



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

ALINE RIBEIRO TEIXEIRA CAVALCANTE

**PREENCHIMENTO DA SUBMUCOSA DO ANORRETO COM
BIOPOLÍMERO DE CANA DE AÇÚCAR PARA O TRATAMENTO DA
INCONTINÊNCIA FECAL APÓS TRAUMA DO ESFÍNCTER ANAL EM
RATOS**

**RECIFE/PE
2015**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

ALINE RIBEIRO TEIXEIRA CAVALCANTE

**PREENCHIMENTO DA SUBMUCOSA DO ANORRETO COM
BIOPOLÍMERO DE CANA DE AÇÚCAR PARA O TRATAMENTO DA
INCONTINÊNCIA FECAL APÓS TRAUMA DO ESFÍNCTER ANAL EM
RATOS**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador-Interno:

José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof^o Titular do Depto. de Cirurgia, CCS-UFPE

Orientador- Externo:

Flávia Cristina Morone Pinto

Prof^o Adjunto do Centro Acadêmico de Vitória Núcleo de saúde Coletiva UFPE.

**RECIFE/PE
2015**

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4 1662

C376p Cavalcante, Aline Ribeiro Teixeira.
Preenchimento da submucosa do anorreto com biopolímero de cana
de açúcar para tratamento da incontinência fecal após trauma do
esfíncter anal em ratos / Aline Ribeiro Teixeira Cavalcante. – 2015.
71 f.: il.; 30 cm.

Orientador: José Lamartine de Andrade Aguiar.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2015.
Inclui referências.

1. Incontinência Fecal. 2. Agentes de Massa. 3. Saccharum. 4.
Ratos. I. Aguiar, José Lamartine de Andrade (Orientador). II. Título.

617.91

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-164)

“PREENCHIMENTO DA SUBMUCOSA DO ANORRETO COM BIOPOLÍMERO DE CANA DE AÇÚCAR PARA O TRATAMENTO DA INCONTINÊNCIA FECAL APÓS TRAUMA DO ESFÍNCTER ANAL EM RATOS”

ALINE RIBEIRO TEIXEIRA CAVALCANTE

APROVADA EM: 03/08/2015

ORIENTADOR INTERNO: DR. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR

COMISSÃO EXAMINADORA:

**PROF. DR. ÁLVARO ANTÔNIO BANDEIRA FERRAZ (PRESIDENTE) –
CCS/UFPE**

PROF. DR. JOSEMBERG MARINS CAMPOS – CCS/UFPE

PROF. DRA. RAQUEL KELNER – CCS/UFPE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Nicodemus Teles de Pontes Filho

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. Frederico Jorge Ribeiro

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Sílvio da Silva Caldas Neto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

VICE-COORDENADOR

Prof. Josemberg Marins Campos

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Josemberg Marins Campos

Prof. Lúcio Vilar Rabelo Filho

Profa. Magdala de Araújo Novaes

Prof. Rodrigo Pessoa Cavalvanti Lira

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio da Silva Caldas Neto

Aos meus pais **Jorge Teixeira e Alice Eulália Chagas Ribeiro** por me ensinarem o caminho do amor e da ética.

Ao meu querido esposo **Moacir Cavalcante de Albuquerque Neto**
pelo amor, compreensão e apoio durante todos
os momentos de minha vida.

À minha amada filha **Maria Ribeiro Teixeira Cavalcante**
que acompanhou minha jornada na pesquisa
desde que estava em meu ventre e que
me faz sentir realizada todos os dias.

Aos meus **queridos amigos** que me proporcionaram
apoio nos momentos difíceis

Agradecimentos

Ao Prof. *Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar*, pela preciosa orientação no desenvolvimento deste trabalho. Exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa.

À Prof^a *Flávia Cristina Morone Pinto*, pelo incentivo, orientação e preciosa ajuda durante todo o processo de elaboração da tese.

À Msc *Veridiana Sales Barbosa de Souza* e Dr *Rodrigo Pontes Lima* que orientaram, incentivaram e tiveram participação indispensável em todos os momentos da pesquisa.

Ao Prof. *Olávio Campos Júnior* pela orientação, confecção das lâminas, realização das fotos digitais e análise histológicas.

À Prof^a *Mariana Lira*, pela orientação e análises histológicas.

Ao estudante *Jaiurte Gomes Martins da Silva* pela ajuda em fazer as análises histológicas.

Aos estudantes de Medicina *Igor Macêdo de Oliveira* e *Victor Moreira Valença Lemos*, pelo seu comprometimento e ajuda nos experimentos.

À médica veterinária Msc. *Adriana Ferreira*, ao médico veterinário *José Joaquim Alves* e aos funcionários do Núcleo de Cirurgia Experimental *Paulo*, *Dôra* e *Lourdes*, pelas suas contribuições na realização dos experimentos.

A *Isabela*, secretária do Programa de Pós-graduação em Cirurgia, pela organização administrativa.

Às irmãs *Márcia* e *Mércia*, pelo auxílio e acolhimento.

*“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”*

(Mahatma Gandhi)

Resumo

Introdução: A incontinência fecal é a perda indesejável de flatos e fezes devido ao déficit do controle esfinteriano, que resulta na diminuição da qualidade de vida e gera grande impacto econômico. A aplicação de um agente de preenchimento tem sido uma opção para o tratamento da incontinência leve a moderada quando as condutas conservadoras forem ineficazes. Porém os agentes disponíveis na prática clínica são de alto custo e de baixa durabilidade. O gel de biopolímero de cana-de-açúcar apresenta-se como uma possível alternativa por ser biocompatível, seguro e com baixo potencial de migração.

Objetivo: Avaliar o gel de biopolímero de cana-de-açúcar como agente de preenchimento do anoreto de ratos submetidos à disfunção esfinteriana.

Materiais e Métodos: Realizou-se ensaio biológico constituído por modelo experimental induzido, de natureza cirúrgica. Foram utilizados 45 ratos *Wistar*, de ambos os gêneros, alocados randomicamente em três grupos de 15: Controle (GC), esfinterectomia e aplicação de soro fisiológico (GE+SF) e esfinterectomia e aplicação de gel biopolímero de cana-de-açúcar (GE+BPCA). Todos os grupos foram submetidos à manometria anorretal nos tempos D0 (início das avaliações), D15 (quinze dias após D0) e D45 (quarenta e cinco dias após D0). Os grupos GE+SF e GE+BPCA foram submetidos à esfinterectomia no tempo D0 para induzir queda dos níveis pressóricos de repouso da região anorretal induzindo disfunção esfinteriana. No tempo D15 foi feita aplicação de 0,6ml de soro fisiológico no anoreto do GE+SF e de 0,6ml de gel de BPCA no anoreto do GE+BPCA. Sessenta dias após o início dos experimentos (D60) os ratos foram sacrificados e as peças anatômicas foram pesadas e enviadas para estudo histológico. Os dados foram submetidos à análise estatística e considerado significativos se $p \leq 0,05$.

Resultados: No D15 o GC manteve a pressão anorretal constante, o GE+SF apresentou queda do nível pressórico ($GC \neq GE+SF$, $p < 0,0001$) e o GE+BPCA também manteve a pressão anorretal constante, apesar do trauma esfinteriano ($GE+SF \neq GE+BPCA$, $p = 0,0004$ e $GC \neq GE+BPCA$, $p = 0,097$). No D45 o GC manteve a pressão anorretal de repouso constante, o GE+SF permaneceu com pressão anorretal de repouso inferior aos outros dois grupos e o GE+BPCA apresentou elevação significativa da pressão anorretal. ($GC \neq GE+SF$, $p = 0,0003$; $GE+SF \neq GE+BPCA$, $p = 0,0002$; $GC \neq GE+BPCA$, $p = 0,0198$). Não foi observado processo inflamatório de reparação e remodelamento tecidual no GC e GE+SF. No GE+BPCA, foi observado o implante estável, homogêneo, apresentando integração ao tecido do hospedeiro, com neovascularização, presença de fibroblastos, fibras colágenas e células inflamatórias incorporando sua matriz de forma centrípeta.

Conclusão: O gel de biopolímero de cana-de-açúcar elevou os níveis pressóricos de repouso da região anorretal dos ratos submetidos à disfunção esfinteriana. Esse agente de preenchimento permaneceu no local do implante neovascularizado, colonizado por células gigantes multinucleadas, fibroblastos e tecido conjuntivo fibroso de sustentação.

Palavras-Chave: Incontinência fecal. Agente de preenchimento. Biopolímero de cana-de-açúcar. Celulose bacteriana. Manometria anorretal.

Abstract

Introduction: Fecal incontinence is the involuntary loss of flatus and stools as a result of poor sphincter control, affecting quality of life and inducing major economic impact. Its treatment with bulking agents has been proposed as an option for mild to moderate fecal incontinence when conservative approach is ineffective. However, the current available bulking agents have high cost and low durability. The sugarcane biopolymer gel presents itself as a possible alternative to be biocompatible, safe and low migration potential.

Objective: To evaluate the sugarcane biopolymer gel as an anorectal bulking agent of rats submitted to sphincteric dysfunction.

Materials and methods: A biologic assay, performed as an experimental induced model through surgery. The study used 45 *Wistar* rats randomly divided equally into three groups: 15 rats for control group (GC); 15 for sphincterectomy and injection of physiological saline group (GE+SF); and 15 for sphincterectomy and injection of sugarcane biopolymer gel group (GE+BPCA). All the rats in all the groups were subjected to anorectal manometry at D0 (first day, on the beginning of evaluations), D15 (fifteen days after D0) and D45 (forty-five days after D0). The GE+SF and GE+BPCA groups were subject to sphincterectomy at D0 in order to reduce the anal pressure at rest. At D15, 0,6ml of physiological saline was injected into the anorectum of animals from GE+SF, whereas for GE+BPCA it was injected 0,6mL sugarcane biopolymer gel. Sixty days after experiments has begun (D60) the rats were sacrificed and their anatomical specimens were weighed and analysed.

Results: The manometry analyses at D15 demonstrated that GC maintained a constant anorectal pressure as well as GE+BPCA, nevertheless the sphincter trauma ($GC \neq GE+BPCA$, $p=0,097$), while GE+SF displayed decreased anorectal pressures ($GC \neq GE+SF$, $p<0,0001$ and $GE+SF \neq GE+BPCA$, $p=0,0004$). At D45, GC remained constant the anorectal pressures at rest, while anorectal pressures of GE+SF group remained below the other's two groups. At same period, GE+BPCA presented a significant increase of anorectal pressure at rest. ($GC \neq GE+SF$, $p=0,0003$; $GE+SF \neq GE+BPCA$, $p=0,0002$; $GC \neq GE+BPCA$, $p=0,0198$). The histopathologic evaluation for GC and GE+SF exhibited no inflammatory process for tissue repairing or remodeling. For GE+BPCA the histopathologic evaluation exhibited the implant as stable, homogeneous, integrated into the surrounding tissue with new blood vessels and presence of fibroblasts, collagen fibers and inflammatory cells embedded in its matrix in a centripetal distribution.

Conclusion: Therefore, we conclude that sugarcane biopolymer gel increased anorectal pressures at rest in rats submitted to sphincterectomy. This bulking agent remained at injection site and it was colonized by multinucleated giant cells, fibroblasts and dense conjunctive tissue.

Key-words: Faecal incontinence. Bulking agent. Sugarcane biopolymer. Cellulosic exopolysaccharide. Anorectal manometry.

Lista de Abreviaturas e Siglas

BPCA	Biopolímero da cana-de-açúcar
GC	Grupo controle
GE	Grupo submetido a esfinterectomia
GE+SF	Grupo submetido a esfinterectomia e aplicação de soro fisiológico
GE+BPCA	Grupo submetido a esfinterectomia e aplicação de biopolímero de cana-de-açúcar
D0	Dia zero, que iniciam as avaliações
D15	Quinze dias após início das avaliações
D45	Quarenta e cinco dias após início das avaliações
D60	Sessenta dias após início das avaliações
HE	Hematoxilina-eosina
TM	Tricrômico de Massom
INFLM	Infiltrado inflamatório linfomononuclear
INFPM	Infiltrado inflamatório polimorfonuclear
NCE	Núcleo de Cirurgia Experimental
PO	Pós-operatório
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco

Lista de Tabelas

- Tabela 1** Mecanismos fisiopatológicos da incontinência fecal.
- Tabela 2** Índice de Incontinência Fecal da Cleveland Clinic Flórida
- Tabela 3** Agentes de preenchimento no tratamento de incontinência fecal (discriminando volume injetado, escala de gravidade de incontinência fecal e tempo de evolução).
- Tabela 4** Revisão sistemática de complicações relacionadas ao tratamento com agentes de preenchimento.
- Tabela 5** Classificação para análise semiquantitativa da proliferação fibroblástica e produção de colágeno.
- Tabela 6** Perdas e exclusões do estudo.
- Tabela 7** Médias pressóricas e ponderais em função da pressão anorretal observada.
- Tabela 8** Médias pressóricas anorretais por volume de água inserida no balão.
- Tabela 9** Médias das diferenças pressóricas anorretais em mmHG e volume de água em ml infundido no balão.

Lista de Figuras

- Figura 1** Anatomia anal do rato antes do procedimento cirúrgico.
- Figura 2** Esfíncter interno e externo do canal anal do rato.
- Figura 3** Anatomia do canal anal do rato após ressecção esfínteriana esquerda.
- Figura 4** Anatomia do canal anal do rato no pós operatório.
- Figura 5** Anatomia do canal anal no décimo quinto dia pós operatório.
- Figura 6** Aplicação de biopolímero de cana-de-açúcar sob visão direta do canal anal.
- Figura 7** Rato com balão no canal anal no tempo de aferição do volume máximo da resistência de expansão do esfíncter anal.
- Figura 8** Confeção da peça anatômica compreendendo anorreto e estruturas adjacentes.
- Figura 9** Peça anatômica fixada em papel grau cirúrgico e suturada a este com fio de sutura nylon 000.
- Figura 10** Peça anatômica seccionada em cortes transversais perpendiculares ao maior eixo do reto e canal anal.
- Figura 11** Sistema de grade teste M42.
- Figura 12** Curva Volume do balão *versus* Pressão anorretal no tempo D0 nos três grupos.
- Figura 13** Curva Volume do balão *versus* Pressão anorretal no tempo D15 nos três grupos estudados.
- Figura 14** Curva Volume do balão *versus* Pressão anorretal no tempo D45 nos três grupos estudados
- Figura 15** Curva Volume do balão *versus* Pressão anorretal para os três grupos estudados entre os tempos D15-D0 e D45-D0
- Figura 16** Análise Histopatológica do anorreto sem anormalidades observado nos grupos controle e esfinterectomia com aplicação de soro fisiológico.

- Figura 17** Gel de biopolímero externamente à camada muscular do anorreto coradas em HE.
- Figura 18** Representação histológica em HE do implante de biopolímero de cana-de-açúcar permeado por leve infiltrado inflamatório linfomononuclear contendo macrófagos e células gigantes do tipo corpo estranho.
- Figura 19** Representação histológica em HE do implante de biopolímero de cana-de-açúcar permeado por numerosos vasos e fibroblastos.
- Figura 20** Representação histológica em TM do implante de biopolímero de cana de açúcar permeado por Fibras colágenas.
- Figura 21** Representação histológica em HE do implante de biopolímero de cana-de-açúcar permeado por leve infiltrado inflamatório linfomononuclear, com células gigantes do tipo corpo estranho e numerosos vasos.

Sumário

1	Introdução	17
1.1	Apresentação do Problema	17
1.2	Justificativa do Estudo	18
1.3	Objetivos	18
1.3.1	Objetivo Geral	18
1.3.2	Objetivos Específicos	18
2	Revisão de Literatura	19
2.1	Incontinência Fecal	19
2.2	Agentes de Preenchimento	22
2.3	Biopolímero de Cana-de-Açúcar	27
2.4	Manometria Anorretal	29
2.5	Modelo Animal	31
3	Materiais e Métodos	34
3.1	Local do Estudo	34
3.2	Tipo de Estudo	34
3.3	Caracterização da Amostra	34
3.3.1	Tamanho da Amostra	34
3.3.2	Ensaio Controlado Aleatório	35
3.3.3	Desenho do Estudo	35
3.3.3.1	Critérios de Inclusão	36
3.3.3.2	Critérios de Exclusão	36
3.4	Procedimentos Técnicos	36
3.4.1	A Anestesia	36
3.4.2	A Cirurgia	37
3.4.3	Confecção do Biopolímero de cana-de-Açúcar	40
3.4.4	Parâmetros Avaliados	40
3.4.4.1	Avaliação Manométrica	40
3.4.4.2	Análise Histopatológica	42
3.3.3.2.1	Coleta e Fixação Do Material	42

3.4.4.2.2	Avaliação da Densidade Volumétrica de Vasos Sanguíneos e População Celular	44
3.4.2.2.3	Análise Semiquantitativa de Produção de Colágeno	45
3.5	Procedimentos Estatísticos	46
3.6	Procedimentos Éticos	47
3.6.1	Aprovação Pelo Comitê de Ética do CCS	47
3.6.2	Proteção dos Animais Envolvidos no Estudo	47
4	Resultados	48
4.1	Avaliação de Resultados	48
4.2	Resultados Manométricos	48
4.3	Resultados Histopatológicos	53
5	Discussão	57
5.1	Justificativa do Estudo: A Busca do Agente Ideal	57
5.2	Metodologia e Delineamento do Estudo	59
5.3	Avaliação Dos Resultados	61
6	Perspectivas	64
7	Conclusão	65
	Referências	66

1 Introdução

1.1 Apresentação do problema

Incontinência fecal é a incapacidade de impedir a eliminação de flatos ou fezes em momentos e locais inapropriados devido à perda do controle esfinteriano.

Os portadores de incontinência fecal muitas vezes se reclusam de sua vida social e abandonam seus empregos com receio de passar por constrangimentos. Conseqüentemente, adquirem problemas físicos, econômicos e psicossociais afetando drasticamente a qualidade de vida.

Recentemente têm-se utilizado a injeção de agentes de preenchimento na submucosa ou espaço interesfinteriano do canal anal, objetivando elevar a pressão de oclusão, aumentando a resistência à passagem das fezes e reduzindo perdas fecais espontâneas. Os melhores resultados desse tratamento se observam nos casos de defeitos do esfíncter interno associado ou não a pequeno defeito do esfíncter externo¹. São bem indicados em pacientes com escapes, incontinência leve a moderada, que não tiveram sucesso com tratamento medicamentoso. Pode ser uma opção nos casos de incontinência passiva grave que haja contra-indicação à neuromodulação sacral². O método é indicado para reduzir a perda fecal e melhorar a qualidade de vida dos pacientes através de um procedimento simples, ambulatorial e com baixa morbidade.

Várias substâncias têm sido utilizadas para esse fim, porém nenhuma delas se enquadra como agente ideal de preenchimento que seria a droga com as seguintes características: biocompatibilidade, baixo potencial de migração, baixo custo, não alergênico, não carcinogênico, de fácil administração e com efeito de preenchimento durável.³

A proposta desse estudo foi testar o gel de biopolímero de cana-de-açúcar como agente de preenchimento para o tratamento da incontinência fecal. Com esse intuito foi avaliado o comportamento do gel BPCA na região anorretal de ratos submetidos à disfunção esfinteriana através de manometria anorretal e estudo histopatológico de reação local e estabilidade. Esse material apresenta-se como uma possível alternativa por ser biocompatível, seguro e com baixo potencial de migração.

1.2 Justificativa do estudo

Testar o biopolímero de cana-de-açúcar como agente de preenchimento para o tratamento da incontinência fecal através de um modelo experimental de disfunção esfinteriana em ratos, visto que os agentes utilizados na prática clínica possuem alto custo e não são eficazes por longo período.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar o gel de biopolímero de cana-de-açúcar como agente de preenchimento do anorreto de ratos submetidos à disfunção esfinteriana.

1.3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar os níveis pressóricos de repouso do anorreto através de um manômetro de mercúrio, de três grupos de ratos, controle (GC), esfinterectomia e aplicação de soro fisiológico (GE+SF) e esfinterectomia e aplicação de biopolímero de cana-de-açúcar (GE+BPCA) em três momentos distintos:
 - D0**- início das avaliações e momento da esfinterectomia dos grupos (GE+SF) e (GE+BPCA);
 - D15**- quinze dias após D0 e momento da aplicação de soro fisiológico (GE+SF) ou BPCA (GE+BPCA);
 - D45**- quarenta e cinco dias após D0;

- ❖ Fazer estudo descritivo histopatológico sobre a estabilidade e biocompatibilidade do gel de biopolímero de cana-de-açúcar identificando a presença e densidade volumétrica de células gigantes multinucleadas, vasos sanguíneos, fibroblastos e colágeno.

2 Revisão da literatura

2.1 Incontinência fecal

Incontinência fecal é a perda involuntária do conteúdo retal. A prevalência estimada é de 8,3% nos Estados Unidos e pode variar de 1,6% até 15,3% dependendo principalmente da classificação da incontinência, da idade do paciente e se o mesmo reside em alguma instituição. Acomete de forma similar ambos os sexos.^{4,5} Quando avaliado em casas de repouso, a prevalência aumenta consideravelmente, podendo alcançar 50%.⁶

Essa afecção determina um impacto devastador na qualidade de vida pois o medo de perdas fecais involuntárias gera constrangimento, isolamento social e mudança comportamental.^{5,7}

Trata-se de um sintoma comum, porém subnotificado, visto que muitos pacientes acabam omitindo esta condição. A prevalência da incontinência fecal é muitas vezes subestimada.^{8,9}

O impacto econômico dos pacientes portadores de incontinência fecal também é importante, pois acarreta em altas taxas de desemprego, despesas em fraldas, plugues anais, absorventes geriátricos, cremes protetores perianais, tratamento psicológico, agentes constipantes, custos em admissões de idosos em asilos, limpeza de vestes, entre outros.¹⁰ Estima-se nos Estados Unidos um gasto de 26 bilhões por ano em cuidados de pacientes portadores de incontinência fecal e urinária.¹¹

O processo de evacuação e continência envolve uma interação complexa entre componentes sensoriais, a musculatura do assoalho pélvico e a região anorretal. A integridade da musculatura esfinteriana anal, dos músculos do assoalho pélvico, dos mamilos hemorroidários, da inervação pélvica, do sistema nervoso central, a consistência das fezes, o tempo de trânsito intestinal e a capacidade, sensibilidade e complacência retal são fatores importantes para preservação da continência.^{12,13} O complexo esfinteriano é composto por dois tipos musculares. O esfíncter anal interno é formado por musculatura lisa que possui atividade tônica involuntária responsável por até 80% da pressão de repouso do canal anal, representa uma barreira à perda de flatos e fezes. O esfíncter anal

externo é formado por musculatura estriada e atua por contração voluntária auxiliando a manutenção da continência. O músculo estriado puborectal pertence a musculatura do assoalho pélvico e mantém atividade contrátil em repouso promovendo angulação anorretal de aproximadamente 90 graus, fortalecendo a barreira à perda fecal. Essa angulação se torna mais aguda durante a contração voluntária. Quando o material fecal preenche a ampola retal, promove sua distensão e ocasiona uma diminuição reflexa da pressão anal de repouso que permite a chegada das fezes ao anoderma sensitivo capaz em distinguir se o conteúdo retal é composto por gás, fezes líquidas ou sólidas. Se essa sensibilidade acontece em momento inapropriado para deposição, ocorre uma inibição simpática reflexa da musculatura lisa retal associada a contração voluntária da musculatura esfinteriana externa e puborretal. Nesse mecanismo de postergar a evacuação é importante uma complacência retal adequada para armazenamento do conteúdo fecal. A integridade dos coxins vasculares anais auxiliam no selamento do canal anal. O nervo pudendo é responsável por função sensitiva e motora, seu bloqueio diminui a sensibilidade perineal e promove enfraquecimento da musculatura esfinteriana. O sistema nervoso central também deve estar preservado para o controle sensitivo e motor da região anorretal.¹⁴

Os mecanismos fisiopatológicos da incontinência fecal estão listadas na tabela 1, modificada por Rao.¹⁵

Tabela 1: Mecanismos fisiopatológicos da incontinência fecal.

Categoria	Causa	Mecanismo de incontinência
Estrutura Anatômica		
Musculatura esfínteriana	Injúria Obstétrica, Cirurgias Orificiais Drogas miorelaxantes Neuropatia	Fraqueza muscular Perda da sensibilidade do anoderma
Reto	Proctite infecciosa, Proctite actínica, DII, SCI, Prolapso Ressecções cirúrgicas	Perda da complacência , Perda da sensibilidade , Hipersensibilidade
Musculatura Puborectal	Descenso perineal, Idade Trauma	Angulo retoanal obtuso Fraqueza muscular
Nervo pudendo	Injúria cirúrgica ou obstétrica, Descenso perineal, Esforço excessivo	Fraqueza muscular Perda sensorial Reflexo débil
Sistema Nervoso Central Medula Espinhal Sistema Nervoso Autônomo	Injúria/ cirurgia da medula espinhal, Injúria encefálica, Esclerose Múltipla, <i>Diabetes</i> , AVE	Perda da sensibilidade Reflexos débeis Miopatia secundária
Características das fezes		
Diarréia	Infecção, DII, SCI, Drogas, Doença metabólica/ disabsortiva, Intolerância alimentar.	Urgência
Constipação	Dissinergia da evacuação , Drogas	Retenção fecal com evacuação por transbordamento Perda da sensibilidade retal

DII- Doença inflamatória intestinal, SCI- Síndrome do Cólon irritável, AVE- Acidente Vascular Encefálico.

A investigação detalhada do fator ou fatores que propiciaram a incontinência fecal e a classificação da gravidade da incontinência fecal (Tabela 2) são fundamentais para direcionar o tratamento ideal de cada paciente individualmente, assim como prever resultados. O tratamento deve ser iniciado com medidas conservadoras como mudança dietética, medicações antidiarreicas e biofeedback (treinamento fisioterápico do assoalho pélvico).¹⁶

Tabela 2: Índice de Incontinência Fecal da Cleveland Clinic Flórida

Tipo de incontinência	Frequência				
	Nunca	Até uma vez ao mês	Entre uma vez por semana e uma ou mais vezes ao mês	Entre uma vez ao dia e uma ou mais vezes por semana	Mais de uma vez ao dia
Sólidos	0	1	2	3	4
Líquidos	0	1	2	3	4
Gases	0	1	2	3	4
Uso de protetores de roupa	0	1	2	3	4
Alteração do estilo de vida	0	1	2	3	4

0 – continência normal; 20 – incontinência completa.

Após a falência do tratamento conservador deve-se considerar o tratamento com agente de preenchimento, pois tem a vantagem de poder ser realizado em caráter ambulatorial, ter baixa morbidade, ser um método simplista, minimamente invasivo, podendo ser repetido se necessário.¹⁷ Esse tratamento aumenta a barreira às perdas fecais, melhorando a qualidade de vida de pacientes portadores de incontinência fecal,¹⁸ porém na prática clínica são materiais de alto custo e pouca durabilidade.

2.2 Agentes de preenchimento

O tratamento da incontinência fecal com agentes de preenchimento é realizado injetando-se um material biocompatível na submucosa ou no espaço interesfincteriano do canal anal com a proposta de aumentar o volume perianal, aproximando a mucosa dessa região, permitindo seu selamento. O efeito desse tratamento no ponto de vista manométrico pode ser de aumento da pressão anal de repouso^{1,19,20}, aumento do comprimento da zona de alta pressão e aprimoramento no índice de assimetria do canal anal, diminuindo dessa forma, episódios de incontinência fecal.²¹

A terapia com agente de preenchimento em canal anal foi realizada pela primeira vez por Shafic que em 1993 publicou o uso de politetrafluoroetileno (Teflon®) em 11 pacientes portadores de incontinência fecal para flatos e fezes líquidas. Foi injetado 5ml em dois pontos da submucosa retal, acima da linha pectínea. Os pacientes foram avaliados por 24 meses e categorizados em escores conforme os sintomas após o tratamento: 1, curado (completa continência); 2, melhor (continência para fezes líquidas e não para flatos) e 3, sem melhora. Ao final da avaliação, 63,6% dos pacientes eram do escore 1 e 36,4% do escore 2. Não houve paciente no escore 3 e nem complicações relacionadas ao procedimento.²²

Shafic em 1995 publicou aplicação de 40ml de gordura autóloga proveniente da parede abdominal na submucosa retal de 14 pacientes com incontinência fecal para flatos e fezes líquidas. A aplicação foi feita em duas posições, no quadrante lateral direito e esquerdo do paciente. Os pacientes foram categorizados em escores conforme os sintomas após tratamento: 1, curado (completa continência); 2, melhor (continência para fezes líquidas e não para flatos); 3 sem melhora, e foram avaliados por manometria anorretal antes e após tratamento. Todos ficaram continentos nos dois a três meses pós injeção. Aos 14 meses, três pacientes apresentavam escore 1. Sete pacientes apresentaram escore 2 e foram submetidos a nova injeção seis meses após a primeira aplicação fazendo-os atingir o escore 1, que permaneceu 10 a 18 meses após segunda intervenção. Quatro pacientes que estavam no escore 3 foram submetidos a aplicações subsequentes. Dois atingiram escore 1, que permaneceu 10 a 16 meses após segunda injeção e dois atingiram escore 1 após terceira injeção, que permaneceu 6 a 8 meses após segunda injeção. A melhora clínica foi acompanhada de elevação nas pressões anorretais de repouso e contração. Não houve complicações relacionadas ao procedimento

Nesse estudo o autor faz referência ao seu trabalho em 1993 com politetrafluoroetileno alertando seu potencial de complicações como formação de granuloma e migração de partículas.²³

C. Bernardi, Favetta e Pescatori em 1998 publicaram um relato de caso de uma paciente com incontinência fecal tipo escape por lesão anterior e parcial do esfíncter externo pós-parto vaginal que se beneficiou com uso de 70ml de gordura autóloga injetada na submucosa retal, apresentando aumento da pressão de repouso do canal anal como também completa continência em oito meses de avaliação. Foi necessário reaplicação do agente em quatro meses.¹⁹

Em 1998, Kumar, Benson e Bland publicaram o uso de colágeno de gluteraldeído (Contingen®) em 17 pacientes com lesão do esfíncter interno que foram avaliados clinicamente, com fisiologia e ultrassonografia anorretal antes e após tratamento. Os pacientes foram acompanhados por quatro a 12 meses (média de oito meses). Após a aplicação, 11 pacientes obtiveram melhora sintomática importante. A manometria anorretal evidenciou aumento dos níveis pressóricos médios de repouso e contração voluntária.²⁴

Bioplastique®, um material a base de silicone, foi utilizado em 10 pacientes com defeitos do esfíncter anal interno. Os pacientes foram avaliados clinicamente, por fisiologia e ultrassonografia anorretal, antes, seis semanas e seis meses após tratamento. Em seis semanas de aplicação, seis pacientes obtiveram melhora importante, um paciente apresentou boa resposta após reaplicação e três não apresentaram resposta ao tratamento. Seis meses após tratamento, apenas dois pacientes ainda mantinham melhora clínica significativa. De seis pacientes que fizeram estudo ultrassonográfico anorretal, cinco apresentavam o silicone no local injetado. Um apresentou extravasamento visível do silicone aplicado. As pressões anorretais de repouso e contração não tiveram alteração significativa nos valores pré e pós aplicação do silicone.²⁵

Em 2002, foi publicado por Kenefick e colaboradores a aplicação de silicone em seis pacientes com incontinência fecal para fezes líquidas e sólidas relacionados a um distúrbio do esfíncter interno. Esse estudo mostrou bons resultados em relação ao escore de incontinência fecal e de qualidade de vida em cinco pacientes num período de 18 meses. Além disso, testes manométricos identificaram aumento da pressão média de repouso e de contração voluntária, porém esse último não foi estatisticamente significativo.¹

Estudo com uso de partículas de carbono pirolítico (Durasphere®) foi publicado em 2003 por Davis, Kumar e Poloniecki que as administrou na submucosa anorretal de 18 pacientes com incontinência fecal tipo escape. Foi injetado em média 1,28ml em quatro pontos da região anorretal. Os pacientes foram avaliados antes, três, seis e 12 meses após tratamento e submetidos a estudo de fisiologia anorretal, ultrassom anorretal, escore de gravidade da incontinência fecal da Cleveland Clinic, escore de satisfação individual utilizando escala visual e escore de qualidade de vida pela escala de Rockwood. Como resultado, houve melhora no escore de incontinência fecal, de qualidade de vida e de satisfação individual com o tratamento

efetuado. Os pacientes apresentaram elevação das pressões de repouso do canal anal nos primeiros três meses após tratamento, mas que não permaneceu no período de 12 meses. Houve melhora na sensibilidade retal porém não houve mudança nos valores pressóricos de contração voluntária esfinteriana.²⁰

Outros estudos com agentes de preenchimento podem ser visualizados na tabela abaixo que foi modificada da revisão sistemática realizada por Luo e colaboradores (tabela 3). Nessa revisão foi observado que todos os estudos eram série de casos, exceto o de Siproudhis (2007). Todos reportaram melhora no escore de incontinência fecal. Efeitos adversos foram prurido anal (n=13), dor durante a aplicação (n=13), proctalgia moderada (n=8), inflamação local (n=6), infecção que necessitou de drenagem (n=1), dor persistente (n=1), sangramento (n=1), vazamento do material injetado (n=1), migração do agente de preenchimento (n=14).²⁶

Tabela 3: Agentes de preenchimento no tratamento de incontinência fecal (discriminando volume injetado, escala de gravidade de incontinência fecal e tempo de evolução)

Autor	n	Agente de preenchimento	Volume injetado MI variação	(CCF-FI) pré tratamento	CCF-FI pós tratamento	Tempo de Evolução meses	Valor p
Ezio (2004)	24	Coaptite	3-4	8.3 σ	2.6 σ	11.9	0.0002
Stojkovic (2006)	73	Contingen	5	10 (6-16) μ	6 (3-10)	12(9-16)	<0.001
Aigner (2007)	11	Durasphere	NE	12 σ	7 σ	3	<0.05
Altomare (2008)	33	Durasphere	8.8 (2-19) μ	12 σ	8 μ	20.8	<0.001
Davis (2003)	18	Durasphere	1.28 (0.5-3) σ	11.89 \pm 5.1 σ	8.07 \pm 3.67 σ	12	0.002
IruKulla (2006)	21	Durasphere	NE	13.5 μ (6-17)	8 (0-14) μ	6	0.025
Farmer (2005)	21	EVOH	6-9	11 (7-15) σ	6.2 (0-15)	6	<0.001
de la Portilla (2006)	20	PTQ	7.5	13.5 \pm 5.3 σ	5.06 \pm 5.08 9.4 \pm 6.9	6 24	<0.001 0.127
Gaj (2007)	16	PTQ	7.5	107 μ (101-119)*	64 (61-94)* μ	12	0.001
Jorge (2004)	12	PTQ	2.5-7.5	16.4 \pm 5.1 σ	8.2 \pm 4.6 σ	1.5	<0.05
Lindsey (2004)	10	PTQ	15	14.1 \pm 4.36 σ	7.9 \pm 4.01 σ	NE	0.004
Sorensen (2008)	35	PTQ	5-7.5	12.7 σ (6-18)	10.4 σ (2-17)	12.9 (3-22)	0.01

Autor	n	Agente de preenchimento	Volume injetado MI variação	(CCF-FI) pré tratamento	CCF-FI pós tratamento	Tempo de Evolução meses	Valor p
Siproudhis (2007)	22	PTQ	7.5	13.8 σ	11.7 σ	3	0.001
	22	Placebo		14.6 σ	11.4 σ	3	0.001
Tjandra (2004)	42	PTQ guiado USG	10	14.5 μ (10-20)	5(2-13) μ 3(1-12) μ	6 12	<0.001 <0.001
	40	PTQ sem USG		14.5 μ (11-20)	8(2-12) μ 11(2-12) μ	6 12	<0.001 0.05

CCFI= Índice de incontinência fecal da Cleveland Clinic Flórida;*MAS= Índice de incontinência da American Medical Systems; NE=Não especificado; USG=ultrassonografia; μ = mediana; σ = média e desvio padrão

Uma revisão sistemática realizada por Vaizey e Kamm em 2005 sobre as complicações e efeitos indesejáveis relacionados a aplicação de agentes de preenchimento para o tratamento da incontinência fecal está esquematizada na tabela 4 ²⁷

Tabela 4: Revisão sistemática de complicações relacionadas ao tratamento com agentes de preenchimento

Agente de preenchimento	Complicações e Efeitos Indesejáveis
Politetrafluoroetileno (Politef®)	Formação de granulomas tipo corpo estranho; Fibrose após aplicação; Migração de partículas menores à distância; Baixa durabilidade.
Gordura autóloga	Embolia pulmonar múltipla; Acidente Vascular Cerebral; Resultados Ruins.
Colágeno de gluteraldeido (Contingen®)	Antigênico em mais de 5% dos pacientes; Baixa durabilidade; Potencial de transmissão de doenças.
Silicone (PTQ® e Bioplastique®)	Potencial de migração de partículas menores com possibilade de formação de granulomas; Alta viscosidade determina resistência à aplicação.
Partículas de carbono pirolítico Durasphere®	Migração para linfonodos locais e à distância; Alta viscosidade determina resistência à aplicação .

A última revisão sistemática sobre tratamento da incontinência fecal com agentes de preenchimento foi realizada por Maeda e colaboradores em 2014. Foram selecionados cinco trabalhos controlados e randomizados incluindo um total de 382 pacientes. Foram avaliados os agentes: hidrogel de poliacrilamida (Bulkamid®), colágeno derivado de pele de suíno (Permacol®), elastômero de polidimetilsiloxano, biomaterial de silicone (PTQ®), partículas de carbono pirolítico (Durasphere®) e dextranômero em ácido hialurônico (NASHA Dx®). No estudo realizado por Graf (2011) os pacientes submetidos a aplicação de NASHA Dx tiveram redução significativa nos episódios de incontinência fecal e melhora significativa da qualidade de vida quando comparados ao grupo “Sham”. Tjandra (2009) comparou aplicação de PTQ® com Durasphere® e observaram que ambos tiveram melhora nos escores de incontinência fecal e qualidade de vida, porém os resultados do PTQ® foram superiores, apesar de ter apresentado mais efeitos adversos. Os trabalhos apresentaram complicações vinculadas ao procedimento de pouca gravidade, curta duração e de resolução espontânea. Apenas um estudo (Graf 2011) apresentou resposta sustentada à aplicação do agente de preenchimento NASHA Dx® num período de 12 meses. Todos outros trabalhos apresentam melhora sintomática ao tratamento por curto período de tempo.²⁸

2.3 Biopolímero de cana-de-açúcar

Os biomateriais têm sido alvo de grande interesse na engenharia de tecidos e medicina regenerativa, tendo papel importante como estrutura de modelos tridimensionais de próteses e como matriz extracelular sintética com propósito de regeneração tecidual. Os polímeros são particularmente atrativos por apresentarem uma composição que permite flexibilidade estrutural na confecção de materiais específicos.²⁹

O pesquisador Francisco de Assis Dutra Melo da Divisão de Indústria da Estação Experimental de Cana-de Açúcar de Carpina da Universidade Federal Rural de Pernambuco (EECA-UFRPE) identificou e isolou uma bactéria produtora de exopolissacarídeo. Posteriormente essa bactéria foi classificada como *Zooglea sp.* no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelo

Professor José Otamar. A estrutura química desse biopolímero é constituída por diferentes monossacarídeos: glicose 87,57%, xilose 8,58%, ribose 1,68%, ácido glicurônico 0,83%, manose 0,82%, arabinose 0,37%, galactose 0,13%, ramnose 0,01% e fucose 0,01%.³⁰

Após ser purificado e processado o biopolímero de cana-de-açúcar, mostrou ser um composto homogêneo, estável, com baixa citotoxicidade, alta biocompatibilidade, elasticidade, resistente à tração e flexível, podendo ser modelado em diferentes formas.³¹

O Biopolímero de cana-de-açúcar (BPCA) foi usado na área de saúde pela primeira vez por Coelho e colaboradores para a cicatrização de feridas cutâneas em animais demonstrando aumento no tecido de granulação, controle da infecção e diminuição do tempo de cicatrização.³²

Em 2005, Lima e colaboradores constataram a capacidade do biopolímero em substituir tecidos biológicos com boa tolerabilidade e pequeno grau de reação inflamatória.³³

Estudos subsequentes demonstraram o biopolímero de cana-de-açúcar como substituto de enxerto na miringoplastia³⁴, como enxerto vascular³⁵ no tratamento de incontinência urinária através de *sling*³⁶, realização de uretroplastia³⁷, reconstituição da túnica albugínea³⁸ e curativo após tratamento cirúrgico de hipospádia³⁹.

Em 2015, Lima e colaboradores fizeram um estudo do efeito do BPCA como agente de preenchimento destinado ao tratamento de refluxo vesicoureteral. Nesse estudo, injetaram-se 0,2 ml de BPCA no lado esquerdo da bexiga e 0,2ml de dextranômero em ácido hialurônico a fim de comparar histologicamente as duas substâncias em três dias, 90 dias e 11 meses após a aplicação. Em três dias, ambas substâncias apresentavam-se estruturalmente homogêneas. Em 90 dias, o BPCA manteve-se homogêneo no tecido, porém o dextranômero não foi detectável, apenas ácido hialurônico. Em 11 meses, havia uma área extensa com implante de BPCA estruturalmente homogêneo e presença de grande número de células multinucleadas gigantes, além de neovascularização, dentro e perifericamente ao implante. O outro agente não estava mais presente nesse período.⁴⁰

2.4 Manometria anorretal

A primeira medida de pressão em um ser vivo foi realizada por Harvey que publicou em 1628 a pressão arterial de um cavalo com um tubo de vidro aberto em posição vertical, ligado à carótida do animal. A manometria dos vasos sanguíneos foi realizada posteriormente por Poiseuille que utilizou sistema de tubos comunicantes conectados de um lado o vaso sanguíneo e de outro uma coluna de mercúrio, fazendo assim, uma leitura direta dos níveis de pressão. Em 1847, Carl Ludwig aperfeiçoou o sistema de leitura de pressão, introduzindo uma bóia conectada à uma pena inscriteira, sobre o nível da coluna de mercúrio. Essa pena inscrevia as variações das pressões. Esse sistema foi o primeiro método gráfico em fisiologia, o quimógrafo, utilizado por mais de 100 anos. Em 1883 foi publicado o primeiro exame manométrico feito no homem por Hugo Von Kronecker e Samuel J Meltzer. Foi usado finos balões de borracha montados na extremidade de sondas que estavam conectados a um quimógrafo para o registro de pressões gastroesofágicas. Em 1950 os manômetros tinham transdutores e registradores elétricos de pressão de forma que a variação de pressão do órgão gerava uma corrente elétrica que conduzia a um polígrafo, portanto as oscilações elétricas eram decorrentes das oscilações pressóricas captadas. Na década de 1980, iniciou o sistema de registro computadorizado das pressões intraluminares após terem sido captados pelo transdutor e polígrafo.⁴¹

A Manometria anorretal permite uma avaliação objetiva do complexo esfinteriano e tem sido um método de grande importância para quantificar a função esfinteriana em pacientes portadores de incontinência fecal.⁴² Os parâmetros avaliados na manometria anorretal são:

Pressão anal de repouso, que avalia a função do esfíncter anal interno responsável pelo tônus de repouso em 55 a 80%, determinando uma barreira à perda de flatos e fezes. Sintomas de incontinência fecal passiva pode ser correlacionado com tônus anal de repouso reduzido e está associado a fraqueza ou degeneração do esfíncter anal interno;

Comprimento do canal anal funcional, que é a área que a pressão anal de repouso excede em pelo menos 5mmHg a pressão intra retal. Pode estar reduzido em pacientes portadores de incontinência fecal;

Pressão anal de contração, em que o paciente deve contrair por 30s o

máximo que conseguir. Dessa forma é possível avaliar o controle voluntário sobre a musculatura estriada do anorreto. Sintomas de urgência fecal está correlacionado a pressões de contração baixas devido a fraqueza do esfíncter externo e musculatura puborretal;

Manobra de esforço evacuatório, é a manobra que simula evacuação. É responsável por analisar a coordenação funcional do reto e ânus, com elevação da pressão intrarretal à manobra de Valsalva associada a queda das pressões do canal anal;

Reflexo de tosse, é solicitado que o paciente tussa para avaliar a presença do reflexo de elevação da pressão anorretal durante o aumento abrupto da pressão intraabdominal. Esse reflexo é um importante mecanismo de continência. Ausência ou atenuação desse reflexo é observado em pacientes com sintomas de urgência fecal;

Reflexo inibitório retoanal é um reflexo intramural mediado pelo plexo mioentérico e modulado pela medula espinhal em que o aumento da pressão intrarretal estimula o relaxamento do esfíncter interno do ânus. Isso permite que o conteúdo fecal chegue até os receptores de contato da mucosa do canal anal, responsável pela discriminação entre flatos, fezes líquidas e fezes sólidas. Nesse teste é inserido um balão intrarretal onde é inserido 50ml de líquido ou ar para avaliar o subsequente relaxamento do canal anal. Esse reflexo está abolido em pacientes com doenças no plexo mioentérico como a Doença de Hirschsprung e em pacientes com defeitos do arco reflexo sacral tanto por lesões na medula espinhal como dos nervos pudendos. Esses pacientes geralmente apresentam urgência fecal e tem sintomas de neuropatia pudenda ou síndrome da cauda equina;

Assimetria do canal anal, avalia a assimetria do canal anal determinada pelas ações dos músculos esfíncterianos. Defeitos esfíncterianos podem alterar os valores de assimetria;

Sensibilidade retal, avalia a sensibilidade retal ao preenchimento progressivo de líquido em um balão intrarretal. A primeira sensação é o volume mínimo que o paciente percebe a presença do balão. O volume subsequente em que o paciente reporta desconforto é também quantificado, caracterizado pelo desejo em evacuar, outro parâmetro estudado;

Complacência retal é avaliado pela insuflação intermitente do balão intrarretal. O balão insuflado aumenta a pressão intrarretal inicialmente seguido de

gradual declíneo pressórico, demonstrando acomodação retal ao volume inserido. A complacência é calculada pelo volume do balão máximo tolerado pelo paciente dividido pela pressão final intrarretal. Decréscimo da complacência retal pode ser observado em pacientes com inflamação retal, isquemia crônica, radioterapia e pode contribuir em sintomas de incontinência fecal.⁴³

Existem uma variedade de aparelhos, de escalas e métodos para avaliação manométrica da região anorretal, dos mais simples aos mais sofisticados, porém capazes de forma semelhante a quantificar as alterações pressóricas.⁴³⁻⁴⁵

Uma das principais avaliações realizadas pelo manômetro é a pressão anal de repouso, que demonstra a tonicidade esfinteriana e é o parâmetro mais fidedigno de sua função.⁴⁶

2.5 Modelo animal

Em pesquisas com animais de laboratório recomenda-se o emprego de animais menos desenvolvidos filogeneticamente e que possam ser obtidos em número suficiente, com maior facilidade. Esses princípios são responsáveis por serem os roedores, em especial os ratos, os animais empregados rotineiramente na maioria dos trabalhos científicos. Alguns preceitos devem ser observados para a escolha do modelo animal, como a facilidade da alimentação, do manuseio, da execução do procedimento técnico e o custo operacional.⁴⁷

O canal anal do rato mede 2 a 3mm de espessura e é envolto pelo esfíncter interno e externo do ânus. Assim como em humanos, o esfíncter interno é composto por tecido muscular liso e é resultado de um espessamento da camada circular interna situada na parede do trato digestivo. No rato, esse esfíncter termina 0,1mm proximal ao orifício anal. O esfíncter externo, que circunda o esfíncter interno, é composto por musculatura estriada e voluntária.^{48,49}

Existem modelos distintos de disfunção esfinteriana assim como modelos de agentes de preenchimento em ratos:

Kang (2008) reproduziu um modelo de incontinência fecal em ratos através de crioinjúria, realizada pelo contato de uma haste de alumínio resfriada em nitrogênio com o esfíncter anal por 30 segundos. Posteriormente aplicou no anorreto 30µl de solução com células tronco derivada do tecido muscular autólogo em três pontos do

anorreto. Nesse estudo, 15 ratos foram alocados em três grupos: grupo controle (n=5), grupo submetido a crioinjúria (n=5) e grupo submetido a crioinjúria e aplicação de células tronco (n=5). Uma semana após a aplicação, o complexo esfinteriano foi ressecado para testar sua força tênsil através de um transdutor de força. O modelo de crioinjúria apresentou redução significativa na amplitude de contração máxima do esfíncter anal. A aplicação das células tronco não resultou em aumento significativo da contração esfinteriana.⁵⁰

Zutshi (2009) estudou os efeitos eletromiográficos e manométricos após lesão direta e indireta dos esfíncteres anais de ratos. Nesse experimento foi utilizado 45 ratos alocados em três grupos: controle (n=15), esfíncterotomia anal (n=15) e transecção do nervo pudendo (n=15). Foi observado alterações eletromiográficas significativas no grupo submetido a transecção bilateral do nervo pudendo e redução significativa na pressão anal de repouso no grupo submetido a esfíncterotomia.⁵¹

Yamaguchi (2013) estudou um modelo em ratos de disfunção esfinteriana anal sustentada por longo período. Utilizou 20 ratos alocados em dois grupos: o grupo “sham” (n=10) e o grupo que foi submetido a ressecção do complexo esfinteriano da hemicircunferência esquerda (n=10). Os grupos tiveram avaliação manométrica da pressão anal de repouso no pré-operatório e no primeiro, sétimo, décimo quarto e vigésimo oitavo dia pós operatório. O modelo de ressecção esfinteriana exibiu disfunção esfinteriana por um mês com queda da pressão anal de repouso sustentada.⁵²

Elzayat (2007) avaliou estabilidade volumétrica e reação tecidual histológica de dois agentes de preenchimento aplicados em ratos: o dextranômero em ácido hialurônico e o colágeno. Foram utilizados 57 ratos alocados em três grupos: controle (n=9), injeção de colágeno (n=24), injeção de dextranômero (n=24). Os agentes foram injetados na dose de 3,5ml no subcutâneo da região abdominal. Foram avaliados histopatologicamente nos tempos : um mês, seis meses e 12 meses após aplicação, sendo oito animais sacrificados por tempo no grupo implante e três animais sacrificados por tempo no grupo controle. No grupo dextranômero houve um aumento do volume no primeiro e sexto mês com redução significativa em 12 meses (- 20%) do volume inicial. O colágeno apresentou declínio no primeiro e sexto mês e em 12 meses estava com um decréscimo acentuado de volume em relação ao inicial (-40%). Em relação a avaliação histológica, o grau de fibroblastos foram semelhantes no primeiro mês entre os agentes. Porém houve diferença

estatística entre os agentes em seis e doze meses, sendo o colágeno o que apresentou decréscimo mais acentuado de fibroblastos. A reação inflamatória foi semelhante em todos os tempos entre os agentes. O colágeno apresentou maior quantidade de células inflamatórias na periferia do implante e em tamanho reduzido em seu centro. O dextranômero apresentou células inflamatórias e fibroblastos dentro do implante. Células gigantes multinucleadas foram observadas em maior quantidade no dextranômero que no colágeno. Em 12 meses o dextranômero apresentava degeneração de microesferas, pequena quantidade de células inflamatórias e fibrose. Colágeno apresentou redução do implante e ausência de reação inflamatória.⁵³

3 Materiais e métodos

3.1 Local de estudo

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

3.2 Tipo de Estudo

Ensaio biológico constituído por modelo experimental induzido, de natureza cirúrgica.

3.3 Caracterização da amostra

3.3.1 Tamanho da amostra

O Tamanho da amostra foi obtido por meio de inferência quantitativa, sendo considerado como desfecho a diferença de pressão em um estudo piloto, o que permitiu uma estimativa de 15 animais por grupo. O valor do n foi determinado segundo a fórmula:

$$n = (S_a^2 + S_b^2) \times [(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta}) / d]^2$$

Onde, S_a e S_b representam o desvio padrão de cada grupo, sendo "a" o controle e "b" o tratado com biopolímero; $Z_{\alpha/2}$ = valor do erro α , usualmente 1,96 (5%); Z_{β} = valor do erro β , usualmente 0,84 (20%); e, d = diferença mínima entre as médias de cada grupo.

Logo,

$$n = (2+4)^2 \times [(1,96+0,84)/3,5]^2$$

$$n = 12,$$

3.3.2 Ensaio Controlado Aleatório

Trata-se de uma abordagem capaz de minimizar a influência de fatores de confusão sobre as relações de causa-efeito e baseia-se na comparação entre duas ou mais intervenções, as quais são controladas pelos pesquisadores e aplicadas de forma aleatória a uma determinada amostra.

Os animais que constituíram a amostra do estudo foram numerados previamente e sorteados para definirem os grupos de estudo. Foi utilizado o programa *Research Randomizer* (Version 4.0, 2013), para randomização dos animais por grupo.

3.3.3 Desenho de Estudo

Quarenta e cinco ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, de ambos os gêneros, provenientes do biotério José Paulino do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco foram numerados e alocados de forma aleatória em três grupos:

- ❖ **Grupo GC** - Grupo controle, composto por 15 ratos. Na posição de decúbito dorsal, foram avaliadas as pressões anorretais de repouso com manômetro nos tempos D0 (início das avaliações), D15 (quinze dias após D0) e D45 (quarenta e cinco dias após D0). No D60 (sessenta dias após D0) os ratos foram sacrificados e espécimes cirúrgicos foram obtidos para pesar e enviar para estudo histológico.

- ❖ **Grupo GE+SF** - Grupo experimental, composto por 15 ratos. Na posição de decúbito dorsal, foram avaliadas as pressões anorretais de repouso com manômetro nos tempos D0 antes e após serem submetidos a esfincterectomia, D15 antes e após aplicação de 0,2 ml de solução de soro fisiológico, em cada um de três pontos do anoreto, nos quadrantes lateral esquerdo, mediano posterior e lateral direito, e no D45. No D60 os ratos foram sacrificados e espécimes cirúrgicos foram obtidos para pesar e enviar

para estudo histológico.

- ❖ **Grupo GE+BPCA** – Grupo experimental, composto por 15 ratos. . Na posição de decúbito dorsal, foram avaliadas as pressões anorretais de repouso com manômetro nos tempos D0 antes e após serem submetidos a esfincterectomia, D15 antes e após aplicação de 0,2 ml de gel de BPCA, em cada um de três pontos do anoreto, nos quadrantes lateral esquerdo, mediano posterior e lateral direito, e no D45. No D60 os ratos foram sacrificados e espécimes cirúrgicos foram obtidos para pesar e enviar para estudo histológico.

3.3.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, de ambos os gêneros, pesando entre 220 a 450g que não possuíam defeito da anatomia anorretal.

3.3.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os ratos que tiveram medidas incompletas por superficialização da anestesia ou doença.

3.4. Procedimentos Técnicos

3.4.1. A anestesia

Os animais foram pesados e o procedimento anestésico foi feito como descrito à seguir: Utilizou-se uma solução anestésica composta pelas drogas cloridrato de cetamina (5mg/100g de peso do animal) e cloridrato de xilazina (2mg/100g de peso do animal). Dez minutos antes do início da anestesia foi aplicado sulfato de atropina por via intramuscular (0,44mg/Kg). Os animais foram mantidos

com máscara de oxigênio (0,5 ml/min) durante todo o procedimento.

Foi considerado anestesiado o animal com respiração regular e com ausência de reflexos a estímulos como o córneo-palpebral e podal.

3.4.2 A cirurgia

Os ratos foram posicionados em decúbito dorsal na mesa cirúrgica (figura 1), realizando-se assepsia e antisepsia do campo operatório e posicionando-se campos estéreis.



Figura 1: Anatomia anal do rato antes do procedimento cirúrgico. Região anal em forma de fenda transversal

Nos grupos GE+SF e GE+BPCA foi realizado uma ressecção esfinteriana conforme modelo sugerido por Izumi Yamaguchi no artigo “A novel animal model of long term sustainable anal sphincter dysfunction”.⁵² Nesse modelo é feito uma incisão semi-circular na hemicircunferência esquerda que inicia no quadrante mediano anterior (às 12h) e finaliza no quadrante mediano posterior (às 6h) removendo dessa forma os esfíncteres interno e externo, incluindo margem anal, gordura subcutânea até alcançar a mucosa retal (figuras 2, 3 e 4).

O fechamento da ferida foi realizado com fio de sutura *catgut* cromado 000 em pontos separados.



Figura 2: Esfíncter interno e externo do canal anal do rato. Os esfíncteres estão tracionados pela pinça Kelly curva

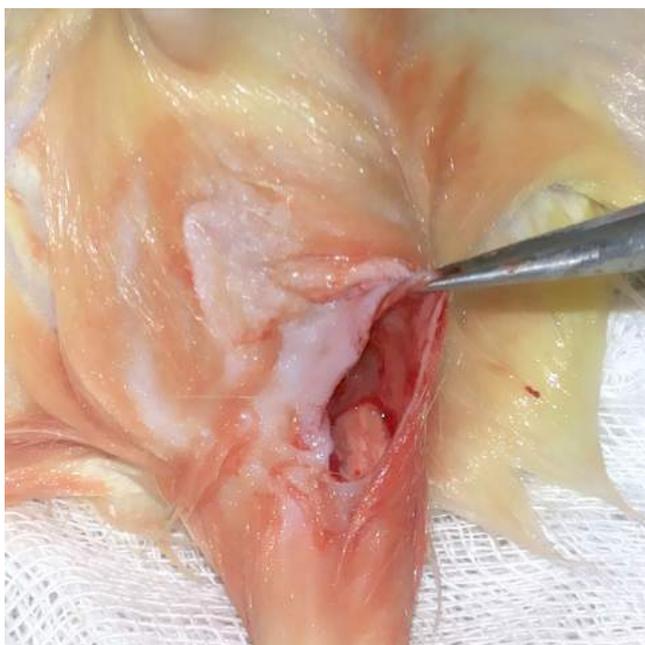


Figura 3: Anatomia do canal anal do rato após ressecção esfíncteriana esquerda. Ressecção da hemicircunferência esquerda do complexo esfíncteriano onde se observa o reto e gordura isquiorretal ao afastar a pele com a pinça.

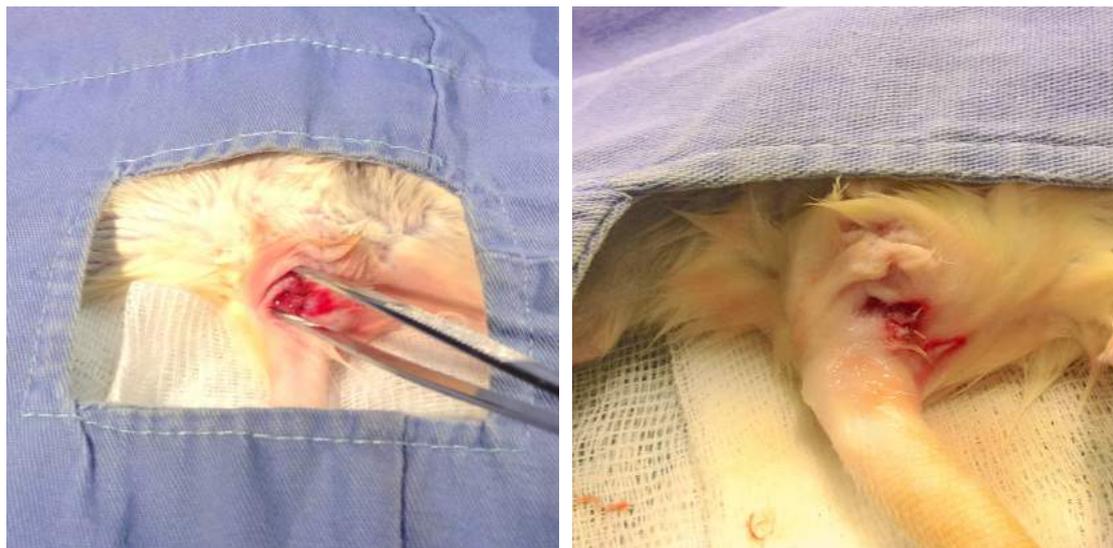


Figura 4: Anatomia do canal anal do rato no pós operatório (esquerda) e em foto ampliada (direita).

Após quinze dias da ressecção esfinteriana, momento que se percebe perda do formato característico em fenda da região anal (figura 5), foi realizado aplicação de soro fisiológico (se GE+SF) ou biopolímero de cana-de-açúcar (se GE+BPCA) sob visão direta do canal anal com auxílio de um otoscópio (figura 6). O soro fisiológico e o gel de BPCA foram injetados com agulha de insulina na região perianal, 0,5cm da margem anal, até 1cm de profundidade, acompanhando o trajeto do anorreto. O volume da solução aplicado foi de 0,2ml em cada um dos três quadrantes: lateral esquerdo, mediano posterior e lateral direito.



Figura 5: Anatomia do canal anal no décimo quinto dia pós operatório. Perda do aspecto em fenda

do canal anal

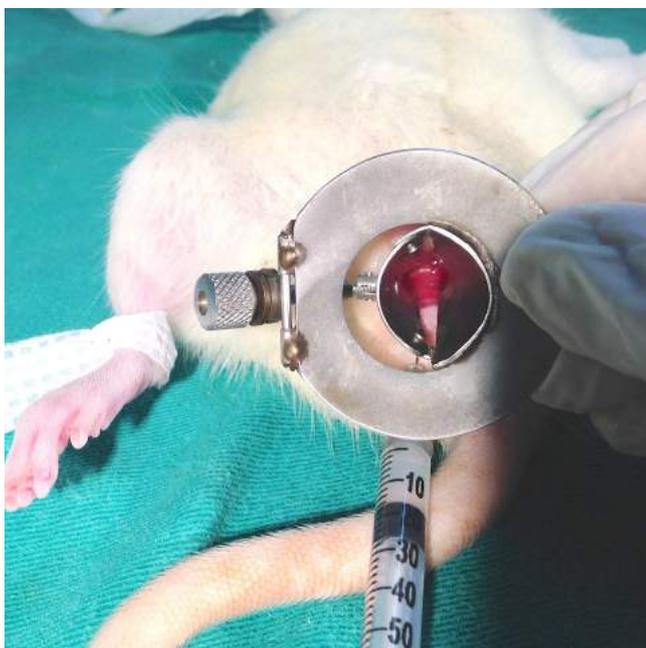


Figura 6: Aplicação de Biopolímero de cana-de-açúcar sob visão direta do canal anal.

3.4.3 Confeção do biopolímero de cana-de-açúcar

O gel de BPCA foi produzido e fornecido pelo grupo de pesquisa Biopolímero de Cana-de-Açúcar. A produção desse material foi desenvolvido na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE. O gel foi fornecido em seringas para aplicação direta embaladas em papel grau cirúrgico e esterilizadas em radiação gama no laboratório de Metrologia do Departamento de Energia Nuclear da UFPE.

3.4.4 Parâmetros Avaliados

3.4.4.1 Avaliação manométrica

Em todos os grupos (GC, GE+SF,GE+BPCA) foram mensurados a pressão de repouso da região anorretal meio de um manômetro de mercúrio. Dez minutos antes da mensuração, os ratos foram submetidos a uma lavagem retal com 1,5ml

solução fisiológica para retirar possíveis resíduos no local estudado correspondente a dois centímetros do anorreto a partir da borda anal.

O manômetro de mercúrio em U possui uma das extremidades aberta e a outra acoplada a uma sonda Nelaton número 10F que possui em sua extremidade uma torneira de três vias. Uma das vias dessa torneira foi conectada a uma sonda Nelaton 6F cuja extremidade possui um balonete expansível de látex graduado em 4cm de extensão e apresentando 1,7cm de diâmetro, confeccionada por luva de látex Sensimax® número 6,5. Na outra via da torneira foi acoplada uma seringa de 1ml para introdução gradual de água no balonete (figura 7). Foi identificado a variação do ponto zero do mercúrio a cada 0,1 ml de água introduzida no balonete.

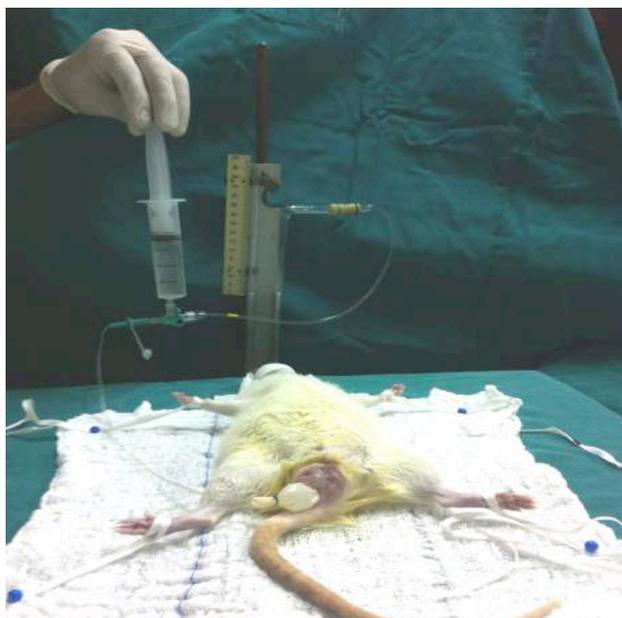


Figura 7: Rato com balão no canal anal no tempo de aferição do volume máximo da resistência de expansão do esfíncter anal.

Para calibração do manômetro é colocado água em todo o circuito acima da coluna do mercúrio. O manômetro é colocado de forma que a altura das colunas U de mercúrio fiquem equivalentes e que fiquem na altura do canal anal onde ficará o balonete. Este é o ponto zero do sistema.

A determinação volumétrica e de oscilação do ponto zero do manômetro determina a pressão anorretal de repouso. Foi considerado o valor da altura da coluna mercúrio e realizado uma curva de nível pressórico para cada 0,1ml de água

introduzida no balonete, no intervalo de 0 a 1ml. Cada aferição foi realizada por três vezes e foi considerada a média pressórica por volume para cada rato e posteriormente foi calculado a média pressórica por volume por grupo. (GC, GE+SF e GE+BPCA) nos três tempos de aferição (D0, D15 e D45).

3.4.4.2 Análise Histopatológica

3.4.4.2.1 Coleta e Fixação Do Material

No 60º dia do início do experimento foi feita a eutanásia dos ratos através da administração por via intracardíaca de dose letal de tiopental sódico na dose de 150mg/Kg. Posteriormente realizou-se tricotomia do segmento a ser ressecado para ser enviado para estudo histológico.

As peças cirúrgicas que compreendiam o anorreto e estruturas adjacentes foram retiradas de maneira uniforme. A região caudal foi ressecada na região perianal a 0,5cm distal do canal. A região proximal foi seccionada a 2,5cm da distância mais caudal. As estruturas laterais foram retiradas em bloco no limite da pelve do rato (figura 8). Todas peças foram pesadas numa balança de precisão.



Figura 8: Confeção da peça anatômica compreendendo anorreto e estruturas adjacentes.

Em seguida as peças foram colocadas sobre um papel grau cirúrgico e uma sonda de nelaton 4F foi introduzida dentro anoreto, todos fixados com fio de sutura *nylon* 000 (figura 9). Essa estrutura foi imersa imediatamente em solução de Formol a 10%.



Figura 9: Peça anatômica fixada em papel grau cirúrgico e suturada a este com fio de sutura nylon 000. Pode-se observar também a sonda e a identificação de áreas de interesse no papel.

Após um período de 24 horas imerso em formol, as peças foram seccionadas em cortes transversais perpendiculares ao maior eixo do reto e canal anal (figura 10). O material foi desidratado em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizado em xilol e incluído em parafina líquida. Cortes de 5 μm foram montados em lâminas e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e pela técnica de Tricrômio de Massom (TM).

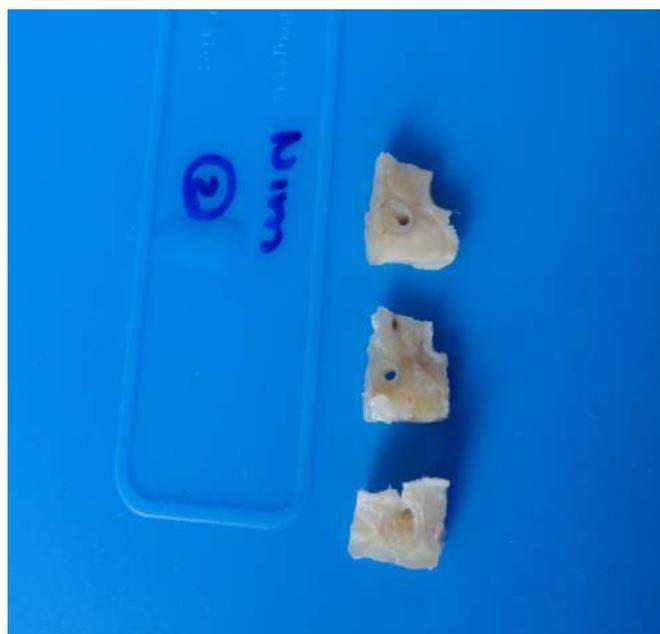


Figura 10: Peça anatômica seccionada em cortes transversais perpendiculares ao maior eixo do reto e canal anal

3.4.4.2.2 Avaliação da densidade volumétrica de vasos sanguíneos e população celular

Foram realizadas secções de cada espécime de forma aleatória. Para cada secção um total de quinze campos aleatórios foram avaliados. A densidade volumétrica de vasos sanguíneos e população celular, que representa o volume relativo que essas estruturas ocupam no tecido, foi calculada usando um sistema de grade teste M42 (figura 11) que é projetado na imagem por meio do software Imaje J. A densidade volumétrica foi calculada de acordo com a fórmula:

$$Vv = Pp/Pt$$

Onde Vv é a densidade volumétrica, Pp é o número de pontos obtidos a partir da contagem dos pontos e Pt é o numero de pontos do sistema de grade teste utilizado. Os resultados de Vv foram expressos em (%). A captura das imagens foi feita com o microscópio de campo claro e imunofluorescência AXIO Imager.M2m/Zeiss conectado a câmera digital AxioCam HRc/Zeiss. Essa câmera é responsável pela transferência das imagens para um computador utilizando-se o Software ZEN-2012/Zeiss através de objetiva de 400x.

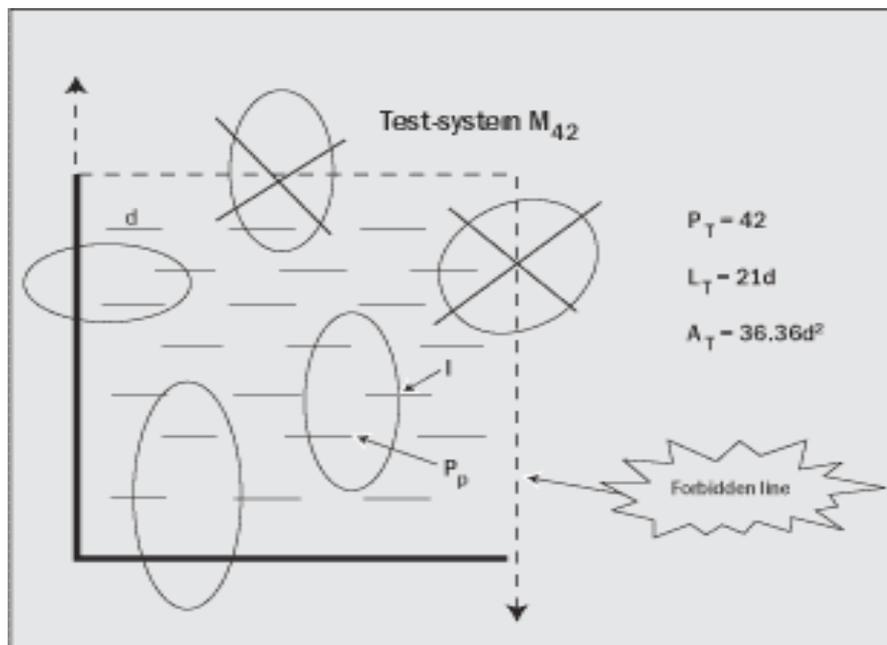


Figura 11: Sistema de grade teste M42. A linha curta “d” calibra o sistema teste e as extremidades são consideradas test-points (Pp). Todas linhas curtas são test-line (Lt) e a test-area (Ar) está dentro do tracejado. As estruturas que alcançam a área tracejada não são contabilizadas para evitar superestimação.

3.4.2.2.3 Análise semiquantitativa de produção de colágeno

Para avaliar a presença de colágeno nas lâminas, procedeu-se a análise semiquantitativa estimando-se de maneira sistematizada as quantidades recém-formadas de colágeno. As lâminas foram portanto classificadas em quatro graus (G0, GI, GII e GIII), com base no percentual sobre o qual o novo colágeno organizado se formara. A análise semiquantitativa foi realizada em concordância com a técnica clássica de morfometria quantitativa.⁵⁴⁻⁵⁸ (tabela 5).

Tabela 5: Classificação para análise semiquantitativa da proliferação fibroblástica e produção de colágeno

Grau	Proliferação fibroblástica (% lâmina)	Colágeno (% da lâmina)
Grau 0	0 a 5%	0 a 5%
Grau I	5 a 25%	5 a 25%
Grau II	25 a 50%	25 a 50%
Grau III	Mais de 50%	Mais de 50%

3.5 Procedimentos Estatísticos

Os dados obtidos foram organizados em planilhas (Microsoft® Excel® for Mac® 2011, versão 14.4.9) para condução das análises (Graphpad prism®, versão 4.0).

A análise de variância (ANOVA) foi usada para tratamento das variáveis contínuas que se ajustavam a uma curva normal (paramétricas) e foram comparadas através do teste t de Student. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney foi usado para a análise de dados não-paramétricos. Para a análise de proporções e percentagens, utilizou-se o teste do Qui-quadrado de Pearson.

Com o objetivo de avaliar o efeito independente do implante de biopolímero como agente de preenchimento sobre o tecido do hospedeiro (parâmetros pressóricos e histológicos), procedeu-se à análise de covariância (tipo III) na qual se introduziram como cofatores: o peso do animal no dia da cirurgia (D0), o peso do animal no dia da eutanásia (D60) e o peso da peça anatômica. A significância foi avaliada pelo teste F, para o cálculo do coeficiente de determinação (R²).

Em todas as situações, a probabilidade máxima de erro aceitável para rejeição da hipótese nula foi de cinco por cento ($p < 0,05$), considerando a margem de segurança de 95%.

3.6 Procedimentos éticos

3.6.1 Aprovação pelo comitê de ética do CCS

Os procedimentos seguiram as normas de experimentação animal pela LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008 e pelas normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Foi avaliado e aprovado pelo protocolo 23076.018170/2013 dia 22/07/2014.

3.6.2 Proteção dos animais envolvidos no estudo

Os ratos envolvidos no estudo foram mantidos de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética em Experimentação em animais. Permaneceram em gaiolas coletivas inicialmente e individuais posteriormente aos procedimentos. Foram colocados no biotério de experimentação do Núcleo de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O ambiente é climatizado, com a temperatura entre 22^oC e 24^oC, com exaustão e ciclo claro e escuro de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Labina® e água mineral *ad libitum*. Durante todo o experimento ficaram sob os cuidados e condutas orientadas por médicos veterinários.

4 Resultados

4.1 Avaliação de resultados

Dentre os 45 animais incluídos na pesquisa, 11 foram excluídos ou perdidos (tabela 4).

Tabela 6: Perdas e exclusões do estudo

Grupo	n	Excluídos ou Perdidos	Motivo	n final	Gênero
GC	15	3	2 Morreram 1 medida incompleta	12	7 machos 5 fêmeas
GE+SF	15	4	2 Morreram 2 Medida incompleta	11	4 machos 7 fêmeas
GE+BPCA	15	4	2 Morreram 2 Medida incompleta	11	5 machos 6 fêmeas

4.2 Resultados manométricos

Não foram observadas diferenças estatísticas entre as médias de peso dos animais ($p=0,1829$) e entre o peso das peças anatômicas ($p=0,5709$). As médias das pressões anorretais, dos pesos dos animais e dos pesos das peças anatômicas dos três grupos nos tempos D0, D15 e D45 estão na tabela 5.

Tabela 7: Médias pressóricas e ponderais em função da pressão anorretal observada.

Grupos Variáveis	GC				GE+SF						GE+BPCA					
	D0	D15	D45	D60	D0		D15		D45	D60	D0		D15		D45	D60
					AE	DE	AI	DI			AE	DE	AI	DI		
Pressão anorretal (mmHg)	9,4	9,2	10,2	-	10,6	10,2	9,8	8,7	9,9	-	11,5	10,2	9,8	9,9	11,7	-
Peso (g)	310,3	322,8	337,1	344,3	275,8		278,2		294,0	296,7	262,6		269,6		294,1	305,3
Peso da peça anatômica (g)	-	-	-	2,9	-		-		-	2,4	-		-		-	2,6

Notas: GC= Grupo Controle; GE+SF= Grupo Esfincterectomia com administração de Soro Fisiológico (SF); GE+BPCA= Grupo Esfincterectomia e administração de Biopolímero de Cana de Açúcar (BPCA); AE = Antes da esfincterectomia; DE= depois da esfincterectomia; Ai= antes da injeção; DI= após injeção; D0=primeiro dia de análise; D15=quinze dias após a primeira análise; D45=quarenta e cinco dias após primeira análise; D60=sessenta dias após primeira análise.

As médias das pressões de cada grupo nos tempos D0, D15 e D45 nos intervalos de 0 a 1.0ml de volume no balão, estão dispostas na tabela 6.

Tabela 8: Médias pressóricas anorretais por volume de água inserida no balão.

Grupo	Pressão (mmHg)									p-valor
	GC			GE+SF			GE+BPCA			
	D0	D15	D45	D0	D15	D45	D0	D15	D45	
0	3,6	3,3	3,6	3,8	3,3	3,6	4,0	3,5	4,0	0,2279
0,1	4,8	4,7	4,8	5,2	4,5	5,1	5,2	4,9	5,4	0,3339
0,2	6,2	6,0	6,5	6,4	5,8	6,3	6,4	6,3	7,3	0,1477
0,3										0,3334 ^a 0,0219 ^{b*}
	7,5	7,2	7,8	7,7	6,8	7,8	7,6	7,6	9,0	0,0573 ^{c*}
0,4	8,6	8,5	9,4	9,1	7,9	9,3	9,2	8,9	10,9	0,0717
0,5	9,6	9,7	10,8	10,4	9,0	10,5	10,5	10,3	12,2	0,0695
0,6										0,0982 ^a 0,0840 ^b
	10,8	10,8	12,0	11,7	10,0	11,6	11,8	11,5	13,7	0,0005 ^{c*} 0,1089 ^a
0,7										0,0453 ^{b*}
	11,8	11,9	13,1	13,1	10,8	12,7	12,6	12,6	15,1	0,0011 ^{c*} 0,1787 ^a
0,8										0,0092 ^{b*}
	12,9	12,5	14,2	13,9	11,8	13,5	14,1	13,6	16,2	0,0007 ^{c*} 0,1308 ^a
0,9										0,0077 ^{b*}
	13,4	13,3	14,7	15,0	12,6	14,3	15,0	14,4	17,3	0,0005 ^{c*} 0,8811 ^a
1,0										0,0060 ^{b*}
	14,4	13,9	15,0	16,0	13,4	14,8	16,1	15,3	18,1	0,0695 ^c
Média±DP	9,4 ±3,6	9,3 ±3,6	10,2 ±4,1	10,2 ±4,1	8,7 ±3,3	9,9 ±3,8	10,2 ±4,1	9,9 ±4,0	11,7 ±4,8	

Notas: GC= Grupo Controle; GE+SF= Grupo Esfincterectomia com administração de Soro Fisiológico (SF); GE+BPCA= Grupo Esfincterectomia e administração de Biopolímero de Cana de Açúcar (BPCA). D0 = logo pós-esfincterectomia; D15 =pós injeção. ANOVA seguida de Teste t de student. a, se GE+SF vs. GC; b, se GE+BPCA vs. GC; c, se GE+SF vs. GE+BPCA , para *p<0,05.

Os gráficos seguintes (figuras 12, 13 e 14) mostram a variação de pressão por volume, nos diferentes tempos e nos três grupos estudados.

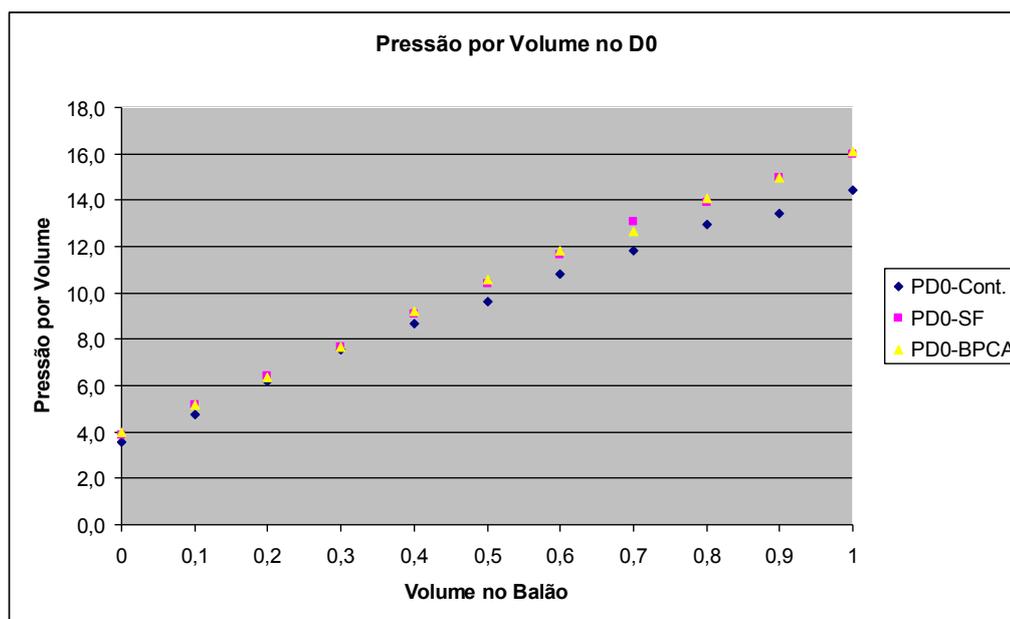


Figura 12: Curva Volume do balão *versus* Pressão anorretal no tempo D0 (início das avaliações) nos três grupos estudados. Note-se que os grupos GE+SF e GE+BPCA foram mensurados pós esfinterectomia. (GC= Grupo Controle; GE+SF= Grupo Esfinterectomia com administração de Soro Fisiológico (SF); GE+BPCA= Grupo Esfinterectomia e administração de Biopolímero de Cana de Açúcar (BPCA). D0= logo pós-esfinterectomia)

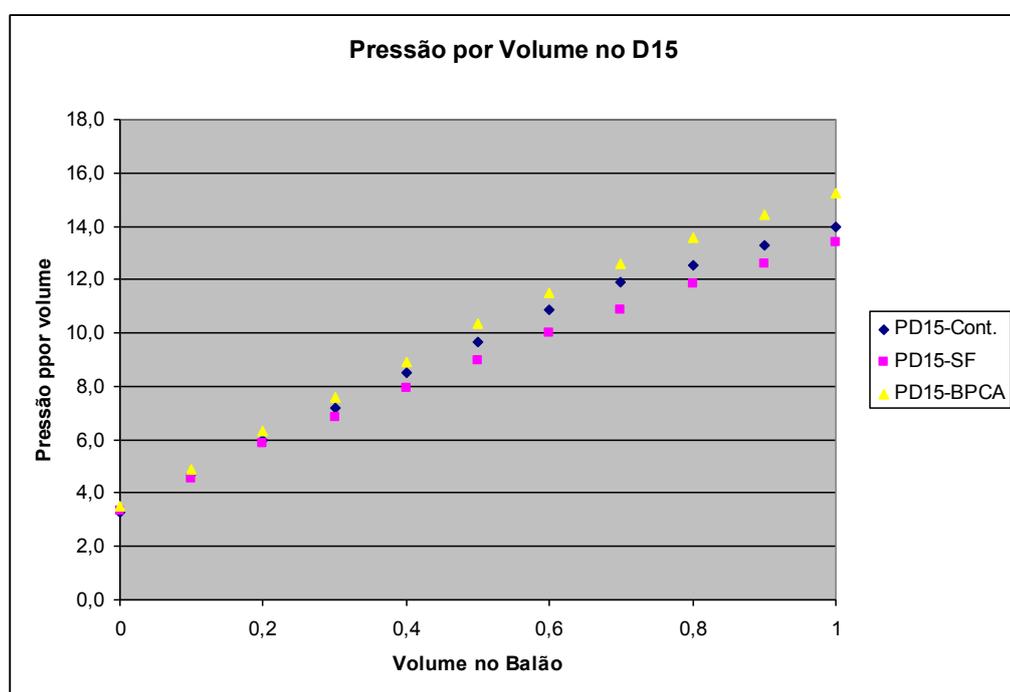


Figura 13: Curva Volume do balão *versus* Pressão anorretal no tempo D15 (15 dias após o início das avaliações) nos três grupos estudados. Nota-se que as medidas nos grupos GE+SF e GE+BPCA foram mensurados pós injeção das substâncias correspondentes.

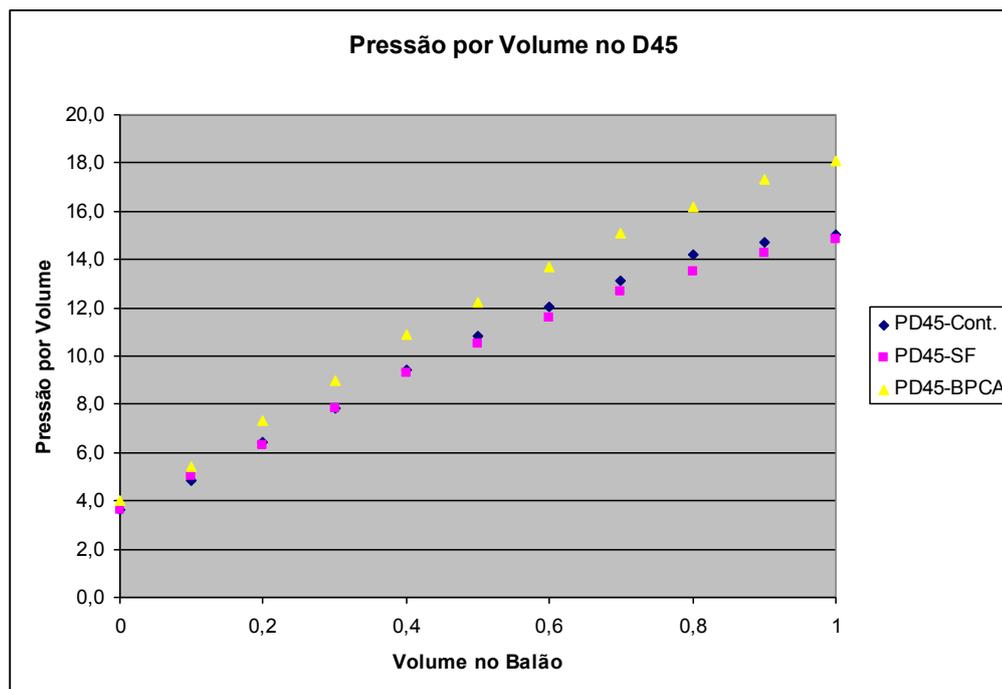


Figura 14: Curva Volume do balão *versus* Pressão anorretal no tempo D45 (45 dias após o início das avaliações) nos três grupos estudados .

A diferença entre as médias de pressão por grupo, considerando os três principais tempos de análise (D0, D15 e D45) pode ser visualizada na Tabela 9. A diferença entre D15-D0 revelou que no GC houve uma redução correspondente a -0,2mmHg na média de pressão, enquanto que no GE+SF foi de -1,5mmHg ($p < 0,0001$); no GE+BPCA foi -0,3mmHg, sendo estatisticamente diferente do GE+SF ($p = 0,0004$), mas não do GC ($p = 0,0997$). A diferença entre D45-D0 foi GC, 0,8mmHg, GE+SF -0,3mmHg e GE+BPCA= 1,5mmHg, sendo estatisticamente significativo entre os grupos GC versus GE+SF ($p = 0,0003$), GC versus GE+BPCA ($p = 0,0198$) e entre GE+SF versus GE+BPCA ($p = 0,0002$). O gráfico da figura 15 mostra a variação na diferença de pressão por volume.

Tabela 9: Médias das diferenças pressóricas anorretais em mmHg e volume de água infundido no balão.

Grupo	Diferença de Pressão (mmHg)					
	GC		GE+SF		GE+BPCA	
	D15-D0	D45-D0	D15-D0	D45-D0	D15-D0	D45-D0
Volume no Balão (ml)						
0	-0,3	0,0	-0,5	-0,2	-0,5	0,0
0,1	0,0	0,1	-0,6	-0,1	-0,3	0,2
0,2	-0,2	0,3	-0,6	-0,1	0,0	0,9
0,3	-0,3	0,3	-0,8	0,1	-0,1	1,4
0,4	-0,1	0,8	-1,2	0,2	-0,3	1,7
0,5	0,0	1,2	-1,4	0,1	-0,2	1,7
0,6	0,0	1,2	-1,7	-0,1	-0,3	1,9
0,7	0,1	1,3	-2,2	-0,4	-0,1	2,5
0,8	-0,4	1,3	-2,1	-0,4	-0,5	2,1
0,9	-0,1	1,3	-2,4	-0,8	-0,6	2,3
1,0	-0,5	0,6	-2,6	-1,2	-0,8	2,0
Média±DP	-0,2±0,2	0,8±0,5	-1,5±0,8	-0,3±0,4	-0,3±0,3	1,5±0,8

Notas: Os dados são média ou média±DP; GC= Grupo Controle; GE+SF= Grupo Esfincterectomia com administração de Soro Fisiológico (SF); GE+BPCA= Grupo Esfincterectomia e administração de Biopolímero de Cana de Açúcar (BPCA). D0 pós esfincterectomia e D15 pós injeção. Teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney.

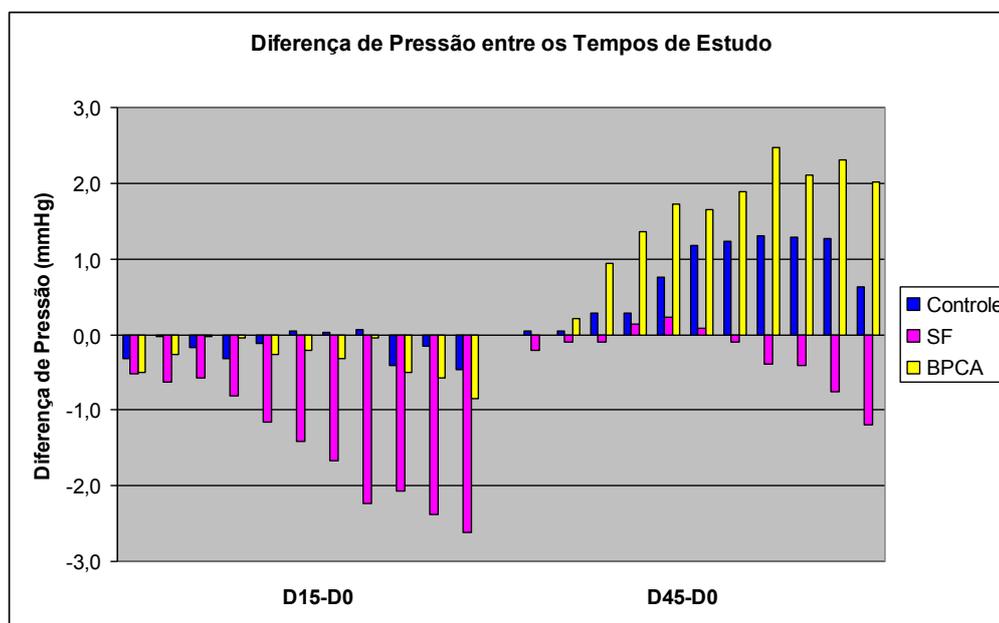


Figura 15: Curva de diferença da pressão anorretal para os três grupos estudados entre os tempos D15-D0 e D45-D0.

4.3 Resultados Histopatológicos

Nos grupos GC e GE+SF não foi possível identificar alterações histológicas.(figura 16)

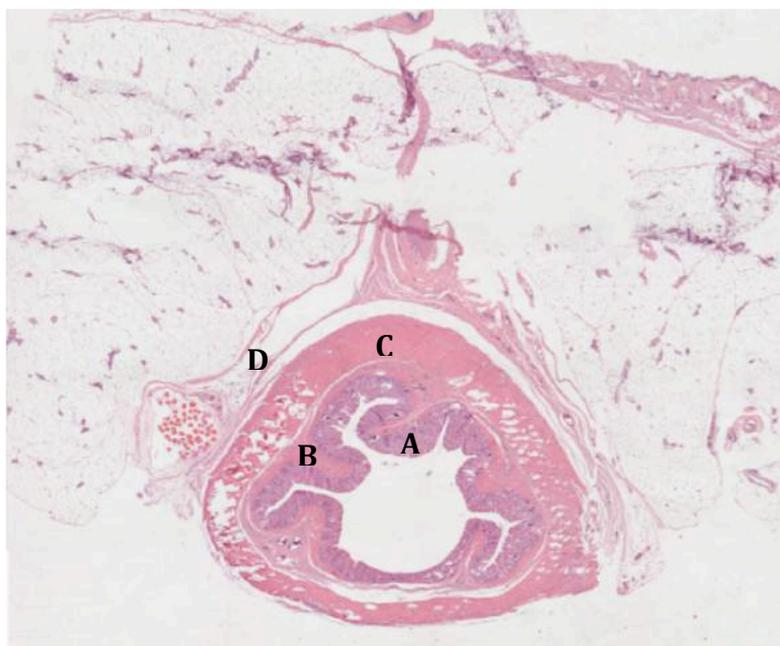


Figura 16: Análise Histopatológica do anorreto sem anormalidades.Observado nos grupos controle e esfinterectomia com aplicação de soro fisiológico. A=mucosa, B=submucosa, C=camada muscular, D=tecido adiposo peri-retal. Aumento de 50x

No grupo GE+BPCA o implante apresentava-se homogêneo e localizado adjacentermente a última camada muscular da parede anorretal, inserido e envolvido por uma fina camada em feixes curtos, sugestivos de tecido fibroso, assim como também elementos de natureza vascular atravessando-a (Figura 17)

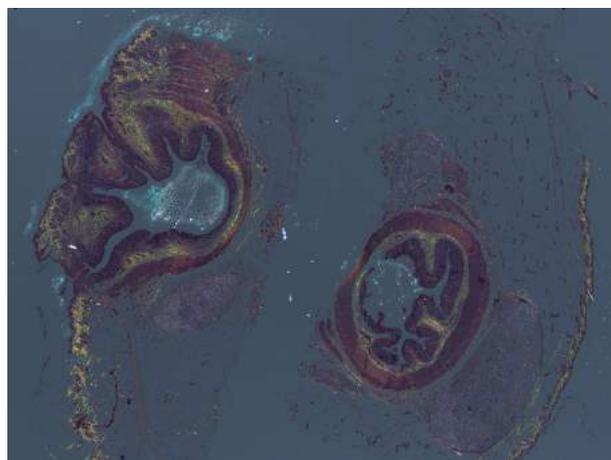
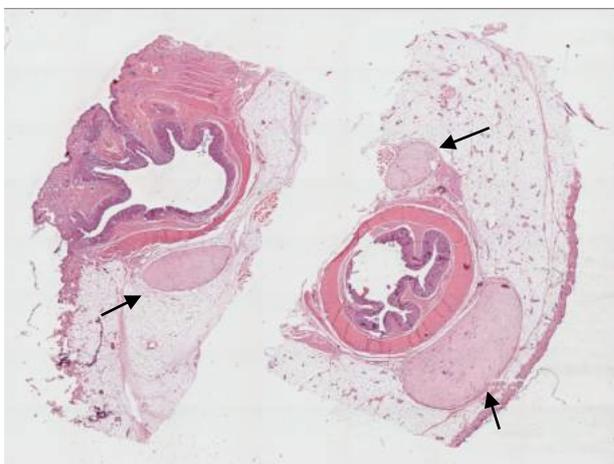


Figura 17: Gel de biopolímero externamente à camada muscular do anorreto coradas em HE. Localização do BPCA (setas) visualizado em luz branca (esquerda) e em luz polarizada (direita) onde observa-se a presença residual de biopolímero no interior do implante.

Observou-se na área do implante formação inicial de células gigantes multinucleadas que se estendem desde a periferia até o centro dos implantes. Sua presença pode ser classificada prevalentemente como leve, com densidade volumétrica média de 9,5%.(figura18)

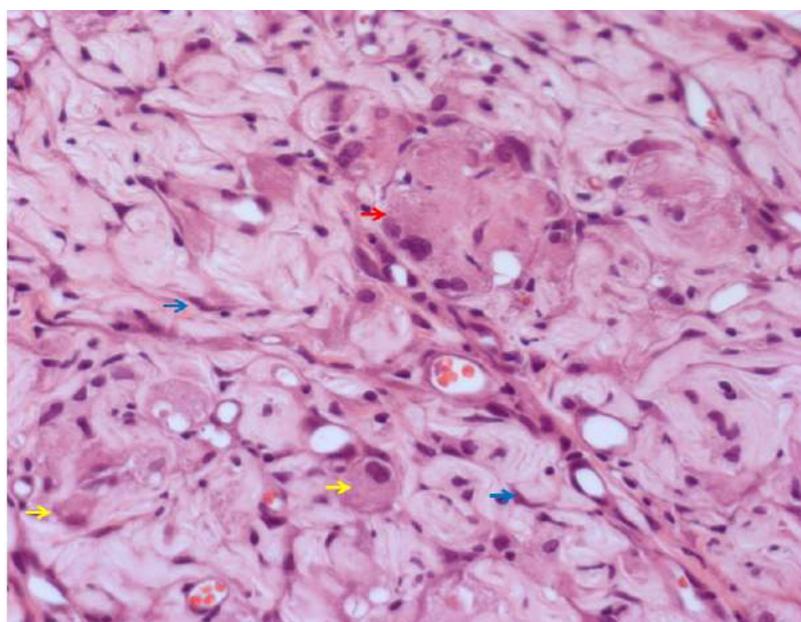


Figura 18 Representação histológica em HE do implante de biopolímero de cana-de açúcar permeado por leve infiltrado inflamatório linfomononuclear contendo macrófagos (seta amarela) e células gigantes do tipo corpo estranho (seta vermelha). Identificam-se fibroblastos (seta azul). Aumento de 400x

A neovascularização se comporta de forma homogênea com vasos presentes desde a periferia até o centro dos implantes e possui uma densidade volumétrica média de 4,5 %. Observou-se vasos externos inserindo-se no implante e penetrando dentro de sua área.(Figura 19)

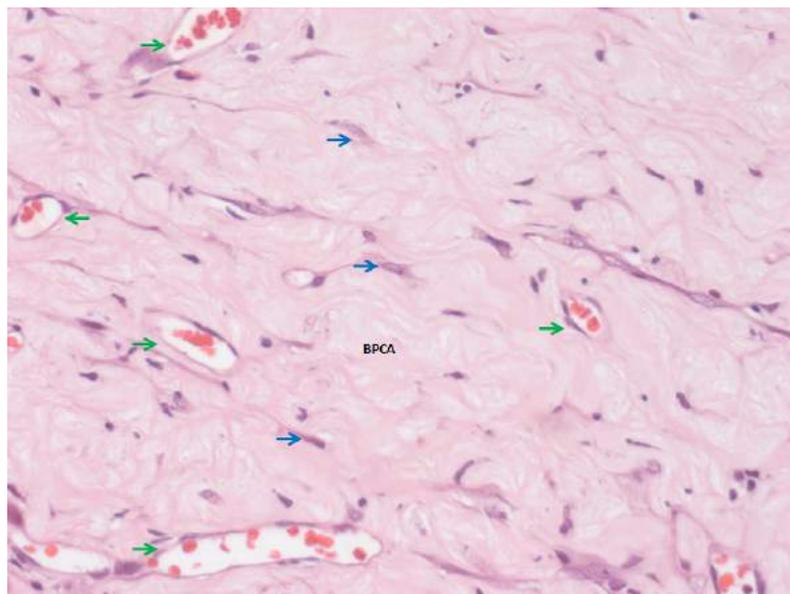


Figura 19 Representação Histológica em HE do implante de biopolímero de cana-de-açúcar permeado por numerosos vasos (setas verdes) e fibroblastos (seta azul). Aumento de 400x

Através da coloração de tricrômio de Masson pôde-se observar deposição de colágeno com fibras maduras formando o envoltório do implante assim como em regiões periféricas e centrais dentro deste (Figura 20). Pôde ser visualizado o trajeto de fibras maduras que partem da periferia ao centro do biopolímero. A presença de colágeno na área do implante foi classificada como Grau 0 (0 a 5%) e Grau I (5 a 25%)

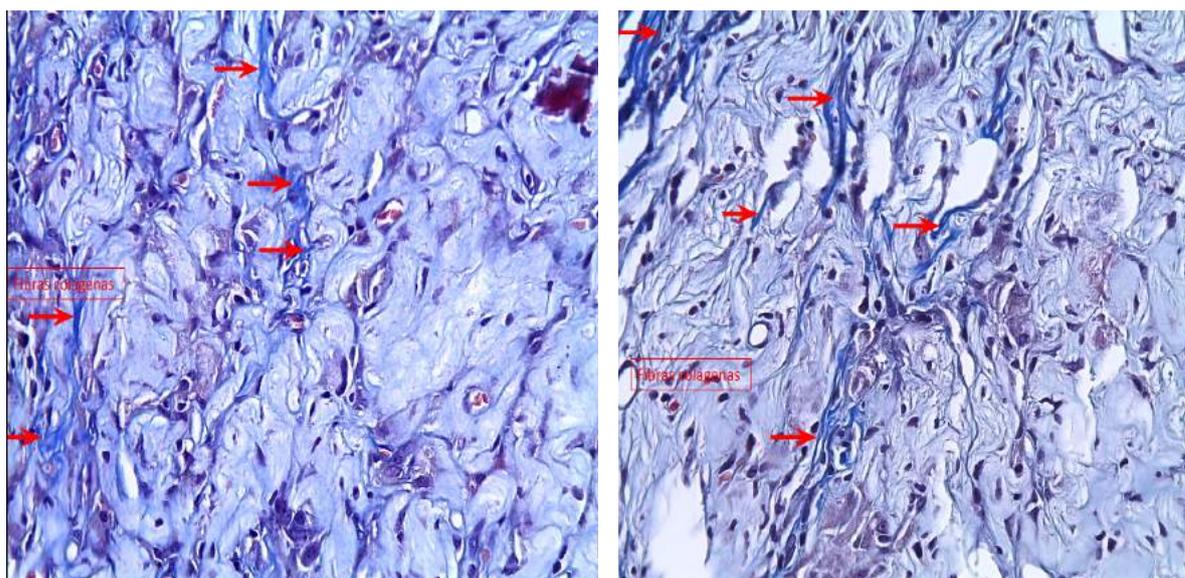


Figura 20: Representação Histológica em TM do implante de biopolímero de cana-de-açúcar permeado de fibras colágenas (setas vermelhas). Aumento de 400x

A densidade volumétrica de fibroblastos e células inflamatórias na área do biopolímero foi de 5,3% e 4,5% respectivamente, ambos distribuídos homogeneamente em sua área desde as margens até o centro. (Figura 20)

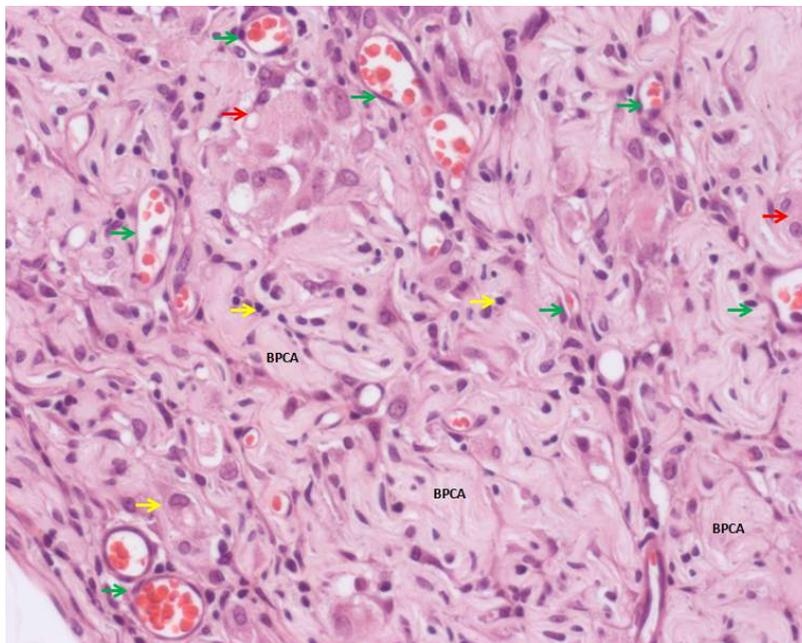


Figura 21 Representação histológica em HE do implante de biopolímero de cana de açúcar permeado por leve infiltrado inflamatório linfomononuclear (setas amarelas) com células gigantes do tipo corpo estranho (setas vermelhas) e numerosos vasos (setas azuis).

5 Discussão

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a o gel de biopolímero de cana-de-açúcar como agente de preenchimento do anorreto de ratos submetidos à disfunção esfinctérica.

5.1 Justificativa do estudo: A busca do agente ideal.

A incontinência fecal é a perda indesejável de flatos e fezes em momentos inapropriados. É um distúrbio que determina impacto negativo na qualidade de vida^{5,7,16} e gera grande impacto econômico^{10,11}, porém é um sintoma subnotificado e sua prevalência é alta porém subestimada.^{4-6,8,9} Existem vários fatores que podem contribuir para o aparecimento desse distúrbio¹²⁻¹⁵ e por isso é importante determinar comorbidades, uso de medicações, história de trauma perineal, cirurgias anorretais, partos vaginais e uso de fórceps. Exame físico detalhado, estudo manométrico, imagem da integridade do complexo esfincteriano e do assoalho pélvico além do estudo da preservação da inervação muitas vezes são necessários para a escolha do tratamento ideal conforme orientado pelos autores J.Van Koughnett e S. Wexner em 2013.¹⁷

O tratamento inicial deve ser com medidas conservadoras como dietas, medicações constipantes, determinação de um ritual para esvaziamento retal e exercícios perineais como recomenda uma diretriz na Inglaterra denominada NICE (National Institute for Clinical Excellence) para o tratamento da incontinência fecal.⁵⁹

No momento que essas medidas se tornam insuficientes, o tratamento com agente de preenchimento mostra-se uma indicação, principalmente nos casos de graus de incontinência fecal leve a moderada, pois é um procedimento minimamente invasivo, ambulatorial e com baixas taxas de complicações.¹⁸ Seu uso é certamente uma opção mais simples e segura que os tratamentos cirúrgicos disponíveis como realização de esfincteroplastia, implante de marcapasso com estimulação do nervo sacral, criação de um esfíncter confeccionado por plástica muscular, colocação de um esfíncter anal artificial e colostomia, apesar de que cada caso deve ser avaliado individualmente. Müller em 2005, fez uma revisão sobre as opções cirúrgicas para o tratamento da incontinência fecal e concluiu que a cirurgia deve ser o último recurso

a ser adotado, enfatizando que os resultados acabam deteriorando com o tempo além de serem de alta complexidade e apresentarem alto índice de complicações.⁶⁰

O uso de agente de preenchimento foi originalmente descrito para o tratamento da incontinência urinária de estresse, que ocorre quando a pressão intravesical excede a pressão de fechamento uretral, tornando-a deficiente.⁶¹ A melhora funcional da incontinência urinária através de um procedimento minimamente invasivo gerou interesse em utilizá-la para o tratamento da incontinência fecal. Os pacientes que apresentam disfunção do esfíncter anal interno são os que mais se beneficiam com esse tipo de tratamento segundo Kenefick e colaboradores (2002)¹ e Watson, Koshy e Sagar (2012).² O mecanismo de ação é aumentar os coxins do canal anal promovendo o selamento do lúmen nessa localização ou preencher defeitos do esfíncter interno proporcionando a simetria do canal anal.²¹

Vários tipos de substâncias foram testadas em busca do agente ideal^{19,20,22-26} que consiste em um material biocompatível, não imunogênico, não carcinogênico, não alergênico, com partículas maiores de 80µm de diâmetro para evitar migração, que seja fácil de injetar, de baixo custo e que reproduza resultados duradouros conforme ressaltado por Vaizey em sua revisão em 2005.²⁷ As drogas mais modernas e seguras como partículas de carbono pirolítico, dextranômero em ácido hialurônico e silicone (PTQ) apresentam desvantagens de ter pouco tempo de duração e alto custo.²⁸ Portanto permanece a necessidade em buscar um agente biocompatível, com baixa toxicidade, que não apresente migração ou degradação tecidual e que tenha efeito por longo tempo.

O Biopolímero de cana-de açúcar é um polímero sintético, que foi desenvolvido na Estação Experimental de Cana-de Açúcar de Carpina, campus avançado da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFPRE) através da síntese bacteriana a partir do melão de cana-de-açúcar. Consta de um material hidrofílico, com alta cristalinidade, alto grau de polimerização, com grande força tênsil e resistência à ruptura conforme descrito por Paterson-Beedle em 2002.³⁰ A partir daí, vários estudos com o uso do biopolímero como implantes foram realizados, mostrando que consta de um material biocompatível, com baixa toxicidade, bacteriostático, não imunogênico e tem a proposta de ter um custo mais acessível devido a disponibilidade da matéria-prima na região.³¹⁻³⁹

Um trabalho particularmente interessante por similaridade ao presente estudo

foi realizado por Lima (2015) que utilizou o BPCA como agente de preenchimento intravesical em coelhos para tratamento de refluxo vesicoureteral. Nesse estudo, o BPCA foi comparado ao dextranômero e ácido hialurônico (Deflux®), substância muito utilizada como agente de preenchimento para incontinência fecal e urinária. Foi injetado 0,2ml de BPCA no lado esquerdo da bexiga e 0,2ml de Deflux® no lado direito. Os animais foram sacrificados em três dias, noventa dias e onze meses após aplicação dos agentes. No terceiro mês o dextranômero não era mais detectável enquanto o BPCA permaneceu homogêneo, estável, com células multinucleadas gigantes e células vasculares, dentro e na periferia do implante até o período de onze meses. Esse comportamento do BPCA em detrimento ao dextranômero remete uma perspectiva que ele seria um agente de preenchimento de maior durabilidade.

Outros estudos sobre uso do dextranômero em ratos comprovaram o decréscimo do volume desse material ao longo do tempo. M. Alkan em 2007 observou que o volume do implante de dextranômero na parede vesical reduziu em 23% no período de doze meses⁶², E. Elzayat em 2008 comparou o volume de dois agentes de preenchimento na região subcutânea da parede abdominal, o colágeno e o dextranômero em ácido hialurônico, nos períodos de um, seis e 12 meses. O volume do dextranômero decresceu em 20% e o colágeno em 40% do volume inicial num período de doze meses.⁵³

5.2 Metodologia e delineamento do estudo

Para avaliar o gel de BPCA como agente de preenchimento do anorreto dos ratos com disfunção esfíncteriana, foi escolhido obter dados objetivos através da manometria anorretal, exame de grande importância para quantificar a função da musculatura esfíncteriana,⁴¹⁻⁴⁶ e avaliação histológica.

Esse estudo foi um ensaio biológico, constituído de modelo experimental induzido, de natureza cirúrgica, caracterizado por uma amostra de 45 ratos alocados de forma aleatória em três grupos de 15: o grupo controle, o grupo esfínterectomia com aplicação de soro fisiológico (GE+SF) e o grupo esfínterectomia com aplicação de BPCA (GE+BPCA).

Para garantir que os ratos mantivessem a pressão do canal anal baixa, determinando um modelo de disfunção esfíncteriana adequado, foi reproduzido a ressecção cirúrgica em bloco da hemicircunferência esquerda do canal anal,

conforme sugerido por Yamaguchi em 2013. Após essa ressecção os ratos mantiveram disfunção esfinteriana por quarenta e cinco dias, período mais longo do que o estudo de Yamaguchi.⁵² Assim como o estudo de Yamaguchi, foi observado que os ratos do grupo controle e da ressecção esfinteriana apresentaram um aumento discreto da pressão anorretal com o passar do tempo e que parece ser um evento esperado no desenvolvimento estrutural de ratos saudáveis. Isso deve ser ocasionado pela abundância muscular ao redor do cóccix, segundo Yamaguchi.

Não existe volume padrão de agente de preenchimento em humanos e ela varia muito entre os trabalhos como observamos na tabela 3, baseada na revisão sistemática realizada por Luo²⁶. Fizemos um volume de 0,2ml em três pontos do anorreto que fosse capaz de resultar em alteração manométrica.

Com o intuito de avaliar as mudanças pressóricas anorretais de repouso antes e após ressecção esfinteriana, antes e após a aplicação do SF ou BPCA, foi feito um modelo de manômetro simples mas que foi capaz de avaliar as diferenças de pressão em repouso entre os grupos de ratos e entre os diferentes tempos. A utilização do manômetro de mercúrio acoplado a uma sonda com balão em sua extremidade foi utilizada nesse estudo porque o material estava disponível no NCE, é seguro e de baixo custo. Esse tipo de manômetro foi demonstrado ser capaz de avaliar a pressão do canal anal de humanos conforme publicado por Ö. Günal em 2007. Nesse trabalho foi utilizado uma sonda de Sengstaken-Blakemore acoplado a um manômetro de mercúrio que o autor usou para avaliar a pressão do canal anal de repouso e de contração voluntária em cinquenta indivíduos. Trinta e cinco eram portadores de fissura anal e foram avaliados com esse sistema de manometria no pré operatório e no segundo e vigésimo dia pós operatório de esfinterotomia lateral esquerda. Quinze foram caracterizados como controle. Nesse estudo foi possível concluir que esse método de aferir a pressão do canal anal em humanos foi factível, fácil, de baixo custo e reproduzível.⁴⁴ M. el-Shafie em 1972 já tinha desenvolvido um manômetro em U acoplado a um cateter de polietileno com balões de látex em sua extremidade para avaliação da pressão dos esfínteres internos e externos durante a distensão do reto para avaliação do reflexo inibitório reto-anal em crianças com suspeita de Doença de Hirshprung. O sistema foi testado em cinquenta e dois pacientes e foi comparado à avaliação manométrica com transdutor elétrico em todos os casos. Pode-se concluir que esse método de aferição refletiu corretamente os resultados gráficos.⁴⁵ Dessa forma, o sistema utilizado pelo presente estudo pode

reproduzir com fidelidade as mudanças pressóricas relacionadas a esfinterectomia e à aplicação perianal de BPCA.

Naturalmente foi necessário avaliar em igual período os dois outros grupos, controle e esfinterectomia com aplicação de SF para permitir maior controle e reduzir possíveis viés.

5.3 Avaliação dos Resultados

Nesse estudo, foi feita avaliação das pressões anorretais de quarenta e cinco ratos, porém após exclusões e perdas de 11 animais, foram analisados trinta e quatro ratos nos tempos D0, D15 e D45. Cinco ratos, um do GC, dois do GE+SF e dois do GE+BPCA não puderam ter suas pressões avaliadas em um dos períodos devido a superficialização da anestesia e impossibilidade em dar continuidade à avaliação manométrica naquele momento, foram portanto excluídos do trabalho. Houve seis mortes durante os experimentos, dois ratos de cada grupo. Pode-se observar que foi um fenômeno aleatório, ocorrendo em número semelhante em todos os grupos. Um rato do grupo GE+SF no décimo sexto dia após esfinterectomia apresentou infecção respiratória com quadro de dispnéia, taquipnéia, ronco e secreção nasal. Foi iniciado antibióticoterapia conforme orientação veterinária porém evoluiu à óbito após seis horas. Os outros seis ratos tiveram óbito horas após serem submetidos a dosagem extra de anestésico imediatamente antes ou durante as avaliações, fato que concluímos que a morte foi relacionada a superdosagem anestésica. Essa observação fez com que evitássemos a reaplicação de anestésico nos ratos subsequentes quando necessário, dando preferência em suspender a avaliação. Todos ratos que morreram foram submetidos à autopsia para investigação de um fator causador, porém não foram observados alterações morfológicas que justificassem.

A amostra foi homogênea pois todos os ratos estavam na fase adulta de desenvolvimento, apresentando pesos corpóreos ($p=0,1829$) e de peça anatômica ($p=0,5709$) semelhantes.

A aplicação de BPCA não resultou em complicações locais como reação corpo estranho, abscesso ou necrose da região anorretal.

Para a avaliação da pressão anorretal criamos uma curva de nível pressórica medindo 10 pontos com intervalos de 0,1ml cada até 1,0ml. Foi realizada a aferição

três vezes por período em cada rato e foi considerada a média das pressões em cada volume. Os dados foram avaliados por volume visto que a média das pressões não foram representativas pela variação ampla das pressões a cada volume.

A pressão anorretal aferida em milímetros de mercúrio foi aumentando a medida que foi introduzido 0,1ml de água no balão. Essa é a pressão intraluminal gerada pela resistência do canal anal à expansão volumétrica do balão. Foi possível observar nos gráficos de dispersão o comportamento pressórico entre os grupos. As pressões do grupo controle mantiveram constante em todos os tempos. O grupo que foi submetido a esfinterectomia e aplicação de SF apresentou queda na curva de pressão ao final do estudo e, de forma contrária, o grupo que foi submetido a esfinterectomia e aplicação de BPCA evoluiu com um aumento discrepante nos níveis pressóricos no final do estudo.

Essa mudança de comportamento pressórico entre os grupos pode ser facilmente identificada quando obtemos a diferença pressórica entre os tempos D15 e D0 (D15-D0) e entre os tempos D45 e D0 (D45-D0) dispostos na tabela 9 e no gráfico de barras da figura 15, tornando a avaliação estatística mais sensível. A análise dos dados da média da diferença pressórica entre D15 e D0 mostraram que no GC foi -0,2mmHg e no GE+SF foi -1,5mmHg, sendo estatisticamente significativa (GC≠GE+SF, $p < 0,0001$). Isso demonstra que o modelo de disfunção esfinteriana foi adequado. No GE+BPCA, a média da diferença pressórica entre D15 e D0 foi de -0,3mmHg, tendo comportamento igual ao grupo controle (GE+ BPCA≠GC, $p = 0,0997$) e diferente do GE+SF (GE+BPCA≠GE+SF, $p = 0,0004$). Isso ocorreu porque a aplicação do BPCA no D15 resultou em elevação pressórica anorretal que permitiu a manutenção do nível pressórico, igualmente ao controle, mesmo tendo sido submetido a esfinterectomia. Quando analisamos as diferenças pressóricas entre os tempos D45 e D0 (D45-D0), o GC foi 0,8mmHg, o GE+SF foi -0,3mmHg e o GE+BPCA foi 1,5mmHg, sendo todas as diferenças com significância estatística (GC≠GE+SF, $p = 0,0003$; GC≠GE+BPCA, $p = 0,0198$; GE+SF≠GE+BPCA, $p = 0,0002$). Portanto, o GC manteve seus níveis pressóricos, o GE+SF apresenta queda da pressão anorretal e o GE+BPCA apresenta elevação importante dos níveis pressóricos, superando a pressão do GC demonstrando que o BPCA elevou os níveis de pressão anorretal nos ratos submetidos a esfinterectomia.

Durante a avaliação histopatológica do GC e GE+SF, não foi observado indução de processo inflamatório de reparação e remodelamento no D60 e portanto

não foi visualizado qualquer alteração tecidual. Portanto o estudo anatomopatológico de análise e quantificação celular foi considerado nulo de evidências.

No GE+BPCA o biopolímero se comporta como um material homogêneo, envolto por uma fina camada em feixes curtos de tecido conjuntivo fibroso, permeável à entrada de vasos sanguíneos, colágeno e outros tipos celulares. O BPCA injetado permaneceu no local que foi administrado, permanecendo-se estável e apresentando integração ao tecido do hospedeiro, possibilitando seu efeito de preenchimento. Foi possível observar a migração de células gigantes multinucleadas, células inflamatórias, fibroblastos, fibras colágenas bem formadas e vasos sanguíneos da parte externa do implante para parte interna, de forma que os processos biológicos aconteceram de forma centrípeta.

Outros estudos também demonstraram que o BPCA induz a neoformação de vasos e de matriz extracelular no implante: Silva em 2006 utilizou uma membrana de BPCA para tratamento de perfuração crônica da membrana timpânica em *Chinchilla laniger* e observou que esse material serviu como um condutor para formação de elementos responsáveis pela cicatrização da membrana³⁴; Quando o BPCA foi utilizado para remendo de arterioplastia em cães por Lamartine em 2007, foi observado processo inflamatório crônico e fibrose na superfície do BPCA. Não houve processo degenerativo da prótese ou calcificação após 180 dias³⁵; O trabalho de Silva em 2015 que comparou BPCA ao dextranômero em ácido hialurônico na bexiga de coelhos observou que o biopolímero permanecia na área injetada e tinha sua estrutura invadida por células e vasos que permaneceram até o período de 11 meses em contraste ao dextranômero em ácido hialurônico que não apresentava infiltrado celular e já apresentava dispersão da massa polimérica em noventa dias.⁴⁰ Portanto as características de estabilidade, durabilidade, integração ao tecido de hospedeiro e incorporação de células inflamatórias, colágeno, fibroblastos e vasos sanguíneos que formam um arcabouço para manutenção do volume do implante demonstram que o biopolímero de cana-de-açúcar tem propriedades de um agente de preenchimento ideal.

6 Perspectivas

Esse estudo é pioneiro na avaliação do BPCA como agente de preenchimento anorretal para o tratamento da disfunção esfinteriana em ratos.

O BPCA já foi comprovado em diversos estudos ser um material homogêneo, resistente, biocompatível, não citotóxico, não imunogênico, e que persiste por longo período nos tecidos. Nesse estudo foi possível observar que esse material injetado no anoreto de ratos resultou no aumento de pressão anorretal de repouso apresentando resultado satisfatório em seu efeito de preenchimento. Além disso, seria um material de menor custo devido a disponibilidade da cana-de açúcar em nosso meio. Tais dados são importantes para consolidar a possibilidade do uso do BPCA como agente de preenchimento a ser utilizado em um protocolo clínico para o tratamento da incontinência fecal.

7 Conclusão

- ❖ O gel de biopolímero de cana-de-açúcar elevou os níveis pressóricos de repouso da região anorretal dos ratos submetidos à disfunção esfinteriana.
- ❖ O gel de biopolímero de cana-de-açúcar permaneceu no local do implante neovascularizado, colonizado por células gigantes multinucleadas, fibroblastos e com neoformação de tecido fibroso de sustentação.

Referências

1. Kenefick NJ, Vaizey CJ, Malouf a J, Norton CS, Marshall M, Kamm M a. Injectable silicone biomaterial for faecal incontinence due to internal anal sphincter dysfunction. *Gut* 2002 Aug;51(2):225–8.
2. Watson NFS, Koshy a, Sagar PM. Anal bulking agents for faecal incontinence. *Colorectal Dis.* 2012 Dec;14 Suppl 3:29–33.
3. Hussain ZI, Lim M, Stojkovic SG. Systematic review of perianal implants in the treatment of faecal incontinence. *Br J Surg* 2011 Dec;98(11):1526–36.
4. Whitehead WE, Borrud L, Goode PS. NIH Public Access. *Gastroenterology.* 2009;137(2):512–7.
5. Perry S, Shaw C, McGrother C, Matthews RJ, Assassa RP, Dallosso H, et al. Prevalence of faecal incontinence in adults aged 40 years or more living in the community. *Gut* 2002 May;50(4):480–4.
6. Nelson RL. Epidemiology of fecal incontinence. *Gastroenterology.* 2004 Jan;126(1 Suppl 1):S3–7.
7. Rockwood TH. Impact of fecal incontinence on quality of life. *World J Gastroenterol.* 2009 Jul14;15(26):3276-3282.
8. Whitehead WE. Diagnosing and managing fecal incontinence: if you don't ask, they won't tell. *Gastroenterology.*2005 Jul ;129(1):6.
9. Leigh RJ, Turnberg LA. Faecal incontinence: the unvoiced symptom. *Lancet.*1982 Jun 12;1(8285):1349–51.
10. Borrie MJ, Davidson H a. Incontinence in institutions: Costs and contributing factors. *Cmaj.* 1992;147(3):322–8.
11. Whitehead WE. Fecal incontinence: a neglected area of gastroenterology. *Gastroenterology.* 2002 Jan;122(1):5.
12. Bharucha AE. Fecal incontinence. *Gastroenterology.* 2003;124(6):1672–85.

13. Oliveira, Lucia de. Incontinência fecal J Bras. Gastroenterol. 2006;6(1):35-37
14. Costilla. VC, Foxx-Orenstein. AE, Mayer. AP, Crowell. MD. Office-Based Management of Fecal Incontinence. Gastroenterology & hepatology. 2013 Jul; 9(7):423-33
15. Rao. SSC. Pathophysiology of Adult Fecal Incontinence. Gastroenterology 2004;126:S14-S22
16. Rockwood TH. Incontinence severity and QOL scales for fecal incontinence. Gastroenterology. 2004 Jan;126(1 Suppl 1):S106–13
17. Van Koughnett JAM, Wexner SD. Current management of fecal incontinence: Choosing amongst treatment options to optimize outcomes. World J Gastroenterol. 2013 Dec 28;19(48):9216–30.
18. Danielson J, Karlbom U, Wester T, Graf W. Efficacy and quality of life 2 years after treatment for faecal incontinence with injectable bulking agents. Tech Coloproctol. 2013 Aug [cited 2014 Jan 31];17(4):389–95.
19. Bernardi C, Favetta U, Pescatori M. Autologous fat injection for treatment of fecal incontinence: manometric and echographic assessment. Plast Reconstr Surg . 1998;102(5):1626–8.
20. Davis K, Kumar D, Poloniecki J. Preliminary evaluation of an injectable anal sphincter bulking agent (Durasphere) in the management of faecal incontinence. Aliment Pharmacol Ther.2003 Jul 15;18(2):237–43.
21. Oliveira LCC, Neves Jorge JM, Yussuf S, Habr-Gama A, Kiss D, Ceconello I. Anal incontinence improvement after silicone injection may be related to restoration of sphincter asymmetry. Surg Innov. 2009 Jul;16(2):155–61.
22. Shafik A. Polytetrafluoroethylene injection for the treatment of partial fecal incontinence. Int Surg. Jan;78(2):159–61.
23. Shafik a. Perianal injection of autologous fat for treatment of sphincteric incontinence. Dis Colon Rectum. 1995;38(6):583–7.
24. Kumar D, Benson MJ, Bland JE. Glutaraldehyde cross-linked collagen in the treatment of faecal incontinence. Br J Surg. 1998 Jul;85(7):978–9.

25. Malouf AJ, Vaizey CJ, Norton CS, Kamm MA. Internal anal sphincter augmentation for fecal incontinence using injectable silicone biomaterial. *Dis Colon Rectum*. 2001 Apr;44(4):595–600.
26. Luo C, Samaranayake CB, Plank LD, Bissett IP. Systematic review on the efficacy and safety of injectable bulking agents for passive faecal incontinence. *Colorectal Dis*. 2010 May ;12(4):296–303.
27. Vaizey CJ, Kamm M a. Injectable bulking agents for treating faecal incontinence. *Br J Surg*. 2005 May;92(5):521–7.
28. Maeda Y, Laurberg S, Norton CS. Perianal injectable bulking agents as treatment for faecal incontinence in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(3).
29. Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Jan 14;60(2):184–98.
30. Paterson-Beedle M, Kennedy JF, Melo FAD, Lloyd LL, Medeiros V. Cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. *Carbohydr Polym*. 2000;42(4):375–83.
31. Assis F De, Melo D, Marques E. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar*. *An da Fac Med da Univ Fed pernambuco*. 2004;49(2):119–23.
32. Coelho MC de OC, Carrazoni PG, Monteiro VL da C, Melo F de AD, Mota RA, Tenório Filho F. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cirúrgica Brasileira/SOBRADPEC*; 2002 ;17:11–3.
33. Lima FR, Lima JRA , Hirakawa P, Medeiros MDJ, Lamartine J de A. Resposta inflamatória à membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno implantadas no peritônio parietal de ratos. *AnFacMedUnivFedPernamb*. 2005;50(1):37–40.
34. Silva DB, Lamartine. JAdeA, Marques A, Coelho. ARB, Filho ELR. Miringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero da cana-de-açúcar e fásia autóloga em *Chinchilla laniger*. *AnFacMedUnivFedPernamb*. 2006;51(1):45–51.

35. Lamartine JA de A, Lins EM, Romero S, Marques DB, De AR. Surgarcane biopolymer patch in femoral artery angioplasty on dogs 1 . Membrana de biopolímero de cana-de-açúcar como remendo em arterioplastias femorais de cães . *Acta Cirúrgica Bras.* 2007;22(Supplement 1):77–81.
36. Gonçalves R, Rangel AE de O, Duarte JA, Andrade R, Aguiar JL, Araújo LA, et al. Sling no tratamento da incontinência urinária de esforço: estudo experimental e primeiros ensaios clínicos. *Ann Int Brazilian J Urol.* 2006;32:65.
37. Chagas HM, Aguiar JL de A, Andrade RT, Montoro M, Vilar F de O, Lima SVC. Uretroplastia com biopolímero da cana-de-açúcar em cão. *Int Brazilian J Urol.* 2006;32:65.
38. Vilar F de O, Vasconcelos GB, Correia Lima SV, Lucena RG, Aguiar JL de A. Utilização do biopolímero de cana-de-açúcar na túnica albugínea: estudo experimental em cães. *Ann Int Brazilian J Urol.* 2005;30:126.
39. Martins AGS, Lima SVC, Araujo LAP De, Vilar FDO, Cavalcante NTP. A wet dressing for hypospadias surgery. *Int braz j urol [Internet].* 2013;39(3):408–13.
40. Lima SV, de Oliveira Rangel AE, de Melo Lira MM, Pinto FC, Campos Júnior O, Sampaio FJ, de Andrade Aguiar JL. The Biocompatibility of a Cellulose Exopolysaccharide Implant in the Rabbit Bladder When Compared With Dextranomer Microspheres plus Hyaluronic Acid. *Urology* 2015 Jun;85(6):1520
41. Meneguelli UG, Dantas RO. História e Futuro da Manometria do Esôfago. 1a edição. Nasi A, Michelsohn NH, editors. São Paulo: Roca; 2001. 3 p.
42. Coller JA. Clinical application of anorectal manometry. *Gastroenterol Clin North Am.* 1987 Mar 16(1):17–33. 41. Techniques AT. Anorectal testing techniques. *Gastroenterology.* 1999;116:732–60.
43. Ihnat P, Vavra P, Gunkova P, Pelikan A, Zonca P. 3D High Resolution Anorectal Manometry in functional anorectal evaluation. *Rozhl v Chir.* 2015;93(11):524–9.
44. Günal Ö, Gürleyik E, Arikan Y, Pehlivan M. Assessment of anal sphincter function by Sengstaken-Blakemore tube anal manometry. *World J Surg.* 2007;31(2):399–402.

45. El-Shafie M, Suzuki H, Schnauffer L, Haller J a, White JJ. A simplified method of anorectal manometry for wider clinical application. *J Pediatr Surg.* 1972;7(2):230–5.
46. Seong MK, Park UC, Jung S II. Determinant of anal resting pressure gradient in association with continence function. *J Neurogastroenterol Motil.* 2011;17(3):300–4.
47. Schnaider TB. Ética e pesquisa. *Acta Cirúrgica Bras.*2008;23(1):107–11.
48. Vinograd I, Hanani M, Hadary A, Merguerian P, Nissan S. Animal model for the study of internal anal sphincter activity. *Eur Surg Res.*1985 Jan;17(4):259–63.
49. Buffini M, O’Halloran KD, O’Herlihy C, O’Connell PR, Jones JFX. Comparison of the motor discharge to the voluntary sphincters of continence in the rat. *Neurogastroenterol Motil.* 2012;24(4):175–84.
50. Kang S-B, Lee HN, Lee JY, Park J-S, Lee HS, Lee JY. Sphincter contractility after muscle-derived stem cells autograft into the cryoinjured anal sphincters of rats. *Dis Colon Rectum.* 2008 Oct [cited 2014 Jan 31];51(9):1367–73.
51. Zutshi M, Salcedo LB, Zaszczurynski PJ, Hull TL, Butler RS, Damaser MS. Effects of sphincterotomy and pudendal nerve transection on the anal sphincter in a rat model. *Dis Colon Rectum.* 2009;52(7):1321–9.
52. Yamaguchi I, Fujita F, Yamanouchi K, Mishima T, Kawahara D, Sakai Y, et al. A novel animal model of long-term sustainable anal sphincter dysfunction. *J Surg Res.* Elsevier Ltd; 2013;184(2):813–8.
53. Elzayat E a, Karsenty G, Bismar T a, Corcos J. Volume changes and histological response to injected dextranomer/hyaluronic acid copolymer (Zuidex) and collagen (Contigen) in rats. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2008 Mar ;19(2):247–52.
54. Domingos ALA, Tucci S, Garcia SB, de Bessa J, Cologna AJ, Martins ACP. Use of a latex biomembrane for bladder augmentation in a rabbit model: biocompatibility, clinical and histological outcomes. *Int Braz J Urol.* Jan;35(2):217–24; author reply 225–6.

55. Hyde DM, King TE, McDermott T, Waldron JA, Colby T V, Thurlbeck WM, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. Quantitative assessment of lung pathology. Comparison of a semiquantitative and a morphometric histopathologic scoring system. *Am Rev Respir Dis*. 1992. Oct;146(4):1042–7.
56. Araf D, Moura E da M, Rodrigues CJ, Figueiredo LA de F. Enxertos homólogos de esclera e dura-máter em olhos de coelhos: análise histopatológica comparativa. *Arq Bras Oftalmol. Conselho Brasileiro de Oftalmologia*; 2007 Dec; 70(6):981–7.
57. Cavazana WC, Simões M de LPB, Yoshii SO, Amado CAB, Cuman RKN. Açúcar (sacarose) e triglicérides de cadeia média com ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas cutâneas: estudo experimental em ratos. *An Bras Dermatol. Sociedade Brasileira de Dermatologia*; 2009 Jul;84(3):229–36.
58. Maeda M de FY, Silva CD, Harima LS, Silva LFF da, Ctenas B, Alves VAF. Vascularização na cirrose hepática: estudo imunoistoquímico baseado em necropsias. *Arq Gastroenterol. IBEPEGE, CBCD e SBMD, FBG, SBH, SOBED*; 2008 Mar;45(1):38–45.
59. Gonçalves JJS, Leão LEV, Ferreira RG, Oliveira R, Ota LH, Santos RS dos. Análise semiquantitativa de biópsias cirúrgicas de diferentes lobos pulmonares de pacientes com pneumonia intersticial usual/fibrose pulmonar idiopática. *J Bras Pneumol. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*; 2009 Jul;35(7):676–82.
60. NICE. Faecal incontinence The management of faecal incontinence in adults. NICE Guidance. 2007.
61. Müller C, Belyaev O, Deska T, Chromik A, Weyhe D, Uhl W. Fecal incontinence: An up-to-date critical overview of surgical treatment options. *Langenbeck's Arch Surg*. 2005;390(6):544–52.
62. Feki a., Faltin DL, Lei T, Dubuisson JB, Jacob S, Irion O. Sphincter incontinence: Is regenerative medicine the best alternative to restore urinary or anal sphincter function? *Int J Biochem Cell Biol. Elsevier Ltd*; 2007;39(4):678–84.
63. Alkan M, Ciftci AO, Talim B, Senocak ME, Caglar M, Buyukpamukcu N. Histological response to injected dextranomer-based implant in a rat model. *Pediatr Surg Int*. 2007;23(2):183–7.