesso deste tipo de transplante, e profetizaram o aumento gradual do transplante funcional, até que a engenharia tecidual se torne uma realidade ^{87,102}.

Do ponto de vista do trato digestivo, no qual a maioria das indicações de transplante tem o objetivo de evitar a morte do paciente (transplante de fígado, pâncreas, intestino e multivisceral), o transplante do segmento anorretal segue o conceito de “transplante funcional”, tendo indicações específicas ainda não estabelecidas.

O conhecimento acumulado com o transplante de intestino e multivisceral deve ser aplicado a esta nova modalidade de transplante, sobretudo levando-se em conta que alguns grupos relatam que o transplante de cólon parece ser viável ^{103,104,105}. Um grupo de Paris, estudando 36 pacientes receptores de transplante intestinal, relatou que a inclusão do cólon não teve influência na sobrevida do paciente ou do enxerto ^{105,106}. Kato e cols. estudando um número grande de pacientes (n=93) que receberam a doação de cólon no enxerto sugerem que este procedimento não acarreta morbidade adicional ou risco de mortalidade, especialmente em relação à

sobrevida do enxerto. Segundo os autores, a inclusão do cólon deve ser considerada ativamente para receptores de transplante intestinal ¹⁰⁷.

O transplante de intestino e o multivisceral têm despertado o interesse de diversos grupos no mundo, incluindo o nosso serviço. Em nosso laboratório diversas pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de incluir o intestino grosso no transplante intestinal e estudar o impacto desta variação técnica principalmente na motilidade intestinal. Em 2012, publicamos um modelo experimental de transplante intestinal que incluiu no enxerto o cólon e o segmento anorretal ^{108,109}. Estes e outros trabalhos realizados através de modelos experimentais foram a base do desenvolvimento e a chave para o sucesso do programa de transplante intestinal e da pesquisa translacional no transplante do segmento anorretal que, intuitivamente, deve seguir os passos do transplante intestinal ¹¹⁰.

Após o extraordinário estudo de O`Bichere, de 2000, encontramos relatos de casos nas quais o transplante autólogo do segmento anorretal foi utilizado para tratamento de incontinência fecal em casos de más formações anorretais ^{111,112}, porém este procedimento não foi efetivamente inserido no arsenal terapêutico da disfunção anorretal grave. Este fato pode estar relacionado à limitada experiência científica a respeito dessa técnica, e muito provavelmente à carência de modelos experimentais necessários para validar tal modalidade terapêutica.

Em 2009, nosso grupo descreveu o primeiro modelo de autotransplante do esfíncter anal em ratos, comparando parâmetros clínicos de animais divididos em quatro grupos: grupo submetido ao autotransplante

heterotópico, grupo submetido a autotransplante ortotópico, grupo submetido à confecção de colostomia à Hartmann e grupo controle. Neste estudo, conseguimos demonstrar a efetividade do modelo em ratos, com mortalidade aceitável dos animais e resultados clínicos muito animadores. A evolução clínica de ratos submetidos ao autotransplante anorretal de forma ortotópica e heterotópica foi bastante semelhante, e muito superior ao grupo de ratos submetidos à colostomia, com recuperação do desempenho e do padrão evacuatório normal em 4 dias, e mortalidade de 4,1% contra 58,3% dos colostomizados ⁹⁷.

A mortalidade dos animais transplantados no estudo atual (33 a 35%) foi muito superior à observada no modelo de 2009 ⁹⁷. Atribuímos tal diferença à isquemia quente e anastomose colônica realizadas no presente modelo, e ausentes no anterior. De fato, 57,1% dos óbitos deste estudo estiveram relacionados à anastomose (obstrução intestinal, n=3) ou ao clampeamento do pedículo vascular (trombose mesentérica, n=1), ficando 28,5% da mortalidade relacionada à dissecação perineal (lesão de via urinária, n=2).

No modelo de 2009, a técnica cirúrgica não contemplava a isquemia vascular nem a anastomose intestinal, o que fugia de um modelo de transplante propriamente dito. No trabalho atual apresentamos um modelo mais semelhante ao transplante intestinal, com isquemia “quente” dos ramos mesentéricos inferiores, e com secção e anastomose intestinal, o que tornou o procedimento mais complexo, refletindo nas taxas de morbi-mortalidade.

Por outro lado, a opção de clampar o pedículo vascular ao invés de seccionar e anastomosar os vasos mesentéricos inferiores, tornou o procedimento mais simples e com menor morbidade. Além disso, o modelo de autotransplante eliminou o risco de rejeição do enxerto, permitindo avaliação dos animais por um período mais longo.

Vale destacar que existem algumas vantagens do modelo experimental em ratos que levaram a facilidade de condução do nosso estudo. Neste modelo, não há a necessidade de equipamento específico de anestesia, os animais são facilmente alojados no laboratório, o manuseio e pesagem dos animais é fácil, os modelos são controlados de melhor maneira, além da economia de recursos com os cuidados e alimentação dos animais e a conveniência de todo procedimento poder ser realizado por um único pesquisador¹¹³.

5.1 PARÂMETROS CLÍNICOS

A mortalidade dos ratos transplantados foi semelhante nos dois grupos. A autópsia dos ratos revelou que as obstruções intestinais no grupo 2 se relacionaram com a angulação da alça intestinal na parede abdominal, e no grupo 1 com estenose da anastomose. Sendo assim, concluímos que em grande parte a mortalidade dos animais neste modelo estiveram relacionadas com aspectos técnicos referentes à vascularização ou posicionamento do segmento anorretal, principalmente no grupo 2.

Em que pese à taxa de mortalidade, na maioria dos animais transplantados o fluxo sanguíneo proveniente dos ramos mesentéricos inferiores foi suficiente para manter a vitalidade dos enxertos. Em 2011, Araki e cols. questionaram a importância da irrigação proveniente dos ramos pudendos, e publicaram um estudo de autotransplante em ratos com a proposta de realizar a ressecção do aparelho esfinteriano, sem laparotomia, e relocar este esfíncter ortotopicamente com anastomose intestinal e dos ramos pudendos vasculares e nervosos. Foram comparados três ratos submetidos a este procedimento com outros três ratos submetidos ao mesmo método, porém sem anastomoses vasculares e nervosas. Os autores acompanharam os animais por duas semanas, notando necrose do enxerto nos animais sem anastomose vascular, e bom resultado dos ratos com anastomose vascular ¹¹⁴.

Apesar dos autores sugerirem que a vascularização proveniente dos ramos pudendos seja fundamental, existem sérias limitações deste modelo que talvez inviabilize a sua reprodução, e limite o impacto de suas conclusões. Em primeiro lugar, o número de animais estudados é extremamente pequeno, não permitindo que sejam tiradas conclusões definitivas sobre a evolução dos animais. Além disso, as anastomoses vasculares e nervosas foram feitas com técnica de super microscopia, extremamente difícil de ser reproduzida. Em nosso modelo, notamos recuperação funcional e vascular do segmento anorretal, mesmo sem a revascularização dos vasos retais inferiores. Esse achado vai de encontro aos relatos de casos clínicos de transplante anorretal descritos na literatura,

que também não realizaram anastomose destes vasos e obtiveram bons resultados pós-operatórios^{94,111,112}.

Ainda referente ao aspecto técnico, o tempo médio de cirurgia, em torno de 45 minutos, demonstra a factibilidade do procedimento, mesmo sendo feito por um único cirurgião.

Com relação ao peso, os animais transplantados apresentaram perda ponderal entre os momentos D0 e D2 (não significativa), com recuperação em D7 e D14. Não foi possível correlacionar a evolução do ganho de peso com a mortalidade. Além disso, em comparação com as demais variáveis clínicas, a variação de peso não pareceu ser parâmetro relevante na evolução dos animais neste estudo.

Diferente do parâmetro Peso, o parâmetro Comportamento demonstrou uma diferença mais marcante entre os dois grupos de ratos transplantados. Os ratos transplantados heterotopicamente tiveram evolução imediata menos favorável do que os ratos transplantados ortotopicamente. Porém, isto não se refletiu em maior mortalidade, e ao final do estudo os quatro grupos eram comparáveis neste parâmetro.

Seguindo a curva de ganho de peso, o parâmetro Comportamento nos permitiu constatar que, após 14 dias, a influência do trauma cirúrgico foi mínima na evolução clínica dos ratos. Vale lembrar que estes dois parâmetros são bem conhecidos de quem faz estudos experimentais com este tipo de animal. Os ratos são animais extremamente sensíveis, e qualquer alteração na sua homeostase se reflete em perda de peso e/ou

alterações de comportamento. Esta constatação, feita em estudos anteriores de nosso grupo, repetiu-se parcialmente neste trabalho ⁹⁷.

Acompanhando a tendência dos escores de comportamento, os ratos transplantados apresentaram distensão abdominal maior no momento D2 de avaliação, com melhora clínica no D7 e D14. Novamente isto foi mais marcante e significativo no grupo 2, que apresentou evolução estatisticamente pior que os demais grupos, exceto na comparação com o grupo 1 no momento D2. Isso pode significar que os procedimentos de transplante evoluem com maior tempo de íleo do que a laparotomia simples do grupo Sham. Porém, novamente ao final do período de estudo, os quatro grupos tinham média semelhante de escores.

O fato de termos um tempo de isquemia e secção/anastomose intestinal poderia implicar em um maior tempo de íleo, porém o acotovelamento do segmento intestinal exteriorizado na parede abdominal no grupo 2 parece ter influência importante nesta variável, inclusive como fator determinante de mortalidade por trombose vascular ou obstrução intestinal, como relatado anteriormente. Este acotovelamento, que não ocorreu no grupo 1, pode ter determinado os níveis de distensão abdominal significativamente maiores no momento D2 do grupo 2, que possivelmente foram compensados no decorrer dos dias nos animais que sobreviveram. Novamente não houve relação estatisticamente comprovada desta variável com a mortalidade.

O nível de isquemia anal dos ratos transplantados foi significativamente diferente entre os grupos 1 e 2. O grupo 2 apresentou

isquemia mais acentuada do que o grupo 1 em todos os momentos pós-operatórios, assim como manteve-se diferente dos dois grupos controle até o final do estudo ($p < 0,05$). O grupo 1, por outro lado, apesar de ter escore significativamente menor no momento D2, iguala-se aos grupos controle já no momento D7.

O fator mais importante, possivelmente implicado no desfecho desfavorável do grupo 2, foi a angulação da alça intestinal na parede abdominal, que pode ter originado déficit no fluxo vascular para o esfíncter exteriorizado. A isquemia anal pode também ser consequente ao clampeamento vascular intraoperatório e à dissecação do reto no tempo perineal do transplante. Estes procedimentos foram realizados nos dois grupos transplantados, portanto não diferenciam um grupo do outro. Já a angulação da alça pode ser um fator diferenciador tanto dos escores de isquemia quanto de distensão abdominal dos animais dos dois grupos transplantados.

As suposições referentes às possíveis consequências da angulação da alça intestinal que ocorre no grupo 2 é baseada em observações feitas em nosso laboratório, quando procurava-se padronizar o método de acompanhamento e de controle manométrico dos animais do estudo atual. Em estudo piloto, alguns animais que foram transplantados heterotopicamente e que vieram a falecer, apresentavam déficit de vascularização intestinal ou obstrução intestinal ao nível do estoma nas suas autópsias. Esta constatação nos alertou para possíveis consequências da exteriorização do segmento anorretal na parede e motivou cuidado extra no

momento da escolha do local a ser maturada a “anastomia” (fossa ilíaca esquerda). Além disso, o aprimoramento da técnica de dissecação do reto e a padronização dos procedimentos dos grupos de transplante ajudaram a minimizar as complicações técnicas também nos ratos transplantados ortotopicamente.

Com relação ao padrão das evacuações, novamente houve tendência de escore pior para os ratos do grupo 2 no momento D2, com tendência à normalização, sendo que no momento D14 os escores foram semelhantes nos quatro grupos. Neste aspecto também podemos ter influência da angulação de alça intestinal que acaba por ser compensada no decorrer dos dias.

Resumindo a análise dos parâmetros clínicos: observou-se que os ratos transplantados apresentaram evolução clínica favorável. O padrão de escores mais elevados no momento D2 não se deve exclusivamente ao transplante autólogo, visto que a simples realização de laparotomia mediana e incisão perianal (grupo Sham) geraram elevação de escores de comportamento e de aspecto de fezes.

No grupo heterotópico, os escores de parâmetros clínicos foram em geral os mais altos em cada avaliação, e demoraram mais para se igualar estatisticamente aos dos grupos controle. Contudo, mesmo com evolução mais arrastada, os ratos transplantados de forma heterotópica apresentaram evolução clínica satisfatória, visto que os escores observados melhoraram com o passar do tempo. Outra observação importante foi a não correlação da mortalidade com nenhuma das variáveis clínicas de forma independente.

5.2 RESULTADO FUNCIONAL E PARÂMETROS MANOMÉTRICOS

Com relação à eficácia funcional do transplante propriamente dito, devemos lembrar que a integridade da morfologia e a função do esfíncter anal são de fundamental importância para a continência normal, mas a contribuição dos componentes extraesfincterianos (por exemplo, cólon e reto) é cada vez mais reconhecida ¹¹⁵. Portanto, podemos especular que possíveis tentativas de transplante do segmento anorretal que contenham parte do cólon e do reto tenham maior chance de evolução favorável.

Em que pese o fato da manometria ter se mostrado uma importante ferramenta para a avaliação funcional do segmento anorretal em humanos ⁹⁹, o uso deste instrumento em modelos animais experimentais é aplicado de forma bastante restrita, sendo os modelos que mais utilizam o método aqueles que usam animais de grande e médio portes ¹¹⁶⁻¹¹⁹. Não encontramos registro de estudo manométrico em ratos com o uso de perfusão de água aos moldes do que fizemos neste trabalho, assim como não existia padronização da metodologia para uso da manometria anorretal em ratos. No presente experimento optamos por acrescentar uma avaliação funcional objetiva além dos parâmetros clínicos, utilizando a manometria anorretal, com a qual tivemos a oportunidade de obter resultados mais consistentes.

No entanto, precisamos desenvolver uma nova metodologia para aplicação da manometria anorretal em ratos. Para tanto, utilizamos equipamento convencional para manometria em humanos, com cateter de

perfusão de água de quatro canais adaptado para utilização em roedores de pequeno porte, o que tornou o método viável em outros experimentos e mais barato do que o desenvolvimento de um equipamento novo.

Um dos grandes desafios deste estudo foi desenvolver o método de avaliação manométrica em ratos com este equipamento de manometria convencional. Inicialmente tivemos a dificuldade de não termos cateter disponível no mercado que se adaptasse ao esfíncter anal do rato. Com a adaptação de um cateter dedicado à manometria esofágica em humanos, tendo seus canais longitudinais obliterados, conseguimos um modelo de cateter que pode ser reproduzido. O próximo passo foi padronizar o método de captação das curvas de manometria.

O canal anal extremamente curto dificultava a identificação da zona de maior pressão do canal anal. Além disso, precisávamos de um anestésico que não interferisse no tônus anal dos animais, e a ketamina se mostrou o anestésico ideal para o procedimento.

Foram necessários muitos testes para aprendermos a identificar o ponto certo de locação do cateter no canal anal, além disso, mesmo com o animal anestesiado, a interferência na captação de pressões era constante. Depois de muitos exames, observamos que era necessário fixar o cateter na mesa cirúrgica para abolirmos a interferência gerada pelos dedos do examinador. Além disso, para manter o rigor de avaliação, sempre mantínhamos o animal em decúbito lateral com a direção dos canais de medida de pressão sempre na mesma posição no canal anal, ou seja, o

canal representado pela curva preta às 12 horas, o verde às 3 horas, o rosa às 6 horas e o azul às 9 horas.

Nos ratos, o mecanismo evacuatório é mais simples do que nos humanos, pois não existe o componente voluntário para inibir as evacuações. Portanto, optamos por usar o estudo manométrico exclusivamente para medir a pressão Média e Máxima do canal anal funcional, sem testar o reflexo inibitório retoanal ou a sensibilidade retal. Além disso, a adaptação de um balão no cateter de manometria para testar o reflexo inibitório retoanal e a sensibilidade retal tornaria o procedimento mais complexo e dispendioso.

Como o canal anal funcional nos ratos é extremamente curto, optamos pela captura contínua de curvas de pressão por 10 minutos em vez de utilizarmos a técnica de retirada rápida do cateter. Este método de captura foi recentemente utilizado em 52 seres humanos voluntários saudáveis que foram submetidos ao registro da pressão anal de repouso, pressão de contração voluntária, tempo de fadiga, além da sensibilidade retal e do reflexo retoanal pelo período de 15 minutos. Os autores conseguiram confirmar os padrões normais de manometria anorretal em humanos, e chamaram a atenção para a boa sensibilidade do método de captura de pressões de forma contínua, sugerindo ser superior ao método de tração rápida do cateter ¹²⁰. Em outro estudo recente realizado no Brasil foi constatado que a técnica de perfusão é a forma mais fisiológica de se obter a medida de pressão de repouso do canal anal ^{121,122}.

Um aspecto que deve ser mais detalhado relaciona-se à anestesia. Em nosso estudo, tanto os procedimentos cirúrgicos quanto os manométricos foram realizados sob anestesia com uso de Ketamina. A ketamina produz um estado de anestesia dissociativa, interrompendo de modo seletivo o percurso das vias associativas cerebrais antes de estabelecer bloqueio sensório-motor. Rapidamente produz analgesia profunda, com preservação do tônus da musculatura esquelética, dos reflexos laríngeos e faríngeos. Quanto a influência da anestesia na manometria, não existem dados recentes comparando a uso da Ketamina com outros anestésicos gerais em estudos experimentais de manometria anorretal.

Em trabalho realizado em 1984, Paskins e cols. compararam os efeitos da sedação com Ketamina e “não sedação” em crianças submetidas a manometria anorretal. Nestes estudos foram medidos o tônus anal de repouso e a amplitude da atividade rítmica do esfíncter anal interno, entre outras variáveis. Os autores não relataram interferência do uso de Ketamina nas pressões do esfíncter anal ¹²³. Pfefferkorn e cols. também demonstraram ausência de impacto da anestesia geral e sedação no reflexo inibitório reto anal ¹²⁴. Em 1995, Erdogan e cols. Realizaram, com sucesso, manometria em leitões com idade entre 7 e 10 semanas, sedados com cloridrato de Ketamina por via venosa em doses de 2 mg/kg dose. A análise dos gráficos publicados neste trabalho mostrou que o relaxamento anorretal durou muito tempo, sugerindo sedação mais profunda ¹²⁵. Em nosso estudo, além de utilizarmos doses menores do anestésico, a via subcutânea favoreceu a

performance dos ratos no estudo manométrico. Vale lembrar que a ketamina mantém o animal anestesiado, porém com reflexo evacuatório preservado^{125,126}. Assim sendo, o uso da ketamina durante estudo de manometria parece ser uma alternativa bastante interessante.

Com relação à técnica, a manometria anorretal pode ser realizada utilizando-se diferentes tipos de sondas e aparelhos de captação de pressão. Medidas satisfatórias de pressões do canal anal e de respostas do esfíncter anal podem ser obtidas com cateteres de perfusão de água ou micro transdutores, sendo a técnica de perfusão mais amplamente utilizada. Diversos estudos utilizando sistemas de perfusão de água validaram o método em seres humanos, alguns desses utilizando técnica de tração rápida do cateter, outros com o método de captação de pressão com o cateter fixo^{98,99,120,127,128}. Em nosso estudo, optamos por utilizar a metodologia convencional de manometria com uso de cateter de perfusão e captação de pressão com cateter fixo, por motivos econômicos e pela familiaridade com o equipamento.

Verificamos o padrão das curvas de pressão nos ratos não operados, e estas medidas serviram de parâmetros para avaliação dos demais ratos incluídos no estudo. Por meio das curvas obtidas no grupo Controle, e de cada rato dos demais grupos no pré-operatório, foi possível obter um padrão de variação de pressão para eletromanometria normal em ratos.

Assim, conseguimos estabelecer um perfil médio de comportamento de pressões no canal anal, com valores médios de 33,7 e 61,2 cmH₂O para pressão Média e Máxima, respectivamente. Em outros modelos, observamos

a manometria sendo realizada com o uso de cateter com balão, e os valores de pressão anal obtidos por meio da média de três medidas consecutivas. Tal metodologia foi descrita primeiramente por Read e cols., em 1992 ¹²⁹, na ausência dos recursos de informática disponíveis atualmente, e com equipamento rudimentar de difícil reprodução. Atribuímos à diferença de metodologia adotada as razões para menor média observada em nossos ratos quando comparada aos estudos citados (33,7 vs 65-72 cmH₂O para pressão Média e 61,2 vs 71,7 cmH₂O para pressão Máxima) ¹³⁰⁻¹³².

A realização da manometria, conforme nossa proposta para aferição da pressão anal em ratos em modelo de transplante intestinal é inédita, não obstante tal método já ter sido utilizado em alguns poucos estudos sobre a função anorretal nesses animais ¹³⁰⁻¹³³. Sem dúvida, a padronização e a reprodutibilidade do método desenvolvido pelo nosso grupo são grandes contribuições deste estudo.

Quando avaliamos a influência dos diversos procedimentos no padrão de manometria dos animais, verificamos que o transplante ortotópico seguiu-se de queda significativa da pressão Média e Máxima no pós-operatório, se comparado ao grupo Controle. No grupo Sham, apesar de realizarmos somente uma incisão perianal e laparotomia, sem isquemia ou anastomose, também notamos queda dos níveis pressóricos médios, porém significativamente diferentes do grupo 1 ($p < 0,05$). Talvez o trauma cirúrgico, independente da realização do transplante propriamente dito, tenha alguma influência neste aspecto, principalmente levando-se em conta que a prensa

abdominal está intimamente relacionada com o esforço evacuatório, e obviamente está prejudicada nos animais submetidos à laparotomia.

Por outro lado, tanto o grupo de ratos transplantados (grupo 1) quanto os grupos controle tiveram pressões semelhantes estatisticamente no momento D14 ($p>0,05$) de observação, mostrando recuperação funcional do esfíncter anal ao longo do tempo.

É importante observarmos que numa primeira análise deixamos de fora o grupo 2, que, por motivos técnicos já relatados, foram submetidos à manometria somente no pré-operatório e no dia D14 (sacrifício). A conduta de se fazer manometria somente em fase mais tardia de evolução pós-operatória trouxe os índices de mortalidade deste grupo de ratos para níveis aceitáveis, tornando-se então a conduta padrão para este grupo.

Durante a realização deste estudo, pela dificuldade de adaptação à metodologia proposta, foi cogitada a eliminação do grupo Heterotópico. Porém, ao nos aprofundarmos no conhecimento dos mecanismos fisiológicos de evacuação, de continência fecal, e de todas as possíveis influências que eles podem sofrer, sobretudo das estruturas pélvicas, optamos por manter este grupo, a fim de estabelecermos uma comparação entre a função de um segmento anorretal posicionado na pelve e a função deste mesmo segmento fora da pelve.

Quando analisamos os quatro grupos no momento D0 pré-operatório e D14, observamos que o grupo 2 tem uma diferença significativa dos níveis pressóricos Médios e Máximos no dia D14, quando comparado com o grupo Controle ($p<0,05$), apesar dos níveis iniciais de pressão serem semelhantes

nos quatro grupos. Quando confrontamos o desempenho dos ratos do grupo 1 com os do grupo 2, notamos que o grupo 1 não difere estatisticamente dos grupos controle, nem do grupo 2 ($p > 0,05$). Assim, podemos dizer que os dois tipos de transplante são factíveis do ponto de vista funcional, mas com tendência de melhor resultado para o transplante ortotópico. Talvez a reintegração do enxerto na estrutura músculo-nervosa da pelve tenha alguma influência no resultado funcional final do transplante.

É intrigante o fato de que nos grupos transplantados, mesmo sendo o procedimento cirúrgico feito sem a preservação dos ramos terminais do nervo podendo, os desfechos clínicos e manométricos nos levem à observação de resultados semelhantes aos grupos controle. A influência da motilidade retal e dos nervos pudendo no mecanismo evacuatório ainda não está totalmente elucidada ^{134,135}, e os trabalhos de investigação destes aspectos mostram que este mecanismo é muito mais complexo do que se pode imaginar.

Estudos experimentais têm sugerido que ondas de pressão se iniciam na junção retossigmoideana, desencadeada por um “marcapasso” local, e se propagam caudalmente ¹³⁶. Um desses estudos mostrou que, após a miotomia retal em cães, ondas elétricas podem ser registradas proximalmente à miotomia, mas não distalmente ¹¹⁷. Supõe-se que alterações da atividade elétrica retal possam levar a alterações da motilidade retal e distúrbios de defecação ¹³⁷⁻¹⁴⁰.

Foi demonstrado que ondas elétricas retais persistem após a ganglionectomia pélvica bilateral, porém com “padrão arritmico”, sugerindo

que ondas de pressão retais podem não ser iniciadas, e podem estar sob o controle da inervação autonômica extra retal, apesar da influência da inervação intrínseca ¹⁴¹. Outros estudos constataram que ondas elétricas se propagam através dos feixes musculares da parede retal e não dos plexos nervosos mioentéricos ¹⁴².

Shafik demonstrou, em estudo experimental em cães, que a secção da camada circular da musculatura retal não alterou a aparência das ondas elétricas registradas por eletrodos aplicados sobre a camada muscular longitudinal, confirmando conclusões anteriores, que as ondas elétricas retais se propagam em direção caudal ¹³⁶. Este autor acredita que as fibras musculares circulares do reto são estimuladas a contrair pela simples distensão, ou seja, a distensão retal estira as fibras musculares circulares e leva a sua contração. Portanto, a contração deste músculo, segundo o autor, parece ser um processo local, aparentemente não evocado por atividade elétrica, como ocorre nas fibras longitudinais, ou por estímulos nervosos, no caso de fibras musculares lisas do tipo multiunidade ¹⁴³.

Estas características intrínsecas neuro-musculares do reto podem ser parte da resposta para a recuperação funcional do enxerto transplantado sem a inervação extrínseca (nervos pudendos), seja ele ortotópico ou heterotópico.

Com relação ao papel do nervo pudendo no mecanismo evacuatório e na continência fecal, os dados são controversos. O nervo pudendo é um nervo misto com componente motor e fibras sensitivas direcionadas para o

esfíncter externo do ânus, esfíncter uretral e musculatura perineal, bem como para a mucosa do canal anal e pele da região perineal.

O componente motor do nervo pudendo do EEA e o componente sensitivo da inervação pudenda do canal anal são importantes para a continência fecal. Um aumento do tempo de latência do nervo pudendo, detectada por exame específico, está associado à incontinência fecal e outras disfunções anorretais em alguns estudos¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Porém, a contribuição destes nervos na inervação da musculatura elevadora do ânus e no processo evacuatório em si ainda é controversa. Evidências vindas de estudos filogenético e eletrofisiológico sugerem que o músculo puborretal, que é parte do elevador do ânus, é innervado não só pelo nervo pudendo, mas também por um ramo do nervo sacral (S3 e S4), que passa acima do assoalho pélvico¹⁴⁷. Não existe prova clara de que a ação das vias aferentes dos nervos pudendos contribui definitivamente para a sensibilidade no reto distal. Os receptores relacionados com esta sensibilidade parecem estar tanto na parede retal como em estruturas vizinhas extramurais do reto, incluindo o músculo puborretal, e demais músculos dos elevadores do ânus, lembrando que a sensibilidade retal é parte integrante do mecanismo de continência fecal^{147,148}.

Além disso, o reto distal pode receber fibras aferentes intramurais provenientes do canal anal superior, ou através do nervo hemorroidário inferior, ou ainda através de outras vias aferentes distintas provenientes de mecano-receptores do assoalho pélvico, que innervam os músculos levantadores do ânus através de ramos primariamente motores^{148,149}.

Estudos recentes a respeito das conexões nervosas da musculatura e das vísceras da pelve, assim como a interação entre estas estruturas do ponto de vista neurológico, demonstram que este sistema pode ser ainda mais complexo.

Ustinova e cols. comprovaram, em modelo experimental em ratos, que a colite aguda induzida influencia na função vesical por meio da sensibilização de propriedades mecano e quimioceptoras da estrutura vesical via nervos pélvicos ^{150,151}. Estas interações irritativas cruzadas entre os órgãos pélvicos sugerem existir um mecanismo de modulação de vias aferentes pré-existentes na pelve, ligando, de alguma forma, as estruturas aí localizadas ¹⁵¹. Tais vias aferentes cruzadas podem ser originárias de vias neuronais centrais, via espinal ou circuitos supraespinais, e/ou de vias periféricas vindas diretamente do cólon, via reflexo axonal antidrômico, ou ainda de uma dicotomização primária do suprimento aferente de duas estruturas viscerais distintas (convergência pré-espinal). A dicotomização aferente foi previamente descrita por Groat e cols. em estudos de eletrofisiologia ¹⁵². Estes e outros autores demonstraram, em modelos experimentais em ratos e gatos, que 3 a 6% da inervação do cólon e dos órgãos urogenitais apresentam características de dicotomização ^{152,153}.

Assim, fica claro que os mecanismos envolvidos no ato evacuatório e as vias neurológicas implicadas vão muito além da simples influência da inervação pudenda, tendo provavelmente influência da inervação local intramural e outras influências ainda não completamente documentadas. Possivelmente a estrutura pélvica desempenhe algum papel na melhor

evolução do transplante ortotópico em comparação com o heterotópico neste estudo.

Neste modelo experimental, optamos pela realização do autotransplante do segmento anorretal sem a inervação ou vascularização de ramos pudendos, pela dificuldade de identificação destas estruturas nos ratos. Segundo nossos resultados, a ausência de inervação ou vascularização proveniente de ramos pudendos não inviabilizou o enxerto do ponto de vista funcional nem determinou isquemia com perda do segmento transplantado.

5.3 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS

No tocante à avaliação histopatológica, foi observada preservação da musculatura e a inervação intrínseca do esfíncter anal em todos os animais, inclusive no grupo Heterotópico. Isso é sugestivo de que o fluxo sanguíneo proveniente da artéria mesentérica inferior foi suficiente para a manutenção do reto distal e do esfíncter anal.

A intensidade do infiltrado inflamatório foi semelhante entre todos os grupos submetidos ao procedimento cirúrgico, indicando que, provavelmente, o transplante anorretal ortotópico ou heterotópico desencadeia reação tecidual local comparada ao procedimento mais simples, que não envolve isquemia ou secção e anastomose intestinal.

Os dados histológicos comprovam a viabilidade do modelo proposto de autotransplante anorretal em ratos.

6 Conclusões

O modelo experimental de autotransplante anorretal ortotópico e heterotópico em ratos é factível, e a metodologia proposta para manometria anorretal em ratos mostrou ser útil e reprodutível em novos estudos.

A evolução funcional do transplante anorretal demonstrou perda da função imediatamente após o transplante, com recuperação ao longo de 14 dias. O transplante heterotópico apresentou pressões Médias e Máximas menores do que o ortotópico ao final de 14 dias.

A evolução clínica dos ratos transplantados mostrou piores resultados no pós-operatório precoce, especialmente o grupo heterotópico, com melhora e estabilização após 14 dias de observação.

Anexo 1: Tabelas das análises comparativas com teste ANOVA e Tukey

Tabela 5 - Análise de Variância Multivariada para Peso. O nível descritivo <0,05 mostra que existe diferença entre os tempos nos grupos e na composição tempo/grupo

Fonte	Teste	Estatística	F	GL Numerador	GL Denominador	Nível descritivo
Grupo	Teste F		0,85	3	41	0,4769
Tempo	Wilks	0,1865	56,69	3	39	0,0000
Tempo*Grupo	Wilks	0,2814	7,22	9	95,0664	0,0000

Tabela 6 - Comparação múltipla pelo método de Tukey para Peso. Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA

Grupo	Momento	Ortotópico				Heterotópico				Sham				Controle			
		D0	D2	D7	D14	D0	D2	D7	D14	D0	D2	D7	D14	D0	D2	D7	D14
Ortotópico	D0		1,000	0,906	0,000	1,000	1,000	1,000	0,943	0,977	1,000	1,000	0,065	0,999	1,000	0,742	0,003
	D2	1,000		0,264	0,000	1,000	1,000	1,000	0,735	1,000	1,000	0,980	0,017	1,000	1,000	0,402	0,001
	D7	0,906	0,264		0,000	1,000	0,959	1,000	1,000	0,538	0,946	1,000	0,441	0,787	1,000	0,998	0,042
	D14	0,000	0,000	0,000		0,034	0,005	0,053	0,867	0,000	0,002	0,259	1,000	0,001	0,047	0,887	1,000
Heterotópico	D0	1,000	1,000	1,000	0,034		0,990	1,000	0,003	0,989	1,000	0,998	0,029	1,000	1,000	0,570	0,001
	D2	1,000	1,000	0,959	0,005	0,990		0,919	0,000	1,000	1,000	0,868	0,004	1,000	0,996	0,166	0,000
	D7	1,000	1,000	1,000	0,053	1,000	0,919		0,012	0,966	1,000	1,000	0,049	0,998	1,000	0,700	0,002
	D14	0,943	0,735	1,000	0,867	0,003	0,000	0,012		0,071	0,375	1,000	0,931	0,166	0,969	1,000	0,287
Sham	D0	0,977	1,000	0,538	0,000	0,989	1,000	0,966	0,071		0,868	0,000	0,000	1,000	0,683	0,007	0,000
	D2	1,000	1,000	0,946	0,002	1,000	1,000	1,000	0,375	0,868		0,001	0,000	1,000	0,993	0,091	0,000
	D7	1,000	0,980	1,000	0,259	0,998	0,868	1,000	1,000	0,000	0,001		0,000	0,511	1,000	0,995	0,011
	D14	0,065	0,017	0,441	1,000	0,029	0,004	0,049	0,931	0,000	0,000	0,000		0,000	0,036	0,945	0,998
Controle	D0	0,999	1,000	0,787	0,001	1,000	1,000	0,998	0,166	1,000	1,000	0,511	0,000		0,008	0,000	0,000
	D2	1,000	1,000	1,000	0,047	1,000	0,996	1,000	0,969	0,683	0,993	1,000	0,036	0,008		0,000	0,000
	D7	0,742	0,402	0,998	0,887	0,570	0,166	0,700	1,000	0,007	0,091	0,995	0,945	0,000	0,000		0,000
	D14	0,003	0,001	0,042	1,000	0,001	0,000	0,002	0,287	0,000	0,000	0,011	0,998	0,000	0,000	0,000	

Tabela 7 Comportamento. O nível descritivo $<0,05$ mostra que existe diferença nos grupos, nos tempos e na composição tempo/grupo

Fonte	Teste	Estatística	F	GL Numerador	GL Denominador	Nível descritivo
Grupo	Teste F		10,08	3	41	0,0000
Tempo	Wilks	0,2732	34,58	3	39	0,0000
Tempo*Grupo	Wilks	0,4728	3,81	9	95	0,0004

Tabela 8 - Comparação múltipla pelo método de Tukey para escore de Comportamento. Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA

Grupo	Momento	Ortotópico				Heterotópico				Sham				Controle			
		D0	D2	D7	D14	D0	D2	D7	D14	D0	D2	D7	D14	D0	D2	D7	D14
Ortotópico	D0		0,007	0,068	1,000	1,000	0,000	0,000	0,859	1,000	0,038	0,293	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	D2	0,007		1,000	0,068	0,008	0,144	0,975	0,989	0,002	1,000	1,000	0,119	0,001	0,006	0,153	0,006
	D7	0,068	1,000		0,355	0,059	0,026	0,750	1,000	0,024	1,000	1,000	0,452	0,017	0,052	0,537	0,052
	D14	1,000	0,068	0,355		0,999	0,000	0,001	0,993	0,998	0,215	0,731	1,000	0,997	1,000	1,000	1,000
Heterotópico	D0	1,000	0,008	0,059	0,999		0,000	0,000	0,117	1,000	0,002	0,041	0,999	1,000	1,000	0,992	1,000
	D2	0,000	0,144	0,026	0,000	0,000		0,884	0,000	0,000	0,030	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	D7	0,000	0,975	0,750	0,001	0,000	0,884		0,016	0,000	0,878	0,349	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	D14	0,859	0,989	1,000	0,993	0,117	0,000	0,016		0,268	0,986	1,000	0,962	0,225	0,446	0,983	0,446
Sham	D0	1,000	0,002	0,024	0,998	1,000	0,000	0,000	0,268		0,000	0,000	0,974	1,000	1,000	0,978	1,000
	D2	0,038	1,000	1,000	0,215	0,002	0,030	0,878	0,986	0,000		1,000	0,003	0,000	0,001	0,065	0,001
	D7	0,293	1,000	1,000	0,731	0,041	0,001	0,349	1,000	0,000	1,000		0,119	0,007	0,027	0,505	0,027
	D14	1,000	0,119	0,452	1,000	0,999	0,000	0,000	0,962	0,974	0,003	0,119		0,995	1,000	1,000	1,000
Controle	D0	1,000	0,001	0,017	0,997	1,000	0,000	0,000	0,225	1,000	0,000	0,007	0,995		1,000	0,855	1,000
	D2	1,000	0,006	0,052	1,000	1,000	0,000	0,000	0,446	1,000	0,001	0,027	1,000	1,000		0,987	1,000
	D7	1,000	0,153	0,537	1,000	0,992	0,000	0,000	0,983	0,978	0,065	0,505	1,000	0,855	0,987		0,987
	D14	1,000	0,006	0,052	1,000	1,000	0,000	0,000	0,446	1,000	0,001	0,027	1,000	1,000	1,000	0,987	

Tabela 9 - Análise de Variância Multivariada para escore de Abdômen. O nível descritivo $<0,05$ mostra que existe diferença nos grupos, nos tempos e na composição tempo/grupo

Fonte	Teste	Estatística	F	GL Numerador	GL Denominador	Nível descritivo
Grupo	Teste F		5,61	3	41	0,0026
Tempo	Wilks	0,7195	7,80	2	40	0,0014
Tempo*Grupo	Wilks	0,6885	2,74	6	80	0,0181

Tabela 10 - Comparação múltipla pelo método de Tukey para escore de Abdômen. Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA

Grupo	Momento	Ortotópico			Heterotópico			Sham			Controle		
		D2	D7	D14	D2	D7	D14	D2	D7	D14	D2	D7	D14
Ortotópico	D2		0,482	0,039	0,375	1,000	0,999	0,365	0,365	0,365	0,326	0,326	0,326
	D7	0,482		0,991	0,008	0,980	1,000	1,000	1,000	1,000	0,999	0,999	0,999
	D14	0,039	0,991		0,001	0,663	0,967	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Heterotópico	D2	0,375	0,008	0,001		0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	D7	1,000	0,980	0,663	0,002		0,995	0,493	0,493	0,493	0,449	0,449	0,449
	D14	0,999	1,000	0,967	0,000	0,995		0,928	0,928	0,928	0,914	0,914	0,914
Sham	D2	0,365	1,000	1,000	0,000	0,493	0,928		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	D7	0,365	1,000	1,000	0,000	0,493	0,928	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000
	D14	0,365	1,000	1,000	0,000	0,493	0,928	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000
Controle	D2	0,326	0,999	1,000	0,000	0,449	0,914	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000
	D7	0,326	0,999	1,000	0,000	0,449	0,914	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000
	D14	0,326	0,999	1,000	0,000	0,449	0,914	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Tabela 11 - Análise de Variância Multivariada para escore de Aspecto anal. O nível descritivo $<0,05$ mostra que existe diferença nos grupos, nos tempos e na composição tempo/grupo

Fonte	Teste	Estatística	F	GL Numerador	GL Denominador	Nível descritivo
Grupo	Teste F		19,28	3	41	0,0000
Tempo	Wilks	0,3441	24,78	3	39	0,0000
Tempo*Grupo	Wilks	0,3014	6,73	9	95	0,0000

Tabela 12 - Comparação múltipla pelo método de Tukey para escore de Aspecto anal. Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA

[illegible]

Tabela 13 - Análise de Variância Multivariada para escore de Fezes. O nível descritivo $<0,05$ mostra que existe diferença nos grupos, nos tempos e na composição tempo/grupo

Fonte	Teste	Estatística	F	GL Numerador	GL Denominador	Nível descritivo
Grupo	Teste F		8,50	3	40	0,0002
Tempo	Wilks	0,6474	10,62	2	39	0,0002
Tempo*Grupo	Wilks	0,6575	3,03	6	78	0,0102

Tabela 14 - Comparação múltipla pelo método de Tukey para escore de Fezes. Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA

Grupo	Momento	Ortotópico			Heterotópico			Sham			Controle		
		D2	D7	D14	D2	D7	D14	D2	D7	D14	D2	D7	D14
Ortotópico	D2		0,642	0,009	0,157	1,000	1,000	0,449	0,449	0,449	0,326	0,326	0,326
	D7	0,642		0,999	0,001	0,873	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	D14	0,009	0,999		0,001	0,512	0,967	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Heterotópico	D2	0,157	0,001	0,001		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	D7	1,000	0,873	0,512	0,000		0,999	0,449	0,449	0,449	0,326	0,326	0,326
	D14	1,000	1,000	0,967	0,000	0,999		0,999	0,999	0,999	0,967	0,967	0,967
Sham	D2	0,449	1,000	1,000	0,000	0,449	0,999		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	D7	0,449	1,000	1,000	0,000	0,449	0,999	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000
	D14	0,449	1,000	1,000	0,000	0,449	0,999	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000
Controle	D2	0,326	1,000	1,000	0,000	0,326	0,967	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000
	D7	0,326	1,000	1,000	0,000	0,326	0,967	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000
	D14	0,326	1,000	1,000	0,000	0,326	0,967	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

Tabela 15 - Análise de Variância para Infiltrado parietal. O nível descritivo <0,05 mostra diferença entre os grupos

Fonte	GL	Soma de quadrados	Quadrados Médios	F	Nível descritivo
Grupo	3	9,1	3,0	14,09	0,000
Resíduo	50	10,8	0,2		
Total	53	19,9			

Tabela 16 - Comparação múltipla de Tukey para Infiltrado parietal. Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo responsável pela diferença verificada no ANOVA

	Ortotópico	Heterotópico	Sham	Controle
Ortotópico		0,9359	0,5400	0,0002
Heterotópico	0,9359		0,2035	0,0002
Sham	0,5400	0,2035		0,0024
Controle	0,0002	0,0002	0,0024	

Tabela 17 - Análise de Variância para Nível do Infiltrado. Análise de Variância para Infiltrado parietal. O nível descritivo $>0,05$ mostra que não há diferença entre os grupos

Fonte	GL	Soma de quadrados	Quadrados Médios	F	Nível descritivo
Grupo	3	3,14	1,0	1,83	0,157
Resíduo	39	22,30	0,6		
Total	42	25,44			

Tabela 18 - Análise de Variância Multivariada para Pressão Média (grupos 1, 3 e 4). O nível descritivo <0,05 mostra que existe diferença nos grupos, nos tempos e na composição tempo/grupo

Fonte	Teste	Estatística	F	GL Numerador	GL Denominador	Nível descritivo
Grupo	Teste F		13,63	2	33	0,0000
Tempo	Wilks	0,1900	44,04	3	31	0,0000
Tempo*Grupo	Wilks	0,1990	12,83	6	62	0,0000

Tabela 19 - Comparação múltipla pelo método de Tukey para Pressão Média grupos 1, 3 e 4). Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo responsável pela diferença verificada no ANOVA

Grupo	Momento	Ortotópico				Sham				Controle			
		D0-pré	D0-pós	D7	D14	D0-pré	D0-pós	D7	D14	D0-pré	D0-pós	D7	D14
Ortotópico	D0-pré		0,000	0,003	0,607	1,000	0,557	1,000	1,000	0,860	0,860	1,000	1,000
	D0-pós	0,000		0,058	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	D7	0,003	0,058		0,597	0,006	0,967	0,115	0,019	0,000	0,000	0,009	0,011
	D14	0,607	0,000	0,597		0,511	1,000	0,982	0,755	0,031	0,031	0,622	0,673
Sham	D0-pré	1,000	0,000	0,006	0,511		0,005	0,927	1,000	0,962	0,962	1,000	1,000
	D0-pós	0,557	0,005	0,967	1,000	0,005		0,316	0,028	0,001	0,001	0,149	0,181
	D7	1,000	0,000	0,115	0,982	0,927	0,316		0,998	0,304	0,304	0,998	0,999
	D14	1,000	0,000	0,019	0,755	1,000	0,028	0,998		0,802	0,802	1,000	1,000
Controle	D0-pré	0,860	0,000	0,000	0,031	0,962	0,001	0,304	0,802		1,000	0,501	0,419
	D0-pós	0,860	0,000	0,000	0,031	0,962	0,001	0,304	0,802	1,000		0,501	0,419
	D7	1,000	0,000	0,009	0,622	1,000	0,149	0,998	1,000	0,501	0,501		1,000
	D14	1,000	0,000	0,011	0,673	1,000	0,181	0,999	1,000	0,419	0,419	1,000	

Tabela 20 - Análise de Variância Multivariada para Pressão Máxima (grupos 1, 3 e 4). O nível descritivo $<0,05$ mostra que existe diferença nos grupos, nos tempos e na composição tempo/grupo

Fonte	Teste	Estatística	F	GL Numerador	GL Denominador	Nível descritivo
Grupo	Teste F		11,04	2	33	0,0002
Tempo	Wilks	0,1937	43,03	3	31	0,0000
Tempo*Grupo	Wilks	0,1990	12,83	6	62	0,0000

Tabela 21 - Comparação múltipla pelo método de Tukey para Pressão Máxima (grupos 1, 3 e 4). Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA

Grupo	Momento	Ortotópico				Sham				Controle			
		D0-pré	D0-pós	D7	D14	D0-pré	D0-pós	D7	D14	D0-pré	D0-pós	D7	D14
Ortotópico	D0-pré		0,000	0,020	0,936	1,000	0,858	1,000	1,000	0,975	0,975	1,000	1,000
	D0-pós	0,000		0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	D7	0,020	0,001		0,584	0,026	0,975	0,198	0,012	0,002	0,002	0,086	0,052
	D14	0,936	0,000	0,584		0,811	1,000	0,997	0,649	0,301	0,301	0,972	0,931
Sham	D0-pré	1,000	0,000	0,026	0,811		0,031	0,987	1,000	0,999	0,999	1,000	1,000
	D0-pós	0,858	0,000	0,975	1,000	0,031		0,483	0,009	0,029	0,029	0,628	0,478
	D7	1,000	0,000	0,198	0,997	0,987	0,483		0,903	0,822	0,822	1,000	1,000
	D14	1,000	0,000	0,012	0,649	1,000	0,009	0,903		1,000	1,000	0,999	1,000
Controle	D0-pré	0,975	0,000	0,002	0,301	0,999	0,029	0,822	1,000		1,000	0,667	0,847
	D0-pós	0,975	0,000	0,002	0,301	0,999	0,029	0,822	1,000	1,000		0,667	0,847
	D7	1,000	0,000	0,086	0,972	1,000	0,628	1,000	0,999	0,667	0,667		1,000
	D14	1,000	0,000	0,052	0,931	1,000	0,478	1,000	1,000	0,847	0,847	1,000	

Tabela 22 - Análise de Variância para Pressão Média (quatro grupos). O nível descritivo $<0,05$ mostra que existe diferença nos grupos e nos tempos

Fonte	Soma de quadrados	GL	Quadrados Médios	F	Nível descritivo
Grupo	5108,1	3	1702,7	10,79	0,0000
Erro	6467,0	41	157,7		
Tempo	1529,0	1	1529,0	16,46	0,0002
Tempo*Grupo	565,7	3	188,6	2,03	0,1247
Erro	3808,4	41	92,9		

Tabela 23 - Comparação múltipla pelo método de Tukey para Pressão Média (quatro grupos). Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA

Grupo	Ortotópico	Heterotópico	Sham	Controle
Ortotópico		0,0567	0,4584	0,1113
Heterotópico	0,0567		0,0005	0,0002
Sham	0,4584	0,0005		0,7950
Controle	0,1113	0,0002	0,7950	

Tabela 24 - Comparação múltipla pelo método de Tukey para Pressão Máxima (quatro grupos). Os valores comparativos menores que 0,05 mostram o grupo/tempo responsável pela diferença verificada no ANOVA

Grupo	Ortotópico	Heterotópico	Sham	Controle
Ortotópico		0,2047	0,4906	0,4236
Heterotópico	0,2047		0,0033	0,0020
Sham	0,4906	0,0033		0,9998
Controle	0,4236	0,0020	0,9998	

Tabela 25 - Análise de Variância para Pressão Máxima (quatro grupos). O nível descritivo <0,05 mostra que existe diferença nos grupos e nos tempos

Fonte	Soma de quadrados	GL	Quadrados Médios	F	Nível descritivo
Grupo	9753,3	3	3251,1	6,19	0,0014
Erro	21531,7	41	525,2		
Tempo	1469,0	1	1469,0	6,84	0,0124
Tempo*Grupo	1052,7	3	350,9	1,63	0,1963
Erro	8805,2	41	214,8		

8 Referências

1. Rintala R, Mildh L, Lindahl H. Fecal continence and quality of life in adult patients with an operated low anorectal malformation. *J Pediatr Surg*. 1992;27:902-5.
2. Mandelstam DA. Faecal incontinence: social and economic factors. In: Henry MM, Swash Meds. *Coloproctology and the pelvic floor: pathophysiology and management*. London: Butterworths; 1985. p.217-22.
3. Nelson R, Norton N, Cautley E. Prevalence of fecal incontinence in Wisconsin households. *Dis Colon Rectum*. 1994;37:Suppl:P9. Abstract.
4. Madoff RD, Parker SC, Varma MG, Lowry AC. Faecal incontinence in adults. *Lancet*. 2004;364:621-32.
5. Mavrantonis C, Wexner SD. A clinical approach to fecal incontinence. *J Clin Gastroenterol*. 1998;27:108-21.
6. Prather CM. Physiologic variables that predict the outcome of treatment for fecal incontinence. *Gastroenterology*. 2004;126:S135-S140.
7. Chiarioni G, Scattolini C, Bonfante F, Vantini I. Liquid stool incontinence with severe urgency: anorectal function and effective biofeedback treatment. *Gut*. 1993;34:1576-80.
8. MacMillan A. Prevalence of fecal incontinence in community - dwelling adults: a systematic review of the literature. *Dis Colon Rectum*. 2004; 47:1341-9.
9. Johanson JF, Lafferty J. Epidemiology of fecal incontinence: the silent affliction. *Am J Gastroenterol*. 1996;91:33-6.

10. Madoff RD, Williams JG, Caushaj PE. Fecal incontinence. *N Engl J Med*. 1992;326:1002-7.
11. Duthie HL, Watts JM. Contribution of the external anal sphincter to the pressure zone in the anal canal. *Gut*. 1965;6:64-8.
12. Gibbons CP, Trowbridge EA, Bannister JJ, Read NW. Role of anal cushions in maintaining continence. *Lancet*. 1986;i:886-8.
13. Gee ASS, Durdey P. Urge incontinence of faeces is a marker of severe external anal sphincter dysfunction. *Br J Surg*. 1995;82:1179-82.
14. Jorge JM, Wexner SD. Etiology and management of fecal incontinence. *Dis Colon Rectum*. 1993;36:77-97.
15. Ctercteko GC, Fazio VW, Jagelman DG, Lavery IC, Weakley FL, Melia M. Anal sphincter repair: a report of 60 cases and review of the literature. *Aust N Z J Surg*. 1988;58:703-10.
16. Keighley MR, Fielding JW. Management of fecal incontinence and results of surgical treatment. *Br J Surg*. 1983;70:463-8.
17. Parks AG. Anorectal incontinence. *Proc R Soc Med*. 1975;68:681-90.
18. Iglíki F, Coffin B, Ille O, Flourié B, Amarenco G, Lémann M, Messing B. Fecal incontinence after pelvic radiotherapy: evidences for a lumbosacral plexopathy. Report of a case. *Dis Colon Rectum*. 1996;39:465-7.
19. Schiller LR, Santa Ana CA, Schmulen AC, Hendler RS, Harford WV, Fordtran JS. Pathogenesis of fecal incontinence in diabetes mellitus: evidence for internal anal sphincter dysfunction. *N Engl J Med*. 1982;307:1666-71.

-
20. Pintor MP, Zara GP, Falletto E, Monge L, Demattei M, Carta Q, Masenti E. Pudendal neuropathy in diabetic patients with fecal incontinence. *Int J Colorectal Dis.* 1994;9:105-9.
 21. Shakil A, Church RJ, Rao SS. Gastrointestinal complications of diabetes. *Am Fam Physician.* 2008;77(12):1697-702.
 22. Khubchandani IT, Reed JF. Sequelae of internal sphincterotomy for chronic fissure in ano. *Br J Surg.* 1989;76:431-4.
 23. Garcia-Aguilar J, Belmonte C, Wong WD, Lowry AC, Madoff RD. Open vs. closed sphincterotomy for chronic anal fissure: long term results. *Dis Colon Rectum.* 1996;39:440-3.
 24. Pernikoff BJ, Eisenstat TE, Rubin RJ, Oliver GC, Salvati EP. Reappraisal of partial lateral internal sphincterotomy. *Dis Colon Rectum.* 1994;37:1291-5.
 25. Hananel N, Gordon PH. Lateral internal sphincterotomy for fissure-in-ano: revisited. *Dis Colon Rectum.* 1997;40:597-602.
 26. Hyman N. Incontinence after lateral internal sphincterotomy: a prospective study and quality of life assessment. *Dis Colon Rectum.* 2004;47:35-8.
 27. Tjandra JJ, Han WR, Ooi BS, Nagesh A, Thorne M. Fecal incontinence after lateral internal sphincterotomy is often associated with coexisting occult sphincter defects: a study using endoanal ultrasonography. *AZN J Surg.* 2001;71:598-602.
 28. Sultan AH, Kamm MA, Nicholls RJ, Bartram CI. Prospective study of the extent of internal anal sphincter division during lateral internal sphincterotomy. *Dis Colon Rectum.* 1994;37:1031-3.

29. Aguilar PS, Plasencia G, Hardy TG, Hartman RF, Stewart WR. Mucosal advancement in the treatment of anal fistula. *Dis Colon Rectum*. 1985;28:496-8.
30. Stelzner F. The morphological principles of anorectal continence. *Prog Pediatr Surg*. 1976;9:1-6.
31. Eason E, Labrecque M, Marcoux S, Mondor M. Anal incontinence after childbirth. *CMAJ*. 2002;166:326-30.
32. Faridi A, Willis S, Schelzig P, Siggelkow W, Schumpelick V, Rath W. Anal sphincter injury during vaginal delivery: an argument for cesarean section on request? *J Perinat Med*. 2002;30:379-87.
33. Fynes M, Donnelly VS, O'Connell R, O'Herlihy C. Cesarean delivery and anal sphincter injury. *Obstet Gynecol*. 1998;92:496-500.
34. Sultan AH, Nicholls RJ, Kamm MA. Anal endosonography and correlation with in vitro and in vivo anatomy. *Br J Surg*. 1993;80:508-11.
35. Hiltunen KM. Anal manometric findings in patients with anal incontinence. *Dis Colon Rectum*. 1985;28:925-8.
36. Read NW, Bartolo DCC, Read MG. Differences in anal function in patients with incontinence to solids and in patients with incontinence to liquids. *Br J Surg*. 1984;71:39-42.
37. Bharucha AE. Outcome measures for fecal incontinence: anorectal structure and function. *Gastroenterology*. 2004;126:S90-S98.
38. Williams AB, Bartram CI, Modhwadia D, Nicholls T, Halligan S, Kamm MA, Nicholls RJ, Kmiot WA. Endocore magnetic resonance imaging quantification of external anal sphincter atrophy. *Br J Surg*. 2001;88:853-9.

39. Briel JW, Stoker J, Rociu E, Lameris JS, Hop WC, Schouten WR. External anal sphincter atrophy on endoanal MRI adversely affects continence after sphincteroplasty. *Br J Surg.* 1999;86:1322-7.
40. Briel JW, Zimmerman DDE, Stoker J, Rociu E, Laméris JS, Mooi WJ, Schouten WR. Relationship between sphincter morphology on endoanal MRI and histopathological aspects of the external anal sphincter. *Int J Colorectal Dis.* 2000;15:87-90.
41. Devesa JM, López-Hervás P, Vicente R, Rey A, Die J, Fraile A. Total anorectal reconstruction: a novel technique *Tech Coloproctol.* 2005;9:149-52.
42. Rosen L, Khubchandani IT, Sheets JA, Spasik JJ, Riether RD. Management of anal incontinence. *Am Fam Physician.* 1986;33:129-37.
43. Hallgren T, Fasth S, Delbro DS, Nordgren S, Oresland T, Hultén L. Loperamide improves anal sphincter function and continence after restorative proctocolectomy. *Dig Dis Sci.* 1994;39:2612-8.
44. Christiansen J, Roed-Petersen K. Clinical assessment of the anal continence plug. *Dis Colon Rectum.* 1993;36:740-2.
45. Engel BT, Nikoomanesh P, Schuster MM. Operant conditioning of rectosphincteric responses in the treatment of fecal incontinence. *N Engl J Med.* 1974;290:646-9.
46. Norton C, Hosker G, Brazzelli M. Biofeedback and/or sphincter exercises for the treatment of fecal incontinence in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;2:CD002111.
47. Parks AG, McPartlin JF. Later repair of injuries of the anal sphincter. *Proc R Soc Med.* 1971;64:1187-9.

-
48. Briel JW, de Boer LM, Hop WCJ, Schouten WR. Clinical outcome of anterior overlapping external anal sphincter repair with internal sphincter imbrication. *Dis Colon Rectum*. 1998;41:209-14.
 49. Rothbarth J, Bemelman WA, Meijerink WJHJ, Buyze-Westerweel ME, van Dijk JG, Delemarre JBVM. Long-term results of anterior anal sphincter repair for fecal incontinence due to obstetric injury. *Digest Surg*. 2000; 17:390-4.
 50. Gutierrez AB, Madoff RD, Lowry AC, Parker SC, Buie WD, Baxter NN. Long-term results of anterior sphincteroplasty. *Dis Colon Rectum*. 2004; 47:727-32.
 51. Pickrell KL, Broadbent TR, Masters FW, Metzger JT. Construction of a rectal sphincter and restoration of anal continence by transplanting the gracilis muscle: a report of four cases in children. *Ann Surg*. 1952;135:853-62.
 52. Yoshioka K, Keighley MRB. Clinical and manometric assessment of gracilis muscle transplant for fecal incontinence. *Dis Colon Rectum*. 1988;31: 767-9.
 53. Konsten J, Baeten CGM, Havenith MG, Soeters PB. Morphology of dynamic graciloplasty compared with the anal sphincter. *Dis Colon Rectum*. 1993;36:559-63.
 54. Fleshner PR, Roberts PL. Encirclement procedures for fecal incontinence. *Perspect Colon Rectal Surg*. 1991;4:280-7.
 55. Kumar D, Hutchinson R, Grant E. Bilateral gracilis neosphincter construction for treatment of faecal incontinence. *Br J Surg*. 1995;82:1645-7.

-
56. Konsten J, Baeten CG, Spaans F, Havenith MG, Soeters PB. Follow-up of anal dynamic graciloplasty for fecal continence. *World J Surg.* 1993;17:404-9.
57. George BD, Williams NS, Patel J, Swash M, Watkins ES. Physiological and histochemical adaptation of the electrically stimulated graciles muscle to neoanal sphincter function. *Br J Surg.* 1993;80:1342-6.
58. Wexner SD, Gonzalez-Padron A, Ruis J, Teoh TA, Cheong DM, Nogueras JJ, Billotti VL, Weiss EG, Moon HK. Stimulated gracilis neosphincter operation. Initial experience, pitfalls, and complications. *Dis Colon Rectum.* 1996;39:957-64.
59. Geerdes BP, Heineman E, Konsten J, Soeters PB, Baeten CGMI. Dynamic graciloplasty. Complications and management. *Dis Colon Rectum.* 1996;39:912-7.
60. Penninckx F; Belgian Section of Colorectal Surgery. Belgian experience with dynamic graciloplasty for faecal incontinence. *Br J Surg.* 2004;91:872-8.
61. Matzel KE, Madoff RD, LaFontaine LJ, Baeten CG, Buie WD, Christiansen J, Wexner S; Dynamic Graciloplasty Therapy Study Group. Complications of dynamic graciloplasty: incidence, management, and impact on outcome. *Dis Colon Rectum.* 2001;44:1427-35.
62. Altomare DF, Rinaldi M, Pannarale OC, Memeo V. Electrostimulated gracilis neosphincter for faecal incontinence and in total anorectal reconstruction: still an experimental procedure? *Int J Colorectal Dis.* 1997;12:308-12.

-
63. Ho KS, Seow-Choen F. Dynamic graciloplasty for total anorectal reconstruction after abdominoperineal resection for rectal tumour. *Int J Colorectal Dis.* 2005;20:38-41.
64. Christiansen J, Lorentzen M. Implantation of artificial sphincter for anal incontinence. *Lancet.* 1987;i:244-5.
65. Christiansen J, Lorentzen M. Implantation of artificial sphincter for anal incontinence. *Dis Colon Rectum.* 1989;32:432-6.
66. Christiansen J, Sparsø B. Treatment of anal incontinence by an implantable prosthetic anal sphincter. *Ann Surg.* 1992;215:383-6.
67. Spencer M, Wong W, Congilosi S, et al. Artificial anal sphincter: preliminary results of a multicenter prospective trial. *Dis Colon Rectum.* 1998;41:A15.
68. Matzel KE, Stadelmaier U, Hohenfellner M, Gall FP. Electrical stimulation of sacral spinal nerves for treatment of faecal incontinence. *Lancet.* 1995;346:1124-7.
69. Hull T. Sacral neuromodulation stimulation in fecal incontinence. *Int Urogynecol J.* 2010;21:1565-8.
70. Maeda Y, Lundby L, Buntzen S, Laurberg S. Suboptimal outcome following sacral nerve stimulation for faecal incontinence. *Br J Surg.* 2011; 98:140-7.
71. Williams NS. Restorative proctocolectomy is the first choice elective surgical treatment for ulcerative colitis. *Br J Surg.* 1989;76:1109-10.
72. Williams NS. Changing patterns in the treatment of rectal cancer. *Br J Surg.* 1989;76:5-6.

-
73. Heald RJ, Smedh RK, Kald A, Sexton R, Moran BJ. Abdominoperineal excision of the rectum - an endangered operation. Norman Nigro Lectureship. *Dis Colon Rectum*. 1997;40:747-51.
74. Onaitis MW, Mantyh C. Ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis: historical development and current status. *Ann Surg*. 2003;238:S42–S48.
75. Garcia-Aguilar J, Shi Q, Thomas CR Jr, Chan E, Cataldo P, Marcet J, Medich D, Pigazzi A, Oommen S, Posner MC. A phase II trial of neoadjuvant chemoradiation and local excision for T2N0 rectal cancer: preliminary results of the ACOSOG Z6041 trial. *Ann Surg Oncol*. 2012;19:384-91. Epub 2011 Jul 14.
76. Habr-Gama A, de Souza PM, Ribeiro U Jr, Nadalin W, Gansl R, Souza AH Jr, Campos FG, Gama-Rodrigues J. Low rectal cancer: impact of radiation and chemotherapy on surgical treatment. *Dis Colon Rectum*. 1998;41(9):1087-96.
77. Habr-Gama A, Perez RO, São Julião GP, Proscurshim I, Gama-Rodrigues J. Nonoperative approaches to rectal cancer: a critical evaluation. *Semin Radiat Oncol*. 2011;21(3):234-9.
78. Leso V, Leggio L, Armuzzi A, Gasbarrini G, Gasbarrini A, Addolorato G. Role of the tumor necrosis factor antagonists in the treatment of inflammatory bowel disease: an update. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010;22(7):779-86.
79. Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2009;136(4):1182-97.

-
80. Sauer R, Fietkau R, Wittekind C, Rödel C, Martus P, Hohenberger W, Tschmelitsch J, Sabitzer H, Karstens JH, Becker H, Hess C, Raab R, German Rectal Cancer Group. Adjuvant vs. neoadjuvant radiochemotherapy for locally advanced rectal cancer: the German trial CAO/ARO/AIO-94. *Colorectal Dis.* 2003;5:406-15.
81. Bujko K, Nowacki MP, Oledzki J, Sopylo R, Skoczylas J, Chwalinski M. Sphincter preservation after short-term preoperative radiotherapy for low rectal cancer - presentation of own data and a literature review. *Acta Oncol.* 2001;40:593-601.
82. Ricciardi R, Virnig BA, Madoff RD, Rothernberger DA, Baxter NN. The status of radical proctectomy and sphincter-sparing surgery in the United States. *Dis Colon Rectum.* 2007;50:1119-27.
83. Rogen M-JGM, Dekker FA, Geerdes BP, Heineman E, Baeten CG. Secondary coloanal pull-through and double dynamic graciloplasty after Miles resection - feasible, but with a high morbidity. *Dis Colon Rectum.* 1999;42:776-781.
84. Romano G, La Torre F, Cutini G, Bianco F, Esposito P, Montori A. Total anorectal reconstruction with the artificial bowel sphincter: report of eight cases. A quality-of-life assessment. *Dis Colon Rectum.* 2003;46:730-4.
85. Delaere PR, Vranckx JJ, Dooms C, Meulemans J, Hermans R. Tracheal autotransplantation: guidelines for optimal functional outcome. *Laryngoscope.* 2011;121(8):1708-14.
86. Fattah A, Cypel T, Donner EJ, Wang F, Alman BA, Zuker RM. The first successful lower extremity transplantation: 6-year follow-up and implications for cortical plasticity. *Am J Transplant.* 2011;11(12):2762-7.

-
87. Pomahac B, Pribaz J, Eriksson E, Annino D, Caterson S, Sampson C, Chun Y, Orgill D, Nowinski D, Tullius SG. Restoration of facial form and function after severe disfigurement from burn injury by a composite facial allograft. *Am J Transplant*. 2011;11(2):386-93.
88. Eid KR, Costa G, Bond GJ, Cruz RJ, Rubin E, Bielefeldt K, Koritsky D, Abu-Elmagd KM. An innovative sphincter preserving pull-through technique with en bloc colon and small bowel transplantation. *Am J Transplant*. 2010;10(8):1940-6.
89. Maurer CA, Renzulli P, Kull C, Käser SA, Mazzucchelli L, Ulrich A, Büchler MW. The impact of the introduction of total mesorectal excision on local recurrence rate and survival in rectal cancer: long-term results. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(7):1899-906.
90. Kjeldsen BJ, Kronborg O, Fenger C, Jørgensen OD. The pattern of recurrent colorectal cancer in a prospective randomised study and the characteristics of diagnostic tests. *Int J Colorectal Dis*. 1997;12(6):329-34.
91. Wang Y, Chen J. Lung transplantation for lung carcinoma: a case report and literature review. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2011;14(7):633-6.
92. Gringeri E, Bassi D, D'Amico FE, Boetto R, Polacco M, Lodo E, D'Amico F, Vitale A, Boccagni P, Zanusi G, Cillo U. Neoadjuvant therapy protocol and liver transplantation in combination with pancreatoduodenectomy for the treatment of hilar cholangiocarcinoma occurring in a case of primary sclerosing cholangitis: case report with a more than 8-year disease-free survival. *Transplant Proc*. 2011;43(4):1187-9.
93. Uskudar O, Raja K, Schiano TD, Fiel MI, del Rio Martin J, Chang C. Liver transplantation is possible in some patients with liver metastasis of colon cancer. *Transplant Proc*. 2011;43(5):2070-4.

-
94. Rushmore JD. Anorectal transplantation. *Ann Surg.* 1901;34:655-9.
95. O'Bichere A, Shurey S, Sibbons P, Green C, Phillips RK. Experimental model of anorectal transplantation. *Br J Surg.* 2000;87:1534-9.
96. Galvão FH, Santos RM, Neto AB, Machado MA, Bacchella T, Machado MC. Small bowel and colon transplantation in rats using porto-portal cuff anastomosis. *Transplant Proc.* 2006;38:1842-3.
97. Galvão FHF, Seid VE, Nunes dos Santos RM, Kitamura M, de Castro Galvão R, Ambar Pinto R, Miyashiro Nunes dos Santos R. Anorectal Transplantation. *Tech Coloproctol.* 2009;13:55-9.
98. Diamant NE, Kamm MA, Wald A, Whitehead WE. American Gastroenterological Association medical position statement on anorectal testing techniques. *Gastroenterology.* 1999;116:732-60.
99. Jorge JM, Habr-Gama A, Wexner SD, Pinotti HW. Practical physiologic evaluation of the colon, rectum and anus. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 1994;49(5):196-8.
100. Dubernard JM, Owen E, Herzberg G, Lanzetta M, Martin X, Kapila H, Dawahra M, Hakim NS. Human hand allograft: report on first 6 months. *Lancet.* 1999;353:1315-20.
101. Strome M, Stein J, Esclamado R, Hicks D, Lorenz RR, Braun W, Yetman R, Eliachar I, Mayes J. Laryngeal transplantation and 40-month follow-up. *N Engl J Med* 2001;344:1676-9.
102. Pomahac B, Aflaki P. Composite tissue transplantation: a new era in transplantation surgery. *Eplasty.* 2010;10.pii: e58.

-
103. Todo S, Tzakis A, Reyes J, Abu-Elmagd K, Furukawa H, Nour B, Casavilla A, Nakamura K, Fung J, Demetris AJ, et al. Small intestinal transplantation in humans with or without the colon. *Transplantation* 1994;57:840-8.
104. Todo S, Reyes J, Furukawa H, Abu-Elmagd K, Lee RG, Tzakis A, Rao AS, Starzl TE. Outcome analysis of 71 clinical intestinal transplantations. *Ann Surg*. 1995;222:270-80.
105. Goulet O, Auber F, Fourcade L, Sarnacki S, Jan D, Colomb V, Cézard JP, Aigrain Y, Riccour C, Révillon Y. Intestinal transplantation including the colon in children. *Transplant Proc*. 2002;34:1885-6.
106. Lacaille F, Vass N, Sauvat F, Canioni D, Colomb V, Talbotec C, De Serre NP, Salomon J, Hugot JP, Cézard JP, Révillon Y, Ruemmele FM, Goulet O. Long-term outcome, growth and digestive function in children 2 to 18 years after intestinal transplantation. *Gut*. 2008;57:455-61.
107. Kato T, Selvaggi G, Gaynor JJ., Takahashi H, Nishida S, Moon J, Levi D, Smith L, Hernandez E, Ruiz P, Tzakis A. Inclusion of donor colon and ileocecal valve in intestinal transplantation. *Transplantation*. 2008;86:293-7.
108. Galvão FH, Santos RM, Machado MA, Bacchella T, Machado MC. Simplified rat model of intestinal transplantation. *Transplantation*. 2005; 80:1522-3.
109. Galvão FH, Waisberg DR, De Mello Vianna RM, De Castro Galvão R, Seid VE, Andraus W, Chaib E, D'Albuquerque LA. Intestinal transplantation including anorectal segment in the rat. *Microsurgery*. 2012;32(1):77-9.
110. Galvão FHF, Pompeu E, de Mello ES, da Costa Lino Costa A, Mory E, dos Santos RM, Santos VR, Machado MC, Bacchella T. Experimental multivisceral xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2008;15:184-90.

-
111. Nainan KM, Mitra SK, Pathak IC. Perineal anal transplant in anorectal malformation in female patients. *Surgery*. 1975;77:697-702.
112. Saxena N, Bhattacharyya NC, Katariya S, Mitra SK, Pathak IC. Perineal anal transplant in low anorectal anomalies. *Surgery*. 1981;90:464-7.
113. Galvão FH, Bacchella T, Machado MC. Teaching intestinal transplantation in the rat for medical students. *Microsurgery* 2007;27:277-81.
114. Araki J, Mihara M, Narushima M, Iida T, Sato T, Koshima I. Vascularized anal autotransplantation model in rats: preliminary report. *Transplant Proc*. 2011;43(9):3552-6.
115. Athanasakos EP, Ward HC, Williams NS, Scott SM. Importance of extrasphincteric mechanisms in the pathophysiology of faecal incontinence in adults with a history of anorectal anomaly. *Br J Surg*. 2008;95:1394-400.
116. Nie Y, Chen JD. Effects and mechanisms of anal electrical stimulation on anorectal compliance and tone in dogs. *Dis Colon Rectum*. 2006;49:1414-21.
117. Shafik A, El-Sibai O. Rectal inhibition by inferior rectal nerve stimulation in dogs: recognition of a new reflex - the 'voluntary anorectal inhibition reflex'. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13:413-8.
118. Peña A, Amroch D, Baeza C, Csury L, Rodriguez G. The effects of the posterior sagittal approach on rectal function (Experimental study). *J Pediatr Surg*. 1993;28(6):773-8.
119. Slors JF, Pietroletti R, Bemelman WA, Schipper ME, Klopper PJ, Brummelkamp WH. What happens to the rectal muscular cuff? An experimental study in dogs. *Eur Surg Res*. 1991;23:108-13.

-
120. Gruppo Lombardo per lo Studio della Motilità Intestinale. Anorectal manometry with water-perfused catheter in healthy adults with no functional bowel disorders. *Colorectal Dis.* 2008;12:220-5.
121. Marques GM, Martins JL, Nobre VD. Comparison between perfusion and balloon techniques for performing anorectal manometry in children with intestinal constipation. *Acta Cir Bras.* 2008;23(5):405-11.
122. Sun WM, Rao SS. Manometric assessment of anorectal function. *Gastroenterol Clin North Am.* 2001;30:15-32.
123. Paskins JR, Lawson JO, Clayden GS. The effect of ketamine anesthesia on anorectal manometry. *J Pediatr Surg.* 1984;19:289-91.
124. Pfefferkorn MD, Croffie JM, Corkins MR, Gupta SK, Fitzgerald JF. Impact of sedation and anaesthesia on the rectoanal inhibitory reflex in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38: 324-7.
125. Erdogan E, Rode H, Hickman R, Cywes S. Transposition of the antropylorus for anal incontinence - an experimental model in the pig. *J Pediatr Surg.* 1995;30(6):795-800.
126. Vicente Y, Da Rocha C, Yu J, Hernandez-Peredo G, Martinez L, Pérez-Mies B, Tovar JA. Architecture and function of the gastroesophageal barrier in the piglet. *Dig Dis Sci.* 2001;46:1899-908.
127. Jorge JM, Habr-Gama A, Wexner SD. Biofeedback therapy in the colon and rectal practice. *Appl Psychophysiol Biofeedback.* 2003;28(1):47-61.
128. Jorge JM, Wexner SD. Anatomy and physiology of the rectum and anus. *Eur J Surg.* 1997;163(10):723-31.

-
129. Read NW, Sun WM. Anorectal manometry. In: Henry MM, Swash M. Coloproctology and pelvic floor. Butterworth: Heinemann; 1992. p.119-145.
130. Fillmann HS, Kretzmann Filho N, Llesuy S, Fillmann LS, Marronni NP. O papel do óxido nítrico na pressão anal esfinteriana de ratos submetidos à colite experimental. *Rev Bras Coloproct*, 2006;26:436-42.
131. Fillmann HS, Llesuy S, Fillmann LS, Marronni CA, Marronni NP. Diabetes mellitus and anal sphincter pressures: an experimental model in rats. *Dis Colon Rectum*. 2007;50:517-22.
132. Tieppo J, Kretzmann Filho NA, Seleme M, Fillmann HS, Berghmans B, Possa Marroni N. Anal pressure in experimental diabetes. *Int J Colorectal Dis*. 2009;24:1395-9.
133. Kido H, Yasukawa H, Hirota T, Shindo A, Naruse T. Decrease in rat internal anal pressure with the use of a topical ointment containing a killed *E. coli* culture suspension. *Int J Colorectal Dis*. 2007;22:271-6.
134. Schafer R, Felber M, Hagemann T, Frieling T, Haussinger D, Enck P. Circadian variation of rectal sensitivity. *Gastroenterology*. 1996;110:A753-A759.
135. Cortesini C, Cianchi F, Infantino A, Lisa M. Nitric oxide synthase and VIP distribution in enteric nervous system in idiopathic chronic constipation. *Dig Dis Sci*. 1995;40:2450-5.
136. Shafik A. Study of the electrical and mechanical activity of the rectum. Experimental study. *Eur Surg Res*. 1994;26:87-93.
137. Shafik A. Electrorectogram in chronic proctitis. *World J Surg*. 1993;17:675-9.

-
138. Shafik A. Electrorectography study of chronic constipation. *World J Surg.* 1995;19:772-5.
139. Shafik A. Electrorectogram study of the neuropathic rectum. *Paraplegia.* 1995;33:346-9.
140. Shafik A. Electrorectogram in Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 1995;10:478-80.
141. Shafik A. A study of the origin of the electric activity of the rectum: is it neurogenic or myogenic? *Spinal Cord.* 1998;36:548-53.
142. Shafik A. On the origin of the rectal electric waves: Further study. *Dis Colon Rectum.* 1999;42:1626-31.
143. Shafik A, El-Sibai O. Transmission of rectal electric waves: Is it through circular or longitudinal smooth muscle layers or both? *Arch Physiol Bioch.* 2001;109(2):127-34.
144. Vernava AM III, LongoWE, Daniel GL. Pudendal neuropathy and the importance of EMG evaluation of fecal incontinence. *Dis Colon Rectum.* 1993;36:23-7.
145. Kiff ES, Swash M. Slowed conduction in the pudendal nerves in idiopathic (neurogenic) faecal incontinence. *Br J Surg.* 1984;71:614-6.
146. Snooks SJ, Henry MM, Swash M. Faecal incontinence due to external anal sphincter division in childbirth is associated with damage to the innervation of the pelvic floor musculature: a double pathology. *Br J Obstet Gynaecol.* 1985;92:824-8.
147. Percy JP, Neill ME, Swash M, Parks AG. Electrophysiological study of motor nerve supply of pelvic floor. *Lancet.* 1981;i:16-17.

-
148. Lawson JO. Pelvic anatomy. I. Pelvic floor muscles. *Ann R Coll Surg Engl.* 1974;54:244-52.
149. Sato K. A morphological analysis of the nerve supply of the sphincter ani externus, levator ani and coccygeus. *Acta Anatomica Nipponica.* 1980; 55:187-223.
150. Ustinova EE, Fraser MO, Pezzone MA. Colonic irritation in the rat sensitizes urinary bladder afferents to mechanical and chemical stimuli: an afferent origin of pelvic organ cross-sensitization. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290:F1478-F1487.
151. Pezzone MA, Liang R, and Fraser MO. A model of neural cross-talk and irritation in the pelvis: implications for the overlap of chronic pelvic pain disorders. *Gastroenterology.* 2005;128:1953-64.
152. De Groat WC, Kawatani M, Houston MB, Rutigliano M, Erdman S. Identification of neuropeptides in afferent pathways to the pelvic viscera of the cat. In: *Organization of the Autonomic Nervous System: Central and Peripheral Mechanisms (Neurology and Neurobiology)*, Volume 31. New York: A. R. Liss; 1987. p. 81-90.
153. Keast JR, De Groat WC. Segmental distribution and peptide content of primary afferent neurons innervating the urogenital organs and colon of male rats. *J Comp Neurol.* 1992;319:615-23.