

MAURÍCIO MACEDO

**ESTUDO DA DENSIDADE DAS CÉLULAS INTERSTICIAIS DE
CAJAL E DAS CÉLULAS GANGLIONARES NO INTESTINO
TERMINAL DE RATOS PORTADORES DE ANOMALIA
ANORRETAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo - Escola Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins

**SÃO PAULO
2006**

Macedo, Maurício

Estudo da densidade das células intersticiais de Cajal e das células ganglionares no intestino terminal de ratos portadores de anomalia anorretal. /Maurício Macedo. —São Paulo, 2006.

xv, 59f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental.

Título em inglês: Study of the density of interstitial cells of Cajal and ganglion cells in the terminal bowel of rats with anorectal malformations.

1. Ânus imperfurado. 2. Constipação. 3. Etilenotiouréia. 4. Proteínas S100. 5. Rato. 6. Célula intersticial de Cajal.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA - UNIFESP - EPM**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TÉCNICA
OPERATÓRIA E CIRURGIA EXPERIMENTAL**

COORDENADOR: Prof. Dr. José Luiz Martins

TESE DE DOUTORADO

AUTOR: Maurício Macedo

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Luiz Martins

**TÍTULO: ESTUDO DA DENSIDADE DAS CÉLULAS INTESTICIAIS DE
CAJAL E DAS CÉLULAS GANGLIONARES NO INTESTINO TERMINAL DE
RATOS PORTADORES DE ANOMALIA ANORRETAL**

BANCA EXAMINADORA

- Presidente:** **Prof. Dr. Jose Luiz Martins**
Professor Adjunto Livre Docente
Disciplina de Cirurgia Pediátrica
Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina
- Membros:** **Prof. Dr. Laércio Gomes Lourenço**
Professor Adjunto
Disciplina de Gastroenterologia Cirúrgica
Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina
- Prof. Dr. Lucio Tedesco Marchese**
Professor Associado
Disciplina de Cirurgia Pediátrica
Universidade Estadual de Londrina
- Prof. Dr. Manoel Carlos Prieto Velhote**
Doutor em Medicina
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo
- Prof. Dr. Pedro Muñoz Fernandez**
Professor Adjunto
Disciplina de Pediatria e Puericultura
Faculdade de Medicina do ABC
- Suplentes** **Prof. Dr. Flavio Saad**
Professor Doutor
Departamento de Clínica Cirúrgica
Faculdade de Ciências Médicas de Santos - UNILUS
- Prof. Dr. Fábio Luis Peterlini**
Doutor em Medicina
Disciplina de Cirurgia Pediátrica
Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

Dedicatória

Aos meus pais, **Luiz Macedo** (*in memoriam*) e **Josefina Vertematti Macedo**, pelo amor, amizade e educação que sempre me ofereceram ao longo da vida.

À minha esposa **Carla Renata Donato Macedo** e minha filha **Nathalia Donato Macedo**, pelo carinho e amor sempre presentes.

Agradecimento especial

Ao Prof. Dr. **JOSÉ LUIZ MARTINS**,
Orientador e grande incentivador deste trabalho

Agradecimentos

À **Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista De Medicina – UNIFESP-EPM.**

À **FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelo financiamento.

Ao **Prof. Dr. Djalma José Fagundes**, Ex-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIFESP-EPM.

À **Prof. Dra. Edna Frason de Souza Montero**, Professora Afiliada do Departamento de Cirurgia da UNIFESP-EPM.

À todos os **Professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP**, pela convivência e amizade.

Ao **Dr. Iberê Cauduro Soares**, médico patologista do Hospital do Servidor Público Estadual, pela realização de todas as lâminas para estudo imunohistoquímico, bem como pelo auxílio na interpretação dos resultados.

À **Dra. Karine Furtado Meyer**, pela incansável ajuda ao longo de todo esse trabalho.

À **Dra. Lina Wang**, pela colaboração durante a fase experimental.

À **Sra. Sandra Malagutti, Sra. Maura Lapa e Sra. Paula G. Strassmann** pela realização do estudo estatístico deste trabalho.

À minha esposa **Dra. Carla Renata Donato Macedo** pela ajuda na elaboração desse manuscrito e pela compreensão de minhas ausências.

Aos amigos **Dr. Jose Luis Ferreira Dias e Dr. Pedro Luiz de Brito**, colegas de trabalho, pelo apoio e retaguarda durante o período de pós-graduação.

As amigas **Dra. Valéria Cortez Ginani e Dra. Adriana Seber** pela ajuda na tradução para o inglês.

As **Sras. Elaine Maria Alves Bazzi Dantas e Valdelice Justiniano Soares**, secretárias da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, pelo apoio, carinho e amizade dispensados.

Lista de figuras

Figura 1-	Esquema de distribuição dos animais nos grupos.....	6
Figura 2-	Administração da droga por gavagem	7
Figura 3-	Laparotomia e retirada dos fetos.....	7
Figura 4-	Exame externo do feto.....	8
Figura 5-	Anatomia da AAR no sexo feminino – Persistência de cloaca.....	9
Figura 6-	Anatomia da AAR no sexo masculino – Fístula retouretral.....	9
Figura 7-	Aspecto da cauda e ânus do feto normal.....	10
Figura 8-	Cauda curta, agenesia de cauda e anomalia anorretal.....	10
Figura 9-	Ureterohidronefrose e Persistência de úraco.....	10
Figura 10-	Retirada do intestino terminal e da fístula retouretral.....	12
Figura 11-	Cálculo da área de musculatura longitudinal e circular da parede total do intestino.....	15
Figura 12-	Esquema demonstrativo do método de contagem celular e cálculo da densidade celular por mm ²	16
Figura 13-	<i>Box-plots</i> da variável “Densidade de células intersticiais de Cajal” por Grupos.....	21
Figura 14-	Fotomicrografia de intestino terminal do grupo Controle externo com coloração para células intersticiais de Cajal (400x).....	22
Figura 15-	Fotomicrografia de intestino terminal do grupo Controle interno com coloração para células intersticiais de Cajal (400x).....	23
Figura 16-	Fotomicrografia de intestino terminal do Grupo Anomalia anorretal com coloração para células intersticiais de Cajal (400x).....	23
Figura 17-	<i>Box-plots</i> da variável “Densidade de células intersticiais de Cajal” nos tipos de anomalia anorretal.....	25
Figura 18-	<i>Box-plots</i> da variável “Densidade de células ganglionares” nos Grupos A, B e C.....	29
Figura 19-	Fotomicrografia de intestino terminal do grupo Controle externo com coloração para proteína S100 (400x).....	30

Figura 20-	Fotomicrografia de intestino terminal do grupo Controle interno com coloração para proteína S100 (400x).....	31
Figura 21-	Fotomicrografia de intestino terminal do grupo controle Anomalia anorretal com coloração para proteína S100 (400x).....	31
Figura 22-	<i>Box-plots</i> da variável “Densidade de células ganglionares” nos tipos de anomalia anorretal.....	33

Lista de tabelas

Tabela 1-	Descrição da variável “Densidade de células intersticiais de Cajal” nos grupos A, B e C.....	21
Tabela 2-	Comparações múltiplas entre os grupos A, B e C, para a variável “Densidade de células intersticiais de Cajal”.....	22
Tabela 3-	Descrição da variável “Densidade de células intersticiais de Cajal” nos tipos de anomalia anorretal.....	24
Tabela 4-	Descrição da variável “Densidade de células ganglionares” nos grupos A, B e C.....	29
Tabela 5-	Comparações múltiplas entre os grupos A, B e C, para a variável “Densidade de células ganglionares”.....	30
Tabela 6-	Descrição da variável “Densidade de células ganglionares” nos tipos de anomalia anorretal.....	32

Lista de quadros

Quadro 1-	Características dos fetos provenientes das ratas que receberam etilenotiouréia.....	11
Quadro 2-	Densidade de células intersticiais de Cajal por mm ² no grupo A – Controle externo.....	18
Quadro 3-	Densidade de células intersticiais de Cajal por mm ² no grupo B - Controle interno.....	19
Quadro 4-	Densidade de células intersticiais de Cajal por mm ² e tipo de anomalia anorretal no grupo C - Anomalia anorretal.....	20
Quadro 5-	Densidade de células ganglionares por mm ² no Grupo A - Controle externo.....	26
Quadro 6-	Densidade de células ganglionares por mm ² no Grupo B - Controle interno.....	27
Quadro 7-	Densidade de células ganglionares por mm ² e tipo de anomalia anorretal no Grupo C – Anomalia anorretal.....	28

Lista de símbolos e abreviaturas

AAR.....	anomalia anorretal
ANOVA.....	análise de variância
°C.....	graus Celsius
C1.....	rata grávida 1 que não recebeu etilenotiouréia
C2.....	rata grávida 2 que não recebeu etilenotiouréia
C3.....	rata grávida 3 que não recebeu etilenotiouréia
CIC.....	célula intersticial de Cajal
c-Kit.....	receptor tirosina quinase
D0.....	dia zero de gestação
D11.....	décimo primeiro dia de gestação
D21.....	vigésimo primeiro dia de gestação
dp.....	desvio padrão
E1.....	rata grávida nº 1 que recebeu etilenotiouréia
E2.....	rata grávida nº 2 que recebeu etilenotiouréia
E3.....	rata grávida nº 3 que recebeu etilenotiouréia
EPM.....	Escola Paulista de Medicina
et al.....	e colaboradores
ETU.....	etilenotiouréia
FAPESP.....	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
g.....	grama
GFAP.....	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IEE.....	inervação entérica extrínseca
IEI.....	inervação entérica intrínseca
kg.....	quilograma
M.....	molar
mg.....	miligrama
ml.....	mililitros
mm ²	milímetros quadrados
N.....	número

OUT-B..... *outbreak*
pH..... potencial hidrogênio-iônico
RAM *random access memory*
SHH..... *sonic hedgehog*
UNIFESP..... Universidade Federal de São Paulo
X vezes

Resumo

Objetivo: Estudar as células ganglionares e as células intersticiais de Cajal (CIC) no intestino terminal de ratos portadores de anomalia anorretal (AAR) induzida pela etilenotiouréia (ETU). **Métodos:** Os animais foram distribuídos em três grupos: Grupo A - fetos normais, obtidos de ratas grávidas às quais não foi administrada ETU; Grupo B - fetos não portadores de AAR obtidos de ratas grávidas às quais foi administrada ETU e Grupo C – fetos portadores de AAR obtidos de ratas grávidas às quais foi administrada ETU. A ETU foi administrada no décimo primeiro dia de gestação na dose de 125 mg/Kg, por gavagem. As ratas foram submetidas à laparotomia e histerotomia para retirada dos fetos no vigésimo primeiro dia de gestação. O intestino terminal dos fetos foi retirado e analisado por imunohistoquímica para pesquisa das CIC e células ganglionares. **Resultados:** Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos A, B e C quanto à densidade de CIC e de células ganglionares. O grupo A apresentou a maior densidade, seguida pelo grupo B, e a menor densidade, de ambas as células, foi encontrada no Grupo C. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os três tipos de anomalia anorretal obtidos, quanto à densidade de ambas as células. **Conclusão:** Existe uma menor densidade de CIC e de células ganglionares no intestino terminal de ratos portadores de AAR.

Abstract

Objective: to study the ganglion cells and the interstitial cells of Cajal (ICC) in the terminal bowel of rats with ethylenethiourea (ETU)-induced anorectal malformations (ARM). **Methods:** the animals were divided into three groups: Group A – normal fetuses from pregnant rats that were not administered ETU; Group B – fetuses without ARM born from pregnant rats that were administered ETU and Group C - fetuses with ARM born from pregnant rats that received ETU. ETU was administered on the 11th day of pregnancy at the dose of 125 mg/kg body weight by gastric gavage. The rats had cesarean section on the 21st day of gestation. The fetuses' terminal bowel tissue was analyzed by immunohistochemistry to demonstrate ICC and ganglion cells. **Results:** statistically significant differences were found between groups A, B and C regarding ICC and ganglion cell densities. Group A had the highest cell density, followed by Group B and the lowest density of both cells was found in Group C. There were no statistically significant differences between the three types of ARM regarding the density of either cell. **Conclusion:** ICC and ganglion cell densities are decreased in the terminal bowel of rats with ARM.

Sumário

Dedicatória.....	iv
Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	x
Lista de quadros.....	xi
Lista de símbolos e abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Geral:.....	4
2.2. Específico:.....	4
3. MÉTODOS.....	5
3.1 Amostra.....	5
3.2 Critério de gravidez.....	6
3.3 Indução de AAR.....	6
3.4 Eutanásia.....	7
3.5 Retirada dos fetos.....	7
3.6 Exame dos fetos.....	8
3.7 Retirada do intestino terminal para imunohistoquímica.....	12
3.8 Procedimento imunohistoquímico.....	13
3.9 Contagem das células intersticiais de Cajal e das células ganglionares.....	14
3.10 Cálculo da densidade celular.....	15
3.11 Análises realizadas.....	16
3.12 Estudo estatístico.....	16
4. RESULTADOS.....	18
4.1 Densidade de células intersticiais de Cajal nos grupos A, B e C.....	18
4.2 Densidade de células intersticiais de Cajal nos diferentes tipos de anomalia anorretal.....	24
4.3 Densidade de células ganglionares nos Grupos A, B e C.....	26

4.4 Densidade de células ganglionares nos diferentes tipos de anomalia anorretal.....	32
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES.....	42
7. REFERÊNCIAS.....	43
8. Anexos.....	50
APÊNDICE	
NORMAS ADOTADAS	

1. INTRODUÇÃO

A anomalia anorretal (AAR) é uma malformação congênita caracterizada pela imperfuração ou ectopia anal. Pode variar desde formas simples, como a fístula perineal, até formas complexas, como a persistência de cloaca. O termo “*ânus imperfurado*”, já consagrado pelo tempo, reflete tão somente o aspecto mais marcante dessa entidade. Além do intestino terminal, os sistemas geniturinário, esquelético e cardiovascular podem estar acometidos ⁽¹⁾.

A AAR acomete um em cada 5.000 recém-nascidos vivos, e é mais freqüente no sexo masculino (M), que representa cerca de 60% dos pacientes ⁽¹⁻⁴⁾. A variante mais comum no sexo M é a fístula retouretral e, no sexo feminino (F), a fístula vestibular.

Existem várias apresentações clínicas de AAR e sua classificação é controversa. Atualmente, a mais usada é a proposta por Peña. No entanto, muitos ainda utilizam o sistema proposto em 1984, durante o *Wingspread Workshop on Anorectal Malformations*, no qual foram classificadas em baixas, intermediárias e altas ⁽⁵⁾.

Independente das técnicas utilizadas na sua correção, a queixa mais freqüente no seguimento pós-operatório é a constipação intestinal, que acomete entre 30 e 60% dos pacientes ⁽⁶⁻⁸⁾. A constipação é um sintoma que deve ser tratado de forma agressiva, pois pode desencadear um quadro de pseudo-incontinência ^(1,6,7,9-11). O acúmulo de fezes forma um fecaloma que impede o paciente de sentir e controlar suas evacuações, ocorrendo, então, escapes fecais ^(10,11).

Na grande maioria dos casos, o tratamento da constipação apresenta bons resultados com o emprego de dieta, laxativos orais e clister. Ocasionalmente, a constipação apresenta um caráter intenso, progressivo e não responsivo às medidas terapêuticas habituais empregadas. Esses pacientes costumam apresentar o reto e o sigmóide extremamente dilatados, atônicos, ectásicos e com deficiente função propulsiva ^(1,6,9-13).

Vários são os fatores descritos para explicar a constipação intestinal no pós-operatório de AAR.

A estenose do orifício anal pode ser a causa da constipação ^(1,9).

A constipação pode ser decorrente de anormalidades da inervação entérica extrínseca (IEE) ^(1,14,15).

Outra explicação seria a denervação do reto por ocasião do procedimento cirúrgico ^(6,11,14,16,17).

A constipação também pode ser atribuída a alterações regionais da inervação entérica intrínseca (IEI), havendo descrição de anormalidades nas células ganglionares dos plexos mioentérico e submucoso. As alterações incluem a aganglionose, a hipoganglionose e a displasia neuronal intestinal ^(14,18-26).

Existem diversos métodos para estudo da IEI. Na histologia convencional, o método clássico é o da coloração pela Hematoxilina-eosina ⁽²⁷⁾. Através de métodos enzimo-histoquímicos, podemos pesquisar a atividade da acetilcolinesterase, da lactato desidrogenase, da succinato desidrogenase e da enzima óxido nítrico sintetase ⁽²⁷⁾. Nos métodos imunohistoquímicos, podem ser usadas colorações para as células ganglionares ou então as células de sustentação neuronal, também conhecidas como células da glia. Para as células da glia, podem ser utilizadas as reações pela Proteína S-100 e pela *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) ^(28,29). Para a coloração das células ganglionares, os métodos mais utilizados são a reação pela enolase específica do neurônio e pela proteína neurofilamentar (parte do citoesqueleto da célula nervosa) ⁽²⁷⁾.

Na década passada, foi proposto que a constipação pode ser decorrente de alterações das células intersticiais de Cajal (CIC). Kenny et al encontraram alterações das CIC em sete de 12 pacientes portadores de AAR ⁽³⁰⁾.

As CIC foram descritas, em 1893, por Ramon Y Cajal, como pequenas células que circundam os gânglios mioentéricos do intestino. No ser humano, elas aparecem no intestino fetal na 13^a semana gestacional e formam uma camada contínua ao redor do plexo mioentérico a partir da 18^a semana ^(30,31).

As CIC são células de origem mesenquimal que possuem receptores de tirosina quinase (c-Kit) em sua superfície. Esses receptores, sob a influência de fatores gerados pelas células nervosas do plexo mioentérico, diferenciam as

células mesenquimais em CIC mioentéricas, caracterizadas pelo citoplasma amplo e múltiplas ramificações. Quando sob influência de fatores gerados pelas células musculares, diferenciam as células mesenquimais em CIC musculares, que se apresentam como células fusiformes e bipolares ^(30,31).

As CIC estão localizadas ao longo de todo o trato digestivo, adjacentes a fibras nervosas e miócitos. Localizam-se na musculatura longitudinal, circular, plexo mioentérico e plexo submucoso. A máxima densidade de CIC é encontrada na parte externa da camada muscular circular, seguida de sua parte mais interna. Na camada longitudinal ela diminui progressivamente em direção à serosa ⁽³⁰⁻³⁴⁾.

As CIC são consideradas marcapassos, geradoras de ondas lentas, facilitadoras da propagação de estímulos elétricos e mediadoras da neurotransmissão na parede intestinal ⁽³⁰⁻³⁴⁾.

As CIC podem ser identificadas através da microscopia eletrônica ou através da demonstração imunohistoquímica de seu receptor tirosina quinase (c-Kit) ⁽³⁰⁻³⁴⁾.

Com base nessas alterações, foram estudadas as CIC e as células ganglionares no intestino terminal de ratos em um modelo animal de anomalia anorretal induzida pela etilenotiouréia (ETU) ⁽³⁵⁻⁴⁰⁾.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Estudar a inervação do intestino terminal de ratos portadores de anomalia anorretal induzida pela etilenotiouréia.

.

2.2. Específico:

Estudar a densidade das células ganglionares e das células intersticiais de Cajal no intestino terminal de ratos portadores de anomalia anorretal induzida pela etilenotiouréia

3. MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP-EPM, protocolo n° 0406/05 (Anexo 1).

3.1 Amostra

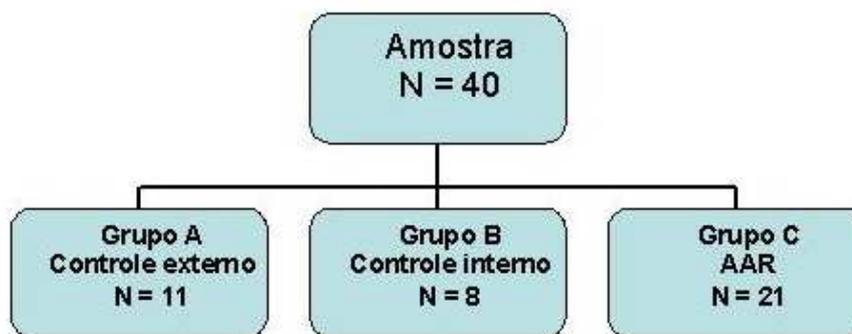
Foram utilizados 40 fetos, obtidos de seis ratas grávidas (peso variando de 241 a 260 gramas), da linhagem OUT-B EPM-1 *WISTAR* (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas de plástico, forradas com serragem, recebendo ração comercial e água *ad libitum*, sob condições ambientais, temperatura e umidade constantes, com ciclo dia e noite com luz artificial por 12 horas controlada automaticamente.

Esses fetos foram divididos em 3 grupos (Figura 1):

Grupo A - Controle externo (N=11) – Fetos normais, obtidos de ratas grávidas, às quais não foi administrada etilenotiouréia.

Grupo B - Controle interno (N=8) – Fetos não portadores de AAR, obtidos de ratas grávidas, às quais foi administrada etilenotiouréia no décimo primeiro dia de gestação.

Grupo C - AAR (N=21) – Fetos portadores de AAR, obtidos de ratas grávidas, às quais foi administrada etilenotiouréia no décimo primeiro dia de gestação.



Legenda:

N – Número

AAR – Anomalia anorretal

Figura 1: Esquema de distribuição dos animais nos grupos.

3.2 Critério de gravidez

Após acasalamento de uma noite, os animais que apresentaram, pela manhã, esfregaço vaginal com a presença de espermatozóides foram considerados potencialmente fertilizados. Esse foi considerado o dia zero (D0) de gestação. As ratas foram pesadas e, a partir desse momento, mantidas em gaiolas individuais até o vigésimo primeiro dia de gestação (D21).

3.3 Indução de AAR

A malformação foi induzida através da administração de ETU (2-Imidazolidinethiona C₃H₆N₂S 98%, lote nº 24251-089, Sigma-Aldrich, Brasil) em três ratas grávidas (E1, E2 e E3), no décimo primeiro dia de gestação (D11).

A ETU, um dos produtos de degradação do fungicida etileno-bis-tiocarbonato, foi diluída em água destilada na concentração de 1%. Foi administrada a dose de 125 mg/Kg (12,5 ml/Kg), por gavagem (Figura 2) à três ratas grávidas. Para o cálculo da dose foi considerado o peso da rata no D11.

Três ratas (C1, C2 e C3) receberam somente água destilada sem adição de etilenotiouréia, na dose de 12,5 ml/Kg, no D11.



Figura 2 – Administração da droga por gavagem

3.4 Eutanásia

As ratas foram submetidas à eutanásia, em câmara de gás para sacrifício de roedores, no D21, após aferição do peso.

3.5 Retirada dos fetos

Após a eutanásia as ratas foram submetidas à laparotomia para retirada dos fetos (Figura 3).



Figura 3 – Laparotomia e retirada dos fetos

3.6 Exame dos fetos

Os fetos foram, numa primeira fase, examinados externamente para determinação do sexo, presença de AAR e presença de malformações de coluna vertebral (Figura 4).



Figura 4 – Exame externo do feto

A seguir, com o auxílio de microscopia óptica, os fetos foram submetidos à laparotomia exploradora para determinação do tipo de AAR, da presença de malformações urinárias e para retirada do intestino terminal.

Nenhum dos fetos provenientes das ratas que não receberam ETU apresentou malformações.

O modelo utilizado provocou anomalia anorretal em 72% dos fetos das ratas que receberam ETU (Quadro 1). Os tipos de anomalia anorretal encontrados foram: 13 persistências de cloacas, 4 AAR com fístula perineal e 4 AAR com fístula uretral (Figuras 5 e 6).

Malformações de coluna vertebral foram encontradas em 82% dos fetos das ratas que receberam ETU (Quadro 1). As alterações encontradas foram agenesia de cauda ou cauda curta (Figura 7 e 8).

Dentre os fetos das ratas que receberam ETU, 34% apresentaram alterações urológicas estruturais (Quadro 1). Foram encontrados ureterohidronefrose em cinco fetos, agenesia renal unilateral em quatro fetos, e persistência do úraco em um feto (Figura 9).

Malformações anorretais, malformações de coluna e malformações urinárias ocorreram simultaneamente em 27% dos fetos (Quadro 1).

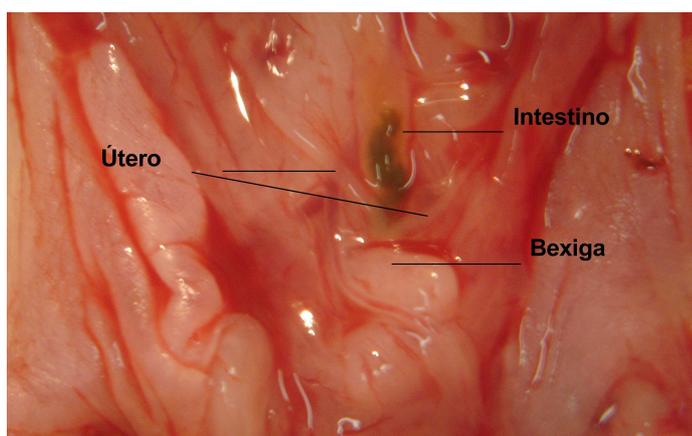


Figura 5 – Anatomia da AAR no sexo feminino – Persistência de cloaca

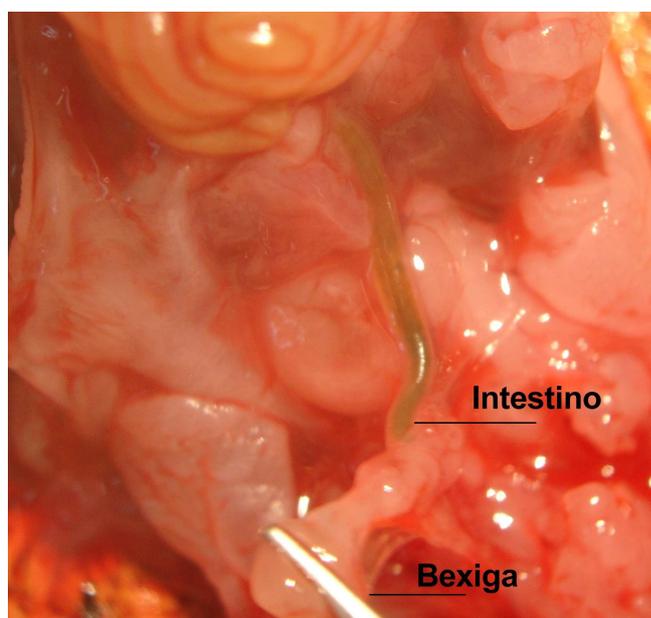


Figura 6 - Anatomia da AAR no sexo masculino – Fístula retouretral

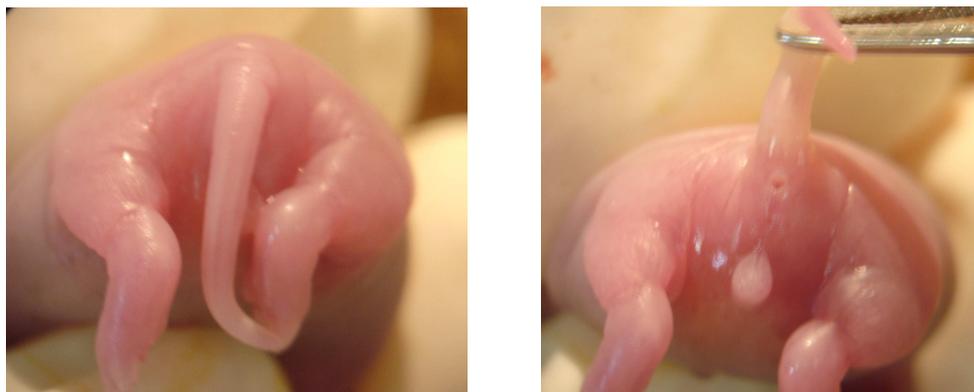


Figura 7 – Aspecto da cauda e ânus do feto normal



Figura 8 – Cauda curta, agenesia de cauda e anomalia anorretal

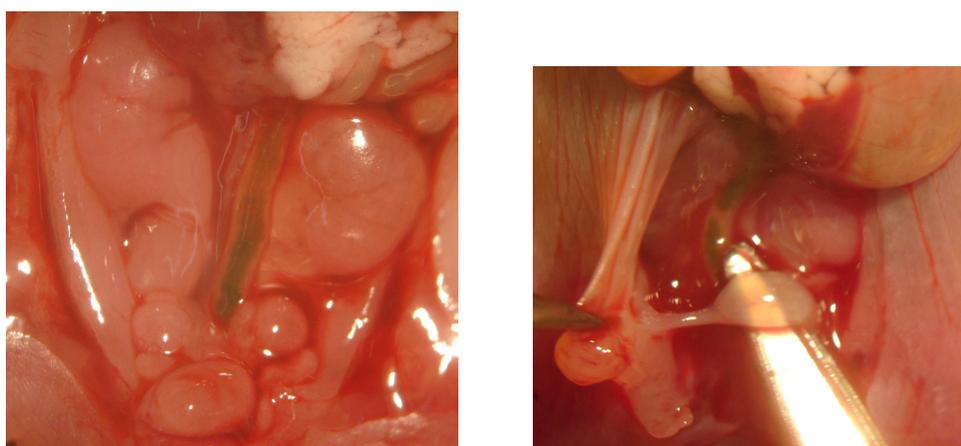


Figura 9 – Ureterohidronefrose e Persistência de úraco

Quadro 1 – Características dos fetos provenientes das ratas que receberam etilenotiouréia

		Sexo	Peso (g)	Anomalia anorretal	Malformação de coluna	Malformação urinária
Rata E1	Feto 1	F	6	Pers. cloaca	Cauda Curta	_____
	Feto 2	F	5	Pers. cloaca	Sem Cauda	_____
	Feto 3	M	4	_____	Cauda Curta	_____
	Feto 4	M	6	Físt. perineal	Sem Cauda	_____
	Feto 5	M	5	Físt. retouretral	Sem Cauda	Ureterohidronefrose
	Feto 6	F	5	Pers. cloaca	Sem Cauda	_____
	Feto 7	F	6	Físt. perineal	Cauda Curta	_____
	Feto 8	F	4	Pers. cloaca	Sem Cauda	_____
	Feto 9	F	4	Pers. cloaca	Sem Cauda	Ureterohidronefrose
	Feto 10	F	5	Pers. cloaca	Sem Cauda	Ureterohidronefrose
Rata E2	Feto 1	F	5	Físt. perineal	Sem Cauda	_____
	Feto 2	F	6	Pers. cloaca	Sem Cauda	_____
	Feto 3	F	6	Físt. perineal	Cauda Curta	Persistência de úraco
	Feto 4	F	5	Pers. cloaca	Sem Cauda	Agenesia renal
	Feto 5	F	4	Físt. retouretral	Sem Cauda	_____
	Feto 6	F	5	Pers. cloaca	Sem Cauda	_____
	Feto 7	M	7	_____	Cauda Curta	Agenesia renal
	Feto 8	M	4	Físt. retouretral	Cauda Curta	Agenesia renal
	Feto 9	M	5	Físt. retouretral	Sem Cauda	Ureterohidronefrose
	Feto 10	F	4	Pers. cloaca	Sem Cauda	Ureterohidronefrose
Rata E3	Feto 1	M	4	_____	_____	_____
	Feto 2	M	4	_____	_____	_____
	Feto 3	M	5	_____	Sem Cauda	_____
	Feto 4	F	5	Pers. cloaca	Sem Cauda	_____
	Feto 5	F	5	Pers. cloaca	Sem Cauda	_____
	Feto 6	M	5	_____	_____	Agenesia renal
	Feto 7	M	5	_____	_____	_____
	Feto 8	F	5	_____	_____	_____
	Feto 9	F	5	Pers. cloaca	Sem Cauda	_____

Legenda:

g - gramas

M - Masculino

F – Feminino

E1 – Rata grávida nº 1 que recebeu etilenotiouréia

E2 – Rata grávida nº 2 que recebeu etilenotiouréia

E3 – Rata grávida nº 3 que recebeu etilenotiouréia

Pers. Cloaca – Persistência de cloaca

Físt. Perineal – Fístula perineal

Físt. Retouretral – Fístula retouretral

Foram separados 11 fetos provenientes das ratas que não receberam ETU (três de C1, quatro de C2 e quatro de C3) para compor o grupo Controle externo (Anexo 2).

Os fetos provenientes das ratas que receberam ETU foram selecionados para compor o grupo Controle interno e o grupo Anomalia anorretal.

3.7 Retirada do intestino terminal para imunohistoquímica

Foi retirado um centímetro de intestino terminal para estudo imunohistoquímico.

No feto normal, a dissecação do intestino terminal se estendeu até o ânus, e nos portadores de AAR, até o local da fístula (Figura 10).

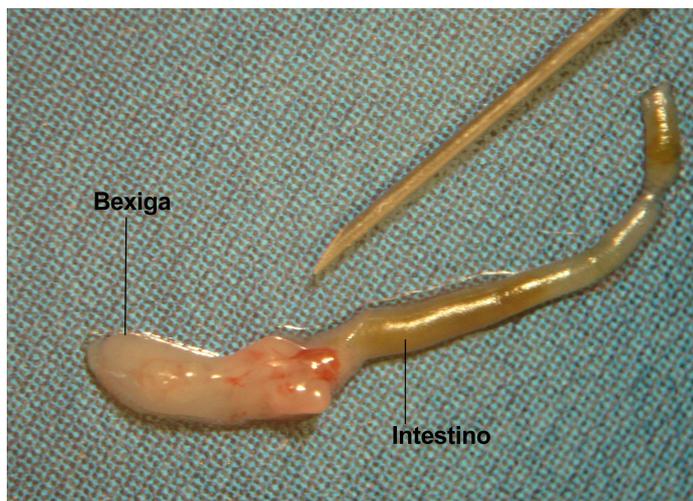


Figura 10 – Retirada do intestino terminal e da fístula retouretral

O fragmento de intestino terminal com um centímetro de extensão foi fixado em formol tamponado a 10%, desidratado e incluído em parafina.

3.8 Procedimento imunohistoquímico

Do material previamente parafinado, foram realizadas secções de três micrômetros no eixo longitudinal do intestino, e os cortes foram processados pela técnica da streptavidina-biotina-peroxidase para pesquisa de CIC e de células ganglionares.

Seqüência de procedimentos para obtenção das lâminas:

1. Desparafinização em estufa.
2. Desparafinização em xilol.
3. Reidratação em álcool absoluto, em álcool a 70%, lavagem em água corrente e em água destilada.
4. Recuperação antigênica com tampão citrato 0,01M, pH 6,0, em forno de microondas, potência máxima, por três ciclos de cinco minutos cada, mantida esta incubação por mais 20 minutos em temperatura ambiente, seguida por lavagem em água corrente e água destilada.
5. Bloqueio da peroxidase endógena com uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), 10 volumes, por dois ciclos de 10 minutos, seguida por lavagem em água corrente e água destilada.
6. Bloqueio de reação inespecífica através da incubação com tampão fosfato, pH 7,2, acrescido de soroalbumina bovina 1% por 15 minutos, desprezando o excesso após este tempo.
7. Incubação no anticorpo primário contra o receptor tirosina quinase (c-Kit), para pesquisa de CIC, na diluição de 1:200 (*Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117, c-kit-DakoCytomation*) e para a pesquisa de células ganglionares incubação no anticorpo primário contra a proteína S100, na diluição de 1:2000 (*Rabbit Polyclonal Antibody NCL-S100p-Novocastra*), durante a noite, em temperatura de cerca de 8°C.
8. Lavagem em tampão.
9. Incubação em anticorpo secundário biotilado, em temperatura ambiente, por 30 minutos.
10. Lavagem em tampão.

11. Incubação no complexo streptavidina-biotina-peroxidase, em temperatura ambiente, por 30 minutos.
12. Lavagem em tampão.
13. Incubação com o substrato enzimático diaminobenzidina.
14. Lavagem em água corrente e água destilada.
15. Contracoloração com hematoxilina de Harris.

3.9 Contagem das células intersticiais de Cajal e das células ganglionares

Cada feto esteve representado por duas lâminas do intestino terminal: uma para contagem de CIC e outra para contagem de células ganglionares.

Cada lâmina foi examinada com um aumento de 400 vezes, ocasião em que 10 imagens foram capturadas ao longo do intestino.

As imagens foram capturadas por meio de um vídeo-câmera *Sony® CCD-IRIS*, acoplada a um microscópio óptico *Olympus (BX 50)*, com objetivas pancromáticas, que transmitiram as imagens a um microcomputador Pentium 4, com 512 megabytes de memória RAM, trabalhando em ambiente Windows 98® e equipado com placa digitalizadora e o software "*Image-Pro-Plus*"®, versão 4.1.

As imagens obtidas foram estudadas com o programa de análise de imagem "*Image Tool*" ® - versão 3.0.

Inicialmente, para cada imagem capturada, calculava-se a área correspondente à musculatura circular e longitudinal (figura 11).

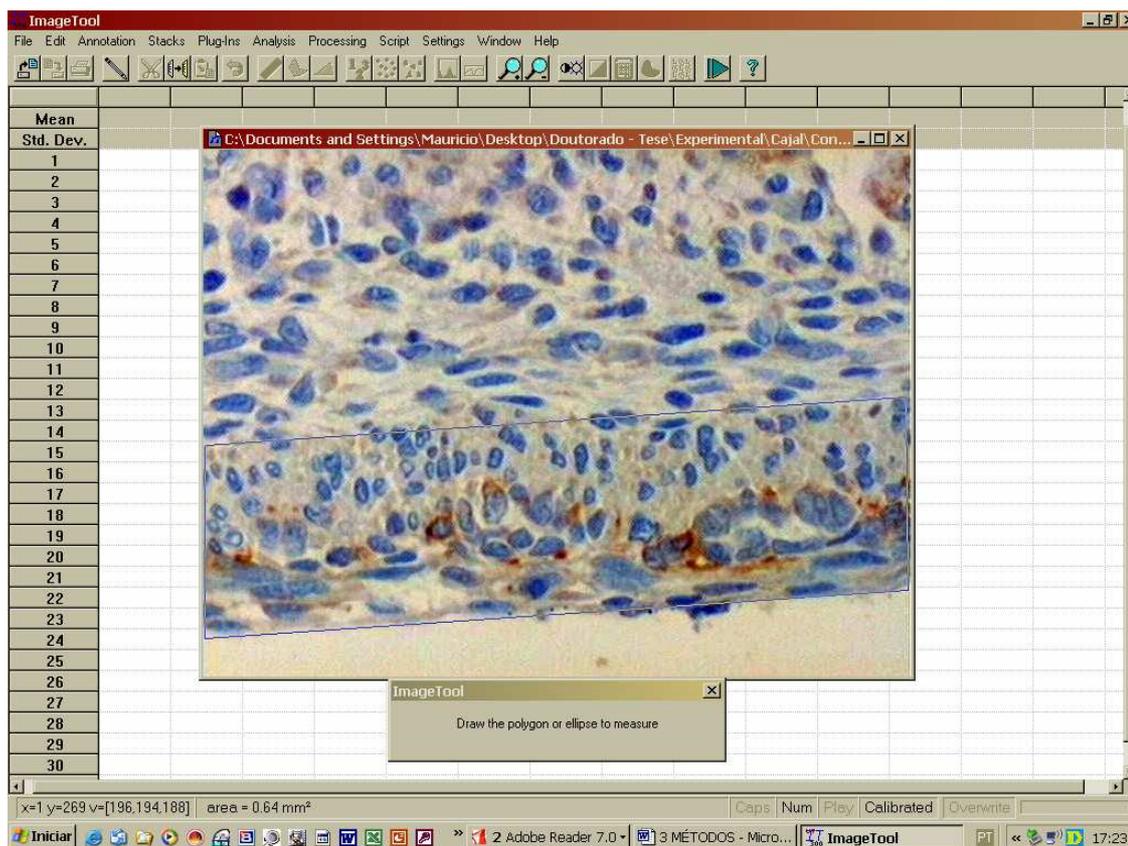


Figura 11 – Cálculo da área de musculatura longitudinal e circular da parede total do intestino

A seguir, as CIC e as células ganglionares, dentro da área demarcada, foram contadas pelo patologista, sem o prévio conhecimento do grupo a que cada animal pertencia.

3.10 Cálculo da densidade celular

Com as medidas de área e com a contagem das CIC e das células ganglionares presentes nesta área, foi feito o cálculo de densidade celular do intestino terminal de cada animal (anexos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10).

Para tanto, foram feitas as somas das áreas e das células dos 10 campos fotografados na lâmina de intestino terminal de cada animal.

A densidade celular de cada feto foi obtida através da divisão da soma total do número de células pela soma total das áreas, obtendo o número de células por mm^2 (Figura 12).

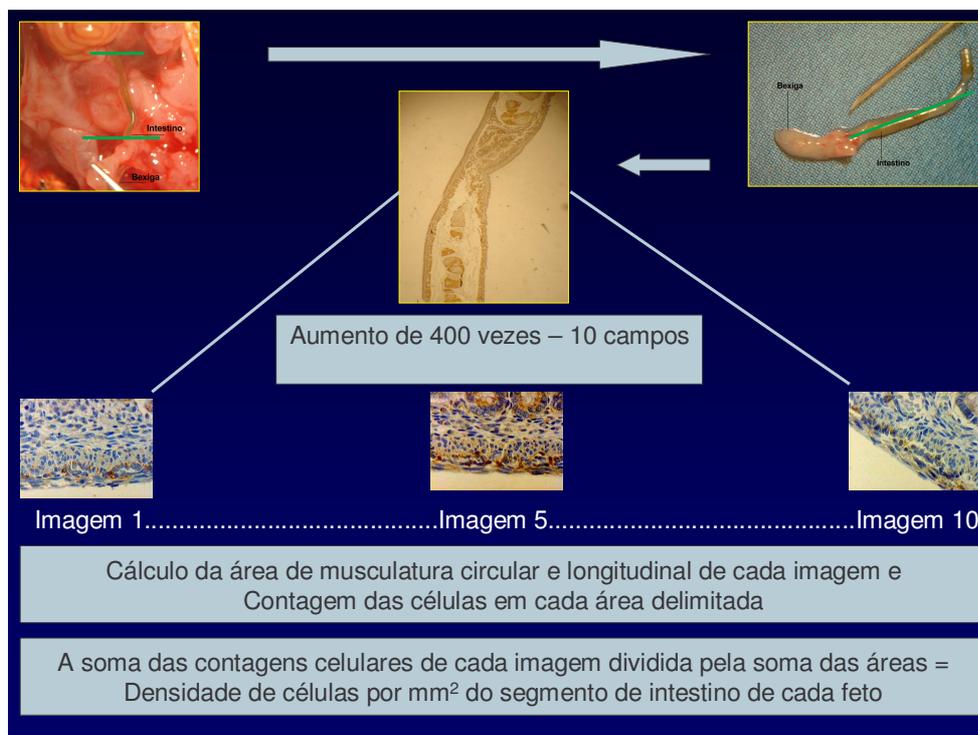


Figura 12 – Esquema demonstrativo do método de contagem celular e cálculo da densidade celular por mm^2

3.11 Análises realizadas

Foram comparadas as densidades de CIC e de células ganglionares do intestino terminal entre os fetos dos três grupos.

Adicionalmente foram comparadas as densidades de CIC e de células ganglionares do intestino terminal entre os três tipos de anomalia anorretal.

3.12 Estudo estatístico

A variável Densidade foi representada pelos valores: média, desvio padrão (d.p.), mediana e valores mínimo e máximo.

A descrição da variável foi feita também através de gráficos (*box-plots*).

Os Grupos foram comparados quanto à variável Densidade através de análise de variância (ANOVA).

No caso em que a hipótese de igualdade das médias em todos os Grupos foi rejeitada, foram feitas comparações múltiplas dos Grupos dois a dois, pelo método de Bonferroni, que ajusta o nível de significância como um nível global para todas as comparações.

O nível de significância adotado foi de 0,05 ($\alpha = 5\%$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Densidade de células intersticiais de Cajal nos grupos A, B e C

A densidade de CIC, no intestino terminal dos fetos do grupo Controle externo, está representada no Quadro 2.

Quadro 2 – Densidade de células intersticiais de Cajal por mm² no grupo A – Controle externo

Animal	Densidade de CIC/mm ²
C1 Feto 1	21,91
C1 Feto 2	18,00
C1 Feto 3	21,65
C2 Feto 1	22,00
C2 Feto 2	20,76
C2 Feto 3	17,57
C2 Feto 4	14,76
C3 Feto 1	16,22
C3 Feto 2	19,08
C3 Feto 3	18,86
C3 Feto 4	17,91

Legenda:

C1 – Rata grávida 1 que não recebeu etilenotiouréia

C2 – Rata grávida 2 que não recebeu etilenotiouréia

C3 – Rata grávida 3 que não recebeu etilenotiouréia

CIC/mm² – Células intersticiais de Cajal por milímetros quadrados

A densidade de CIC, no intestino terminal dos fetos do grupo Controle interno, está representada no Quadro 3.

Quadro 3 – Densidade de células intersticiais de Cajal por mm² no grupo B - Controle interno

Animal	Densidade de CIC/mm²
E1 Feto 3	15,66
E2 Feto 7	10,92
E3 Feto 1	11,50
E3 Feto 2	8,69
E3 Feto 3	7,68
E3 Feto 6	10,98
E3 Feto 7	10,17
E3 Feto 8	8,52

Legenda:

E1 – Rata grávida nº 1 que recebeu etilenotiouréia

E2 – Rata grávida nº 2 que recebeu etilenotiouréia

E3 – Rata grávida nº 3 que recebeu etilenotiouréia

CIC/mm² – Células intersticiais de Cajal por milímetros quadrados

A densidade de CIC, no intestino terminal dos fetos do grupo Anomalia anorretal, está representada no Quadro 4.

Quadro 4 – Densidade de células intersticiais de Cajal por mm² e tipo de anomalia anorretal no grupo C - Anomalia anorretal

Animal	Densidade de CIC/mm²	Tipo de anomalia anorretal
E1 Feto 1	13,35	Persistência de cloaca
E1 Feto 2	6,24	Persistência de cloaca
E1 Feto 4	6,58	Fístula perineal
E1 Feto 5	4,35	Fístula retouretral
E1 Feto 6	9,00	Persistência de cloaca
E1 Feto 7	8,11	Fístula perineal
E1 Feto 8	9,12	Persistência de cloaca
E1 Feto 9	5,13	Persistência de cloaca
E1 Feto 10	6,33	Persistência de cloaca
E2 Feto 1	6,54	Fístula perineal
E2 Feto 2	8,45	Persistência de cloaca
E2 Feto 3	1,90	Fístula perineal
E2 Feto 4	5,70	Persistência de cloaca
E2 Feto 5	9,94	Fístula retouretral
E2 Feto 6	4,90	Persistência de cloaca
E2 Feto 8	9,69	Fístula retouretral
E2 Feto 9	8,77	Fístula retouretral
E2 Feto 10	5,77	Persistência de cloaca
E3 Feto 4	5,41	Persistência de cloaca
E3 Feto 5	6,43	Persistência de cloaca
E3 Feto 9	6,84	Persistência de cloaca

Legenda:

E1 – Rata grávida nº 1 que recebeu etilenotiouréia

E2 – Rata grávida nº 2 que recebeu etilenotiouréia

E3 – Rata grávida nº 3 que recebeu etilenotiouréia

CIC/mm² – Células intersticiais de Cajal por milímetros quadrados

Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos, quanto à densidade de CIC no intestino terminal (Tabela 1 e Figura 13).

Tabela 1 - Descrição da variável “Densidade de células intersticiais de Cajal” nos grupos A, B e C

Grupo	Densidade de CIC/mm ²			
	N	Média ± D.P.	Mediana	Mínimo-Máximo
Grupo A	11	18,97 ± 2,40	18,86	14,76 – 22,00
Grupo B	8	10,51 ± 2,49	10,55	7,68 – 15,66
Grupo C	21	7,07 ± 2,44	6,54	1,90 – 13,35

$p < 0,001$

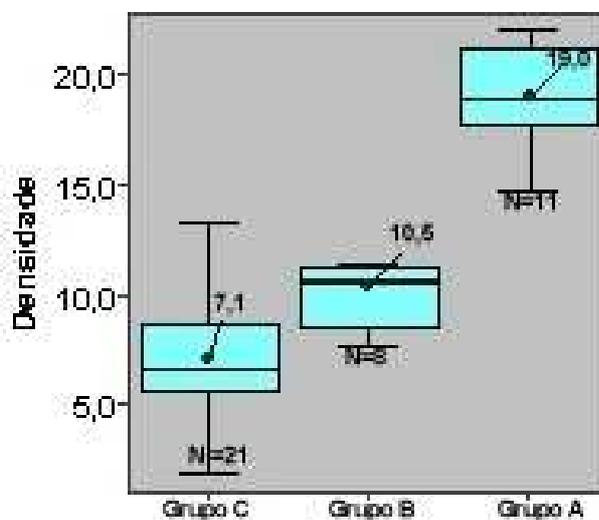
Teste F (ANOVA)

Legenda:

CIC/mm² – Células intersticiais de Cajal por milímetros quadrados

N – Número

D.P. – Desvio padrão



Legenda:

N – Número

Figura 13 – Box-plots da variável “Densidade de células intersticiais de Cajal” por Grupos.

Os resultados encontrados, quando comparados os grupos dois a dois pelo método de Bonferroni, mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparações múltiplas entre os grupos A, B e C, para a variável “Densidade de células intersticiais de Cajal”

Variável	Diferença Média	p	Conclusão
Grupo A – Grupo C	11,9	<0,001	Grupo A > Grupo C
Grupo A – Grupo B	8,4	<0,001	Grupo A > Grupo B
Grupo B – Grupo C	3,4	0,005	Grupo B > Grupo C

Método de Bonferroni

$p < 0,05$

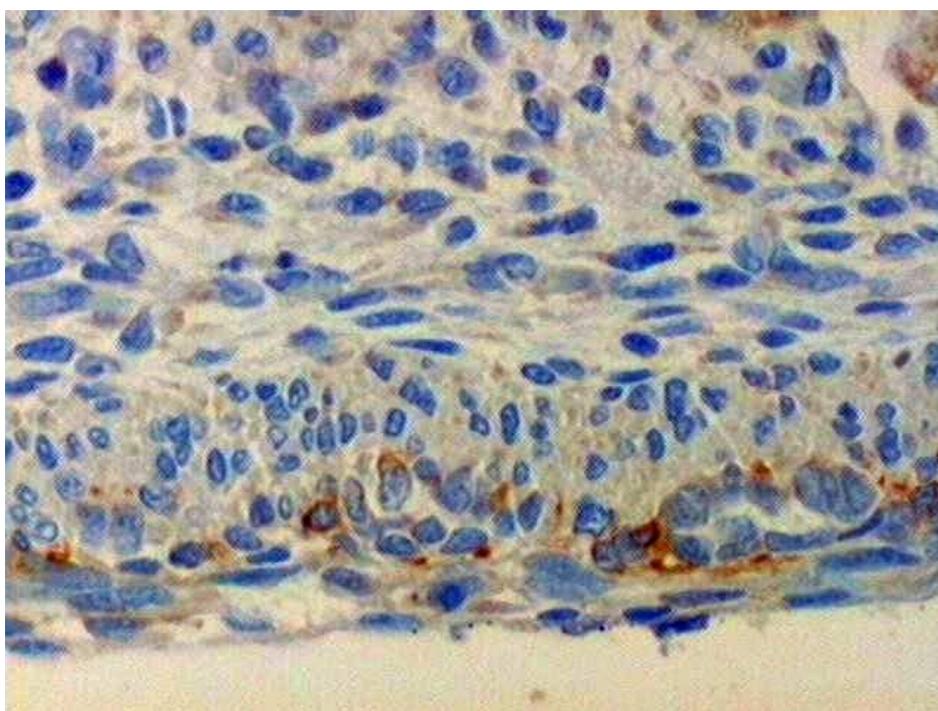


Figura 14 – Fotomicrografia de intestino terminal do grupo Controle externo com coloração para células intersticiais de Cajal

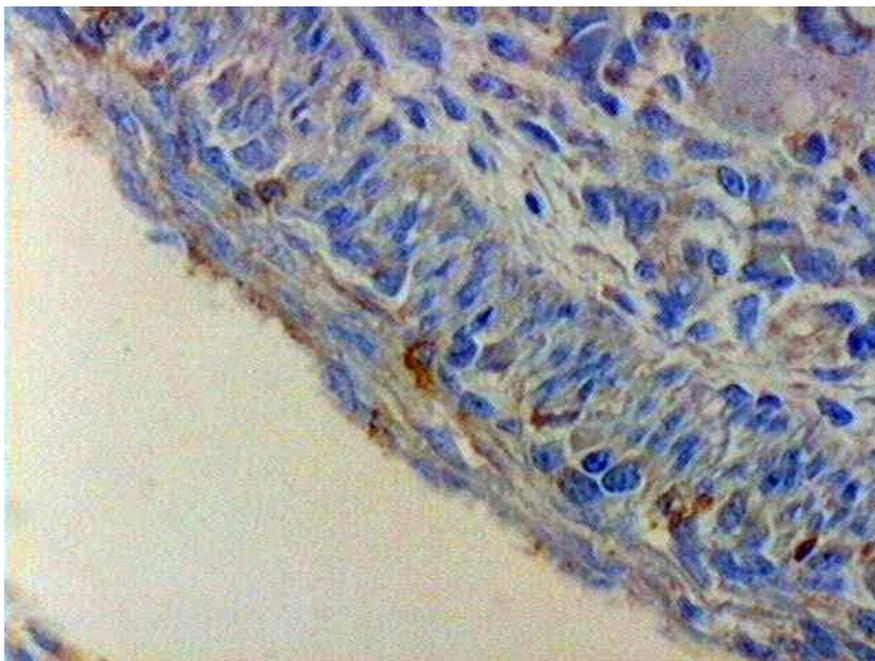


Figura 15 – Fotomicrografia de intestino terminal do grupo Controle interno com coloração para células intersticiais de Cajal

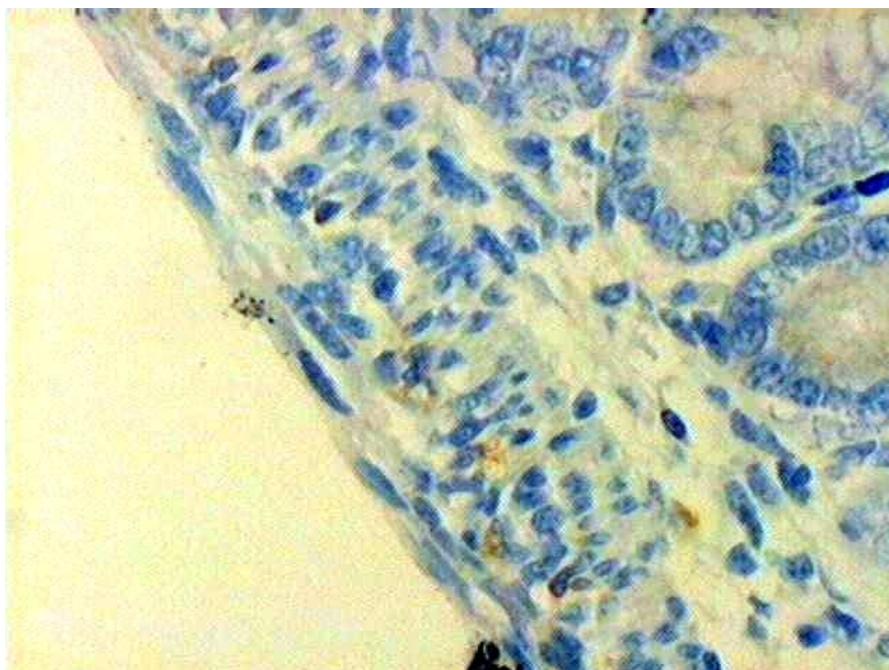


Figura 16 – Fotomicrografia de intestino terminal do Grupo Anomalia anorretal com coloração para células intersticiais de Cajal

4.2 Densidade de células intersticiais de Cajal nos diferentes tipos de anomalia anorretal.

A densidade de CIC no intestino terminal dos fetos portadores de anomalia anorretal está representada no Quadro 4.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os três tipos de anomalias anorretais, quanto à densidade de CIC no intestino terminal (Tabela 3 e Figura 17).

Tabela 3 - Descrição da variável “Densidade de células intersticiais de Cajal” nos tipos de anomalia anorretal

Grupo	Densidade CIC/mm ²			
	N	Média ± D.P.	Mediana	Mínimo-Máximo
Retouretal	4	8,19 ± 2,61	9,23	4,35 – 9,94
Persistência de Cloaca	13	7,40 ± 2,61	6,29	4,90 – 13,35
Perineal	4	5,78 ± 2,69	6,56	1,90 – 8,11

p = 0,430

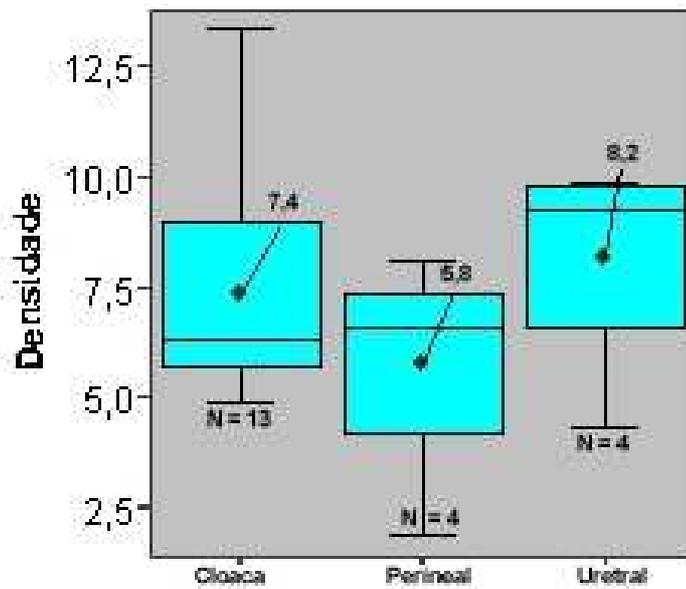
Teste F (ANOVA)

Legenda:

N – Número

D.P. – Desvio Padrão

CIC/mm² – Células intersticiais de Cajal por milímetros quadrados mm²



Legenda:
N-Número

Figura 17 – Box-plots da variável “Densidade de células intersticiais de Cajal” nos tipos de anomalia anorretal

4.3 Densidade de células ganglionares nos Grupos A, B e C.

A densidade de células ganglionares, no intestino terminal dos fetos, do grupo Controle externo está representada no Quadro 5.

Quadro 5 – Densidade de células ganglionares por mm² no Grupo A - Controle externo

Animal	Densidade de células ganglionares por mm²
C1 Feto 1	28,71
C1 Feto 2	27,10
C1 Feto 3	26,84
C2 Feto 1	23,17
C2 Feto 2	26,08
C2 Feto 3	24,63
C2 Feto 4	24,07
C3 Feto 1	21,83
C3 Feto 2	33,70
C3 Feto 3	29,00
C3 Feto 4	26,47

Legenda:

C1 – Rata grávida 1 que não recebeu etilenotiouréia

C2 – Rata grávida 2 que não recebeu etilenotiouréia

C3 – Rata grávida 3 que não recebeu etilenotiouréia

mm² – Milímetros quadrados

A densidade de células ganglionares, no intestino terminal dos fetos, do grupo Controle interno está representada no Quadro 6.

Quadro 6 – Densidade de células ganglionares por mm² no Grupo B - Controle interno

Animal	Densidade de células ganglionares por mm²
E1 Feto 3	21,64
E2 Feto 7	23,02
E3 Feto 1	17,49
E3 Feto 2	18,93
E3 Feto 3	18,43
E3 Feto 6	17,69
E3 Feto 7	17,16
E3 Feto 8	20,56

Legenda:

E1 – Rata grávida nº 1 que recebeu etilenotiouréia

E2 – Rata grávida nº 2 que recebeu etilenotiouréia

E3 – Rata grávida nº 3 que recebeu etilenotiouréia

mm² – milímetros quadrados

A densidade de células ganglionares, no intestino terminal dos fetos, do grupo Anomalia anorretal está representada no Quadro 7.

Quadro 7 – Densidade de células ganglionares por mm² e tipo de anomalia anorretal no Grupo C – Anomalia anorretal

Animal	Densidade de células ganglionares/mm²	Tipo de anomalia anorretal
E1 Feto 1	18,12	Persistência de cloaca
E1 Feto 2	9,95	Persistência de cloaca
E1 Feto 4	17,05	Fístula perineal
E1 Feto 5	17,16	Fístula retouretral
E1 Feto 6	13,34	Persistência de cloaca
E1 Feto 7	14,24	Fístula perineal
E1 Feto 8	11,34	Persistência de cloaca
E1 Feto 9	12,29	Persistência de cloaca
E1 Feto 10	10,10	Persistência de cloaca
E2 Feto 1	8,77	Fístula perineal
E2 Feto 2	9,78	Persistência de cloaca
E2 Feto 3	11,67	Fístula perineal
E2 Feto 4	6,55	Persistência de cloaca
E2 Feto 5	10,53	Fístula retouretral
E2 Feto 6	8,70	Persistência de cloaca
E2 Feto 8	11,75	Fístula retouretral
E2 Feto 9	19,66	Fístula retouretral
E2 Feto 10	15,42	Persistência de cloaca
E3 Feto 4	11,82	Persistência de cloaca
E3 Feto 5	13,37	Persistência de cloaca
E3 Feto 9	11,27	Persistência de cloaca

Legenda:

E1 – Rata grávida nº 1 que recebeu etilenotiouréia

E2 – Rata grávida nº 2 que recebeu etilenotiouréia

E3 – Rata grávida nº 3 que recebeu etilenotiouréia

mm² – milímetros quadrados

Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos, quanto à densidade de células ganglionares no intestino terminal (Tabela 4, Figura 18).

Tabela 4 - Descrição da variável “Densidade de células ganglionares” nos grupos A, B e C

Grupo	Densidade de células ganglionares por mm ²			
	N	Média ± D.P.	Mediana	Mínimo-Máximo
Grupo A	11	26,51 ± 3,25	26,47	21,83 – 33,70
Grupo B	8	19,36 ± 2,15	18,68	17,16 – 23,02
Grupo C	21	12,52 ± 3,39	11,75	6,55 – 19,66

$p < 0,001$

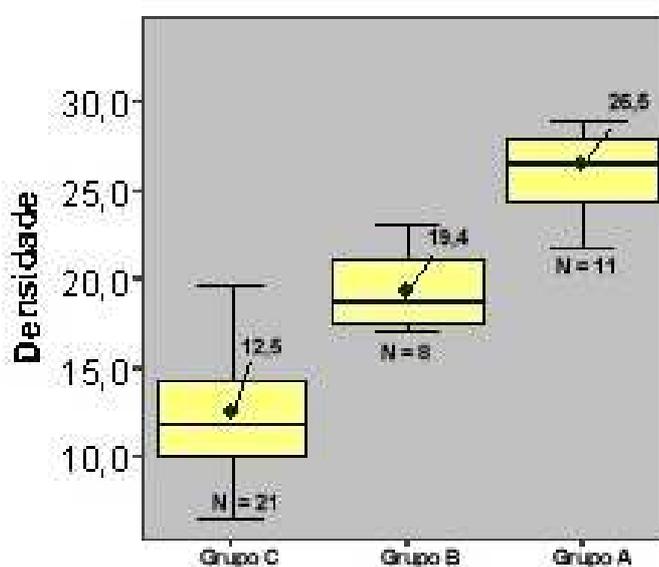
Teste F (ANOVA)

Legenda:

N – Número

D.P. – Desvio padrão

mm² – Milímetros quadrados



Legenda:

N – Número

Figura 18 – Box-plots da variável “Densidade de células ganglionares” nos Grupos A, B e C

Os resultados encontrados, ao comparar os grupos dois a dois pelo método de Bonferroni, mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os 3 grupos (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparações múltiplas entre os grupos A, B e C, para a variável “Densidade de células ganglionares”

Variável	Diferença Média	p	Conclusão
Grupo A – Grupo C	13,9	<0,001	Grupo A > Grupo C
Grupo A – Grupo B	7,1	<0,001	Grupo A > Grupo B
Grupo B – Grupo C	6,8	<0,001	Grupo B > Grupo C

Método de Bonferroni

$p < 0,05$

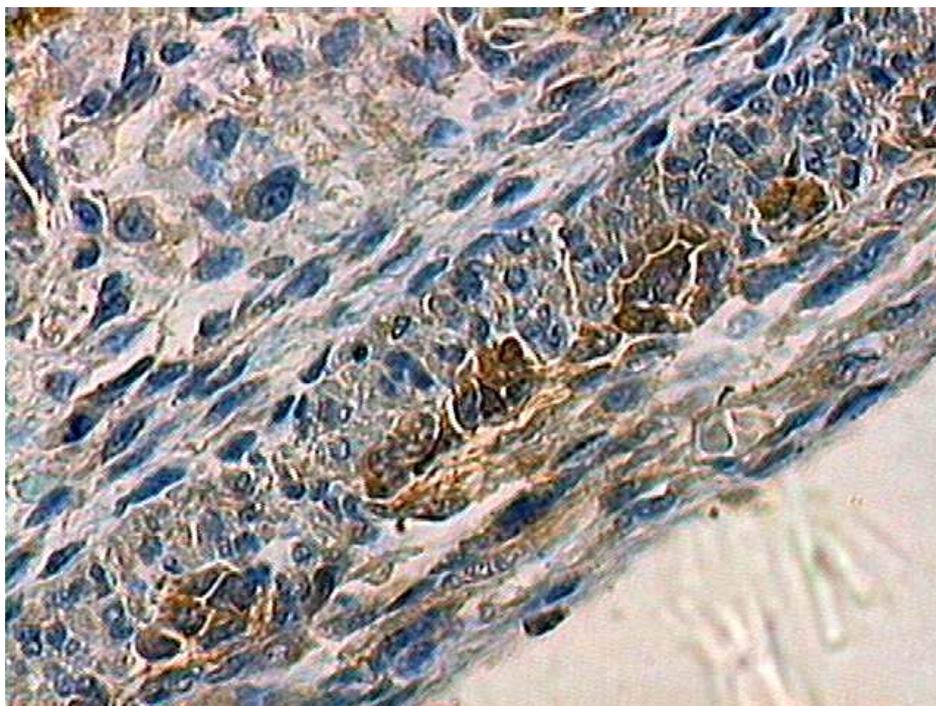


Figura 19 – Fotomicrografia de intestino terminal do grupo Controle externo com coloração para proteína S100

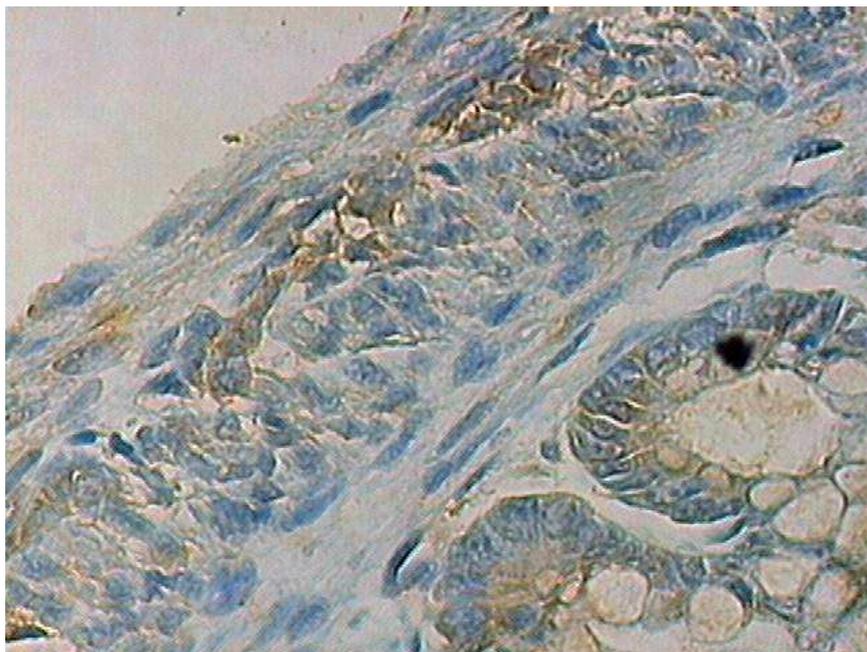


Figura 20 – Fotomicrografia de intestino terminal do grupo Controle interno com coloração para proteína S100



Figura 21 – Fotomicrografia de intestino terminal do grupo controle Anomalia anorretal com coloração para proteína S100

4.4 Densidade de células ganglionares nos diferentes tipos de anomalia anorretal.

A densidade de células ganglionares no intestino terminal dos fetos portadores de anomalia anorretal está representada no Quadro 7.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, entre os três tipos de anomalia anorretal, quanto à densidade de células ganglionares (Tabela 6, Figura 15).

Tabela 6 - Descrição da variável “Densidade células ganglionares” nos tipos de anomalia anorretal.

Grupo	Densidade células ganglionares por mm ²			
	N	Média ± D.P.	Mediana	Mínimo-Máximo
Uretral	4	14,77 ± 4,35	14,46	10,53–19,66
Cloaca	13	11,28 ± 3,72	11,34	3,28–18,12
Perineal	4	12,93 ± 3,54	12,96	8,77–17,05

p = 0,279

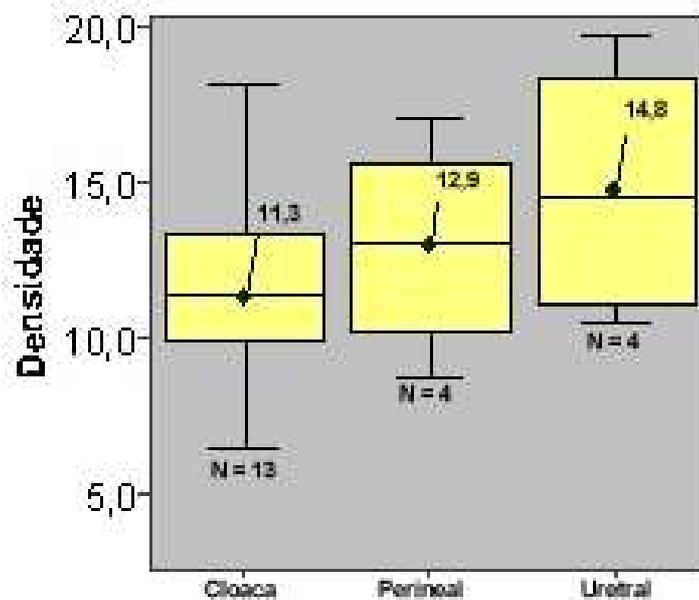
Teste F (ANOVA)

Legenda:

N – Número

D.P. – Desvio Padrão

mm² – Milímetros quadrados



Legenda:

n – Número

Figura 22- *Box-plots* da variável “Densidade de células ganglionares” nos tipos de anomalia anorretal

5. DISCUSSÃO

O objetivo final no tratamento da AAR é alcançar o melhor resultado possível, em termos de continência fecal. Para tanto, o tratamento cirúrgico visa à criação de um orifício anal adequado para a passagem regular de fezes, anatomicamente bem posicionado em relação ao complexo esfíncteriano ⁽¹⁵⁾ e com preservação do esfíncter interno ⁽²²⁾. No entanto, essa reconstrução anatômica das estruturas esfíncterianas voluntárias e involuntárias não significa que a função intestinal será normal ⁽¹⁵⁾. Sabe-se hoje que o resultado final do tratamento depende, entre outras coisas, do tipo de anomalia, do grau de desenvolvimento da musculatura perineal e da presença ou não de malformações associadas ⁽⁴⁾. Além disso, não existe um critério universal de avaliação da função intestinal, inviabilizando a comparação dos resultados de diferentes séries ⁽⁶⁾. Peña em 1995 ⁽⁴⁾, analisando pacientes portadores de AAR alta submetidos à anorretoplastia sagital posterior, relata 36% de continência. Rintala em 2002 ⁽⁶⁾, analisando um grupo de pacientes adultos portadores de AAR baixa, encontrou hábito intestinal normal em somente 15%.

Independente do critério de avaliação utilizado, uma queixa freqüente no pós-operatório é a constipação intestinal, acometendo de 30 a 60% dos pacientes ⁽⁶⁾. A constipação deve ser tratada de forma agressiva, pois pode desencadear um quadro de pseudo-incontinência ^(1,6,7,9-11). O acúmulo de fezes forma um fecaloma que impede o paciente de sentir e controlar suas evacuações, ocorrendo, então, escapes fecais ^(10,11).

Na grande maioria dos casos, o tratamento da constipação apresenta bons resultados com o emprego de dieta, laxativos orais e clister. Entretanto, alguns pacientes exibem quadros graves de constipação que não respondem às medidas terapêuticas habituais, além de apresentar o reto e o sigmóide extremamente dilatados, atônicos, ectásicos e com deficiente função propulsiva ^(1,6,9-13). Stephens et al ⁽¹⁾ rotularam essa condição de “rectal inertia” e preconizavam a retossigmoidectomia. Nixon et al ⁽⁹⁾ em uma análise de 78 pacientes portadores de AAR encontraram inércia retal em 11 de 31 portadores de anomalias baixas e em quatro de 47 portadores de anomalias altas. Brent et

al ⁽¹²⁾ se referiam a essa situação como “primary rectal ectasia”. Powell ⁽¹⁰⁾ descreveu nove pacientes com essa característica rotulando-os de “megarectum” e tratando-os com retossigmoidectomia e abaixamento endoanal. Cheu ⁽¹³⁾ descreveu três pacientes com reto extremamente dilatado, com mobilidade ineficaz e propulsão mínima, rotulando-o de “atonic baggy rectum” e nos quais realizou a retossigmoidectomia com preservação de coto retal de quatro centímetros. Peña et al ⁽¹¹⁾ relataram três pacientes com constipação intratável associada com megarreto e megassigmóide nos quais realizaram somente a sigmoidectomia com bons resultados de continência fecal. Segundo Peña et al ⁽¹¹⁾, o reto deve ser preservado, pois possui função de reservatório fecal e a sua ressecção implicaria em incontinência fecal.

A constipação intestinal nos pacientes portadores de AAR pode resultar de estenose do orifício anal ^(1,9), anormalidades da inervação entérica extrínseca ^(1,14,15), denervação do reto por ocasião do procedimento cirúrgico ^(6,11,14,16,17), alterações regionais da inervação entérica intrínseca ⁽¹⁸⁻²⁶⁾ e alterações das células intersticiais de Cajal ⁽³⁰⁾.

A estenose do orifício anal deve ser pesquisada sempre e, quando da sua ocorrência, tratada de forma adequada ^(1,9).

A constipação pode ser decorrente de anormalidades da IEE, cujo componente parassimpático na região do cólon distal e reto é composto basicamente por fibras sacrais pré-ganglionares ⁽⁴¹⁾. Malformações do sacro, freqüentes em portadores de AAR (13 % a 50%), podem afetar tais fibras ^(1,15).

A denervação do reto, por causa da sua mobilização durante a cirurgia, poderia desencadear um quadro de hipomotilidade retal ^(6,11,16,17). No entanto, a constipação é mais freqüente no pós-operatório de AAR consideradas baixas, quando o esperado seria uma maior freqüência nas AAR altas onde se realiza uma maior mobilização. Segundo Rintala ⁽⁶⁾, a extensa mobilização do reto poderia, também, causar uma denervação sensorial que prejudicaria a sensação de fezes no reto ⁽⁶⁾. Holschneider et al ⁽¹⁴⁾ consideram que a mobilização do reto poderia ser a causa de lesões iatrogênicas da inervação extramural que se localiza anteriormente à fáscia de Denonvilliers, de difícil identificação em recém-nascidos.

A presença de alterações da IEI é assunto controverso entre os autores, que sempre exibiram a preocupação de investigar a presença ou não de células ganglionares em biópsias ou em ressecções cirúrgicas. Em relatos anteriormente mencionados ^(1,10-13), não foram encontradas anormalidades. Outros autores, porém, exibem resultados diferentes. Parkkulainen et al ⁽²⁰⁾ avaliaram a presença de gânglios em 25 portadores de AAR, encontrando aganglionose em 15 deles (60%). Kiesewetter et al ⁽²¹⁾ realizaram um estudo abrangendo 32 centros de cirurgia pediátrica nos Estados Unidos e Canadá em que avaliaram 296 pacientes, encontrando uma associação com aganglionose em 10 deles (3,4%). Holschneider et al ⁽²³⁾ estudando 52 pacientes encontraram padrão de inervação anormal em 49 deles (94%). Méier-Ruge et al ^(25,42) estudaram 41 pacientes portadores de AAR observando 60% de anomalias do sistema nervoso entérico. De qualquer forma, considerando que a incidência de AAR, assim como a de aganglionose, é de um em cada 5.000 recém-nascidos, seria de esperar que uma combinação dessas duas lesões ocorresse com uma frequência ainda menor do que as mesmas em suas formas isoladas.

As alterações das CIC, em pacientes portadores de AAR, foram descritas por Kenny et al em 1998 ⁽²⁷⁾. Analisando 12 pacientes portadores de AAR, encontraram ausência de CIC em dois e diminuição acentuada em cinco. É o único artigo que estuda as CIC em pacientes portadores de AAR. No entanto, anormalidades na densidade e distribuição dessas células já foram descritas na Doença de Hirschsprung e em portadores de constipação crônica do tipo slow transit constipation ⁽³²⁻³⁴⁾.

Baseado nesses dados, o presente trabalho estudou a IEI, através do estudo da população de células ganglionares, e as células intersticiais de Cajal em um modelo experimental de AAR, induzida pela ETU.

Existem três modelos animais de AAR: o proveniente de mutações, o de ocorrência espontânea e o induzido por drogas.

O modelo clássico, e mais antigo, é proveniente de uma mutação: é o camundongo de cauda curta de Danforth ⁽⁴³⁾. Trata-se de uma mutação natural, que apresenta uma série de malformações, entre elas a imperfuração anal.

Mais recentemente, foi descoberto um camundongo com uma mutação envolvendo o gene sonic hedgehog (SHH), que também exhibe imperfuração anal em seu fenótipo. O gene sonic hedgehog codifica uma molécula sinalizadora que exerce diversos papéis no desenvolvimento dos vertebrados⁽⁴⁴⁾. São animais de difícil obtenção e extremamente caros.

A ocorrência espontânea de malformações anorretais não é incomum em animais domésticos, especialmente em porcos, com uma incidência ao redor de 0,2%. Apresentam similaridades com as malformações humanas, porém com um baixo índice de malformações associadas⁽⁴⁵⁾. Hori e colaboradores⁽⁴⁶⁾, em estudo de mapeamento genético, utilizaram porcos com AAR, obtidos através do cruzamento de animais afetados ao longo de 15 anos. Com esse modelo alcançaram uma incidência de 62% de portadores de AAR. A vantagem desse modelo está no tamanho do animal, que permite um estudo anatômico e histológico mais aprofundado. O inconveniente do modelo é o tempo de gestação e a sua manutenção em biotério.

O emprego de drogas indutoras de AAR em pequenos roedores, como o camundongo e o rato, é o modelo experimental mais utilizado. O período de gestação é curto (21 dias) e são de fácil manutenção em biotério. As drogas mais empregadas são: a adriamicina⁽⁴⁷⁾; os derivados da vitamina A^(48,49) e a ETU⁽³⁵⁻⁴⁰⁾. A adriamicina é mais utilizada na indução de atresia de esôfago e provoca uma baixa incidência de AAR⁽⁴⁷⁾. Os derivados da vitamina A só apresentam efeito em camundongos, ao contrário da ETU que só apresenta efeito em ratos. O emprego de ratos proporciona o estudo em fetos maiores, constituindo-se em uma vantagem.

O modelo escolhido foi o da indução de AAR em ratos utilizando a ETU. A ETU é um produto de degradação do etileno-bis-tiocarbonato, formalmente empregada como fungicida agrícola, sabidamente teratogênica e carcinogênica em animais de laboratório. Khera, em 1973⁽³⁵⁾, e Ruddick e Khera, em 1975⁽³⁶⁾, através da administração de ETU a ratas e coelhas grávidas induziram anomalias em vários órgãos dos fetos gerados. O potencial de gerar AAR foi estudado por Hirai e Kuwabara, em 1990⁽³⁷⁾. Os dados obtidos indicaram como dose ideal para indução de AAR 125 mg/kg. As anomalias mais encontradas

foram a fístula reto-uretral no macho e a reto-cloacal na fêmea. Outros trabalhos, como os conduzidos por Qi et al^s ⁽³⁸⁾, Qi et al^s ⁽³⁹⁾, Yuan et al^s ⁽⁴⁰⁾, empregando a droga na mesma dosagem alcançaram o mesmo resultado.

O método utilizado se mostrou de fácil reprodutibilidade, sendo que 71% dos fetos apresentaram anomalia anorretal, 80% alterações de coluna vertebral e 35% alterações urológicas.

A incidência de AAR foi comparável a de outros trabalhos, que variam de 55 a 85% ⁽³⁷⁻⁴⁰⁾. Essa incidência é menor do que a obtida com o emprego de derivados da Vitamina A, em que cerca de 95% da prole apresenta a malformação ⁽⁴⁸⁾. Os tipos de anomalias encontradas foram similares aos encontradas na espécie humana, porém com incidência diferente: a cloaca foi a alteração mais freqüente ^(62%), sendo que na espécie humana é um dos tipos mais raros ^(1,2).

A incidência de 80% de alterações de coluna vertebral foi um pouco mais baixa que a de outros autores que relatam agenesia de cauda ou cauda rudimentar em 100% dos fetos, sendo que 48 a 70% deles, adicionalmente, exibem mielosquise, situação não encontrada nesse estudo ⁽³⁷⁻⁴⁰⁾.

Alterações urológicas, que na espécie humana ocorrem entre 13 e 50% dos pacientes, ocorreram em 35% dos fetos, sendo que as principais alterações encontradas foram a agenesia renal (40%) e a ureterohidronefrose (50%), similares à espécie humana.

O estudo das células ganglionares e das CIC foi realizado através do cálculo da densidade celular por milímetros quadrados. Esse método foi utilizado por Wedel em 2002 ⁽³⁴⁾, analisando CIC em pacientes portadores de megacolo congênito e de constipação crônica. A contagem celular se restringiu à área representada pela camada muscular circular e longitudinal, onde se localiza o plexo mioentérico, já presente no rato recém-nascido ⁽⁵²⁾. As CIC também já podem ser identificadas no rato recém-nascido, e a região em que exibem maior incidência é justamente a parte externa da camada muscular circular ^(31,50).

Para a pesquisa das CIC foi utilizada a técnica imunohistoquímica com a demonstração de seu receptor tirosina quinase ⁽³⁰⁻³⁴⁾.

Para a pesquisa de células ganglionares optou-se por método imunohistoquímico para pesquisa da proteína S100. Ferri em 1982 ⁽²⁹⁾, foi quem primeiro demonstrou que as células gliais entéricas e as células de Schwann no intestino apresentam grande imunoreatividade para a proteína S100. Essa coloração é muito útil pela marcante visualização dos elementos de sustentação das células ganglionares ⁽²⁷⁾. Nesse estudo, associou-se a contracoloração de Harris, para coloração das células ganglionares. Na ausência de células ganglionares, as células de sustentação se distribuem irregularmente ao redor de vasos sanguíneos nas camadas mucosa, submucosa e muscular ⁽²⁸⁾.

Os dados obtidos permitiram o estudo comparativo das células ganglionares e das CIC entre os três grupos de fetos, assim como permitiu a análise dessas células entre os três tipos de anomalia anorretal encontrados.

Os resultados demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os três grupos de fetos, quando analisados pelo método de análise de variância, quanto à densidade de CIC e quanto à densidade de células ganglionares.

Os resultados também demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os três grupos de fetos, quando analisados, dois a dois, pelo método de Bonferroni, quanto à densidade de CIC e quanto à densidade de células ganglionares. O grupo Controle externo apresentou uma maior densidade que o grupo Controle interno que por sua vez apresentou maior densidade que o grupo AAR.

Os dois grupos celulares (células ganglionares e CIC) exibiram perfil semelhante. A semelhança entre as densidades dos dois grupos celulares pode ser decorrente da origem das CIC. São células mesenquimais, cujos receptores tirosina quinase (c-Kit) sob a influência de fatores gerados pelas células nervosas do plexo mioentérico, diferenciam-nas em CIC mioentéricas ^(30,31).

Não existem trabalhos experimentais relacionando AAR com as CIC, assim como não existem relatos da densidade de CIC em ratos. Wedel em 2002 ⁽³⁴⁾ determinou a densidade das CIC em pacientes adultos normais,

portadores de constipação crônica e portadores de megacolo congênito. Nos pacientes normais encontrou uma densidade de CIC por mm² de $18,8 \pm 3,3$ e nos pacientes portadores de megacolo congênito encontrou uma densidade de CIC por mm² de $6,1 \pm 3,2$. Curiosamente, e sem efeitos de comparação, essas medidas se aproximam das encontradas no presente estudo, onde os fetos do grupo Controle externo (normais) exibiram uma densidade de $18,97 \pm 2,4$ e os do grupo AAR $7,07 \pm 2,44$.

Estudos experimentais correlacionando AAR com estudos de IEI são escassos e empregaram metodologia diferente. Favre et al ⁽⁵¹⁾ utilizando a coloração pela proteína neurofilamentar e pelo óxido nítrico sintetase em camundongos de cauda curta de Danforth demonstraram uma associação com hipoganglionose (41%) e aganglionose (58%). Mandhan et al ⁽⁵²⁾ utilizando enolase específica do neurônio e Substância P avaliaram o intestino terminal de ratos recém nascidos portadores de AAR induzida pela ETU, demonstrando diminuição da imunoreatividade em ambos os métodos.

Os resultados obtidos também demonstraram que o grupo Controle interno apesar de não apresentar AAR em seu fenótipo, apresentou uma contagem diminuída de células ganglionares e de CIC, e metade deles apresentou outras malformações. Esse fato pode estar relacionado ao mecanismo de ação da ETU.

Acredita-se que a ETU exerça seus efeitos possivelmente por alterar a sinalização do gene SHH. A molécula codificada pelo gene SHH está envolvida no desenvolvimento de diversos sistemas, entre eles o sistema nervoso, o sistema esquelético, estruturas craniofaciais e o trato gastrointestinal. No trato gastrointestinal, ela é responsável pela regionalização do tubo digestivo primitivo, pelo padrão radial do tubo digestivo, pela diferenciação de suas camadas e pela diferenciação dos neurônios entéricos ^(53,54,55). Camundongos com mutação do SHH exibem diversos defeitos do trato gastrointestinal semelhante aos humanos, entre eles o pâncreas anular, a estenose duodenal, o megacolo congênito e as AAR.

As alterações encontradas no grupo Controle interno poderiam ter sido desencadeadas por alterações da sinalização do gene SHH, que desencadeou

algumas das alterações encontradas, porém que não tiveram seu efeito pleno ao não induzir a AAR.

Os resultados também indicaram que não houve diferença estatisticamente significativa quanto à densidade de células ganglionares e de CIC, entre os três tipos de AAR. Dessa forma, não podemos intuir que os diferentes graus de obstipação que se observa nos diferentes tipos de AAR sejam decorrentes de diferentes densidades dessas células.

Os resultados obtidos demonstram que existem alterações da inervação entérica intrínseca e das células intersticiais de Cajal no intestino terminal de ratos portadores de AAR.

Novas pesquisas podem ser desenvolvidas em modelos experimentais para melhor compreensão das alterações existentes.

6. CONCLUSÕES

1. Existe uma menor densidade de células ganglionares no intestino terminal de ratos portadores de anomalia anorretal induzida pela etilenotiouréia.
2. Existe uma menor densidade de células intersticiais de Cajal no intestino terminal de ratos portadores de anomalia anorretal induzida pela etilenotiouréia

7. REFERÊNCIAS

1. Stephens FD, Smith ED. Ano-rectal malformations in children. Chicago IL: Year Book Medical, 1971.
2. Peña A. Anomalias anorretais In Maksoud JG. Cirurgia Pediátrica. Rio de Janeiro: Livraria e Editora RevinteR Ltda; 1998. Pág 809-35.
3. Martins JL, Pinus J. Anomalias anorrectales: evaluación de resultados de su tratamiento quirúrgico en 162 niños tratados de 1986 a 1999. Rev Cirur Infant. 1999;9:221-6.
4. Peña A. Anorectal malformations. Seminar Pediatr Surg. 1995;4:35-47.
5. Shaul DB, Harrison EA. Classification of anorectal malformations – initial approach, diagnostic tests and colostomy. Semin Pediatr Surg. 1997;6:187-95.
6. Rintala RJ. Fecal incontinence in anorectal malformations, neuropathy, and miscellaneous conditions. Seminar Pediatr Surg. 2002;11:75-82.
7. Martucciello G, Mazzola C, Favre A, Negri F, Bertagnon M, Morando A et als. Preoperative enzyme-histochemical diagnosis of dysganglionoses associated with anorectal malformations (ARM) with recto-vestibular and recto-perineal fistula. Eur J Pediatr Surg. 1999;9:96-100.
8. deVries PA, Peña A. Posterior sagittal anorectoplasty. J Pediatr Surg. 1982;17:638-43.
9. Nixon HH, Puri P. The results of treatment of anorectal anomalies: a thirteen to twenty year follow-up. J Pediatr Surg. 1977;12:27-37.

10. Powell RW, Sherman JO, Raffensperger JG. Megarectum: a rare complication of imperforate anus repair and its surgical correction by endorectal pullthrough. *J Pediatr Surg.* 1982;17:786-95.
11. Peña A, El Behery M. Megasigmoid: A source of pseudoincontinence in children with repaired anorectal malformations. *J Pediatr Surg.* 1993;28:199-203.
12. Brent L, Stephens FD. Primary rectal ectasial. A quantitative study of smooth muscle cells in normal and hypertrophied human bowel. *Prog Pediatr Surg.* 1976;9:41-62.
13. Cheu HW, Grosfeld JL. The atonic baggy rectum: a cause of intractable obstipation after imperforate anus repair. *J Pediatr Surg.* 1992;27:1071-4.
14. Holschneider AM, Koebeke J, Meier-Ruge W, Land N, Jesch NK, Pfrommer W. Pathophysiology of chronic constipation in anorectal malformations. Long-term results and preliminary anatomical investigations. *Eur J Pediatr Surg.* 2001;11:305-10.
15. Macedo M, Martins JL, Freitas-Filho LG. Sacral Ratio and fecal continence in children with anorectal malformations. *BJU Int.* 2004;94:893-4.
16. Rintala R, Lindahl H, Sariola H, Rapola J, Louhimo I. The rectourogenital connection in anorectal malformations is an ectopic anal canal. *J Pediatr Surg.* 1990;25:665-8.
17. Husberg B, Lindahl H, Rintala R, Frenckner B. High and intermediate imperforate anus: results after surgical correction with special respect to internal sphincter function. *J Pediatr Surg.* 1992;27:185-9.

18. Riker WL. Diagnosis and treatment of aganglionosis of the myenteric plexus. *Arch Surg.* 1957;75:362-76.
19. Brayton D, Norris WJ. Further experiences with the treatment of imperforate anus. *Surg Gynec & Obst.* 1958;107:719-26.
20. Parkkulainen KV, Hjelt L, Sulamaa M. Anal atresia combined with aganglionic megacolon. *Acta chir scandinav.* 1959;118:252-6.
21. Kiesewetter WB, Sukarochana K, Sieber WK. The frequency of aganglionosis associated with imperforate anus. *Surgery.* 1965;58:877-80.
22. Rintala R, Lindahl H, Marttinen E, Sariola H. Constipation is a major functional complication after internal sphincter-saving posterior sagittal anorectoplasty for high and intermediate anorectal malformations. *J Pediatr Surg.* 1993;28:1054-8.
23. Holschneider AM, Ure BM, Pirommer W, Méier-Ruge W. Innervation patterns of the rectal pouch and fistula in anorectal malformations: a preliminary report. *J Pediatr Surg.* 1996;31:357-62.
24. Berger S, Ziebell P, Kessler M, Hofmann-von Kap-herr S. Congenital malformations and perinatal morbidity associated with intestinal neuronal dysplasia. *Pediatr Surg Int.* 1998;13:474-9.
25. Méier-Ruge WA, Holschneider AM. Histopathologic observations of anorectal abnormalities in anal atresia. *Pediatr Surg Int.* 2000;16:2-7.

26. Martucciello G, Torre M, Prato AP, Lerone M, Campus R, Leggio S, Jasonni V. Associated anomalies in intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Surg.* 2002;37:219-23.
27. Mackenzie JM, Dixon MF. An immunohistochemical study of the enteric neural plexi in Hirschsprung's disease. *Histopathology.* 1987;11:1055-66.
28. Kato H, Yamamoto T, Yamamoto H, Ohi R, So N, Iwasaki Y. Immunocytochemical characterization of supporting cells in the enteric nervous system in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1990;25:514-9.
29. Ferri GL, Probert L, Cocchia D, Michetti F, Marangos PJ, Polak JM. Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature.* 1982;297:409-10.
30. Kenny SE, Connel MG, Rintala RJ, Vaillant C, Edgard DH, Lloid DA. Abnormal colonic interstitial cells of Cajal in children with anorectal malformations. *J Pediatr Surg.* 1998;33:130-2.
31. Vanderwinden JM. Role of interstitial cells of Cajal and their relationship with the enteric nervous system. *Eur J Morphol.* 1999;37:250-6.
32. Yamataka A, Kato Y, Tibboel D, Murata Y, Sueyoshi N, Fujimoto T, Nishiye H, Miyano T. A lack of intestinal pacemaker (c-kit) in aganglionic bowel of patients with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1995;30:441-4.
33. Yamataka A, Ohshiro K, Kobayashi H, Fujiwara T, Sunagawa M, Miyano T. Intestinal pacemaker C-Kit + cells and synapses in allied Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1997;32:1069-74.

34. Wedel T, Spiegler J, Soellner S, Roblick UJ, Schiedeck THK, Bruch HP, Krammer HJ. Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow transit constipation and megacolon. *Gastroenterology*. 2002;123:1459-67.
35. Khera KS. Ethylenethiourea: Teratogenicity study in rats and rabbits. *Teratology*. 1973;7:243-52.
36. Ruddick JA, Khera KS. Pattern of anomalies following single oral doses of ethylenethiourea to pregnant rats. *Teratology*. 1975;12:277-82.
37. Hirai Y, Kuwabara N. Transplacentally induced anorectal malformations in rats. *J Pediatr Surg*. 1990;25:812-6.
38. Qi BQ, Beasley SW, Frizelle FA. Clarification of the process that lead to anorectal malformations in the ETU-induced rat model of imperforate anus. *J Pediatr Surg*. 2002;37:1305-12.
39. Qi BQ, Beasley SW, Frizelle FA. Evidence that the notochord may be pivotal in the development of sacral and anorectal malformations. *J Pediatr Surg*. 2003;38:1310-6.
40. Yuan ZW, Lui VCH, Tam PKH. Deficient motor innervation of the sphincter mechanism in fetal rats with anorectal malformation: a quantitative study by fluorogold retrograde tracing. *J Pediatr Surg*. 2003;38:1383-8.
41. Rolle U, Nemeth L, Puri P. Nitrergic innervation of the normal gut and in motility disorders of childhood. *J Pediatr Surg*. 2002;37:551-67.
42. Meier-Ruge WA, Bruder E. Anorectal irregularities in anal atresia. *Pathobiology*. 2005;72:59-62.

43. Danforth CH. Developmental anomalies in a special strain of mice. *Am J Anat.* 1930;45:275-87.
44. Mo R, Kim JH, Zhang J, Chiang C, Hui C, Kim PCW. Anorectal Malformations caused by defects in sonic hedgehog signaling. *Am J Pathol.* 2001;159:765-74.
45. Lambrecht W, Lieser W. The internal sphincter in anorectal malformation: Morphologic investigations in neonatal pigs. *J Pediatr Surg.* 1987;22:1160-8.
46. Hori T, Giuffra, Anderson L, Ohkawa H. Mapping loci causing susceptibility to anal atresia in pigs, using a resource pedigree. *J Pediatr Surg.* 2001;36:1370-4.
47. Diez-Pardo JA, Baoquan Q, Navarro C, Tovar JA. A new rodent experimental model of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula: preliminary report. *J Pediatr Surg.* 1996;31:498-502.
48. Kubota Y, Shimotake T, Iwai N. Congenital anomalies in mice induced by etretinate. *Eur J Pediatr Surg.* 2000;10:248-51.
49. Bitoh Y, Shimotake T, Kubota Y, Kimura O, Iwai N. Impaired distribution of retinoic acid receptors in the hindgut-tailgut region of murine embryos with anorectal. malformations. *J Pediatr Surg.* 2001;36:377-380.
50. Fausson-Pellegrini MS, Matini P, Stach W. Differentiation of enteric plexus and interstitial cells of Cajal in the rat during pre- and postnatal life. *Acta Anat.* 1996;155:113-125.

51. Favre A, Briano S, Mazzola C, Brizzolara A, Torre M, Cilli M, Sanguineti M, Martucciello G. Anorectal malformations associated with enteric dysgangliosidosis in Danforth's short tail (sd) mice. *J Pediatr Surg.* 1999;34:1818-21.
52. Mandhan P, Qui QB, Beasley SW. Aberrations of the intrinsic innervation of the anorectum in fetal rats with anorectal malformations. *J Pediatr Surg.* 2005;40:397-402.
53. Sukegawa A, Narita T, Kameda T, Saitoh K, Nohno T, Iba H, Yasugi S, Fukuda K. The concentric structure of the developing gut is regulated by sonic hedgehog derived from endodermal epithelium. *Development.* 2000;127:1971-80.
54. Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development.* 2000;127:2763-72.
55. Heussler HS, Suri M. Sonic Hedgehog. *Br Med J.* 2003;56:129-33.

8. Anexos

Anexo 1 – Carta de aprovação da Comissão de Ética em Pesquisas


Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 13 de maio de 2005.
CEP 0406/05

Ilmo(a) Sr(a).
 Pesquisador(a) MAURÍCIO MACEDO
 Co-Investigadores: José Luiz Martins
 Disciplina/Departamento: Cirurgia Pediátrica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
 Patrocinador: Recursos Próprios

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref. Projeto de pesquisa intitulado: "Estudo da inervação entérica do intestino terminal em ratos portadores de anomalia anorretal, induzida pela etilenotureia".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo experimental agudo em ratos para desenvolvimento de uma nova forma diagnóstica.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.

OBJETIVOS: Pesquisar as alterações das células ganglionares do intestino terminal em ratos portadores de anomalias anorretal, induzida pela etilenotureia.

RESUMO: Serão estudadas ratas grávidas da linhagem wistar cedidas pelo Biotério da Unifesp, os animais após algumas horas de acasalamento apresentarem presença de muco vaginal e esfregaço vaginal com a presença de espermatozoides, esse será considerado o dia zero da gestação. Para a indução do AAR, no décimo primeiro dia de gestação se fará a administração intragástrica de etilenotureia (ETU), diluído em água. Os animais serão classificados em dois grupos: controle(receberão somente água sem adição do ETU) e grupo experimental(com ETU) Serão sacrificados no 19º dia da gestação e submetidos a uma laparotomia para retirada dos fetos que serão identificados e fixados em formol, e após serão examinados para determinação do sexo e presença ou não de AAR e de outras malformações e a seguir serão dissecados para retirada do intestino terminal para posterior análise histológica.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Demonstrar a existência, ou não de associação entre as AAR e as alterações da inervação entérica do reto adquire importância fundamental, pois tal fato poderia interferir em condutas clínicas estabelecidas.

MATERIAL E MÉTODO: descritos os procedimentos experimentais em cada fase.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Fapesp R\$ 1950,00.

CRONOGRAMA: 08 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 8/5/2006 e 3/5/2007.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
 Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

Anexo 2**Peso e sexo dos fetos provenientes de ratas grávidas que não receberam etilenotiouréia**

	Sexo	Peso (gramas)
C1 Feto 1	M	5
C1 Feto 2	F	4
C1 Feto 3	F	6
C2 Feto 1	M	4
C2 Feto 2	M	4
C2 Feto 3	F	5
C2 Feto 4	M	4
C3 Feto 1	F	4
C3 Feto 2	M	5
C3 Feto 3	M	6
C3 Feto 4	F	6

Legenda:

C1 – Rata grávida 1 que não recebeu etilenotiouréia

C2 – Rata grávida 2 que não recebeu etilenotiouréia

C3 – Rata grávida 3 que não recebeu etilenotiouréia

M – Masculino

F – Feminino

Anexo 3

Cálculo da densidade de células intersticiais de Cajal nos fetos das ratas C1, C2 e C3

	Imagem	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Total	Dens. CIC/mm2
C1 Feto 1	Num CIC	11	14	11	14	9	9	9	8	7	9	101	21,91
Normal	Área mm2	0,57	0,52	0,45	0,52	0,48	0,47	0,38	0,4	0,35	0,47	4,61	
C1 Feto 2	Num CIC	8	9	9	12	11	12	9	9	11	9	99	18,00
Normal	Área mm2	0,65	0,39	0,45	0,58	0,48	0,75	0,7	0,58	0,4	0,52	5,5	
C1 Feto 3	Num CIC	14	10	9	14	9	12	10	7	6	6	97	21,65
Normal	Área mm2	0,35	0,4	0,38	0,6	0,5	0,53	0,5	0,38	0,43	0,41	4,48	
C2 Feto 1	Num CIC	8	9	7	10	11	9	8	10	9	9	90	22,00
Normal	Área mm2	0,39	0,42	0,36	0,46	0,47	0,45	0,3	0,42	0,42	0,4	4,09	
C2 Feto 2	Num CIC	12	11	10	15	7	9	11	14	8	7	104	20,76
Normal	Área mm2	0,56	0,71	0,46	0,79	0,35	0,43	0,54	0,38	0,43	0,36	5,01	
C2 Feto 3	Num CIC	8	9	8	9	7	12	9	10	8	11	91	17,57
Normal	Área mm2	0,35	0,43	0,41	0,47	0,63	0,43	0,72	0,59	0,56	0,59	5,18	
C2 Feto 4	Num CIC	11	9	12	11	8	9	12	8	10	8	98	14,76
Normal	Área mm2	0,64	0,72	0,8	0,82	0,59	0,67	0,56	0,6	0,52	0,72	6,64	
C3 Feto 1	Num CIC	6	7	6	6	4	6	7	4	8	7	61	16,22
Normal	Área mm2	0,3	0,34	0,43	0,3	0,18	0,56	0,29	0,36	0,45	0,55	3,76	
C3 Feto 2	Num CIC	6	9	6	8	6	7	6	4	8	6	66	19,08
Normal	Área mm2	0,28	0,26	0,3	0,25	0,38	0,5	0,39	0,44	0,43	0,23	3,46	
C3 Feto 3	Num CIC	6	5	7	3	5	9	8	7	6	7	63	18,86
Normal	Área mm2	0,26	0,2	0,34	0,1	0,24	0,4	0,67	0,49	0,34	0,3	3,34	
C3 Feto 4	Num CIC	5	6	8	6	7	6	5	6	8	8	65	17,91
Normal	Área mm2	0,29	0,31	0,42	0,41	0,31	0,29	0,28	0,53	0,43	0,36	3,63	

Legenda:

C1 – Rata grávida 1 que não recebeu etilenotiouréia

C2 – Rata grávida 2 que não recebeu etilenotiouréia

C3 – Rata grávida 3 que não recebeu etilenotiouréia

Num CIC – Número de células intersticiais de Cajal

mm² – Milímetros quadrados

Dens. CIC/mm2 – Densidade de células intersticiais de Cajal por milímetros quadrados

Anexo 4

Cálculo da densidade de células intersticiais de Cajal nos fetos da rata E1

	Imagem	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Total	Dens. CIC/mm ²
E1 Feto 1	Num CIC	7	5	5	6	4	6	5	6	6	3	53	13,35
Cloaca	Área mm ²	0,38	0,34	0,33	0,38	0,4	0,39	0,42	0,47	0,41	0,45	3,97	
E1 Feto 2	Num CIC	3	3	1	2	4	3	1	3	3	4	27	6,24
Cloaca	Área mm ²	0,58	0,45	0,54	0,36	0,64	0,3	0,23	0,34	0,39	0,5	4,33	
E1 Feto 3	Num CIC	8	8	10	10	9	11	15	8	12	13	104	15,66
Normal	Área mm ²	0,58	0,67	0,75	0,73	0,58	0,62	0,68	0,64	0,61	0,78	6,64	
E1 Feto 4	Num CIC	5	4	4	3	3	4	3	2	3	3	34	6,58
Perineal	Área mm ²	0,66	0,54	0,59	0,59	0,49	0,48	0,46	0,47	0,4	0,49	5,17	
E1 Feto 5	Num CIC	2	1	1	2	1	1	2	1	2	3	16	4,35
Vesical	Área mm ²	0,33	0,32	0,38	0,38	0,4	0,31	0,35	0,31	0,42	0,48	3,68	
E1 Feto 6	Num CIC	4	5	5	3	3	3	5	3	4	2	37	9,00
Cloaca	Área mm ²	0,51	0,55	0,5	0,48	0,43	0,39	0,29	0,37	0,38	0,21	4,11	
E1 Feto 7	Num CIC	4	4	5	2	4	5	3	3	4	3	37	8,11
Perineal	Área mm ²	0,53	0,59	0,65	0,34	0,35	0,42	0,57	0,37	0,36	0,38	4,56	
E1 Feto 8	Num CIC	4	5	5	7	5	3	5	7	4	5	50	9,12
Cloaca	Área mm ²	0,56	0,53	0,52	0,66	0,76	0,41	0,46	0,47	0,54	0,57	5,48	
E1 Feto 9	Num CIC	4	2	2	2	3	3	3	1	6	1	27	5,13
Cloaca	Área mm ²	0,88	0,69	0,52	0,35	0,36	0,37	0,47	0,26	0,83	0,53	5,26	
E1 Feto 10	Num CIC	5	4	3	4	3	2	2	2	2	4	31	6,33
Cloaca	Área mm ²	0,35	0,89	0,45	0,5	0,45	0,28	0,4	0,37	0,42	0,79	4,9	

Legenda:

E1 – Rata grávida 1 que recebeu etilenotiouréia

Num CIC – Número de células intersticiais de Cajal

mm² – Milímetros quadrados

Dens. CIC/mm² – Densidade de células intersticiais de Cajal por milímetros quadrados

Anexo 5

Cálculo da densidade de células intersticiais de Cajal nos fetos da rata E2

	Imagem	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Total	Dens. CIC/mm ²
E2 Feto 1	Num CIC	7	4	4	4	5	4	5	5	5	7	50	6,54
Perineal	Área mm ²	0,37	0,52	0,69	0,89	0,91	0,72	1,16	0,59	0,96	0,84	7,65	
E2 Feto 2	Num CIC	3	4	3	5	4	4	7	6	7	6	49	8,45
Cloaca	Área mm ²	0,48	0,69	0,49	0,65	0,42	0,62	0,62	0,55	0,65	0,63	5,8	
E2 Feto 3	Num CIC	1	1	2	3	0	1	2	0	1	0	11	1,90
Perineal	Área mm ²	0,38	0,38	0,38	0,55	0,52	0,47	0,67	0,75	0,88	0,82	5,8	
E2 Feto 4	Num CIC	4	3	4	3	1	4	2	4	5	4	34	5,70
Cloaca	Área mm ²	0,53	0,55	0,55	0,66	0,49	0,56	0,61	0,8	0,76	0,46	5,97	
E2 Feto 5	Num CIC	6	3	4	5	6	3	4	4	6	6	47	9,94
vesical	Área mm ²	0,41	0,46	0,35	0,56	0,5	0,42	0,48	0,57	0,48	0,5	4,73	
E2 Feto 6	Num CIC	2	4	2	1	1	3	2	3	3	5	26	4,90
Cloaca	Área mm ²	0,64	0,48	0,35	0,34	0,67	0,53	0,45	0,57	0,8	0,48	5,31	
E2 Feto 7	Num CIC	6	4	4	8	5	9	8	9	6	4	63	10,92
Normal	Área mm ²	0,5	0,56	0,49	0,66	0,61	0,51	0,65	0,57	0,59	0,63	5,77	
E2 Feto 8	Num CIC	4	2	5	3	7	2	5	4	5	7	44	9,69
vesical	Área mm ²	0,63	0,45	0,5	0,27	0,56	0,35	0,68	0,34	0,35	0,41	4,54	
E2 Feto 9	Num CIC	7	4	6	4	7	3	4	4	4	9	52	8,77
vesical	Área mm ²	0,51	0,85	0,75	0,63	0,54	0,49	0,53	0,57	0,58	0,48	5,93	
E2 Feto 10	Num CIC	4	4	3	4	3	4	0	1	1	6	30	5,77
Cloaca	Área mm ²	0,47	0,64	0,55	0,45	0,52	0,54	0,43	0,52	0,55	0,53	5,2	

Legenda:

E2 – Rata grávida 2 que recebeu etilenotiouréia

Num CIC – Número de células intersticiais de Cajal

mm² – Milímetros quadrados

Dens. CIC/mm² – Densidade de células intersticiais de Cajal por milímetros quadrados

Anexo 6

Cálculo da densidade de células intersticiais de Cajal nos fetos da rata E3

	Imagem	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Total	Dens. CIC/mm ²
E3 Feto 1	Num CIC	8	11	7	10	7	5	8	10	12	4	82	11,50
Normal	Área mm ²	0,55	0,89	0,75	0,79	0,68	0,6	0,71	0,67	0,74	0,75	7,13	
E3 Feto 2	Num CIC	3	7	6	2	7	4	8	5	8	7	57	8,69
Normal	Área mm ²	0,62	0,66	0,57	0,58	0,55	0,61	0,7	0,74	0,79	0,74	6,56	
E3 Feto 3	Num CIC	5	3	4	3	5	2	5	7	5	5	44	7,68
Normal	Área mm ²	0,42	0,66	0,69	0,46	0,5	0,53	0,55	0,59	0,62	0,71	5,73	
E3 Feto 4	Num CIC	3	2	2	3	2	2	3	2	3	3	25	5,41
Cloaca	Área mm ²	0,47	0,39	0,6	0,42	0,45	0,36	0,36	0,6	0,52	0,45	4,62	
E3 Feto 5	Num CIC	3	2	3	2	3	4	4	3	7	5	36	6,43
Cloaca	Área mm ²	0,43	0,53	0,56	0,53	0,45	0,64	0,65	0,55	0,68	0,58	5,6	
E3 Feto 6	Num CIC	2	4	5	4	5	3	2	3	4	5	37	10,98
Normal	Área mm ²	0,39	0,39	0,39	0,38	0,38	0,31	0,26	0,24	0,36	0,27	3,37	
E3 Feto 7	Num CIC	4	6	7	5	4	5	6	5	6	6	54	10,17
Normal	Área mm ²	0,62	0,69	0,61	0,49	0,35	0,42	0,49	0,6	0,55	0,49	5,31	
E3 Feto 8	Num CIC	5	5	6	4	3	5	5	5	8	4	50	8,52
Normal	Área mm ²	0,65	0,59	0,53	0,63	0,62	0,57	0,54	0,58	0,6	0,56	5,87	
E3 Feto 9	Num CIC	3	3	3	3	2	1	2	2	4	3	26	6,84
Cloaca	Área mm ²	0,39	0,38	0,44	0,41	0,32	0,51	0,4	0,32	0,31	0,32	3,8	

Legenda:

E3 – Rata grávida 3 que recebeu etilenotiouréia

Num CIC – Número de células intersticiais de Cajal

mm² – Milímetros quadrados

Dens. CIC/mm² – Densidade de células intersticiais de Cajal por milímetros quadrados

Anexo 7

Cálculo da densidade de células ganglionares nos fetos das ratas C1, C2 e C3

	Imagem	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Total	Dens cel/mm ²
C1 Feto 1	Num Cel Gang	19	13	15	15	17	19	19	20	19	22	178	28,71
Normal	Área mm ²	0,66	0,44	0,49	0,59	0,6	0,67	0,7	0,7	0,68	0,67	6,2	
C1 Feto 2	Num Cel Gang	16	18	14	12	17	17	23	22	22	20	181	27,10
Normal	Área mm ²	0,58	0,58	0,59	0,52	0,56	0,63	0,78	0,88	0,73	0,83	6,68	
C1 Feto 3	Num Cel Gang	21	14	23	19	22	25	22	21	16	18	201	26,84
Normal	Área mm ²	0,8	0,53	0,73	0,73	0,88	0,94	0,74	0,74	0,72	0,68	7,49	
C2 Feto 1	Num Cel Gang	16	10	19	18	19	16	16	20	20	20	174	23,17
Normal	Área mm ²	0,52	0,58	0,64	0,75	0,67	0,76	0,76	0,88	0,95	1	7,51	
C2 Feto 2	Num Cel Gang	20	26	26	26	25	33	24	22	22	17	241	26,08
Normal	Área mm ²	0,76	0,97	1,17	1,08	1,06	1,21	0,87	0,64	0,85	0,63	9,24	
C2 Feto 3	Num Cel Gang	32	24	11	12	13	13	12	18	16	17	168	24,63
Normal	Área mm ²	1,28	1,03	0,59	0,48	0,56	0,46	0,37	0,73	0,66	0,66	6,82	
C2 Feto 4	Num Cel Gang	34	30	28	30	34	33	21	37	29	29	305	24,07
Normal	Área mm ²	1,3	1,18	1,43	1,29	1,33	1,39	1,16	1,32	1,11	1,16	12,67	
C3 Feto 1	Num Cel Gang	13	12	9	10	21	12	11	11	15	10	124	21,83
Normal	Área mm ²	0,66	0,44	0,45	0,39	0,76	0,62	0,85	0,5	0,56	0,45	5,68	
C3 Feto 2	Num Cel Gang	23	28	18	18	26	26	19	17	19	20	214	33,70
Normal	Área mm ²	0,67	0,62	0,52	0,56	0,59	0,72	0,72	0,51	0,57	0,87	6,35	
C3 Feto 3	Num Cel Gang	12	30	24	11	14	14	14	11	16	19	165	29,00
Normal	Área mm ²	0,44	0,88	0,56	0,33	0,31	0,51	0,57	0,52	0,6	0,97	5,69	
C3 Feto 4	Num Cel Gang	21	21	15	15	16	11	7	17	12	18	153	26,47
Normal	Área mm ²	0,83	0,75	0,63	0,61	0,62	0,53	0,39	0,45	0,49	0,48	5,78	

Legenda:

C1 – Rata grávida 1 que não recebeu etilenotiouréia

C2 – Rata grávida 2 que não recebeu etilenotiouréia

C3 – Rata grávida 3 que não recebeu etilenotiouréia

Num Cel Gang – Número de células ganglionares

mm² – Milímetros quadrados

Dens cel/mm² – Densidade de células ganglionares por milímetros quadrados

Anexo 8

Cálculo da densidade de células ganglionares nos fetos da rata E1

	Imagem	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Total	Dens cel/mm ²
E1 Feto 1	Num Cel Gang	8	10	10	10	16	13	14	8	11	10	110	18,12
Cloaca	Área mm ²	0,86	0,89	0,64	0,7	0,59	0,52	0,58	0,4	0,44	0,45	6,07	
E1 Feto 2	Num Cel Gang	9	2	7	15	10	9	9	6	6	9	82	9,95
Cloaca	Área mm ²	0,79	0,71	0,81	1,02	0,74	0,81	0,84	0,82	0,61	1,09	8,24	
E1 Feto 3	Num Cel Gang	19	17	19	18	18	14	14	17	15	13	164	21,64
Normal	Área mm ²	0,61	0,67	0,69	0,61	0,82	0,94	0,72	0,98	0,86	0,68	7,58	
E1 Feto 4	Num Cel Gang	14	12	15	13	13	10	8	8	16	11	120	17,05
Perineal	Área mm ²	0,59	0,66	0,73	0,84	0,84	0,75	0,66	0,61	0,66	0,7	7,04	
E1 Feto 5	Num Cel Gang	16	13	6	8	7	13	13	12	13	16	117	17,16
Vesical	Área mm ²	0,85	0,62	0,48	0,65	0,8	0,67	0,73	0,71	0,71	0,6	6,82	
E1 Feto 6	Num Cel Gang	16	12	11	11	14	6	17	13	8	7	115	13,34
Cloaca	Área mm ²	1,22	1,35	1,2	1,16	0,69	0,56	0,79	0,61	0,47	0,57	8,62	
E1 Feto 7	Num Cel Gang	10	8	6	8	8	10	9	10	12	10	91	14,24
Perineal	Área mm ²	0,44	0,3	0,37	0,36	1,22	0,65	0,59	0,65	0,87	0,94	6,39	
E1 Feto 8	Num Cel Gang	4	9	7	7	6	7	17	4	8	3	72	11,34
Cloaca	Área mm ²	0,54	0,45	0,43	0,61	0,72	0,62	0,71	0,84	0,73	0,7	6,35	
E1 Feto 9	Num Cel Gang	14	17	14	18	12	9	7	5	14	16	126	12,29
Cloaca	Área mm ²	1,14	1,11	1,28	1,43	1,26	0,73	0,71	0,52	0,97	1,1	10,25	
E1 Feto 10	Num Cel Gang	3	5	6	8	7	7	9	9	4	3	61	10,10
Cloaca	Área mm ²	0,34	0,48	0,64	0,75	0,73	0,75	0,86	0,62	0,43	0,44	6,04	

Legenda:

E1 – Rata grávida 1 que recebeu etilenotiouréia

Num Cel Gang – Número de células ganglionares

mm² – Milímetros quadrados

Dens cel/mm² – Densidade de células ganglionares por milímetros quadrados

Anexo 9

Cálculo da densidade de células ganglionares nos fetos da rata E2

	Imagem	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Total	Dens cél/mm ²
E2 Feto 1	Num Cel Gang	7	7	8	7	16	7	10	12	11	12	97	8,77
Perineal	Área mm ²	1,34	1,14	1,09	0,93	1,55	0,58	1,05	1,11	1,17	1,1	11,06	
E2 Feto 2	Num Cel Gang	8	9	7	7	4	1	4	3	6	5	54	9,78
Cloaca	Área mm ²	0,82	0,64	0,53	0,55	0,4	0,51	0,61	0,34	0,54	0,58	5,52	
E2 Feto 3	Num Cel Gang	12	7	6	7	10	14	17	9	11	12	105	11,67
Perineal	Área mm ²	0,99	0,79	0,78	0,6	0,79	1,24	0,81	0,77	0,94	1,29	9	
E2 Feto 4	Num Cel Gang	6	3	4	5	2	2	2	3	5	5	37	6,55
Cloaca	Área mm ²	0,65	0,46	0,45	0,48	0,68	0,61	0,65	0,59	0,46	0,62	5,65	
E2 Feto 5	Num Cel Gang	6	3	5	4	4	5	7	10	6	6	56	10,53
vesical	Área mm ²	0,54	0,52	0,46	0,57	0,48	0,53	0,62	0,56	0,5	0,54	5,32	
E2 Feto 6	Num Cel Gang	5	5	6	4	6	6	5	8	5	6	56	8,70
Cloaca	Área mm ²	0,55	0,78	0,66	0,7	0,77	0,59	0,5	0,62	0,74	0,53	6,44	
E2 Feto 7	Num Cel Gang	11	15	14	16	18	17	13	13	16	15	148	23,02
Normal	Área mm ²	0,79	0,65	0,67	0,76	0,62	0,66	0,65	0,55	0,55	0,53	6,43	
E2 Feto 8	Num Cel Gang	5	5	5	4	2	4	7	12	6	5	55	11,75
vesical	Área mm ²	0,51	0,45	0,3	0,38	0,37	0,42	0,55	0,68	0,59	0,43	4,68	
E2 Feto 9	Num Cel Gang	5	7	9	11	7	9	7	10	6	10	81	19,66
vesical	Área mm ²	0,49	0,44	0,42	0,4	0,42	0,4	0,38	0,43	0,36	0,38	4,12	
E2 Feto 10	Num Cel Gang	10	9	14	8	16	14	10	11	6	9	107	15,42
Cloaca	Área mm ²	0,67	0,68	0,67	0,65	0,64	0,76	0,8	0,66	0,65	0,76	6,94	

Legenda:

E2 – Rata grávida 2 que recebeu etilenotiuréia

Num Cel Gang – Número de células ganglionares

mm² – Milímetros quadrados

Dens cel/mm² – Densidade de células ganglionares por milímetros quadrados

Anexo 10

Cálculo da densidade de células ganglionares nos fetos da rata E3

	Imagem	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	Total	Dens cél/mm ²
E3 Feto 1	Num Cel Gang	21	21	12	16	20	17	22	13	17	15	174	17,49
Normal	Área mm ²	1,18	0,92	0,67	0,85	1,07	1,18	1,08	1,09	1	0,91	9,95	
E3 Feto 2	Num Cel Gang	13	13	12	18	16	14	16	11	8	14	135	18,93
Normal	Área mm ²	0,64	0,59	0,66	0,77	0,85	0,54	1,05	0,58	0,57	0,88	7,13	
E3 Feto 3	Num Cel Gang	17	14	18	16	22	12	16	13	17	15	160	18,43
Normal	Área mm ²	0,82	0,75	0,99	1,15	0,99	0,84	0,92	0,74	0,78	0,7	8,68	
E3 Feto 4	Num Cel Gang	1	8	0	2	5	8	8	6	8	8	54	11,82
Cloaca	Área mm ²	0,39	0,38	0,34	0,37	0,37	0,47	0,66	0,44	0,47	0,68	4,57	
E3 Feto 5	Num Cel Gang	8	10	9	4	5	7	7	12	11	8	81	13,37
Cloaca	Área mm ²	0,76	0,52	0,56	0,51	0,48	0,52	0,49	0,56	0,83	0,83	6,06	
E3 Feto 6	Num Cel Gang	18	16	16	20	20	22	24	21	17	24	198	17,69
Normal	Área mm ²	1,23	1,05	1,07	1	1,09	1,33	1,12	1,14	1,06	1,1	11,19	
E3 Feto 7	Num Cel Gang	16	28	18	24	18	13	6	6	6	5	140	17,16
Normal	Área mm ²	0,67	1,21	1,18	1,19	1,05	0,96	0,59	0,52	0,41	0,38	8,16	
E3 Feto 8	Num Cel Gang	12	16	15	21	14	15	7	14	16	16	146	20,56
Normal	Área mm ²	0,72	0,76	0,78	0,66	0,68	0,68	0,78	0,69	0,77	0,58	7,1	
E3 Feto 9	Num Cel Gang	11	8	3	3	5	5	4	7	4	4	54	11,27
Cloaca	Área mm ²	0,88	0,82	0,32	0,41	0,47	0,34	0,44	0,39	0,37	0,35	4,79	

Legenda:

E3 – Rata grávida 3 que recebeu etilenotiouréia

Num Cel Gang – Número de células ganglionares

mm² – Milímetros quadrados

Dens cel/mm² – Densidade de células ganglionares por milímetros quadrados

APÊNDICE

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO	
TERMO DE OUTORGA E ACEITACAO DE AUXÍLIO PROCESSO Nº 2005/56062-8	
O Conselho Técnico-Administrativo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, doravante denominada OUTORGANTE , usando das atribuições que lhe confere o Artigo 14, letra "b", da lei Estadual no 5.918, de 18 de outubro de 1960, e de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que são parte integrante deste Termo, concede:	
OUTORGADO JOSE LUIZ MARTINS CPF: 516.485.128-87	
INSTITUIÇÃO 05 075 001 - ESC PAULISTA MEDICINA/UNIFESP	
LINHA DE FOMENTO AUXILIO PESQUISA - REGULAR	
PROJETO ESTUDO DA INERVAÇÃO ENTERICA INTRINSECA DO INTESTINO TERMINAL DE RATOS PORTADORES DE ANOMALIA ANORRETAL.	
ÁREA 04010000 - MEDICINA	PERÍODO 01/11/2005 a 31/10/2006
RELATÓRIOS CIENTÍFICOS ATÉ: 30/10/2006	PRESTAÇÃO DE CONTAS ATÉ: 30/10/2006
OBSERVAÇÕES - Qualquer alteração na destinação dos recursos concedidos, inclusive a utilização de saldos resultantes de diferença entre os preços previstos no projeto e os preços efetivamente pagos, deve ser previamente autorizada pela Outorgante. - Material de consumo (se houver): Caso sejam adquiridos materiais que não sejam manifestamente necessários a realização deste projeto, a Outorgante poderá impugnar as despesas correspondentes na prestação de contas. - Imediatamente após a apresentação do relatório científico estabelecido pela FAPESP como relatório final, o saldo acaso existente será automaticamente cancelado. - O Outorgado reconhece que o auxílio concedido, nos termos aqui descritos, viabilizam plenamente a execução do projeto, salvo circunstâncias imprevisíveis no ato da assinatura. Solicitações de qualquer alteração de orçamento, exceto em casos emergenciais, poderão ser apresentadas por ocasião da apresentação do(s) relatório(s) científico(s). - Em se tratando de projetos da área de arqueologia, o Outorgado deverá adequar-se ao que determina a Constituição Federal e a Lei número 3924/61, devendo contactar o IPHAN (www.iphan.gov.br). - A aquisição de material radioativo, nacional ou importado, fica condicionada a entrega a FAPESP do comprovante de registro do Outorgado e da Instituição na CNEN.	

NORMAS ADOTADAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Apresentação de originais: NB -1139. Rio de Janeiro, 2000.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE - n.º. 01/88: Normas de pesquisas em saúde. Bioética. 1955;3:137-54.

DeCS – Descritores em Ciências de Saúde. 3ª. ed. São Paulo. Bireme; 1992.

UNIFORM REQUIREMENTS FOR MANUSCRIPTS SUBMITTED TO BIOMEDICAL JOURNALS. INTERNATIONAL COMMITTEE OF MEDICAL EDITORS. Ann Intern Med. 1997;126:36-47.

Disponível em www.icmje.org.

FEDERATIVE COMMITTEE ON ANATOMICAL TERMINOLOGY. Terminologia Anatômica, [Tradução para o Português por CTA-SBA]. São Paulo, Manole, 2001, 248.

Inmetro - UNIDADES LEGAIS DE MEDIDA.

Disponível em www.inmetro.gov.br/consumidor/unidlegaismed.asp