

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**NOTES TRANSRETAL EM SUÍNOS: ASPECTOS TÉCNICOS E AVALIAÇÃO
CICATRICAL DO RETO COM OU SEM CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS**

Anelise Bonilla Trindade

PORTO ALEGRE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**NOTES TRANSRETAL EM SUÍNOS: ASPECTOS TÉCNICOS E AVALIAÇÃO
CICATRICAL DO RETO COM OU SEM CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS**

Autora: Anelise Bonilla Trindade

Orientador: Emerson Antonio Contesini

Co-orientadora: Elizabeth Obino Cirne-Lima

**Tese apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias, na área de concentração de
Cirurgia Veterinária, na Universidade Federal
do rio Grande do Sul.**

PORTO ALEGRE

2014

Bonilla Trindade, Anelise

NOTES transretal em suínos: aspectos técnicos e avaliação cicatricial do reto com ou sem células-tronco mesenquimais / Anelise Bonilla Trindade. -- 2014.

95 f.

Orientador: Emerson Antonio Contesini.

Coorientador: Elizabeth Obino Cirne-Lima.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Cirurgia sem cicatriz. 2. Cirurgia endoscópica. 3. Terapia Celular. 4. efeitos anti-inflamatórios. I. Contesini, Emerson Antonio, orient. II. Obino Cirne-Lima, Elizabeth, coorient. III. Título.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Veterinária
Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**NOTES transretal em suínos: aspectos técnicos e avaliação cicatricial do reto com
ou sem células-tronco mesenquimais**

Elaborada por

Anelise Bonilla Trindade

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências Veterinárias

Comissão Examinadora

Emerson Antonio Contesini, Dr., UFRGS
Orientador e Presidente da Comissão

Ana Cristina Pacheco de Araújo, Dra., UFRGS

Carlos Afonso de Castro Beck, Dr., UFRGS

Fernanda dos Santos de Oliveira, Dra., UFRGS

Maurício Veloso Brun, Dr., UFSM

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA-UFRGS) pelo apoio financeiro recebido para a realização do projeto de doutorado. Agradeço ao Hospital de Clínicas Veterinárias por fornecer recursos e conceder sua estrutura para trabalhar com os animais.

Ao meu orientador, professor Dr. Emerson Antonio Contesini pelo incentivo, confiança e disposição durante todo o período de doutorado. À minha co-orientadora professora Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima pelos valiosos ensinamentos de imunologia, resposta inflamatória e terapia celular.

Ao professor Dr. Carlos Afonso de Castro Beck por me acolher no serviço de videocirurgia do HCV-UFRGS e transmitir seus ensinamentos sempre de uma forma amigável e com palavras sábias. Por ser um grande amigo, um profissional de primeira grandeza e principalmente, por ter aceitado ser meu orientador no projeto submetido ao CNPQ para conseguirmos a verba.

Ao maior presente que a UFRGS poderia me dar, a oportunidade de conhecer o grande amor da minha vida, Daniel Guimarães Gerardi, não só pelo exemplo de profissional que és, mas pelo amor que demonstra diariamente, pela paciência em me ajudar mesmo em uma área totalmente diferente, pelo apoio e incentivo diário. O seu amor só me trouxe coisas boas e encheu a minha vida de alegrias e de felicidades. Ter conhecido você foi para mim uma dádiva. Agradeço a Deus por isso!

À minha querida família, em especial a minha mãe Maria Elisa Trindade pelo amor incondicional e incentivo constante. À minha irmã Lisiane Bonilla Trindade que com muito carinho, cuidado e competência deixou o português desta tese impecável. Amo vocês !!!

Aos professores Dr. Dravid Driemeier e Dra. Marisa Ribeiro Cardoso por abrirem as portas dos seus laboratórios para que a tese tivesse maior qualidade. Muito obrigada !

À Dra. Fernanda Dos Santos de Oliveira que com tanta paciência, disposição e profissionalismo, me ajudou nos testes ELISA, bem como interpretar os resultados das citocinas.

Agradeço muito às minhas colegas de pós-graduação que formaram uma equipe fantástica de trabalho: Fabiana Schiochet, Fernanda Valente, Luciana Merini, Juliana Matheus, Naila Duda, Priscila Mörchbacher, Priscila Zlotowki e Tuane Garcez. Aos estagiários Amanda Junqueira e Günther Greiwi que não mediram esforços em ajudar.

Ao professor Dr. Maurício Veloso Brun, meu primeiro orientador na vida profissional e responsável por mostrar-me o caminho maravilhoso da videocirurgia. Agradeço pela ideia no assunto da tese e pela oportunidade de me fazer participar de seu livro.

À Priscila Guerra, colega e amiga que o próprio experimento nos apresentou. Obrigada pelo companheirismo, parceria nos projetos e, principalmente, pela amizade. Espero que possamos trabalhar juntas em muitos outros projetos.

Agradeço à aluna Patrícia Machado, por abrilhantar a tese com seus desenhos artísticos.

À Monnalyza Cadore Gonçalves, colega e amiga, me ajudou em todas as etapas do experimento, sempre com muita alegria e disposição além de contribuir de forma relevante com os *abstracts*.

Ao Setor de Suinocultura da UFRGS pelo fornecimento dos animais do experimento e ao Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da UFRGS (LACVET-UFRGS) pela análises laboratoriais.

Ao Setor de Grandes Animais do HCV e aos funcionários, especialmente à dona Karen, Emerson, Marcos e estagiários do setor que me ajudaram no manejo dos animais com muita boa vontade e sempre pude contar com a ajuda deles.

À querida Liz Marina que me recebeu com muita disposição no Laboratório de Análises Clínicas do HCPA e conduziu os exames de proteína C reativa ultrasensível com entusiasmo. Muito obrigada pelo incentivo e carinho, mesmo sem me conhecer direito.

Sem palavras para agradecer à colega Cris Khul, por me socorrer, mesmo à distância, na interpretação das análises estatísticas.

Ao Cristiano Gomes, amigo e parceiro de pós-graduação, agradeço a amizade e incentivo. Pelos momentos compartilhados e parceria de sempre.

À querida Ana Cristina Pacheco de Araújo, professora e amiga, pela incansável ajuda na anatomia do suíno. Agradeço a amizade e grande incentivo na vida profissional.

Aos bichanos que mudaram minha vida: Duda, Morceguinho, Cinzinha, Mitcha e Bubs e minha cadelinha Cindy que está comigo há 17 anos. Amá-los, enche minha alma de alegrias e torna minha vida mais feliz!

Não poderia deixar de agradecer aos animais, principalmente aos suínos do experimento, que foram objeto da pesquisa. Por permitirem que eu aprendesse seu modo de viver, hábitos e inteligência que foi algo que me surpreendeu. Deixo aqui meu respeito, e eterna gratidão.

Por último, agradeço a Deus por todas as alegrias, pela saúde e pela força que me concedeu, para que eu conseguisse chegar até aqui.

NOTES transretal em suínos: aspectos técnicos e avaliação cicatricial do reto com ou sem células-tronco mesenquimais

Autora: Anelise Bonilla Trindade

Orientador: Emerson Antonio Contesini

Co-orientadora: Elizabeth Obino Cirne-Lima

RESUMO

A cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais (NOTES) é uma nova modalidade cirúrgica caracterizada pela ausência de incisões cutâneas. Diferentes vias de acesso para a NOTES já foram testadas, porém, existem poucos estudos sobre os efeitos imunomoduladores da via transretal e de sua associação com as células-tronco mesenquimais (MSCs) como adjuvante nos efeitos anti-inflamatórios e na cicatrização retal. Este trabalho objetivou avaliar a exequibilidade da técnica NOTES transretal, os efeitos imunomodulatórios e regenerativos desta abordagem cirúrgica e sua associação com as MSCs em um modelo experimental suíno. A tese foi dividida em quatro capítulos sendo que o primeiro trata de uma revisão bibliográfica sobre as vias de acesso para a NOTES e suas implicações. O segundo objetivou testar a exequibilidade da via transretal em três suínos, o que demonstrou ser um acesso alternativo para procedimentos abdominais. O terceiro capítulo avalia a resposta inflamatória da técnica NOTES e da sua associação com MSC derivadas de tecido adiposo. Para isso, 11 suínos foram submetidos a NOTES transretal e distribuídos aleatoriamente em dois grupos: GNOTES e GNOTES+MSC. Amostras de sangue foram coletadas em diferentes tempos para exames de hemograma, albumina, proteína C reativa (PCR) e interleucina-6 (IL-6). Não houveram alterações entre os grupos quanto aos valores de hemograma, albumina e PCR, sendo que a IL-6 foi indetectável em todos os animais. Histologicamente, foi observado menor quantidade de células inflamatórias no GNOTES+MSC na camada muscular. Estes dados sugerem que tanto a técnica NOTES quanto as MSCs atenuam os efeitos inflamatórios do procedimento. Um prolapso retal ocorrido como complicação da técnica NOTES transretal foi detalhadamente descrito no quarto capítulo. Assim, a técnica NOTES associada ou não às MSCs no sítio da incisão apresenta mínima resposta inflamatória em suínos submetidos à peritoneoscopia transretal.

Palavras-chave: Cirurgia sem cicatriz, cirurgia endoscópica, terapia celular, efeitos anti-inflamatórios.

Transrectal NOTES in porcine: technical aspects and scar evaluation of the rectum with or without mesenchymal stem cells

Author: Anelise Bonilla Trindade

Supervisor/Advisor: Emerson Antonio Contesini

Co-supervisor: Elizabeth Obino Cirne-Lima

ABSTRACT

Natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES) is an evolving surgical approach to be performed without skin incisions. Different access sites have been tested, however, studies regarding immunomodulation of the transrectal approach and its association with mesenchymal stem cells (MSC) are still lacking. The viability of transrectal NOTES and the associated effects of MSC local therapy on rectal healing and inflammation were tested in a porcine model. The results of the study are depicted in four chapters. The first chapter presents a literature review and state-of-the-art on the accesses for NOTES. The subsequent paper describes the transrectal approach performed in three pigs and its viability as an alternative access to abdominal endoscopic procedures. In the third chapter, the evaluation of the inflammatory response with transrectal NOTES and adipose tissue MSC therapy is presented. For that, 11 pigs were either submitted to NOTES only or NOTES with local MSC application. Blood samples, peritoneal fluid, and post-mortem rectal tissue specimens were collected. Total blood count, albumin and C-reactive protein showed no significant differences between groups. Interleukin-6 was undetectable in both groups. Histological evaluations demonstrated less inflammatory cells in the muscular layer of rectum of the animals where NOTES was associated with MSC. A possible lessening of the immune response may be seen with NOTES with or without MSCs; however, the presence of MSC attenuate the local inflammatory reaction in the muscular layer of porcine rectum after transrectal NOTES. A rectal prolapse that occurred after transrectal NOTES in one pig is reported in the last chapter. The transrectal NOTES technique with or without the MSCs at the incision site shows minimal inflammatory response in porcine.

Key-words: Scarless surgery, endoscopic surgery, cellular therapy, anti-inflammatory effects.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
2. CAPÍTULO 1- Cirurgia endoscópica por orifícios naturais (NOTES): Principais acessos e suas implicações – Revisão	12
3. CAPÍTULO 2- Transrectal endoscopic liver biopsy: NOTES survival study in a porcine model - Short Communication	31
4. CAPÍTULO 3- Efeitos imunomodulatórios da associação da cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais (NOTES) pelo acesso transretal com células-tronco mesenquimais em suínos	41
5. CAPÍTULO 4- Prolapso retal como complicação da NOTES transretal em modelo experimental suíno	72
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
8. ANEXOS	91

INTRODUÇÃO

A prática médica é marcada por constante evolução em todos os seus ramos de atuação. Isso também ocorre na clínica cirúrgica, sendo possível observar diversas mudanças em curtos períodos de tempo. No que diz respeito às técnicas cirúrgicas, essas também evoluem cada vez mais à medida que novos arsenais diagnósticos e terapêuticos são criados (SANTOS FILHO et al., 2009).

Assim, a cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais ou NOTES (*Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery*) é uma nova alternativa, em alguns casos ainda experimental, para a cirurgia tradicional por eliminar as incisões abdominais bem como as complicações relacionadas a esta, combinando técnicas endoscópicas e laparoscópicas para diagnosticar e tratar doenças abdominais (RATTNER; KALLOO, 2006). As vias mais comumente utilizadas para NOTES são a via transvaginal, a transuretral, a transoral ou transgástrica, a transcolônica e a transretal (LIMA et al., 2008; SEID et al., 2008; ALCARAZ et al., 2009; SANTOS FILHO et al., 2009), sendo as duas últimas ainda pouco exploradas.

As abordagens transcolônica e transretal podem representar método promissor para os procedimentos NOTES sendo que suas principais vantagens em relação às outras vias são: a rápida visualização da cavidade abdominal, o melhor alcance e estabilidade do endoscópio dentro do abdome e, principalmente, a produção de maior orifício para retirada de espécimes de tecidos ou massas. Porém, um dos requisitos mais importantes para a realização é a necessidade de fechamento seguro da víscera de acesso à cavidade abdominal e adequada cicatrização, pois o extravasamento de conteúdo fecal na cavidade anula quaisquer vantagens desta nova abordagem cirúrgica (PAI et al., 2006.; SANTOS FILHO et al., 2009). Portanto, o estudo da união de novas técnicas cirúrgicas com terapias diferenciadas, com intuito de proporcionar rápida e efetiva cicatrização de órgãos e tecidos é uma alternativa com possibilidades de resultados promissores.

Dentro do contexto do desenvolvimento tecnológico, encontra-se a terapia celular, que é um conjunto de métodos e abordagens tecnológicas fundamentadas no conhecimento de várias ciências, que visam à utilização de células para tratamento de muitas doenças (ZAGO, 2006). No entanto, entre as aplicações mais imediatas da terapia com células-tronco, a qual vem sendo explorada em termos experimentais no

mundo todo, estão os seus usos na regeneração de órgãos e objetivando os efeitos anti-inflamatórios. Essa modalidade de terapia implica na inoculação de células-tronco em meio ao tecido danificado, na expectativa de que estas proliferem e se diferenciem em células sadias típicas daquele tecido (http://www.academicos.cefetmg.br/admin/downloads/2108/Artigo_BIO_Celulas_Tronco.pdf).

Apesar dos resultados serem animadores em termos de regeneração de órgãos e efeitos imunomoduladores, a utilização da terapia celular na rotina e suas aplicações clínicas, ainda é considerado um grande desafio para a engenharia tecidual, a qual segue buscando por meio de novas pesquisas, e resultados consistentes para sua utilização de uma forma segura (COVAS, 2006).

Assim, apesar da técnica NOTES representar uma via alternativa para a cirurgia convencional, a via de acesso transretal ainda carece de estudos, bem como a combinação desta técnica com terapias adjuvantes com intuito de promover melhor cicatrização da víscera de acesso e, conseqüentemente, menores efeitos imunomoduladores, condição que resulta em melhor e mais rápida recuperação pós-operatória.

Desta maneira, esta tese teve por objetivos:

a) Geral

Analisar a influência da terapia celular na cicatrização do reto de suínos submetidos a NOTES transretal e verificar a exequibilidade desta nova abordagem cirúrgica, bem como as suas repercussões clínicas e resposta inflamatória.

b) Específicos

* Verificar a exequibilidade da técnica NOTES via transretal para peritoneoscopia em modelo experimental suíno;

* Verificar se a terapia celular através de células-tronco mesenquimais aplicadas no sítio da incisão retal promove melhor cicatrização do mesmo quando comparada aos animais que não a receberam.

* Avaliar a resposta inflamatória da técnica NOTES transretal e de sua associação com as células-tronco mesenquimais, por meio da mensuração dos níveis séricos da interleucina-6, da proteína c ultrasensível e da albumina, bem como hemograma.

* Verificar e comparar a presença de contaminação bacteriana abdominal, através da análise de lavado peritoneal antes do procedimento cirúrgico e após 14 dias, nos diferentes grupos: com e sem terapia celular.

* Analisar a ocorrência de complicações nos animais submetidos ao procedimento NOTES transretal.

Desta maneira, essa tese foi dividida em quatro capítulos formatados conforme indicação do periódico submetido ou a ser submetido: o capítulo um referiu-se a uma revisão bibliográfica sobre as diferentes vias de acesso para a realização da NOTES; no capítulo dois foi relatada a exequibilidade cirúrgica da técnica NOTES transretal em modelo experimental suíno; no capítulo três foram descritos os efeitos inflamatórios da NOTES e a associação desta técnica com as células-tronco mesenquimais, a contaminação bacteriana da cavidade abdominal e as repercussões clínicas dos animais submetidos a este procedimento; e por último, o capítulo quatro descreveu uma complicação grave associada ao procedimento de NOTES transretal.

2. CAPÍTULO 1

Cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais (NOTES): Principais acessos e suas implicações - Revisão

Anelise Bonilla Trindade, Günther Greiwe, Elizabeth Obino Cirne-Lima, Emerson
Antonio Contesini

Manuscrito a ser submetido para a revista
Veterinária em Foco

Cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais (NOTES): Principais acessos e suas implicações - Revisão

Natural Orifices Transluminal Endoscopic Surgery (NOTES): Main access and implications- Review

**Anelise Bonilla Trindade¹, Günther Greiwe², Elizabeth Obino Cirne-Lima³,
Emerson Antonio Contesini⁴**

¹ Médica Veterinária, Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

² Aluno de graduação do curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

³ Bióloga, Doutora, Professora na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

⁴ Médico Veterinário, Doutor, Professor na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

RESUMO

As cirurgias endoscópicas transluminais por orifícios naturais ou NOTES (Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery), significam um novo conceito de cirurgia uma vez que são produzidas pela hibridização de endoscopia e laparoscopia, culminando em uma modalidade cirúrgica com ausência de incisões abdominais. Diversas vias de acesso para a NOTES já foram descritas na literatura dentre elas: a via transvaginal, a transgástrica, a transuretral, a transcolônica e a transretal, sendo os acessos transvaginal e transgástrico os mais estudados até o momento. Apesar da

NOTES apresentar vantagens como menor dor abdominal, rápida recuperação pós-operatória, menor risco de aderências e herniações, ausência de cicatriz e menor resposta inflamatória sistêmica, a necessidade de um fechamento seguro da víscera de acesso à cavidade abdominal, bem como adequada cicatrização do órgão ainda são desafios desta nova abordagem cirúrgica. Desta maneira, o presente trabalho tem por objetivo trazer uma revisão bibliográfica da cirurgia por orifícios naturais, como também suas implicações clínicas decorrentes dos diferentes acessos à cavidade abdominal.

Palavras-chave: cirurgia endoscópica, cirurgia transluminal, cirurgia sem cicatriz.

ABSTRACT

Natural orifices transluminal endoscopic surgery (NOTES) is a new concept in surgery produced from the hybridization of endoscopy and laparoscopy and results in incisionless to the abdominal cavity. Different routes for NOTES have been described in the literature among them, the transvaginal, the transgastric, transurethral, transcolonic and the transretal, but the transvaginal and transgastric access the most studied to date. Present advantages, such as lower abdominal pain, rapid postoperative recovery, less risk of adhesions and hernias, no scar and lower systemic inflammatory response, however the secure closure and cicatrization of the viscera are still challenges of this new surgical approach. This study aims to review of natural orifice surgery, as well as their clinical implications of different access to the abdominal cavity.

Key-words: endoscopic surgery, transluminal surgery, scarless

INTRODUÇÃO

A prática médica é marcada por constante evolução em todos os seus ramos de atuação. Isso também ocorre na clínica cirúrgica, sendo possível observar diversas mudanças em curtos períodos de tempo. No que diz respeito às técnicas cirúrgicas, essas também evoluem cada vez mais à medida que novos arsenais diagnósticos e terapêuticos são criados (SANTOS FILHO et al., 2009).

Assim, a cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais ou NOTES (*Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery*) é uma técnica cirúrgica, a qual a via de acesso até as cavidades corporais é adquirida através de incisão na parede de uma víscera, evitando, assim, incisões de pele e complicações relacionadas ao acesso convencional (BONIN et al., 2012). Constituindo-se, então, em uma nova alternativa experimental para a cirurgia tradicional por eliminar as incisões cutâneas, combinando técnicas endoscópicas e laparoscópicas para diagnosticar e tratar doenças abdominais (RATTNER; KALLOO, 2006).

As vias utilizadas para a NOTES, até o momento, são a transvaginal, a transoral ou transgástrica, a transuretral, a transcolônica e a transretal (LIMA et al., 2008; SEID et al., 2008; ALCARAZ et al., 2009; SANTOS FILHO et al., 2009), sendo as duas primeiras mais comumente utilizadas para procedimentos de peritoneoscopia diagnóstica, biopsia hepática, ligadura tubárica, apendicectomia e colecistectomia (BONIN et al., 2012).

Por evitar incisões na parede abdominal, os procedimentos por orifícios naturais apresentam vantagens como menor dor pós-operatória, rápida recuperação, menor tempo de hospitalização e ausência de cicatriz, o que é importante esteticamente em animais de exposição e em humanos (SEID et al., 2008; SHIN; KALLOO, 2009).

Porém, um dos requisitos mais importantes para a realização é a prevenção de infecção (BONIN et al., 2012), a necessidade de fechamento seguro da víscera de acesso à cavidade abdominal e adequada cicatrização, pois o extravasamento de conteúdo na cavidade, anula quaisquer vantagens desta nova abordagem cirúrgica (PAI et al., 2006.; SANTOS FILHO et al., 2009).

Desta maneira, o presente trabalho tem por objetivo fazer uma revisão bibliográfica da cirurgia por orifícios naturais, considerando também suas implicações clínicas decorrentes dos diferentes acessos à cavidade abdominal.

DESENVOLVIMENTO

Natural Orifices Transluminal Endoscopic Surgery (NOTES)

A NOTES significa um novo conceito de cirurgia, onde se combinam duas abordagens cirúrgicas convencionais guiadas por imagens: a endoscopia flexível e/ou rígida e as cirurgias laparoscópicas, culminando em uma modalidade cirúrgica marcada pela ausência de incisões abdominais (BARON, 2007; DENK et al., 2008). Essa técnica cirúrgica também é denominada de cirurgia endoluminal, transluminal, cirurgia sem incisão (*incisionless*), sem cicatriz (*scarless*) ou mais habitualmente conhecida como cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais (LEE et al., 2006). Existe uma classificação, ainda não oficial das técnicas de NOTES, que mudam a sigla de acordo com auxílio ou não de materiais vídeolaparoscópicos acessórios juntamente com diminuta incisão cutânea e, por isso, são divididas em duas: T-NOTES e H-NOTES. A NOTES total (T-NOTES) é conhecida quando todo o material de trabalho é inserido

apenas através de orifícios naturais; já na NOTES híbrida (H-NOTES), o acesso se dá através de uma víscera e é auxiliado por laparoscopia. A H-NOTES permite a execução segura de viscerotomias enquanto ainda não há domínio total sobre a realização de portais transluminais às cegas (LUZ et al., 2009; BASSO et al., 2012).

O conceito de cirurgia endoscópica transluminal através de orifícios naturais tem crescido em aceitação (GIDAY et al., 2008). O grupo denominado NOSCAR (*Natural Orifice Surgery Consortium for Assessment and Research*), composto por líderes da *Society of American Gastrointestinal and Endoscopic Surgeons* e da *American Society of Gastrointestinal Endoscopy*, tem estabelecido a taxonomia, delineando as atuais limitações da NOTES e motivando a unificação de um plano de pesquisa. Os maiores obstáculos obtidos com cirurgias NOTES são esboçados pelo grupo NOSCAR, que apresentam como principal objetivo obter resultados sólidos e seguros da cirurgia transluminal, para então aceitar como prática clínica (GIDAY et al., 2008).

Vantagens e Indicações

Existem vantagens potenciais propiciadas por esta modalidade cirúrgica quando comparado com técnicas tradicionais como a laparotomia e a laparoscopia. O procedimento NOTES tem a capacidade de realizar uma intervenção cirúrgica na cavidade abdominal sem violar a integridade da parede do abdômen. Dessa forma, a dor pós-operatória é reduzida, eliminando a possibilidade de herniação incisional da parede de acesso e reduzindo a possibilidade de aderências de vísceras abdominais, visto que estas se correlacionam com o tamanho da incisão cirúrgica (SEID et al., 2008; SHIN; KALOO, 2009).

Anvari; Marescaux (2008) relataram, como vantagem, que a utilização da NOTES poderá permitir uma redução da necessidade de anestesia e analgésicos, pois a viscerotomia provoca menor estresse metabólico (COHEN et al., 2003). Com base nestes dados, alguns autores afirmaram que os avançados procedimentos endoscópicos poderão ser realizados utilizando sedação profunda, o que sugere procedimentos transluminais, em humanos, poderiam ser desenvolvidos sem anestesia geral (GIDAY et al., 2008).

Ainda, os procedimentos da NOTES também apresentam potencial para serem utilizados no tratamento de pacientes com cicatrizes ou queimaduras abdominais da mesma forma que portadores de obesidade mórbida, que apresentam alto risco de complicação da incisão cirúrgica, incluindo a má cicatrização (DELLA FLORA et al., 2007; VOSBURGH; ESTÉPAR, 2007). O outro grupo de pacientes onde a NOTES pode ser benéfica é o de pacientes críticos internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), especialmente àqueles com indicação de gastrostomia endoscópica percutânea para nutrição entérica, sem necessitar de gastrotomia aberta. Esse procedimento transluminal além de ser menos traumático também facilita o diagnóstico de isquemia intestinal em pacientes críticos, situações extremamente difíceis de serem diagnosticadas radiograficamente (NESARGIKAR; JAUNOO, 2009).

Além de todas essas indicações, Onders et al. (2007) também sugerem que a via de acesso transluminal pode ser vantajosa para diagnosticar afecções abdominais em pacientes com sepse abdominal de origem indeterminada.

Rotas de acesso para a NOTES

As primeiras experiências clínicas da cirurgia endoluminal não foram publicadas oficialmente em periódicos, sendo realizadas e apresentadas por dois cirurgiões indianos Reddy e Rao em 2004 no *Annual Conference of the Society of Gastrointestinal Endoscopy of India*. Estes profissionais utilizaram o acesso transgástrico para realizar uma apendicectomia em um paciente com graves queimaduras abdominais.

Publicações oficiais foram realizadas por Kalloo et al., no ano de 2004. Estes autores utilizaram o acesso transgástrico para proceder a uma peritoneoscopia e biopsia hepática em modelos experimentais suínos, apresentando como complicações microabscessos intrabdominais. Já Jagannath et al. (2005), publicaram o resultado da cirurgia de seis suínos operados pela via transgástrica para realização da ligadura tubárica, onde não obtiveram complicações pós-operatórias, relatando a rápida recuperação dos animais. Estes últimos resultados também se repetiram em outras pesquisas as quais utilizaram o acesso transoral/ transgástrico tanto para colecistectomia quanto para gastrojejunostomia (KANTSEVOY et al., 2005; PARK et al.; 2005).

A NOTES híbrida com acesso transoral/transgástrico foi utilizada em modelo experimental canino por Lee et al. (2010), para a realização de tiflectomia em três cães. Estes autores relataram apenas aderência local, observada durante a necropsia dos animais, porém não houve sinais de extravasamento de conteúdo visceral ou peritonite. Ainda pela via transgástrica, Sood et al. (2012) compararam a NOTES transgástrica com a endoscopia digestiva alta e a laparoscopia quanto a resposta inflamatória sistêmica e contaminação bacteriana da cavidade abdominal em suínos. Nos três grupos comparados, os autores encontraram valores semelhantes nos níveis de fator de necrose tumoral (TNF- α) nas primeiras horas após o procedimento cirúrgico, interleucina-1 β , interleucina-6, interleucina-10 e IFN γ . Além disso, o grupo NOTES apresentou menor

contaminação microbiológica quando comparado ao grupo laparoscopia. Os autores concluíram que a resposta imunomoduladora do acesso NOTES é semelhante ao acesso por meio da laparoscopia.

Ainda, a via transvesical foi utilizada em suínos para realização de esplenectomia, ooforectomia, histerectomia parcial e gastrojejunostomia (LIMA et al., 2008), além de toracoscopia para biopsia pulmonar (LIMA et al., 2007).

Pai et al. (2006), foram os primeiros pesquisadores a realizarem as cirurgias endoluminais por via transcolônica em modelo experimental. Para tal, procederam colecistectomias em cinco suínos obtendo sucesso em quase todas as intervenções. Apenas um animal evoluiu para peritonite por falha no fechamento da incisão transcolônica 48 horas após o procedimento. Os autores concluíram que este acesso é factível de ser realizado, e que o fechamento adequando da incisão transluminal é um passo importante para evitar graves complicações.

A NOTES transretal híbrida, também foi utilizada para a realização de nefrectomia em três suínos, os quais foram eutanasiados imediatamente após o procedimento. Não foram observados quaisquer indícios de sangramento abdominal ou laceração do local de retirada do espécime. Os autores concluíram que a nefrectomia por meio de NOTES híbrida é um procedimento exequível, porém sugerem ensaios clínicos experimentais em animais mantidos vivos no pós-operatório (BAZZI et al., 2011)

A abordagem transcolônica/transretal apresenta várias vantagens teóricas sobre a via transgástrica, como a inserção de instrumentais de maior diâmetro e remoção de espécimes maiores (baço, rins, cólon e neoplasias); na junção anorretal, melhor visualização da cavidade abdominal com eliminação da necessidade de retroflexão do endoscópio, melhor estabilidade do endoscópio e instrumentais, permitindo acesso mais

direto. No entanto, obstáculos técnicos iniciais como: risco de infecção pela translocação intraluminal bacteriana em espaço peritoneal previamente estéril, formação de fístula e abscessos e fechamento confiável do orifício colônico, permaneceram como possíveis problemas que retardam o uso dessa modalidade, quando comparada com os acessos vaginal e transgástrico (PAI et al.; 2006; SHIN; KALOO, 2009; ZORRON et al., 2010).

Por conseguinte, vários pesquisadores ainda procuram realizar a NOTES por diferentes acessos em busca da melhor via para adentrar a cavidade abdominal de acordo com o procedimento cirúrgico a ser realizado.

Atualmente, a forma mais segura de se realizar a cirurgia através de um orifício natural é a vagina, pois os orifícios abertos nos outros órgãos podem não ser ocluídos com segurança, já que há grande dificuldade de rafia da víscera quando são utilizados endoscópios tradicionais. Desta maneira, o fechamento da parede vaginal de 2 a 3 mm no fundo vaginal, o qual se comunica com a cavidade abdominal, pode ser suturado com segurança porque é feito sob visualização direta, pela exteriorização da ferida de acesso (DE CARLI et al., 2009).

Desde que Branco et al. (2007), Marescaux et al. (2007), Zorron et al. (2007), Zorning et al. (2008), descreveram bem sucedidas colecistectomias NOTES por via transvaginal em 2007, outros grupos seguiram e publicaram seus resultados clínicos iniciais das técnicas na maior parte com assistência laparoscópica para propósito de retração das vísceras e melhor visualização da cavidade abdominal. Apendicectomia transvaginal também foi descrita por Palanivelu et al. (2008) e Ramos et al. (2008), os quais também apresentaram os primeiros relatos clínicos de gastrectomia em manga (*sleeve* gastrectomia) via NOTES transvaginal.

A rota transvaginal já foi descrita para a ovariosalpingohisterectomia (OSH) em cadelas (BRUN et al., 2011), onde os autores utilizaram a técnica NOTES híbrida, com a introdução do endoscópio rígido através da parede abdominal para assim realizar o procedimento por meio da inserção de instrumentais através da punção junto à cérvix, sem intercorrências trans e pós-operatórias.

Sabe-se que a extração transcolônica ou transvaginal de espécimes em cirurgia laparoscópica tem sido bastante utilizada nos últimos anos por permitir a remoção de espécimes grandes, o que elimina a necessidade de incisão auxiliar como ocorre na laparoscopia. Estas técnicas são classificadas como NOSE (*natural orifice espécime extraction*) e demonstram bons resultados com poucas complicações relatadas (ZORRON et al., 2010).

Desafios e complicações

Apesar de alguns estudos experimentais já evidenciarem sucesso em seus procedimentos, esta nova abordagem cirúrgica esbarra ainda em alguns desafios importantes. Um deles, diz respeito ao método de promover o pneumoperitônio, já que o abdômen é insuflado com ar de forma descontrolada pelo endoscópio flexível (SHAFI et al., 2006). A insuflação através desses instrumentos geralmente não tem controle de pressão e a taxa de fluxo é muito mais lento que um insuflador laparoscópico típico, além disso, descreve-se o uso de ar ambiental, não estéril, diferentemente da laparoscopia, a qual utiliza normalmente CO₂ medicinal (SANTOS FILHO et al., 2009). Dessa forma, os clássicos efeitos hemodinâmicos do aumento da pressão abdominal decorrente da insuflação descontrolada têm sido descritos em vários animais e humanos. Esses efeitos são taquicardia, arritmias cardíacas, aumento da pressão arterial, vasoconstrição periférica, diminuição do volume sistólico e débito cardíaco e

diminuição do fluxo sanguíneo renal e do retorno venoso, especificamente com a pressão acima de 15 mmHg. Algumas técnicas foram desenvolvidas para minimizar esses problemas, uma delas é introduzir uma agulha de *Veress* percutânea para monitorar a pressão intra-abdominal e agir como um escape. Alternativamente, insufladores autorregulados podem ser conectados nessa agulha para fornecer melhor controle da pressão intrabdominal, contudo, Pai et al. (2006) e Ko et al. (2007) sugerem insuflação da cavidade abdominal previamente à incisão transluminal com agulha de *Veress* adaptada ao insuflador autorregulável. Portanto, esta manobra pode facilitar a viscerotomia e minimizar o risco de lesões iatrogênicas de órgãos adjacentes.

Em colecistectomias via transvaginal em suínos, Zorron et al. (2008) utilizaram 5 a 6 mmHg de pressão de CO₂ para a insuflação da cavidade abdominal por intermédio de insuflador acoplado ao colonoscópio. Já Ryou et al. (2008) promoveram o pneumoperitônio com agulha de *Veress* inserida percutaneamente na linha média do abdômen caudal dos modelos suínos, mantendo a pressão de CO₂ intraperitoneal de 8 a 10 mmHg para os procedimentos por via transcolônica. Já Ko et al. (2007), utilizando a mesma técnica de insuflação com agulha de *Veress*, mantiveram o pneumoperitônio em 12 mmHg.

Outra complicação em potencial dos procedimentos da cirurgia endoscópica transluminal é a infecção intrabdominal. Durante o acesso a cavidade peritoneal pode tornar-se contaminada pelo contato com o endoscópico não esterilizado ou pela passagem deste e do instrumental cirúrgico por meio de um orifício contaminado (BERMAN; MELVIN, 2008). Desta maneira, a prevenção de infecções com antibioticoterapia e lavagem abundante da víscera de acesso é um passo importante.

A prevenção de infecções para a rota transvaginal consiste em limpeza vaginal e antisepsia da pele perivaginal com solução de povidone iodine associados à ampicilina e sulbactam por via parenteral (BONIN et al., 2012).

Para prevenir infecções pós-operatórias na NOTES transgástrica, é recomendada dieta líquida seguida por jejum de 24 horas (SHAFI et al., 2006). Posteriormente, realiza-se uma lavagem gástrica com solução salina estéril pelo meio de gastroscópio até a remoção total do conteúdo gástrico. Em seguida, recomenda-se a lavagem do estômago com solução antibiótica como a cefazolina 1g diluída em 100 ml (SOOD et al., 2012) ou 300 ml de solução salina, mantendo a solução em contato com a mucosa por um período de 10 minutos, sendo a mesma removida por sucção (LEE et al., 2010). Os usos de antibióticos parenterais, como a cefazolina, também são indicados associados aos procedimentos anteriormente citados (SOOD et al., 2010). Estudos mostram que o uso de inibidores da bomba de prótons promove maior crescimento bacteriano intraperitoneal e, dessa maneira, estariam contraindicados nesses procedimentos (BERMAN; MELVIN, 2008).

Para o acesso transcolônico e transretal, a prevenção de infecções pós-operatórias consiste em jejum alimentar de 48 horas, uso profilático parenteral de antibiótico como a cefazolina, remoção mecânica das fezes, lavagem colônica e retal com solução salina e, posteriormente, lavagem com solução contendo antibiótico como a cefazolina 1g diluída em 500 mL de solução salina estéril (Pai et al., 2006). Especialmente para a via transretal, Bazzi et al. (2011) recomendam a lavagem intestinal com solução monobásica e dibásica de sódio associada a antibioticoprofilaxia parenteral.

E por fim, outro principal desafio para a realização da NOTES é saber qual a forma e o material ideal para a rafia da víscera pela qual o endoscópio obteve acesso à cavidade. Os trabalhos que utilizaram a via de acesso transgástrica e transcolônica, realizaram a sutura visceral por intermédio de endoclipes e *endoloop* (PAI et al., 2006), porém, os estudos experimentais avaliaram a cicatrização em um curto período de tempo.

CONCLUSÃO

Em suma, as cirurgias realizadas através de orifícios naturais são consideradas como possíveis alternativas aos procedimentos convencionais e laparoscópicos por apresentarem potencial vantagem quanto à recuperação do paciente. Todavia, mais estudos ainda são necessários no intuito de esclarecer o melhor método de prevenção de infecções, fechamento e cicatrização da víscera de acesso, para assim tornar este procedimento seguro.

REFERÊNCIAS

- ALCARAZ, A.; et al. Feasibility of Transvaginal NOTES-Assisted Laparoscopic Nephrectomy. *European Urology*, v. 3205, p. 1-5, 2009.
- ANVARI, M.; MARESCAUX, J. Natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES): the dawn of a new era. Disponível em: <<http://www.websurg.com/notes>> acesso em: maio 2008.
- BARON, T.H. Natural orifice transluminal endoscopic surgery. *British Journal of Surgery*, v.1, n. 94, p. 01-02, 2007.

- BASSO, P.C., RAISER, A.G., BRUN, M.V. Atualidades em videocirurgia na Medicina Veterinária: cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais (NOTES) e cirurgia laparoendoscópica por único portal (LESS). *Revista Científica de medicina Veterinária – Pequenos animais e animais de estimação – MEDVEP*, v. 10, n. 32, p. 82-89, 2012.
- BAZZI, W.M., et al. Transrectal Hybrid Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery (NOTES) Nephrectomy in a Porcine Model. *Urology*, v. 3, n. 77, p. 518-523, 2011.
- BERMAN, S.; MELVIN, S. Natural orifice transluminal endoscopic surgery. *Surgical Clinics of North America*. v.88, p.1131-1148, 2008.
- BONIN, E.A.; et al. Evaluation of bacterial contamination after “pure” (totally) transvaginal NOTES diagnostic peritoneoscopy with biopsies in swine: a comparative study with laparoscopy. *Surgical Endoscopy*, DOI 10.1007/s00464-012-2448-4, 2012.
- BRANCO FILHO A.J. et al. Initial experience with hybrid transvaginal cholecystectomy. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 66, n.6, p. 1245-1248, 2007.
- BRUN, M.V.; et al. Ovariohysterectomy in a dog by a hybrid NOTES technique. *Canadian Veterinary Journal*, v. 52, p.637–640, 2011
- COHEN, R.V., et al., 2003, Alterações Sistêmicas e Metabólicas da Cirurgia Laparoscópica. *Revista Brasileira de Videocirurgia*, v.1, n. 2, p. 77-81, 2003.
- De CARLI. Cirurgia através de orifícios naturais – sem cicatrizes. *Tribuna Livre*. 3p., 2009.
- DELLA FLORA, E., et al. A systematic review of natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES) for intra-abdominal surgery – *ASERNIP-S report n. 62*. Adelaide: ASERNIP-S, 2007.

DENK, P.M., et al. Transanal endoscopic microsurgical platform for natural orifice surgery. *Gastrointestinal endoscopy*, v. 68, n.5, p. 954-959, 2008.

GIDAY, S. A., et al. NOTES: the future. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, v. 18, p. 387-395, 2008.

JAGANNATH, S.B., et al. Peroral transgastric endoscopic ligation of fallopian tubes with long-term survival in a porcine model. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 3, n. 61, p. 449-453, 2005.

KALLOO A.N., et al. Flexible transgastric peritoneoscopy: a novel approach to diagnostic and therapeutic interventions in the peritoneal cavity. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 60, n.1, p. 114-7, 2004.

KANTSEVOY, S.V., et al. Endoscopic gastrojejunostomy wit survival in a porcine model. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 2, n. 62, p. 287-292, 2005.

KO, C. W., et al. Preliminary pneumoperitoneum facilitates transgastric access into the peritoneal cavity for natural orifice transluminal endoscopic surgery: a pilot study in a live porcine model. *Endoscopy*. v.39, p.849-853, 2007.

LEE, LS. Desarrollo tecnológico actual de la cirugía endoscópica transluminal através de orificios naturales. *Cirugía Española*, v. 80, n.5, p. 283-288, 2006.

LEE, L.S., et al. Transgastric cecectomy in canine models: natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES). *Surgical Endoscopy*, v. 24, p. 2387-92, 2010.

LIMA, E., et al. Transvesical endoscopic peritoneoscopy: a novel 5 mm port for intra-abdominal scarless surgery. *Journal of Urology*, v. 2, n. 176, p. 802-805, 2008.

LIMA, E., et al. Transvesical thoracoscopy: a natural orifice transluminal endoscopic approach for thoracic surgery. *Surgical Endoscopy*, v. 21, p. 854-858, 2007.

LUZ, M.J., et al. Ovariectomia por via laparoscópica em cadela com ovário remanescente. *Revista Científica de Medicina Veterinária (MEDVEP)*. v.7, n.22, p.372-376, 2009.

MARESCAUX, J. N.O.T.E.S editorials – Operation Anubis: a new step in NOTES history! [internet]. [cited 2007 june 2]. Disponível em: <http://www.websurg.com/editorials/media.php?doi=ed01en0018> Acessado em: 29 outubro/2009.

NESARGIKAR, P.N.; JAUNOO, S.S. Natural orifice transluminal endoscopic surgery (N.O.T.E.S). *International Journal of Surgery*. v.7, p.232-236, 2009.

ONDERS, R.P. et al. Natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES) as a diagnostic tool in the intensive care unit. *Surgical Endoscopy*, v. 21, n.4, p. 681-683, 2007.

PAI, R.D., et al. Transcolonic endoscopic cholecystectomy: a NOTES survival study in a porcine model (with video). *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 4, n. 65, p. 679-683, 2006.

PARK, P.O., et al. Experimental Studies of transgastric gallbladder surgery: cholecystectomy and cholecystogastric anastomosis (videos). *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 4, n. 61, p. 601-606, 2005.

PALANIVELU, C., et al. Transvaginal endoscopic appendectomy in humans: a unique approach to NOTESworld's first report. *Surgical Endoscopy*, v. 22, n.5, p. 1343-1347, 2008.

RAMOS, A.C, et al. NOTES Transvaginal videoassisted cholecystectomy: first series. *Endoscopy*, v. 40, n. 7, p. 572-575, 2008.

- RATTNER, D.; KALLOO, A; ASGE/SAGES Working Group. ASGE/SAGES Working Group on Natural Orifice Translumenal Endoscopic Surgery. October 2005. *Surgical Endoscopy*, v. 20, n.2, p. 329-333, 2006.
- REDDY, N.; RAO, P. Per oral transgastric endoscopic appendectomy in human. Abstract presented at 45th *Annual Conference of the Society of Gastrointestinal Endoscopy of India*. Jaipur, India, February, p. 28-29, 2004.
- RYOU, M., et al. Evaluation of a novel access and closure device for NOTES applications: a transcolônica survival study in porcine model. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 67, n.6, p. 964-969, 2008.
- SANTOS-FILHO, P.V., et al. Cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais: realidade atual. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia*, v. 36, n. 2, p. 167-172, 2009.
- SHAFI, B.M., et al. Natural orifice translumenal endoscopic surgery (NOTES). *Seminars Pediatric Surgery*. v.15, n.4, p.251-258, 2006.
- SHIN, E.J.; KALOO, A.N. Transcolonic NOTES: Current Experience and Potential Implications for Urologic Applications. *Journal of Endourology*, v. 23, n.5, p. 743-47, 2009.
- SEID, V.E., et al. NOTES: presente e futuro – uma breve revisão. *Einstein*, v. 6, n. 1, p. 99-101, 2008.
- VOSBURGH, K. G.; ESTEPAR, R. S. J. Natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES): an opportunity for augmented reality. *Studies in Health Technology and Informatics*, v.125, p.485-490, 2007.
- ZORNIG, C., et al. Scarless cholecystectomy with combined transvaginal and transumbilical approach in a series of 20 patients. *Surgical Endoscopy*, v.22, p.1427-1429, 2008.

ZORRON, R. et al. NOTES Transvaginal cholecystectomy: Report of the first case. *Surgical Innovation*, v. 14, n.4, 279-283, 2007.

ZORRON, R.; et al. NOTES transvaginal cholecystectomy: preliminary clinical application. *Surgery Endoscopic*, v. 22, p. 542-547, 2008.

ZORRON, R., et al. Cirurgia por Orifícios Naturais Transcolônica: Acesso NOTES Peri-retal (PNA) para Excisão Mesorectal Total. *Revista Brasileira de Coloproctologia*, v. 30, n.1, p. 14-22, 2010.

3. CAPÍTULO 2

Transrectal endoscopic liver biopsy: NOTES survival study in a porcine model

Short Communication

Anelise B Trindade; Carlos AC Beck; Michelli W Ataíde; Priscila R Guerra; Priscila Zlotowski; Daniel G Gerardi; Maurício V Brun; Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso; David Driemeier; Elizabeth O Cirne-Lima; Emerson A Contesini

Manuscrito submetido para a revista *Research in Veterinary Science*

1 **Transrectal endoscopic liver biopsy: NOTES survival study in a porcine model**

2 **Short Communication**

3
4 Anelise B Trindade; Carlos AC Beck; Michelli W Ataíde; Priscila R Guerra; Priscila
5 Zlotowski; Daniel G Gerardi; Maurício V Brun; Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso;
6 David Driemeier; Elizabeth O Cirne-Lima; Emerson A Contesini

7
8 A. B. Trindade; M. W. Ataíde; F. Schiochet; P.R Guerra; P. Zlotowsky

9 Veterinary, PhD student, Post Graduation Program of Veterinary Science (PPGCV),
10 Veterinary College (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),
11 Porto Alegre, RS, Brazil. Avenida Bento Gonçalves, 9090, Bairro Agronomia, Porto
12 Alegre, RS, CEP 91540-000. Brazil.

13 Correspondence autor: anelisebt@yahoo.com.br

14 C.A.C. Beck; D.G. Gerardi; M.R.I. Cardoso; E.A. Contesini

15 Veterinary, PhD, Professor, Departament of Animal Medicine, Veterinary College,
16 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.
17 Avenida Bento Gonçalves, 9090, Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS, CEP 91540-000.
18 Brazil.

19 E. O. Cirne-Lima

20 Biologist, PhD, Professor, Departament of Clinical Patology. Laboratory of Embriology
21 and celular diferenciacion, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de
22 Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

23
24 M.V. Brun

25 Veterinary, PhD, Professor, Department of Small Animals, Hospital Veterinário,
26 Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Hospital Veterinário Universitário,
27 prédio 97B, UFSM - Av. Roraima, 1.000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brazil.

28

29 **Abstract**

30 The natural orifices transluminal endoscopic surgery (NOTES) represent a new surgery
31 concept, characterized by the absence of abdominal incisions. The most commonly used
32 accesses are the transvaginal and the transgastric. However, the transcolonic and
33 transrectal routes are promising alternatives. To evaluate the feasibility of the transrectal
34 NOTES technique in three swines subjected to liver biopsy and its clinical and
35 hematologic implications. A transversal incision was made on the rectum for the
36 passage of the endoscope into the abdominal cavity in three swines for liver biopsy.
37 There were no clinical alterations and no signs of peritonitis, adherence or dehiscence
38 of the suture at the necropsy in all animals. The transrectal NOTES in porcine model is
39 feasible and showed no important implications, representing an alternative access route
40 for liver biopsy.

41 **Keywords:** endoscopic surgery, endoscopy, rectal access.

42

43 *Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery* (NOTES) is a surgical
44 technique produced from combination of endoscopy and laparoscopy to diagnose and
45 treat abdominal diseases, characterized by absence of abdominal incisions (Rattner and
46 Kaloo, 2006).

47 The NOTES approach has several proposed benefits including potentially
48 decreased abdominal pain, wound infections, and hernia formation (Seid, et al, 2008;

49 Shin and Kaloo, 2009). The most common routes for NOTES are transvaginal and
50 transoral/transgastric; however, the viability of transurethral, transcolonic and
51 transrectal routes have been studied (Lima et al, 2008; Seid et al, 2008; Alcaraz et al,
52 2009; Santos-Filho et al, 2009; Bazzi et al, 2011).

53 Therefore, this work aimed at evaluating the viability of the transrectal NOTES
54 in a swine model subjected to liver biopsy and its clinical and hematological
55 repercussions.

56 All the procedures were conducted at the Faculty of Veterinary Medicine of the
57 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), in accordance with the standards
58 issued by the ethics and research committee of the same university, protocol number
59 23376.

60 Three swines were used in the experiment - two females and one male, 120 days
61 old, weighting 40 ± 5 kg..

62 All animals were restricted from food 30 hour. The bowel preparation included the
63 administration of $0,23 \text{ mg.kg}^{-1}$, bisacodyl and 12 mg.kg^{-1} of mannitol 20% ^b, both per
64 oral 48 and 24 hours prior to the surgical procedure.

65 The surgical procedure was conducted under general anesthesia. The animals
66 were first sedated with intramuscular dose of a mixture containing 15 mg.kg^{-1} ketamine,
67 1 mg.kg^{-1} of midazolam and 3 mg.kg^{-1} meperidine. Anesthesia was induced with
68 intravenous (i.v) dose of 5 mg.kg^{-1} of propofol. After endotracheal intubation,
69 anesthesia was maintained with isoflurane 1-5% inhaled. All the animals were given
70 ceftriaxone (30 mg.kg^{-1} , i.v) immediately after the liver biopsy.

71 The animals were positioned in left lateral decubitus. The rectum was cleaned
72 with mechanically emptied, intestinal washing with 500 mL of iodine
73 polyvinylpyrrolidone (PVP-I) 0,1% and 140 mL fleet enemas.

74 The abdominal cavity is insufflated using a *Veress* needle with medicinal CO₂ (2
75 L.min⁻¹, pressure kept at 12 mmHg). The rectum was pulled out and three repair points
76 were inserted with nylon 3-0. Under direct visualization, a 3 cm transverse incision was
77 made, 5 cm distant from the anal sphincter (Fig. 1). A Kelly straight forceps was placed
78 in order to divulsion the pelvic adjacent tissues. A flexible colonoscope (Pentax®) with
79 14 mm in diameter and 150 cm length was, then, inserted through the anus into the
80 rectal incision until reaching the abdominal cavity. The animals were positioned in
81 dorsal decubitus and in *Trendelenburg* position seeking to keep the ventral wall of the
82 abdominal cavity in focus, so the abdominal viscera could be located with special
83 attention being paid to the hepatic lobes (Fig. 2). Sterile biopsy forceps with 2 mm in
84 diameter were introduced through the working channels to grasp and pull a hepatic
85 fragment collected in the edge of the left lateral liver lobe. The specimen was
86 immediately immersed in transport medium with *brain heart infusion* (BHI) broth, for
87 microbiological analysis and sent to bacteriologic culture. The samples were incubated
88 in aerobiosis at 37°C for 120 hours. The sample with bacterial growth in BHI broth was
89 seeded on blood agar supplemented with 5% sheep blood and on MacConkey agar and
90 incubated at 37°C under microaerophilic condition, for 24 to 72 hours [14].

91 The rectal wound was closed under direct visualization using conventional
92 instruments. Each animal received a different kind of suture. The first swine (number1)
93 received a suture in two planes (simple isolated points and running 3-0 inabsorbable
94 suture). Swine number 2 received a polypropylene synthetic mesh measuring 3 x 3 cm

95 that was accommodated in the serous region and sutured to it in simple isolated points
96 with polyglactin 910 3-0. A simple continuous suture was done on the submucosal layer
97 with the same suture. On the third swine, it was used bovine pericardium membrane
98 conserved on 98% glycerin, first immersed in NaCl 0,9% solution for 15 minutes and,
99 then, molded (3 cm x 3 cm) and accommodated in the serous portion of the rectum and
100 sutured with polyglactin 910 3-0, in simple isolated pattern. Finally, this animal
101 received a simple continuous pattern suture in the submucosa region with the same
102 wire.

103 After the surgical procedure, an abdominocentesis was performed in order to
104 withdraw the remaining abdominal medical CO₂. During the postoperative, the animals
105 were given metronidazole (10 mg.kg⁻¹, bid), cephalexin (13 mg.kg⁻¹ bid) for five days,
106 meloxicam (0,05 mg.kg⁻¹, bid), and tramadol hydrochloride ⁿ (2,5 mg.kg⁻¹ bid), both for
107 three days. All the drugs postoperative were administered orally.

108 For the swines hematologic evaluation, blood was collected from the superior
109 vena cava in two occasions - before the surgical procedure and at the seven day of the
110 postoperative. After the clinical evaluation period of 20 days, the animals were
111 euthanized.

112 As from the date of the surgical procedure, the animals were evaluated daily
113 regarding abdominal pain on palpation, dyschezia, hematochezia, appetite and water
114 ingestion, in addition to the evaluation of mucosa and rectal temperature.

115 For that, initial sedation was achieved using tiletamine associated with
116 zolazepam ^o (2mg.kg⁻¹, i.m), morphine (0,3 mg. kg⁻¹, i.m), sodium thiopental 2,5%
117 (approximate dosage 30 mg.kg⁻¹, i.v) and induction of cardiorespiratory arrest with
118 potassium chloride.

119 During the necropsy, liver and rectal scars, the presence of dehiscence of the
120 rectal suture, abdominal adhesences and peritonitis signs were evaluated
121 macroscopically. A hepatic fragment was collected for microbiologic analysis. The
122 bacterial identification was based on colony morphology, microscopic morphology and
123 biochemical tests (Quinn et al, 2011).

124 For the three swines subjected to the liver biopsy procedure via transrectal
125 NOTES, the possibility of conducting the entire surgical procedure without any trans
126 and postoperative interurrences was verified.

127 The absence of abdominal adhesences and signs of peritonitis during the
128 necropsy procedure suggest that, among other features, the technique applied promoted
129 a proper bowel preparation, leading to a reduction of the rectal content and the
130 consequent reduction of the bacterial count that could be carried into the cavity and
131 cause inflammatory signs preceding peritonitis. Other factors that could justify the
132 absence of adhesences in the animals subjected to this study are the absence of
133 abdominal incision, since most of the adhesences are situated at the abdominal access
134 (Shin and Kaloo, 2009), added to the type of procedure associated to the few
135 manipulations.

136 Another advantage of the transrectal access observed in this work is the
137 possibility of performing the approach incision on the exposed portion of the viscera,
138 therefore, under direct visualization, similarly to what was done by Bazzi et al. (2011).
139 This access allows the use of conventional sutures and/or rectal reinforcements. If this
140 conditions shows necessary, with meshes or membranes, preventing the need for
141 specialized devices.

142 Regarding the hematologic alterations, only swine number 1 showed significant
143 increase in the total leukocytes count. However, it is worth stressing that this animal
144 was the only male among two other females, showing dominant behavior. Thus, it is
145 reasonable to assume that this alteration could be due to the contention stress. The other
146 two animals presented normal test results.

147 The presence exclusively of *Staphylococcus* sp in the liver fragment collected
148 during the surgical procedure can be due to translocation from the skin with the
149 insertion of the *Veress* needle or of the endoscope or biopsy forceps, this bacteria are
150 commonly found in the normal skin flora (Scott et al, 2011; Sood et al, 2012).

151 The transrectal NOTES procedure for liver biopsy in live porcine model is
152 possible, with a fast recovery, without any clinical and hematologic consequences.

153

154 **References**

155

156 1. Rattner D., Kalloo A., 2006. ASGE/SAGES working Group on Natural Orifice
157 Translumenal Endoscopic Surgery. *Surgical Endoscopy* 20, 329-333.

158 2. Seid, V.E., Araujo, E.A., Caravatto, P.P.P., Kiss D.R., 2008. NOTES: presente e
159 futuro – uma breve revisão. *Einstein* 6, 99-101.

160 3. Shin EJ, Kalloo NA., 2009. Transcolonic NOTES: Current Experience and Potential
161 Implications for Urologic Applications. *Journal of Endourology* 23,743-746.

162 8. Lima, E., Rolanda, C., Correia-Pinto, J., 2008. Transvesical endoscopic
163 peritoneoscopy: a novel 5 mm port for intra-abdominal scarless surgery. *J Urol* 2, 802-
164 805.

- 165 9. Alacaraz, A., Peri, L., Molina, A., Goicoechea, I., Garcia, E., Izquierdo, L., Ribal, M.,
166 2009. Feasibility of Transvaginal NOTES-Assisted Laparoscopic Nephrectomy. Eur
167 Urol 3205, 1-5.
- 168 10. Santos-Filho, P.V., Santos, M.P., Menezes, J.E.M.T., 2009. Surgery endoscópica
169 transluminal por orifícios naturais: realidade atual. Revista do Colégio Brasileiro de
170 Surgery 36,167-172.
- 171 11. Bazzi, W.M., Wagner, O., Stroup, S.P., Silberstein, N.B., Belkind, N., Katagiri, T.,
172 Paleari, J., Duro, A., Ramamoorthy, S., Talamini, M.A, Horgan, S., Derweesh, I.H.,
173 2011. Tranrectal hybrid natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES)
174 nephrectomy in a porcine model. Urol 77, 518-523.
- 175 14. Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., Fitzpatrick, E.S., Fanning, S., Hartigan,
176 P.J., 2011. Veterinary microbiology and microbial disease. In: Quinn PJ, Markey BK,
177 Leonard FC, Fitzpatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ (eds)Veterinary microbiology and
178 microbial disease, 2nd edition, Iowa, USA.
- 179 20. Scott, D.W., Miller, W.H., Griffin, C.E., 2001. Bacterial skin disease. In:___ Small
180 animal dermatology. Pennsylvania: Saunders. cap. 4, p. 274-335.
- 181 21. Sood, V., Collins, C., Harrington, S., Hahn, A., Ata, A., Mapara-Shah, Wang, W.,
182 Dunnican, W., 2012. Transgastric endoscopic pneumoperitoneum versus laparoscopy:
183 effects on host systemic and peritoneal inflammatory responses in a porcine model. Surg
184 Endosc 26, 189-196.
- 185
186
187
188
189

190

191

192

193

194

195

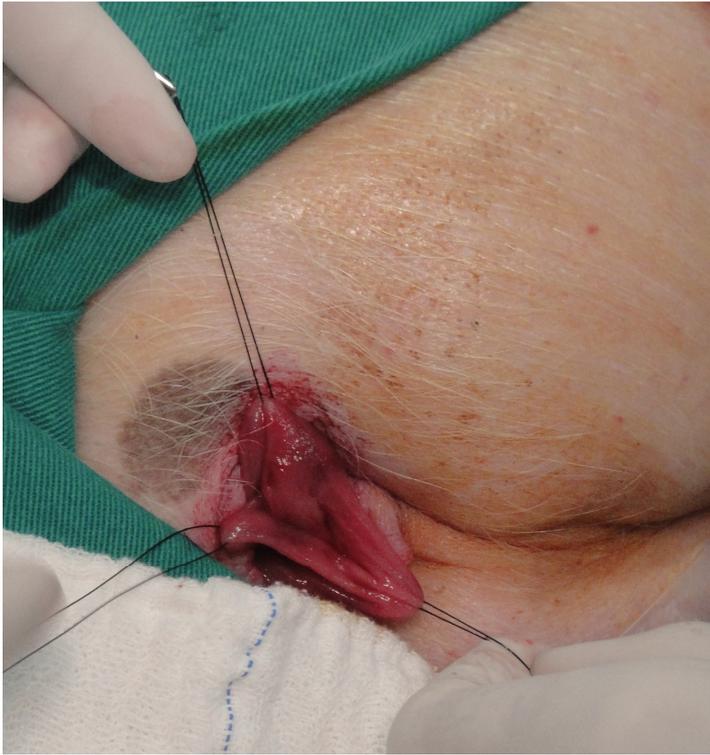
196

197

198

199

200



201

202

Fig 1- The mucosal rectal is pull out through three repair points for the rectal incision under direct visualization

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

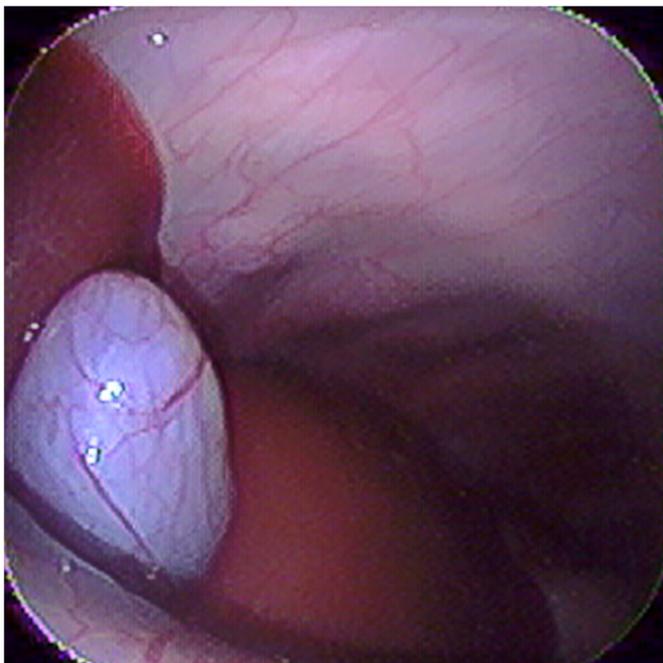


Fig 2- Endoscopic view of the liver and gallbladder before the biopsy.

4. CAPÍTULO 3

Resposta Inflamatória da associação da cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais (NOTES) pelo acesso transretal com a terapia por células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo em suínos

Anelise Bonilla Trindade; Carlos Afonso de Castro Beck; Priscila Regina Guerra, Naila Cristina Duda, Fabiana Schiochet; Tuane Nerissa Garcez, Priscila Zlotowski, Fernanda dos Santos de Oliveira, Monnalyza Cadore Gonçalves, Daniel Guimarães Gerardi; Elizabeth Obino Cirne-Lima; Emerson Antonio Contesini

Manuscrito a ser submetido para a revista
Surgical Endoscopy

1 **Resposta inflamatória da associação da cirurgia endoscópica transluminal por**
2 **orifícios naturais (NOTES) pelo acesso transretal com a terapia por células-tronco**
3 **mesenquimais em suínos**

4 *Inflammatory response of natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES)*
5 *with mesenchymal stem cell therapy in a transrectal access in a porcine model*

6
7 Anelise Bonilla Trindade¹; Carlos Afonso de Castro Beck²; Priscila Regina Guerra,
8 Naila Cristina Duda, Fabiana Schiochet¹; Tuane Nerissa Garcez, Monnalyza Cadori
9 Gonçalves; Daniel Guimarães Gerardi²; Elizabeth Obino Cirne-Lima^{2,3}; Emerson
10 Antonio Contesini²

11 **Resumo**

12 *Introdução:* A cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais (NOTES) é uma
13 nova, e potencialmente menos invasiva, possibilidade alternativa para a cirurgia
14 laparoscópica. Porém o risco de contaminação das cavidades corporais pelo acesso pode
15 favorecer o aumento nos biomarcadores inflamatórios sistêmicos. Portanto, o uso
16 adjuvante da terapia celular poderá facilitar a evolução na cicatrização de tecidos, além
17 de reduzir a resposta inflamatória. Este trabalho objetiva avaliar os efeitos inflamatórios
18 da associação da NOTES transretal com o emprego de células tronco mesenquimais em
19 suínos.

20 *Metodologia:* Dez animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: GNOTES
21 (sem a terapia com células-tronco mesenquimais) e GNOTES+MSC (com aplicação de
22 células-tronco mesenquimais). Amostras de sangue e do fluído de lavagem peritoneal
23 foram coletadas para análise de biomarcadores inflamatórios e crescimento
24 microbiológico. Os níveis de interleucina-6 (IL-6) séricos foram quantificados usando o
25 teste ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*); a proteína C reativa ultrasensível
26 foi quantificada pelo método de imunotubidimetria; a albumina foi dosada por
27 intermédio de análise bioquímica. A histologia do reto foi realizada com coloração de
28 hematoxilina-eosina (HE), tricrômico de Masson (TM) e microscopia eletrônica de
29 varredura (MEV).

30 *Resultados:* A IL-6 foi indetectável em ambos os grupos. Houve um aumento
31 significativo na albumina do GNOTES+MSC no t=24h ($p=0,03$) em relação ao
32 GNOTES. A PCR e a contaminação bacteriana foram similares em ambos os grupos.

33 Na técnica de HE, houve redução significativa ($p<0,05$) de células inflamatórias na
34 camada muscular do GNOTES+MSC.

35 *Conclusões:* Os efeitos imunomoduladores da técnica NOTES e da associação da
36 NOTES com a terapia celular são semelhantes em ambos os grupos, contudo, a
37 utilização das células-tronco mesenquimais promoveu maior efeito anti-inflamatório
38 local, observado na camada muscular do reto.

39 **Palavras-chave:** cirurgia transluminal, cirurgia endoscópica, interleucina, terapia
40 celular, cicatrização retal.

41

42 **Abstract**

43 *Introduction/Background:* Natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES) is
44 a novel and likely less invasive alternative to laparoscopic surgery. Yet, the risk of
45 contamination of body cavities may favor systemic inflammation. Since cellular therapy
46 can facilitate tissue healing, its adjuvant use may attenuate inflammatory responses. The
47 inflammatory effects of associating mesenchymal stem cells (MSC) to transretal
48 NOTES were evaluated in a porcine model.

49 *Methods:* Ten animals were randomly assigned to one of two groups: NOTES or
50 NOTES+MSC. The only difference between the treatments was the use of adjuvant
51 local stem cell therapy in the NOTES+MSC group. Blood samples and peritoneal
52 lavage fluid were collected for inflammatory biomarkers analyses and microbiological
53 culture, respectively. Serum concentrations of interleukin-6 (IL-6) were determined by
54 *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), while serum levels of C-reactive protein
55 (CRP) were measured by immunoturbidimetry. Albumin was quantified in the serum
56 and peritoneal fluid by biochemical assays. Histopathological evaluation of the rectum
57 was performed by hemotoxilin-eosin (HE) and Masson's trichrome stains and through
58 scanning electron microscopy (SEM).

59 *Results:* IL-6 levels were not detected in any of the groups. A significant increase in the
60 serum albumin level ($p=0,03$) was observed in the NOTES+MSC group after 24h of the
61 surgical procedure. CRP concentrations and microbiological growth did not differ
62 between groups. An statistical lower amount of inflammatory cells ($p<0,05$) was noticed
63 in the rectum muscular layer of the NOTES+MSC group by the HE staining.

64 *Conclusion:* Cytokine activity after NOTES with and without local stem cells therapy is
65 similar; however, local inflammatory cellular response is diminished in the muscular
66 layer of rectum with the use of mesenchymal stem cells.

67 **Key words:** transluminal surgery, endoscopic surgery, interleukin, cell therapy, rectal
68 healing

69

70 **Introdução**

71 Um trauma cirúrgico ou uma infecção promovem uma série de reações
72 inflamatórias no organismo as quais objetivam limitar o dano tecidual, restaurar a
73 estrutura lesionada e/ou eliminar os patógenos [1,2].

74 Todavia, de acordo com a severidade cirúrgica, um aumento exacerbado na
75 concentração sistêmica de citocinas inflamatórias [3] pode, por sua vez promover
76 efeitos deletérios, levando o paciente a apresentar sinais de taquicardia, taquipneia,
77 leucocitose e febre [4].

78 Alguns biomarcadores inflamatórios como a proteína C reativa, interleucina 1 e
79 interleucina 6, apresentam seus níveis séricos baixos, reconhecidos como benéficos por
80 atuarem como imunomoduladores, porém seus níveis elevados cursam com a piora no
81 quadro clínico [5,1].

82 Neste contexto, a cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais
83 (NOTES) significa um novo conceito de cirurgia, onde podem se combinaram duas
84 abordagens cirúrgicas guiadas por imagens: a endoscopia flexível e as cirurgias
85 laparoscópicas, culminando em uma modalidade cirúrgica marcada pela ausência de
86 incisões abdominais [6,7,8] com decorrente redução da resposta inflamatória [9].

87 As vias utilizadas para a NOTES são a via transvaginal, a transuretral, a
88 transgástrica, a transcolônica e a transretal [10, 11, 12,13], sendo esta última ainda
89 pouco explorada.

90 O acesso transretal pode representar método promissor para os procedimentos
91 NOTES sendo que suas principais vantagens em relação às outras vias são: a rápida
92 visualização da cavidade abdominal, o melhor alcance e estabilidade do endoscópio
93 dentro do abdome e, principalmente, a produção de maior orifício para retirada de
94 espécimes de tecidos ou massas. Entretanto, um dos requisitos mais importantes para a
95 sua realização é a necessidade de fechamento seguro da víscera de acesso e, com

96 adequada cicatrização, pois o extravasamento de conteúdo fecal na cavidade anula
97 quaisquer vantagens desta nova abordagem cirúrgica [13,14]

98 Apesar de ter sido demonstrada reduzida concentração de marcadores
99 inflamatórios na técnica NOTES, ainda não foram estudados os efeitos das citocinas e
100 proteínas de fase aguda com o acesso transretal, bem como a qualidade de cicatrização
101 das camadas do reto associada à terapia celular. Portanto, o estudo da união de novas
102 técnicas cirúrgicas com terapias diferenciadas, com intuito de proporcionar rápida e
103 efetiva cicatrização de órgãos e tecidos é uma alternativa com possibilidades de
104 resultados promissores.

105 As células-tronco mesenquimais (MSC= *mesenchymal stem cells*), ou células
106 estromais multipotentes, são um grupo de células clonogênicas (Abdallah & Kassen,
107 2008), capazes de suportar a hematopoiese e de se diferenciar em diversas linhagens
108 celulares [16]. As MSCs apresentam alta plasticidade, facilidade de cultivo por serem
109 aderentes, podendo ser isoladas, principalmente, da medula óssea e do tecido adiposo
110 (Pereira et al., 2008). Possuem capacidade de diferenciação multipotente *in vitro*, com
111 morfologia semelhante ao fibroblasto [18].

112 Recentemente, as MSCs foram exploradas pela medicina regenerativa não
113 somente pelo seu potencial de diferenciação e reparo de lesões teciduais, mas também
114 por apresentarem capacidade imunomodulatória em tecidos naturalmente contaminados
115 [19].

116 Assim, o presente trabalho avaliou os efeitos inflamatórios e regenerativos da
117 técnica NOTES transretal e de sua associação com células tronco mesenquimais
118 derivadas de tecido adiposo em modelo experimental suíno.

119

120

121 **Material e Métodos**

122

123 *Animais*

124

125 Este trabalho foi avaliado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do
126 Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), sob protocolo de número 130148 e da
127 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) sob protocolo número 23376,

128 seguindo princípios e normas para a utilização de animais experimentais. Os
129 procedimentos que envolveram o uso de animais foram realizados no Hospital de
130 Clínicas Veterinárias da UFRGS e o cultivo celular e exames laboratoriais foram
131 realizados no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do Hospital de
132 Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

133 Foram utilizados 11 suínos originários do cruzamento das raças Landrace e
134 Large White, hígidos, do sexo feminino, pesando $20,26\text{kg} \pm 2,97$ de massa corporal,
135 com aproximadamente 90 dias de idade, provenientes do Setor de Suinocultura da
136 Faculdade de Veterinária (FAVET)-UFRGS.

137 Os animais passaram por um período de adaptação ambiental mínimo de 60 dias
138 no Hospital Veterinário da FAVET-UFRGS, onde receberam como alimentação ração
139 comercial peletizada de crescimento específica para suínos. Foram alocados em baias
140 com no máximo dois animais, todos com a mesma dieta e acesso ilimitado à água. Sete
141 dias antes do procedimento cirúrgico, foi realizado, em cada animal, exame
142 parasitológico de fezes e exame parasitológico da maravalha. Estando negativo, foram
143 encaminhados para o procedimento cirúrgico.

144 Os suínos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de igual número:
145 Grupo NOTES (GNOTES) e grupo NOTES associado a células-tronco mesenquimais
146 (GNOTES+MSC), sendo que apenas o grupo NOTES+MSC recebeu a terapia celular
147 com células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo subcutâneo.

148

149 *Estabelecimento de culturas primárias*

150

151 A gordura subcutânea (10 g) foi colhida, sob anestesia geral, a partir da área
152 abdominal ventral de um suíno do sexo feminino, sem raça definida com idade
153 aproximada de 70 dias, apresentando hérnia umbilical, sendo o tecido adiposo coletado
154 de forma estéril no momento da herniorrafia umbilical. A amostra foi transportada para
155 o Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do HCPA a uma temperatura de
156 4°C , imersa em solução Dulbecco tamponada com bicarbonato (DMEN; Gibco, Grand
157 Island, NY, EUA) contendo 200 U / mL de penicilina e 200 μg / mL de estreptomicina
158 (P / S; Gibco). O tecido foi fragmentado com lâminas de bisturi em uma placa de *Petry*,
159 lavado com PBS e passado para um tubo falcon.

160 Adipócitos foram separados do estroma e fração vascular por centrifugação a
161 110 G durante 5 min.

162 A amostra foi homogeneizada com um volume igual de colagenase 1 mg/mL
163 tipo I (255 UI / ml; Gibco) em DPBS com 1% de albumina de soro bovino num agitador
164 (vórtex) e em seguida colocada em banho-maria a 37° C, homogeneizando e amostra no
165 vórtex a cada cinco minutos durante 30 minutos. Após este período, para inativar a
166 colagenase, a amostra foi retirada do aquecimento lento e uniforme para receber meio
167 DMEN 20% três vezes o volume inicial de gordura perfazendo uma concentração de
168 3:1. O tubo foi centrifugado durante 10 minutos a 600 G (2000 rpm) e o sobrenadante
169 foi desprezado. O *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de meio DMEN 20%, sendo
170 plaqueado em uma placa com seis poços. Cada poço foi completado com mais 1 mL de
171 meio com glucose e suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB; Hyclone), 100 U /
172 ml de penicilina, 100 µg /ml de estreptomicina e 2,5 µg / mL de Fungizone em um meio
173 com 75-cm², sendo incubadas a 39 °C em 5% de CO₂ [20].

174

175 *Manutenção de cultura de células*

176

177 Meio fresco foi fornecido a cada 3-4 dias. Na confluência de 70-90%, células
178 adiposas foram passadas por tripsinização, foram contadas usando um hemacitômetro e
179 ressemeadas a uma concentração inicial de 6.700 células / cm². Duplicações da
180 população foram calculadas a cada passagem através da seguinte equação: log
181 (concentração final / concentração inicial) x 3,33. Também o ciclo celular e
182 comprimento foram calculados com base na equação seguinte: número de dias em
183 cultura / população duplicações. As células foram passadas até a senescência replicativa
184 ser observada. A senescência replicativa foi alcançada quando as células deixaram de se
185 dividir, sendo definidas por uma mudança na morfologia celular de alongadas,
186 fusiformes para achatadas, irregulares com citoplasma disperso e com o aparecimento
187 de vacúolos citoplasmáticos [20].

188

189

190

191

192 *Capacidade clonogência*

193

194 As células foram isoladas de acordo com o procedimento acima descritos e
195 plaqueadas

196 (Passagem 0) em aproximadamente 5 células / cm² em 10 mL de meio de expansão
197 numa placa de 100-mm de cultura e incubadas a 39 ° C em 5% de CO₂. As células
198 aderentes que formaram colônias após 10 dias em cultura, o halo foi selecionado para a
199 clonagem (passagem 0) com base nos seguintes critérios: colônias contendo pelo menos
200 100 células, sendo localizadas por meio da verificação de um campo microscópico de
201 todas as outras colônias. As células passaram então por tripsinização e foram
202 ressemeadas numa placa de cultura 1,9 cm² (Passagem 1); em confluência de 70-90%,
203 foram passadas para uma placa de cultura de 9,62 cm² (passagem 2) e, após, para uma
204 placa com 25 cm (passagem 3). Posteriormente foram passadas para uma placa de 75
205 cm (passagem 4).

206

207 *Diferenciação de culturas primárias e clones*

208

209 Na confluência de 70-90% (seguidas de 4 passagens), as células foram passadas
210 por tripsinização e cultivadas durante 21 dias em meio de cultura anteriormente citada
211 para induzir a diferenciação. O meio de cultura foi trocado a cada três a quatro dias
212 durante todo o estudo. Para adipogênese, as células foram cultivadas em um a quatro
213 dias em meio de diferenciação contendo DMEM suplementado com 3% de SFB, 100 U
214 / mL de penicilina e 100 µg / mL de estreptomicina, 2,5 µg / mL de fungizona, 10 ng /
215 mL de insulina, 10⁻⁹ M de dexametasona, 250 µM isobutilo metilxantina e 0,2 mM
216 indometacina. O meio de cultura para além de quatro dias continha DMEM com SFB a
217 3%, 100 U / ml de penicilina e 100 µg / ml de estreptomicina, 2,5µg / ml de fungizona,
218 10 ng / ml de insulina e 10⁻⁹ M de dexametasona.

219

220 Para a condrogênese, as células continuaram sendo cultivadas até a duração da
221 diferenciação em meio contendo DMEM com 10% de SFB, 100 U / mL de penicilina e
222 100 µg / mL de estreptomicina, 2,5 µg / mL de Fungizone, 6,25 µg / mL de insulina, 10
ng / ml de transformador do fator β de crescimento e 10⁻⁹ dexametasona M.

223 Para a osteogênese, as células foram cultivadas em meio de diferenciação
224 contendo DMEM com 10% de FBS, 100 U / mL de penicilina e 100 µg / mL de
225 estreptomicina, 2,5 µg / mL de fungizona, 10 mM β-glicerofosfato, 50 ng / ml de ácido
226 ascórbico e 10^{-9} M de dexametasona.

227 Técnicas de coloração histológica foram utilizadas para determinar a
228 diferenciação celular. Nilo vermelho formou uma mancha que detecta acúmulo de
229 lipídios intracelulares e foi utilizado para determinar a diferenciação de adipócitos.
230 Safranina O foi incorporada para identificar os glicosaminoglicanos na matriz
231 extracelular dos condrócitos diferenciados. Após a indução da osteogênese, o vermelho
232 de alizarina S foi empregado para detectar depósito de cálcio mineralizado.

233

234 *Preparação pré-operatória e Anestesia*

235

236 Os animais de ambos os grupos foram submetidos à redução gradual da
237 alimentação, iniciando com dieta pastosa (300 g) no período compreendido de 36 horas
238 antes do procedimento cirúrgico, sendo realizado jejum total de sólidos, sem jejum
239 hídrico, de 20 horas. Para a limpeza intestinal, os suínos receberam bisacodil (0,5
240 mg.kg⁻¹) por via oral, e Manitol 0,5% (10 mL. kg⁻¹), 48 e 24 horas prévios ao
241 procedimento cirúrgico.

242 Para evitar catabolismo proteico, os animais receberam reposição calórica 827,5
243 kcal ou 207.000 mg de glicose por via oral, cinco horas antes do procedimento.

244 Para a realização da NOTES transretal, todos os animais foram submetidos à
245 anestesia geral, que constou como medicação pré-anestésica a associação de quetamina
246 (15 mg.kg⁻¹), midazolam (0,5 mg.kg⁻¹) e cloridrato de petidina (3 mg.kg⁻¹), todos
247 administrados por via intramuscular. Com os animais sedados, o acesso venoso foi
248 realizado pela cateterização percutânea da veia marginal da orelha, administrando-se
249 solução de NaCl 0,9% (10 mL.kg.h⁻¹), com equipo macrogotas. Os suínos foram
250 induzidos à anestesia geral com propofol (5 mg.kg⁻¹, IV). Na sequência, foi instilada
251 lidocaína sem vasoconstritor a 1% na região da glote (1 mL) e posteriormente, os
252 animais foram intubados com sonda endotraqueal número 5,0. Procedeu-se então, a
253 vaporização de isoflurano em oxigênio 100% a 2 L.min⁻¹ para a manutenção do plano
254 anestésico a 2 V% em sistema semiaberto. Em seguida, os animais tiveram o reto

255 esvaziado manualmente, acrescido de lavagem intestinal com 500 mL de solução de
256 iodopovidona (PVPI) 0,1%.

257 Durante todo o procedimento cirúrgico, foram monitoradas a frequência
258 cardíaca, a frequência respiratória, a oximetria, a capnografia e a temperatura corporal
259 interna em todos os animais por meio de um monitor multiparamétrico (Datex-Ohmeda
260 s/ 5_TM – Finlândia).

261

262 *Procedimento cirúrgico*

263

264 Para o acesso abdominal foi utilizado um colonoscópio flexível da marca
265 Pentax®, medindo 150 cm de comprimento e 14 mm de diâmetro com um canal de
266 trabalho.

267 Os animais foram colocados inicialmente em decúbito dorsal para a realização
268 do pneumoperitônio, o qual foi obtido anteriormente à incisão retal, por meio da
269 insuflação com CO₂ medicinal acoplada à agulha de *Veress* inserida na parede
270 abdominal 2 cm craniais à cicatriz abdominal, a uma pressão de 12 mmHg e na
271 velocidade de 2 L.min⁻¹. A incisão cirúrgica da mucosa retal ocorreu com o suíno em
272 decúbito lateral esquerdo (Fig.1A) através da tração e exteriorização da mucosa retal,
273 sendo produzida transversalmente na mucosa retal, de aproximadamente 3 cm, com
274 localização aproximada de 5 cm do esfíncter anal.

275 Posteriormente, o endoscópio foi introduzido através do ânus e, na sequência,
276 inserido através do orifício retal criado cirurgicamente, sendo o paciente posicionado
277 novamente em decúbito dorsal (Fig. 1B), procurando-se manter, sob visualização, a
278 parede ventral da cavidade abdominal para, posteriormente, localizar as vísceras
279 abdominais. O endoscópio foi mantido por um período de 15 minutos na cavidade
280 abdominal para localizar as vísceras abdominais e logo em seguida foi removido.

281 A sutura retal foi realizada sob visualização direta, em plano único, extra-
282 mucoso, com padrão contínuo simples na região serosa, muscular e submucosa com fio
283 poliglactina 910 3-0.

284 Os animais do GNOTES+MSC receberam o transplante de 1×10^7 células-
285 tronco mesenquimais em um volume total de 0,5 mL. Os animais do GNOTES
286 receberam 0,5 mL de PBS. Em ambos os grupos, o volume de 0,5 mL foi aplicado ao

287 redor de toda a incisão cirúrgica retal, com agulha 12,7 x 0,33 mm, a uma profundidade
288 de aproximadamente 5 mm no tecido, totalizando 10 aplicações.

289

290 *Procedimentos pós-operatórios*

291

292 Para controle da dor pós-operatória, os animais receberam, ao final da cirurgia
293 e nos três dias subsequentes, cloridrato de tramadol (3 mg.kg⁻¹ v.o, b.i.d).

294 A partir da data do procedimento cirúrgico (dia zero), os animais foram
295 avaliados diariamente quanto à disquezia, hematoquezia, apetite e ingesta de água, além
296 da avaliação da temperatura corporal.

297

298 *Avaliação dos Biomarcadores inflamatórios*

299

300 Amostras de sangue foram coletadas da veia cava cranial, em frascos estéreis
301 com e sem ácido etilenodiamínico tetra-acético (EDTA) para posteriores exames de
302 hemograma, albumina, proteína C reativa e interleucina-6 respectivamente. Assim
303 obteve-se os valores dos biomarcadores inflamatórios em diferentes momentos: antes do
304 procedimento cirúrgico (tempo= 0) , subsequentemente 1 hora após o término da
305 cirurgia (tempo= 1) , 24 horas (tempo= 2), 48 horas (tempo= 3), 72 horas (tempo= 4), 7
306 dias (tempo= 5) e 14 dias (tempo= 6). As amostras foram congeladas a -80° C até sua
307 análise. Para a avaliação dos níveis de citocina no soro, utilizou-se o método *enzyme-*
308 *linked immunosorbent assay kit* (ELISA) para interleucina 6 (IL-6 quantikan *kit*; Uscn
309 Life Science Inc, Houston, Texas, USA) com detecção mínima de 5,1 pg/mL.

310 A proteína C reativa (PCR) ultrasensível foi mensurada a partir do soro dos
311 animais, pelo método de imunoturbidimetria intensificada por látex (ADVIA®
312 Chemistry, Siemens Healthcare Diagnostics Inc.) nos tempos 0= basal, 2= 24h, 3= 48h,
313 4= 72h.

314

315 *Eutanásia*

316

317 A eutanásia dos animais foi efetuada no 14° dia de pós-operatório, seguindo
318 condutas regulamentadas em leis estaduais e federais de ética na experimentação animal

319 (CFMV- resolução 714/02 e lei federal 11794). A sedação inicial foi realizada com
320 quetamina (15 mg.kg^{-1}) associada ao midazolam ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) e morfina ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$),
321 ambos por via i.m. Em seguida, foi acessada a veia marginal da orelha para a aplicação
322 de sobredose de propofol até atingir um efeito anestésico desejado seguido-se então com
323 a administração de cloreto de potássio.

324

325 *Avaliação Microbiológica por meio do Lavado peritoneal*

326

327 Para verificar a presença de microrganismos na cavidade abdominal, a análise
328 microbiológica foi realizada por meio do um lavado peritoneal previamente ao
329 procedimento cirúrgico e no momento da eutanásia (14 dias de pós-operatório). Ambos
330 obtidos com o animal sob anestesia geral.

331 Para o lavado peritoneal, foi infundida 250 mL de solução de NaCl 0,9%, estéril
332 no abdome. A solução recuperada foi encaminhada para o Laboratório de Medicina
333 Veterinária Preventiva da UFRGS onde foi centrifugada a 1018G durante 15 minutos,
334 sendo que sedimento obtido ressuspendido em 0,1 mL de solução salina estéril. O
335 volume de 10 μL da amostra foi distribuído nos seguintes meios de cultura: (1) ágar
336 sangue suplementado com 5% de sangue ovino (incubação aeróbica e microaerofila);
337 (2) ágar TSA- *trypticase soy agar* (incubação aeróbica e microaerofila); (3) ágar
338 MacConkey (incubação aeróbica); (4) Caldo Tioglicolato (incubação aeróbica e
339 anaeróbica); (5) Caldo BHI- *Brain Heart Infusion* (incubação aeróbica e microaerofila);
340 (6) ágar SPS- *Sulfite Polymyxin Sulfadiazine* (incubação anaeróbica). Todas as amostras
341 foram incubadas a 37°C em condições atmosféricas apropriadas, durante 48 a 120
342 horas. As amostras que apresentaram crescimento bacteriano nos meios de cultura
343 descritos foram identificadas de acordo com a observação macroscópica das colônias, a
344 morfologia microscópica e os testes bioquímicos, segundo Holt et al. (1994) [21].

345 Todos os animais receberam ampicilina (30 mg.kg^{-1}), como
346 antibioticoprofilaxia, por via intravenosa (IV) imediatamente após a primeira lavagem
347 abdominal para evitar interferência no exame microbiológico realizado no líquido
348 recuperado.

349

350

351 *Avaliação macroscópica*

352

353 Foi realizada a necropsia do animal a fim de avaliar a cavidade abdominal
354 procurando-se evidências de peritonite, sangramentos, perfurações, aderências ou
355 abscessos que possam ter sido provocados pelo acesso retal.

356 O sítio de sutura retal foi avaliado diretamente quanto à viabilidade da técnica de
357 sutura utilizada, deiscência ou necrose local.

358

359 *Avaliação microscópica*

360

361 Amostras do reto, do linfonodo mesentérico e do omento foram coletadas e
362 fixadas em solução de formalina 10%, sendo uma segunda amostra do reto também
363 fixada em glutaraldeído 2,5%, por um período mínimo de 24 horas, as quais foram
364 submetidas ao processamento histológico. Foram realizados cortes transversais dos
365 fragmentos de reto, na área da sutura e em áreas adjacentes. As amostras foram
366 processadas pelas técnicas de rotina histológica e emblocadas em parafina. Os cortes
367 histológicos foram realizados em micrótomo manual a cinco micras e corados pela
368 técnica de hematoxilina e eosina [22] e tricrômico de Masson, conforme protocolo do
369 fabricante (EasyPath).

370 Os parâmetros morfológicos avaliados nos cortes histológicos foram: presença
371 de necrose; de exsudato neutrofílico, macrófagos, células mononucleares e colágeno nas
372 camadas mucosa, muscular e serosa. Para os parâmetros necrose, exsudato neutrofílico,
373 presença de macrófagos e, células mononucleares (quando presentes), aplicou-se uma
374 escala de 0 a 3: 0- quando o parâmetro estava ausente; 1- quando discretos; 2- quando
375 moderado; 3- quanto intenso. O colágeno foi graduado em zero quando ausente e um
376 quando presente.

377 As amostras do reto fixadas em glutaraldeído 2,5%, com tampão cacodilato de
378 sódio 0,1M e pH 7,4, durante o tempo mínimo de 8 horas a temperatura de 4° C e a
379 temperatura ambiente durante sete dias. Foram então submetidas à microscopia de
380 varredura para análise da superfície do tecido retal de forma tridimensional.

381 O preparo e as análises das amostras foram realizados junto ao Centro de
382 Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CME-UFRGS).

383 As amostras, após serem fixadas, foram submetidas a uma nova lavagem em solução
384 tampão de cacodilato de sódio e desidratadas em concentrações ascendentes de álcool
385 etílico (30, 50, 70, 85, 90, 95 e 100%) e acetona P.A. (100%), sendo mantidas nas
386 soluções por um período de 15 minutos, para cada concentração repetindo três vezes
387 este protocolo nas concentrações de 100%.

388 Posteriormente, as amostras foram secas em secador de ponto crítico, utilizando
389 dióxido de carbono líquido. Foram fixadas em porta-espécime, com fita condutiva de
390 cola de carbono e metalizadas no metalizador com uma camada de ouro e paládio de 35
391 nm de espessura em íon *sputter coater* durante dois minutos. Na sequência, cada
392 amostra foi analisada no microscópio eletrônico de varredura operado com 10 kv com
393 aumentos entre 55 e 950 vezes.

394

395 *Análise estatística*

396

397 Os dados não paramétricos foram descritos como mediana e intervalo interquartil.

398 Para a análise dos resultados histológicos quanto à presença de células
399 mononucleares, neutrófilos, macrófagos, necrose e colágeno em cada camada do reto,
400 foi utilizado o teste Mann-Whitney.

401 Para a avaliação da temperatura corporal dos animais nos tempos 2 (24 horas)
402 após o procedimento, tempo 3 (48 horas), tempo 4 (72 horas) e tempo 5 (7 dias), foi
403 aplicado o teste de equações de estimação generalizadas (GEE). Este mesmo teste foi
404 aplicado para as variáveis de leucócitos totais, eritrócitos, hematócrito, albumina nos
405 tempos 0, 2, 3, 4, 5 e 6 e a proteína C reativa ultrasensível nos tempos 0, 2, 3, 4.

406 Em todos os testes, o nível de significância adotado foi de 5%. Desta forma, foram
407 consideradas diferenças significantes aquelas cujos valores foram abaixo de 0,05 ($p < 0,05$).
408 As análises foram realizadas através do programa SPSS versão 20.0.

409

410

411

412

413

414

415

416 **Resultados**

417

418 *Caracterização das MSCs de tecido adiposo subcutâneo de suíno*

419

420 A utilização de 10 gramas de tecido adiposo do subcutâneo da região abdominal
421 ventral de um suíno foi efetiva para o cultivo e diferenciação das células-tronco
422 mesenquimais.

423

424 *Aspectos técnicos do procedimento cirúrgico*

425

426 O tempo total do procedimento incluindo o pneumoperitônio foi de 67,7
427 $\pm 23,3$ min.; e o tempo do procedimento endoscópico sem o pneumoperitônio foi de
428 48 ± 20 min.

429 A utilização de suínos como modelo experimental para o procedimento NOTES
430 transretal para acesso a cavidade abdominal, mostrou-se eficaz, visto que em todos os
431 animais foi possível realizar todo o procedimento cirúrgico, não havendo óbito
432 decorrente da cirurgia.

433 A cirurgia, pelo acesso transretal, apresentou algumas dificuldades e
434 complicações. Para realizar o pneumoperitônio de forma controlada através da
435 introdução de agulha de *Veress*, dois animais apresentaram enfisema subcutâneo
436 durante o trans e pós-operatório imediato e, em dois animais a agulha de *Veress* foi
437 introduzida de forma iatrogênica no ceco e no estômago respectivamente.

438 Na maioria dos animais (7/10), houve dificuldade para recuperar o líquido
439 infundido na cavidade abdominal para a realização dos lavados abdominais. Durante o
440 primeiro lavado, houve a infusão iatrogênica de líquido no interior do ceco.

441 Houve dificuldade para a introdução do endoscópio por meio do orifício criado
442 no reto em dois animais. Um animal apresentou sangramento retal excessivo durante a
443 confecção do orifício retal.

444

445

446

447

448 *Procedimentos pós-operatórios*

449

450 Nenhum animal apresentou sinais de disquezia ou hematoquezia, mantendo-se
451 com apetite e ingestão de água normalmente. As mucosas permaneceram rosadas durante
452 todas as avaliações clínicas. Um animal apresentou edema da mucosa retal, com leve
453 protrusão da mesma ao realizar esforço no pós-operatório imediato. Este edema foi auto
454 limitante sendo reduzido espontaneamente 24 horas após o procedimento.

455 A temperatura dos animais foi diferente estatisticamente no decorrer do tempo
456 em ambos os grupos, porém, não houve diferenças entre os grupos. A média dos valores
457 encontra-se na figura 2.

458

459 *Avaliação Microbiológica*

460

461 No lavado abdominal realizado previamente ao início do procedimento NOTES,
462 dois animais do GNOTES e dois do GNOTES+MSC foram positivos para a presença de
463 bactérias. Um animal GNOTES foi positivo para *Staphylococcus* sp. e o outro positivo
464 para *Escherichia coli*. Já no GNOTES+MSC, um animal apresentou *Klebsiella* sp e o
465 outro *Escherichia coli*. Nenhum destes suínos foram positivos no segundo lavado,
466 realizado 14 dias após o procedimento.

467

468 *Avaliação Hematológica*

469

470 Nas avaliações hematológicas, para a variável eritrócito, não houve diferenças
471 estatísticas entre os grupos nos diferentes tempos.

472 O hematócrito 14 dias foi significativamente maior que o hematócrito basal
473 ($p=0,04$) nos animais do GNOTES.

474 Os leucócitos totais não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos no
475 decorrer dos tempos, mantendo-se sempre dentro dos valores normais para a espécie.

476

477

478

479

Biomarcadores inflamatórios

A IL- 6, avaliada nos tempos: t= 0, t= 1 h, t= 24h, t= 48h, t= 72 h, t= 7 dias, t= 14 dias apresentou níveis indetectáveis em todos os animais de ambos os grupos.

A albumina manteve-se dentro dos valores normais de referência em ambos os grupos e em todos os tempos avaliados. Houve diferença estatística apenas no GNOTES+MSC ao comparar a média da albumina 24h ($25,31 \pm 1,37$ g/L) com a média dos valores de 14 dias ($21,80 \pm 0,75$) após o procedimento em que ocorreu uma redução significativa ($p=0,03$) no momento da eutanásia (Fig. 3).

A proteína C reativa avaliada nos tempos: t= basal, t= 24h, t=48h e t= 72h, aumentou significativamente no decorrer do tempo do grupo NOTES ($p= 0,036$, $p= 0,00$, $p= 0,00$), respectivamente, quando comparada com os valores basais. Também, no grupo NOTES+MSC, ocorreu um aumento significativo quando comparada com valores basais ($p=0,001$, $p= 0,00$, $p= 0,00$) nessa ordem. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos (Fig. 4).

Avaliação Macroscópica

À necropsia, macroscopicamente, o local de acesso retal apresentava-se cicatrizado em nove de 10 animais (Fig. 5), sendo que nenhum animal apresentou aderência principalmente da bexiga ao local da viscerotomia retal. Não foram constatados sinais de peritonite.

Um animal do GNOTES apresentou deiscência de sutura retal, não havendo cicatrização do reto no local de inserção do endoscópio, porém, o mesmo não apresentava quaisquer sinais de disquezia, hematoquezia ou hipertermia, sendo esta alteração verificada somente *pots mortem*.

Avaliação Microscópica

Na avaliação da quantidade de células mononucleares do reto, quantidade de neutrófilos, tecido conjuntivo e necrose na mucosa retal não foi significativamente diferente entre os grupos. Na região muscular do reto o grupo NOTES apresentou

512 aumento significativo na quantidade de neutrófilos ($p=0,018$), macrófagos ($p=0,028$) e
513 tecido conjuntivo ($p=0,014$). Na camada serosa, não foi observado diferença estatística
514 entre os grupos (Fig. 6A). Na microscopia eletrônica de varredura, percebeu-se
515 continuidade da mucosa e presença de bactérias (Fig.6B)

516 Quanto à presença de colágeno, não houve diferença estatística entre os grupos,
517 apresentando moderada quantidade em todos os animais.

518 Nenhum animal apresentou alterações no linfonodo mesentérico ou no omento.

519

520 **Discussão**

521

522 A cirurgia por orifícios naturais (NOTES) pode ser uma nova e potencialmente
523 menos invasiva alternativa para a cirurgia laparoscópica. No entanto, os problemas do
524 acesso e fechamento seguro da víscera são os principais obstáculos para a introdução
525 desta modalidade cirúrgica na medicina [8]. Para isso, o estudo da utilização da terapia
526 celular através do uso de células-tronco mesenquimais como terapia adjuvante na
527 cicatrização da víscera de acesso fez-se importante, já que o reto apresenta maior
528 dificuldade de cicatrização quando comparado com outros órgãos, por apresentar menor
529 quantidade de colágeno e contaminação fisiológica local o que dificulta o processo
530 cicatricial [23].

531 No que diz respeito à técnica NOTES via acesso através do reto, verificou-se a
532 possibilidade de realização de todo o procedimento cirúrgico, sendo possível localizar e
533 identificar as vísceras abdominais, o que demonstra exequibilidade dessa modalidade
534 cirúrgica.

535 Se por um lado a criação do pneumoperitônio, através da introdução de agulha
536 de *Veress*, previamente à incisão transluminal nos animais do presente estudo, evitou
537 alterações sistêmicas que poderiam ocorrer quando a pressão intra-abdominal é
538 realizada de forma descontrolada [24, 25], por outro a utilização da técnica fechada para
539 a distensão da cavidade abdominal implicou em complicações como a punção e
540 insuflação parcial inadvertida de duas vísceras ocas: o estômago e o ceco
541 respectivamente não obtiveram extravasamento de conteúdo gastrintestinal nos animais
542 e, essa condição não ocasionou repercussões clínicas ou hematológicas no pós-
543 operatório. Complicações na introdução da agulha de *Veress* são comumente relatadas

544 por alguns autores, devido a introdução da mesma ser “às cegas” [26], além disso, as
545 complicação podem ser justificadas pelas características anatômicas do suíno cujo
546 apresenta um ceco relativamente grande para a espécie [27], predispondo a punção desta
547 víscera.

548 A formação de enfisema subcutâneo observado no pós-operatório imediato em
549 dois animais é outra complicação comum de ocorrer [28] e, no presente estudo, a
550 mudança de posicionamento do animal na mesa cirúrgica durante o procedimento pode
551 ter facilitado a saída da agulha de *Veress* do local puncionado inicialmente.

552 A presença de sangramento retal durante o acesso em um suíno e edema retal no
553 pós-operatório imediato em outro, ambos do GNOTES+MSC, pode ser explicada pela
554 transfixação inadvertida da junção circulatória da artéria mesentérica caudal e artéria
555 pudenda interna, as quais suprem a parte caudal do reto [29]. Assim, a permeabilidade
556 capilar foi maior, causando extravasamento de líquidos para o espaço extracelular e,
557 consequentemente, o edema [30]. Por conseguinte, esta iatrogenia nos vasos levou a
558 uma rápida resposta inflamatória local, sendo o edema o sinal inicial.

559 Uma característica do acesso transretal foi a possibilidade da viscerorrafia ser
560 realizada através da exteriorização da mucosa retal e ser confeccionada sob visualização
561 direta, semelhantemente ao que foi realizado por Bazzi et al. (2011) [31]. Este acesso
562 possibilita o uso de suturas convencionais sem, no entanto, necessitar de aparelhos
563 especializados. Ademais, possibilitou a aplicação da terapia celular no sítio da lesão,
564 sendo a mesma, administrada em diferentes pontos da incisão.

565 Apesar da cirurgia por orifícios naturais ser considerada menos invasiva e,
566 consequentemente apresentar menor resposta inflamatória quando comparada à cirurgia
567 laparoscópica ou à convencional [26], a via transretal para a peritoneoscopia pode levar
568 a contaminação da cavidade abdominal com bactérias entéricas tornando este
569 procedimento mais imunorreativo. Os estudos sobre os efeitos imunomoduladores da
570 NOTES utilizaram a via transgástrica como modelo experimental para acesso à
571 cavidade abdominal [9, 32, 33], todavia nenhum deles compararam os efeitos
572 imunomoduladores da combinação da NOTES transretal com a terapia celular através
573 da inoculação de células-tronco mesenquimais, em razão de estas últimas também
574 apresentam efeitos anti-inflamatórios [34].

575 As MSCs são células multipotentes encontradas em diferentes tecidos de várias
576 espécies animais, incluindo suínos, sendo frequentemente utilizadas como transplantes
577 para a terapia celular. Muitos estudos prévios focaram as propriedades regenerativas das
578 MSCs e avaliaram evidências de que estas células podem promover a regeneração de
579 tecidos lesionados, como na cicatrização óssea [35] e, cutânea [36], no infarto do
580 miocárdio [37], na regeneração de nervo periférico [38, 39], dentre outras. Outrossim,
581 foi demonstrado que as MSCs derivadas de medula óssea ou do tecido adiposo
582 apresentam propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras [34], uma vez que
583 acumulam-se em tecidos inflamados, contribuindo para o reparo e diferenciação celular.

584 No entanto, a resposta inflamatória, apresentada pelos animais, observada por
585 meio da análise dos níveis de interleucina-6, proteína C reativa ultrasensível, albumina
586 sérica, e leucócitos totais, tanto do grupo NOTES quanto do grupo NOTES+MSC não
587 demonstrou diferenças nas variáveis estudadas, sendo que a IL-6 foi indetectável.

588 A interleucina-6 é uma citocina considerada pró e anti-inflamatória [1], e é
589 produzida por estimulação de mastócitos e macrófagos através de endotoxina
590 bacteriana. Regula a transição entre um processo dominado por neutrófilos, no início da
591 inflamação, e o predomínio de macrófagos, verificado em fases mais tardias da resposta
592 inflamatória [40]. Os dados encontrados demonstraram que o procedimento de NOTES
593 transretal, com uma incisão de aproximadamente 3 cm não estimula uma resposta
594 inflamatória detectável sistemicamente em ambos os grupos. Para aumentar a
595 sensibilidade do teste na detecção de citocinas, uma opção seria a detecção das mesmas
596 em uma fração do tecido local do reto ou a dosagem de IL no lavado abdominal, ao
597 invés do soro. Ainda assim, alguns autores [33] ao testarem a presença de IL-6 no fluido
598 peritoneal em pacientes submetidos à peritoneoscopia transgástrica, também
599 encontraram níveis indetectáveis desta citocina. McGee et al. (2008) sugeriram que a
600 não detecção da IL-6 pode ocorrer devido a uma imunoparalisia tardia mediada por
601 outros fatores desconhecidos, posto que estudos prévios identificaram um mecanismo
602 típico de imunoparalisia envolvendo regulação baixa de citocinas pró-inflamatórias
603 mediadas por um aumento de citocinas anti-inflamatórias IL - 10.

604 Outro imunomodulador estudado foi a proteína C reativa (PCR) que atua como
605 marcador de fase aguda, ativando a cascata do complemento e estimulando a fagocitose
606 por neutrófilos e macrófagos [5, 40]. No presente trabalho, houve aumento significativo

607 da PCR após o procedimento cirúrgico em ambos os grupos, com pico entre 24 h e 48 h,
608 sendo que seus valores começavam a apresentar redução gradual a partir de 72 h. Estes
609 dados, estão de acordo com Campos et al. (2005) [5] os quais citaram que a PCR
610 aumenta em um período de 4 a 12 horas após o procedimento, com pico entre 24 a 72
611 horas, posteriormente, retornando aos níveis basais gradualmente em duas semanas.
612 Acredita-se que seus níveis séricos, no período pós-operatório, foram correlacionados à
613 intensidade do trauma cirúrgico, sendo considerados baixos após cirurgia NOTES.
614 Ainda, a utilização de PCR ultrasensível detectou valores mais baixos do que os limites
615 dos métodos usuais, ou seja, foi possível constatar pequenas alterações inflamatórias,
616 sem repercussões clínicas nos animais avaliados [1] o que não seria possível com
617 métodos convencionais.

618 Pesquisas afirmaram [41] que os níveis de interleucina-6 e proteína C-reativa
619 durante o procedimento cirúrgico são significativamente inferiores na cirurgia
620 laparoscópica quando comparadas a cirurgia convencional. Portanto, é possível que
621 aspectos metabólicos à resposta aguda fossem atenuados na cirurgia transluminal, em
622 virtude do diminuto trauma tecidual, com conseqüente reduzida quimiotaxia de células
623 inflamatórias e destruição de células mesoteliais, com manutenção do número de
624 leucócitos totais em todos os animais e preservação da imunidade celular o que
625 proporcionou baixa resposta inflamatória observada sistemicamente [24].

626 Com relação à albumina avaliada no decorrer do tempo, não houve diferença
627 estatística entre os grupos, entretanto, houve uma redução significativa no
628 GNOTES+MSC no tempo 2 ($25,31 \pm 1,37$) com relação ao tempo 6 ($21,80 \pm 0,75$), porém,
629 sempre dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie. Isto pode ter ocorrido porque
630 inicialmente, os animais haviam passado por um preparo intestinal com jejum prévio de
631 20 horas, o que pode ter ocasionado desidratação inicial com decorrente aumento em
632 seus níveis séricos [1]. No tempo 6, os animais já haviam recuperado suas perdas
633 hidroeletrolíticas e, conseqüentemente, os níveis séricos poderiam ter sido reduzidos.

634 Todos os animais do experimento apresentaram boa recuperação pós-operatória
635 com normorexia, não apresentando disquezia, tenesmo ou hematoquezia. A temperatura
636 corporal dos animais, tanto no GNOTES quanto no GNOTES+MSC manteve-se dentro
637 dos parâmetros normais para a espécie já que leitões apresentam temperatura corporal

638 entre 38,9 a 40° C, diferentemente de fêmeas adultas as quais a temperatura normal é
639 menor, variando de 38,7 a 39,3° C [42].

640 Um importante fator para a realização da cirurgia por orifícios naturais é a
641 necessidade de reduzir o risco de contaminação do peritônio [43]. Para isso, o preparo
642 intestinal dos animais foi etapa importante já que se constatou eficiência na redução de
643 conteúdo fecal do preparo em todos os animais o que foi comprovado pela ausência de
644 peritonite em ambos os grupos.

645 A presença de bactérias no fluido de lavagem abdominal antes do procedimento
646 em três animais do GNOTES (3/7) e em dois animais do GNOTES+MSC (2/5) sugere
647 que houve contaminação durante de coleta do líquido peritoneal. No suíno 3 do
648 GNOTES e suíno 9 do GNOTES+MSC, em ambas coletas de fluido previamente ao
649 procedimento cirúrgico, houve crescimento de *Escherichia coli*. Durante a colheita do
650 fluido peritoneal do suíno 3, puncionou-se o ceco do animal. No suíno 9, apenas
651 observou-se alteração na coloração do líquido coletado, sendo que o mesmo apresentava
652 coloração levemente marrom, possivelmente devido a uma perfuração inadvertida em
653 alça intestinal. A mesma explicação pode ser dada para presença de *Klebsiella* sp no
654 líquido peritoneal previamente cirurgia em um suíno do GNOTES+MSC (1/5) em razão
655 deste gênero pertencer à família *Enterobacteriaceae* [44].

656 A justificativa encontrada para a presença de *Staphylococcus aureus* tanto do
657 GNOTES (2/5) e um do GNOTES+MSC (1/5) no fluido peritoneal antes do
658 procedimento e em dois animais do GNOTES (2/5) 14 dias após, sugere que houve
659 contaminação cutânea no momento da coleta por esta bactéria estar comumente presente
660 na flora da pele [45]. Dados semelhantes foram encontrados por Sood et al. (2012),
661 onde estes autores observaram além de *Staphylococcus* sp. e *Escherichia coli*, as
662 bactérias *Lactobacilli* sp., *Clostridium* sp e *Coryneform bacilli*.

663 Diferentemente de alguns autores [14] que utilizaram a técnica NOTES
664 transcolônica e encontraram aderências entre a bexiga e o cólon, no presente trabalho
665 não foram observados sinais de aderências, tampouco de peritonite, condição
666 confirmada pela análise histológica do linfonodo mesentérico e do omento em todos os
667 animais. Estes resultados sugerem que a limpeza intestinal estava adequada, reduzindo a
668 chance de carrear bactérias do reto para a cavidade abdominal através do endoscópio,

669 permitindo ausência de incisão cutânea, dado que a maioria das aderências tem como
670 sítio a incisão abdominal [46] associada a não manipulação de vísceras abdominais.

671 Ainda, a utilização de padrão de sutura contínuo em plano único contribuiu para
672 a cicatrização retal, posto que macroscopicamente a maioria dos animais apresentaram
673 boa regeneração da víscera de acesso. Esta manobra está de acordo com alguns autores
674 que ressaltaram que as anastomoses em plano único, além de serem mais anatômicas,
675 apresentam revascularização mais precoce, são seguras e produzem menor estreitamento
676 luminal, oferecendo melhores condições para a cicatrização. Apesar disso, um animal
677 do GNOTES apresentou deiscência da sutura retal, sendo as características da ferida
678 confirmada na microscopia já que foi observado necrose da região serosa do reto, sendo
679 o único animal a apresentar tal alteração. Deiscências em suturas intestinais podem
680 ocorrer como complicação cirúrgica, em razão de infecção local ou distante exerce
681 efeito inibitório sobre a cicatrização de feridas, esta pode determinar inflamação
682 excessiva e aumentar a atividade da colagenase, contribuindo para deiscência da sutura
683 [47].

684 Na histologia do reto, não houve diferenças estatísticas entre os grupos quanto a
685 quantidade de células mononucleares, de neutrófilos, de macrófagos, de colágeno e
686 necrose nas camadas mucosa, submucosa e serosa. Porém, na camada muscular houve
687 diferença estatística, sendo observado menor quantidade de células inflamatórias no
688 GNOTES+MSC. Este fato sugere que as MSCs exógenas promoveram aceleração no
689 processo de cicatrização retal, uma vez que, ao ocorrer a lesão inicial os primeiros
690 elementos celulares a alcançar o local da ferida são os neutrófilos e os monócitos, com a
691 função de desbridar a superfície da ferida, fagocitar as partículas antigênicas e corpos
692 estranhos, no caso de a regeneração não ocorre até que a infecção seja controlada. Os
693 neutrófilos morrem durante uma resposta inflamatória e são fagocitados por macrófagos
694 [40]. Portanto, a redução significativa no número de células inflamatórias na camada
695 muscular do reto sugere fase inflamatória mais avançada, o que pode ter ocorrido
696 devido às propriedades regenerativas e anti-inflamatórias das MSCs [34].

697

698

699

700

701 Conclusão

702

703 A técnica NOTES tranretal, associada ou não à terapia celular com células-
704 tronco mesenquimais no sítio da víscera de acesso, apresenta mínima resposta
705 inflamatória aguda, podendo ser uma via aplicável para peritoneoscopia em suínos.

706

707 Referências

708

709 1. Rosa Neto, NL; Carvalho, J.F (2009). O uso de provas de atividade inflamatória em
710 reumatologia. Rev Bras Reumatol 49: 413-30.

711 2. Kvarnström A, Swartling T, Kurlberg G, Bengtson J, Bengtsson A (2013) Pro-
712 inflammatory cytokine in rectal surgery: comparison between laparoscopic and open
713 surgical techniques. Arch. Immunol. Ther. Exp. 61: 407-411.

714 3. Kim TK, Yoon JR (2010) Comparison of the neuroendocrine and inflammatory
715 responses after laparoscopic and abdominal hysterectomy. Korean J Anesthesiol
716 59:265-269.

717 4. Herzum I, Renz H (2008) Inflammatory Markers in SIRS, Sepsis and Septic Shock
718 Current Medicinal Chemistry 15:581-587.

719 5. Campos FGCM, Cavaratto PPP, Araújo SEA (2005) Avaliação dos efeitos
720 imunológicos em operações colo-retais minimamente invasivas. Rev bras Coloproct, 3:
721 285-292.

722 6. Baron TH (2007) Natural orifice transluminal endoscopic surgery. British Journal of
723 Surgery, 1:01-02.

724

725 7. Denk PM, Swanström LL, Whiteford MH (2008) Transanal endoscopic platform for
726 natural orifice surgery. Gastrointest Endosc 68 (5):954-959.

727 8. Ryou M, Fong DG, Pai RD, Sauer J (2008) Evaluation of a novel access and closure
728 device for NOTES applications: a transcolônica survival study in porcine model.
729 Gastrointest Endosc 67:964-969.

730 9. McGee MF, Marks JM, Onders RP, Chak A, Jin J, Williams CP, Schomisch SJ,
731 Ponsky JL (2008) Complete endoscopic closure of gastrotomy after natural orifice
732 transluminal endoscopic surgery using the NDO plicator. Surg Endosc 22: 214-220.

- 733 10. Lima E, Rolanda C, Correia-Pinto J (2008) Transvesical endoscopic peritoneoscopy:
734 a novel 5 mm port for intra-abdominal scarless surgery. *J Urol* 2:802-805.
- 735 11. Seid VE, Araujo EA, Caravatto PPP, Kiss DR (2008) NOTES: presente e futuro –
736 uma breve revisão. *Einstein* 6: 99-101, 2008.
- 737 12. Alacaraz A, Peri L, Molina A, Goicoechea I, Garcia E, Izquierdo L, Ribal M (2009)
738 Feasibility of Transvaginal NOTES-Assisted Laparoscopic Nephrectomy. *Eur Urol*
739 3205: 1-5.
- 740 13. Santos-Filho PV, Santos MP, Menezes JEMT (2009) Surgery endoscópica
741 transluminal por orifícios naturais: realidade atual. *Revista do Colégio Brasileiro de*
742 *Surgery* 36:167-172.
- 743 14. Pai RD, Fong MD, Bundga ME, Odze RD, Rattner DW, Thompson MD (2006)
744 Transcolonic endoscopic cholecystectomy: a NOTES survival study in a porcine model
745 (with video). *Gastrointest Endosc* 64 (3):428-433.
- 746 15. Abdallah BM, Kassem M (2008) Human mesenchymal stem cells: from basic
747 biology to clinical applications. *Gene Therapy* 2:109-16, 2008.
- 748 16. Covas DT (2006) Células-tronco mesenquimais. In: Zago MA, Covas DT. *Células-*
749 *tronco: a nova fronteira da medicina*. São Paulo: Atheneu, p. 35-48.
- 750 17. Pereira ISO, Pontes P, Eça LP, Ferreira AT, Mazzetti PMV, Silva L, Souza FC
751 (2008) Protocolo piloto de separação e quantificação de células tronco de tecido adiposo
752 de coelhos para posterior uso em laringe. *ACTA ORL/Técnicas em*
753 *Otorrinolaringologia* 26: 11-16.
- 754 18. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL (2009) Características biológicas
755 das células-tronco mesenquimais. *RBHH* 31: 25-35.
- 756
- 757 19. Castelo-Branco MTL, Soares ID, Lopes DV, Buongusto F, Martinusso CA, Rosario
758 AJr, Souza SA, Gutfilen B, Fonseca LM, Elia C, Madi K, Schanaider A, Rossi MI,
759 Souza HS (2012) Intraperitoneal but not intravenous cryopreserved mesenchymal
760 stromal cells home to the inflamed colon and ameliorate experimental colitis. *Plos One*
761 7:1-12, 2012.
- 762 20. Williams KJ, Picou AA, Kish SL, Giraldo AM, Godke RA, Bondioli KR (2008)
763 Isolation and Characterization of Porcine Adipose Tissue-Derived Adult Stem Cells.
764 *Cells Tissues Organs* 188: 251-258.

- 765 21. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (2004) .In:___ Bergey's
766 Manual of Determinative Bacteriology. 9th.ed. Baltimore, USA, 1994. p. 1134.
- 767 22. Prophet EB, Mills R (1992) Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Forces
768 Institute of Pathology, Washington, DC. P.279.
- 769 23. Soares-Júnior C, Souza C, Gomes CA, Soares FFTP (2010) Fatores intervenientes e
770 métodos de avaliação das anastomoses gastrointestinais. Rev Med Minas Gerais 3: 354-
771 58.
- 772 24. Cohen RV, Pinheiro-Filho JC, Schiavon CA, Correa JLL (2003) Alterações
773 sistêmicas e metabólicas da surgery laparoscópica. Rev Bras de Videocir 2:77-81.
- 774 25. Ko CW, Shin EJ, Buscaglia JM, Clarke JO, Magno P, Giday SA, Chung SS, Cotton
775 PB, Gostout CJ, Hawes RH, Pasricha PJ, Kalloo AN, Kantsevov SV (2007) Preliminary
776 pneumoperitoneum facilitates transgastric access into the peritoneal cavity for natural
777 orifice transluminal endoscopic surgery: a pilot study in a live porcine model model.
778 Endosc 39: 849-853.
- 779 26. Minami S, Okamoto Y, Eguchi H, Kato K (1997) Laparoscopic assisted
780 ovariohysterectomy in two dogs with pyometra. J. Vet. Med. Sci.59:845-847.
- 781 27. Dyce KM, et al. O sistema digestório. In: ____ . Tratado de anatomia veterinária. Rio
782 de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap.8. p. 206-257.
- 783 28. Campos FGCM, Roll S (2003) Complicações do Acesso Abdominal e do
784 Pneumoperitônio em Cirurgia Laparoscópica - Causas, Prevenção & Tratamento. Rev.
785 Bras. Vídeo-cir 1: 21-28.
- 786 29. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (2007) Pathology of domestic animals In: Jubb
787 KVF, Kennedy PC, Palmer N. Alimentoar Sistem. New York and London: Saunders, v.2,
788 cap.1, p.2340.
- 789 30. Tazima MFGS, Vicente YAMVA, Moria T (2008) Biologia da ferida e cicatrização.
790 Medicina, Ribeirão Preto 3 259-264.
- 791 31. Bazzi WM, Wagner O, Stroup SP, Silberstein NB, Belkind N, Katagiri T, Paleari J,
792 Duro A, Ramamoorthy S, Talamini MA, Horgan S, Derweesh IH (2011) Transrectal
793 hybrid natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES) nephrectomy in a
794 porcine model. Urol 77(3):518-523.
- 795 32. Trunzo JA, McGee MF, Cavazzola LT, Schomish S, Nikfarjam M, Bailey J, Mishra
796 T, Poulouse BK, Lee Y, Ponsky JL, Marks JM (2010) Peritoneal inflammatory response

- 797 of natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES) versus laparoscopy with
798 carbon dioxide and air pneumoperitoneum. *Surg Endosc* 24: 1727-1736.
- 799 33. Sood V, Collins C, Harrington S, Hahn A, Ata A, Mapara-Shah, Wang W,
800 Dunnican W (2012) Transgastric endoscopic pneumoperitoneum versus laparoscopy:
801 effects on host systemic and peritoneal inflammatory responses in a porcine model. *Surg*
802 *Endosc* 26:189-196.
- 803 34. Kuo Y-R, Chen C-C, Goto S, Huanh Y-T, Wang C-T, Tsai C-C, Chen C-L (2012)
804 Immunoimodulatory effects of bone-marrow mesenchymal stem cells in a swine hemi-
805 facial allotransplantation model. *Plos one* 7: 1-10.
- 806 35. Gomes C, Paz AH, Bonilla AT, Corrêa A, Cavalcante RL, Veiga D, Colomé LM,
807 Foerstnow LP, Contesini EA, Cirne-Lima EO (2011) Bone regeneration in mandible
808 defect with autograft bone and cell suspension from bone marrows in rabbit *Arq. Bras.*
809 *Med. Vet. Zootec.* 63: 836-843.
- 810 36. Lu W, Zhang YJ, Jin Y (2009) Potential of Stem Cells for Skin Regeneration
811 Following Burns. *Expert Rev Dermatol* 2: 97-99.
- 812 37. Schuster MD, Martens TP, Itescu S (2008) Células-tronco mesenquimais para
813 reparo cardíaco. *Rev. Bras. Cardiol. Invasiva* 16: 95-111.
- 814 38. Colomé LM, Gomes C, Crosignani N, Paz AH, Lugo AA, Guimarães KM,
815 Foerstrow, LP, Tessari JP, Colomé LM, Graça DL, Meurer L, Passos EP, Pippi NL,
816 Contesini, EA, Cirne-Lima EO (2008) Utilização de células-tronco autólogas de medula
817 óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com
818 prótese de silicone. *Ciência Rural* 38, 2529-2534.
- 819 39. Trindade AB, Elizeire MB, Silva PG, Gerardi DG, Contesini EA (2011) Influência
820 da fração mononuclear autóloga de medula óssea na evolução da marcha de coelhos
821 submetidos a neurraxia *MedVep* 9:576-578.
- 822 40. Tizzard IR (2009) Como se inicia a inflamação. In: __ *Imunologia Veterinária*. Rio
823 de Janeiro: Elsevier. cap.2, p. 11-27.
- 824 41. Jakeways MSR, Mitchell V, Hashim IA, Chadwick SJD, Shenkin A, Green1 CJ,
825 Carli F (1994) Metabolic and inflammatory responses after open or laparoscopic
826 cholecystectomy. *BJS* 81: 127-131.

- 827 42. Houston, DM, Radostits, OM. O exame clínico. in: Radostits, OM., Mayhew, IGJ,
828 Houston, DM. Exame clínico e diagnóstico em veterinária. Guanabara Koogan, 2002.
829 cap.6, p. 71-97.
- 830 43. Narula VK, Happel LC, Volt K, Bergman S, Roland JC, Dettorre R, Renton DB,
831 Reavis KM, Needleman BJ, Mikami DJ, Ellison EC, Melvin WS, Hazey JW (2009)
832 Transgastric endoscopic peritoneoscopy does not require decontamination of the
833 stomach in humans. Surg Endosc 23:1331–1336.
- 834 44. Almeida FS, Rigobelo EC, Marin JM, Maluta RP, Ávila FA (2007) Diarreia suína:
835 estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados em
836 leitões na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. Ars Veterinaria 23:151-157.
- 837 45. Scott DW, Miller WH, Griffin, CE (2001) Bacterial skin disease. In: __ Small
838 animal dermatology. Pennsylvania: Saunders. cap. 4, p. 274-335.
- 839 46. Shin EJ, Kaloo AN (2009) Transcolonic NOTES: Current Experience and Potential
840 Implications for Urologic Applications. Journal of Endourology, 23:743-47.
- 841 47. Bezutti, MT, Féres O, Dorival A, Campos FA, Rocha JJR, Garcia RS, Joviliano
842 OFD (2002) Cicatrização de anastomoses colônicas na vigência de obstrução intestinal.
843 estudo experimental em ratos. Acta Cir Bras, 17:109-115.
- 844
- 845
- 846
- 847
- 848
- 849
- 850
- 851
- 852
- 853
- 854
- 855
- 856
- 857
- 858

859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888

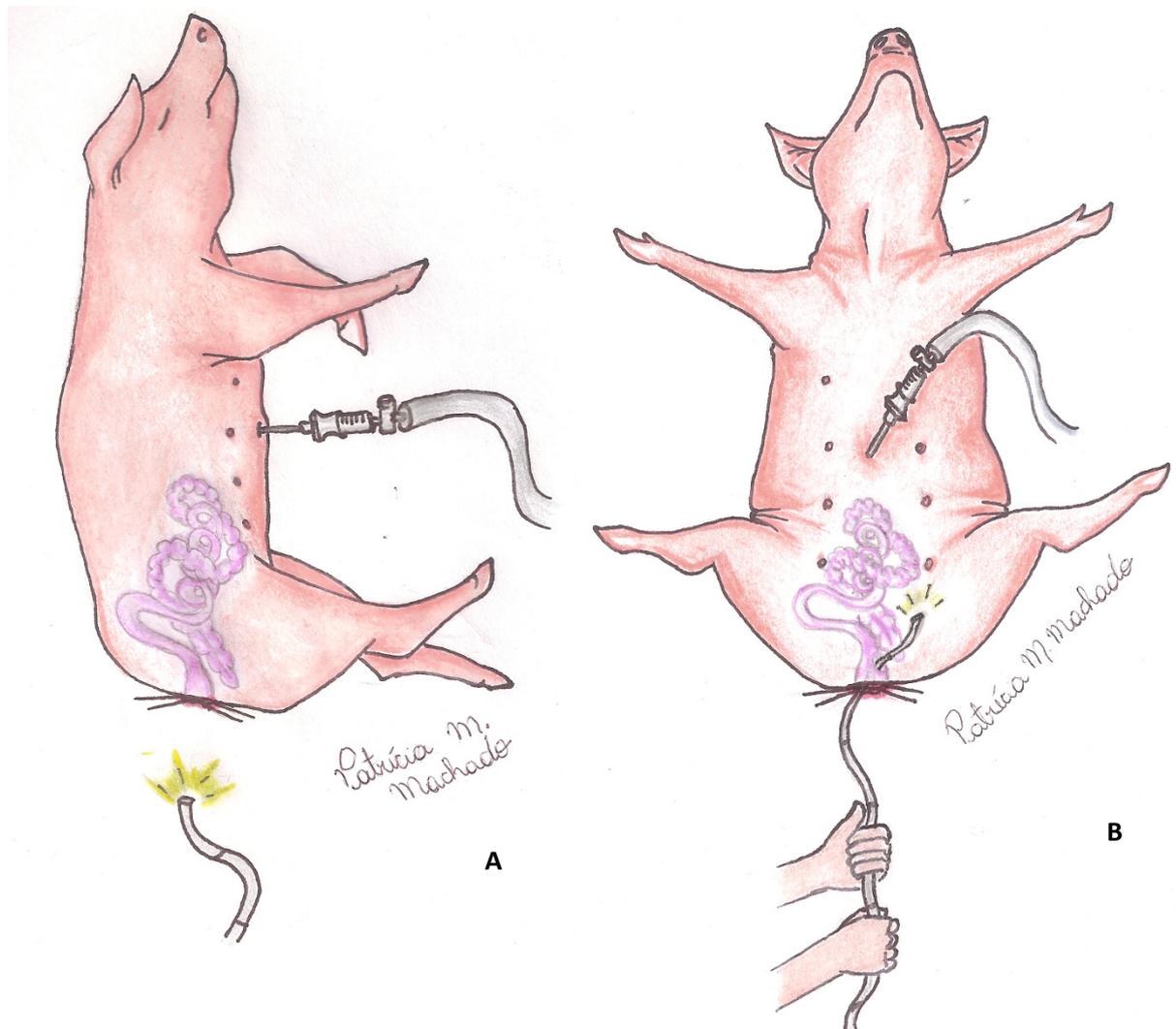


Figura 1: Posicionamento do suíno para a cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais (NOTES) pelo acesso transretal. **(A)** A agulha de Veress inserida, a obtenção do pneumoperitônio foi alcançada, em decúbito lateral esquerdo e os pontos de reparo na mucosa retal foram tracionados para a inserção do endoscópio através do orifício retal criado. **(B)** Com o endoscópio na cavidade abdominal, o animal é posicionado em decúbito dorsal para melhor identificação dos órgãos.

889

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

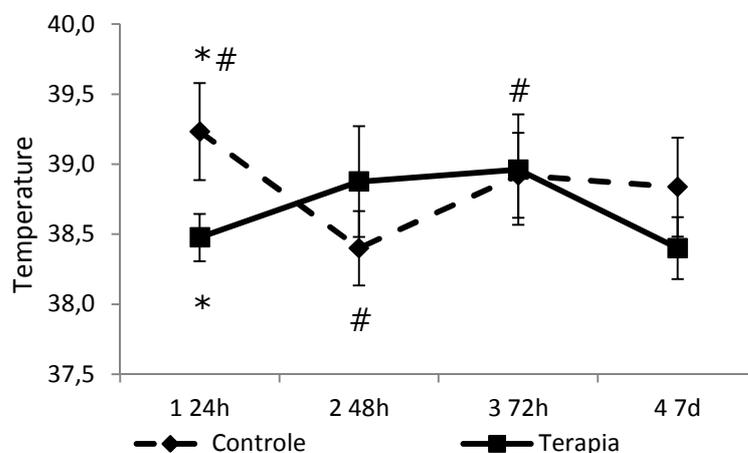


Figura 2- Média dos valores de temperatura dos animais do grupo NOTES e grupo NOTES+MSC. * Representa diferença estatística entre os grupos ($p=0,04$). # Representa variação de temperatura no decorrer do tempo entre animais do mesmo grupo NOTES ($p=0,00$).

905

906

907

908

909

910

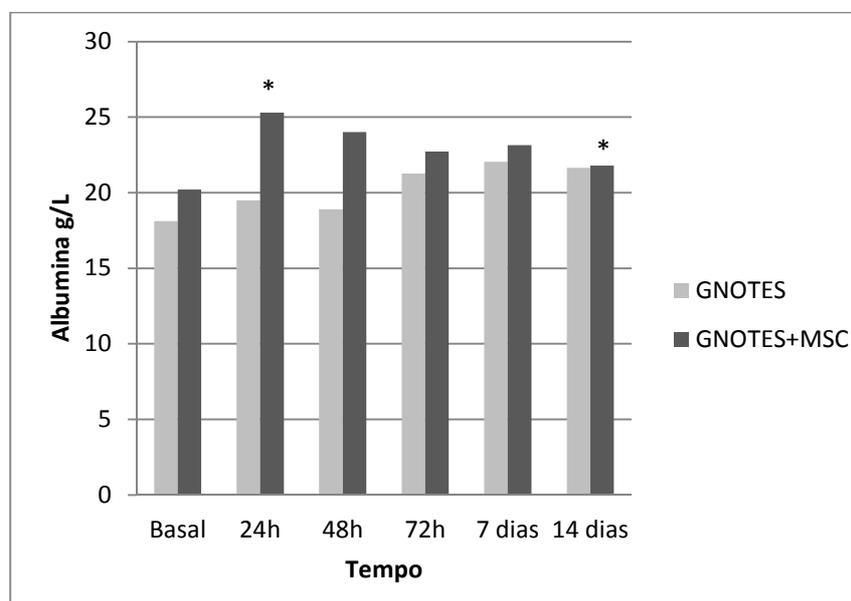
911

912

913

914

915



916

Figura 3- Valores médios da variável albumina no decorrer dos tempos do GNOTES e GNOTES+MSC. *Representa diferença estatística entre animais do mesmo grupo com $p= 0,03$.

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

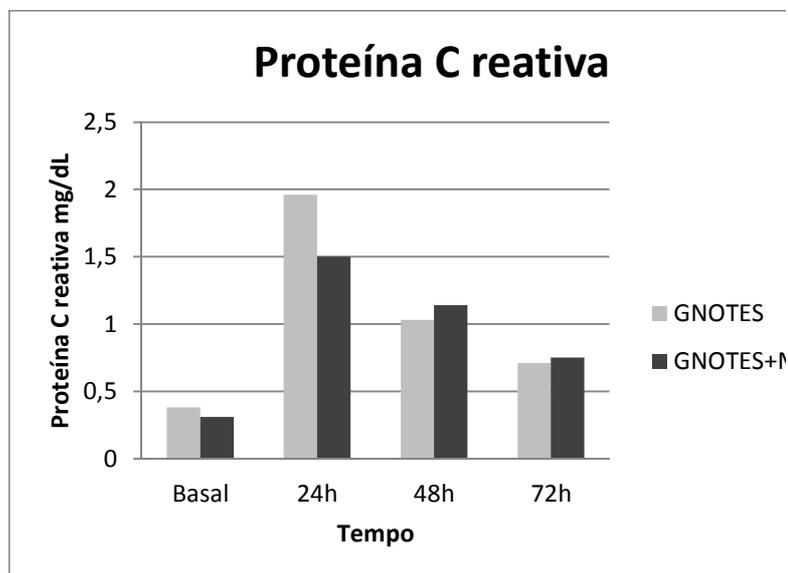
930

931

932

933

934



935

Figura 4- Valores médios da variável proteína C reativa ultrasensível no decorrer dos tempos do GNOTES e GNOTES+MSC.

937

938

939

940

941

942

943

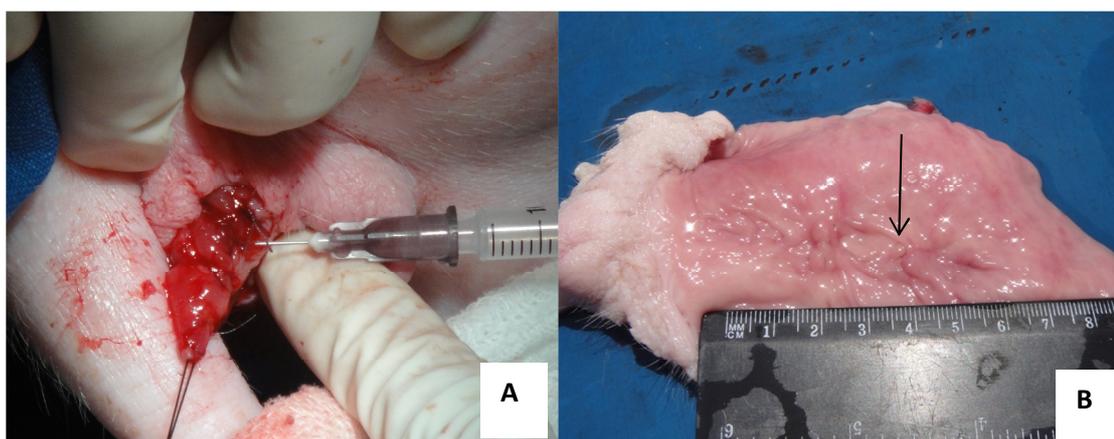
944

945

946

947

948



949

Figura 5: Local de acesso no reto. (A) Aplicação das células-tronco mesenquimais no reto dos suínos submetidos a NOTES transretal imediatamente ao término do procedimento endoscópico. (B) Avaliação macroscópica da cicatrização retal de um suíno submetido a cirurgia transluminal por orifício natural pelo acesso transretal. Observar mucosa retal macroscopicamente cicatrizada (seta).

950

951

952

953

954

955

956

957

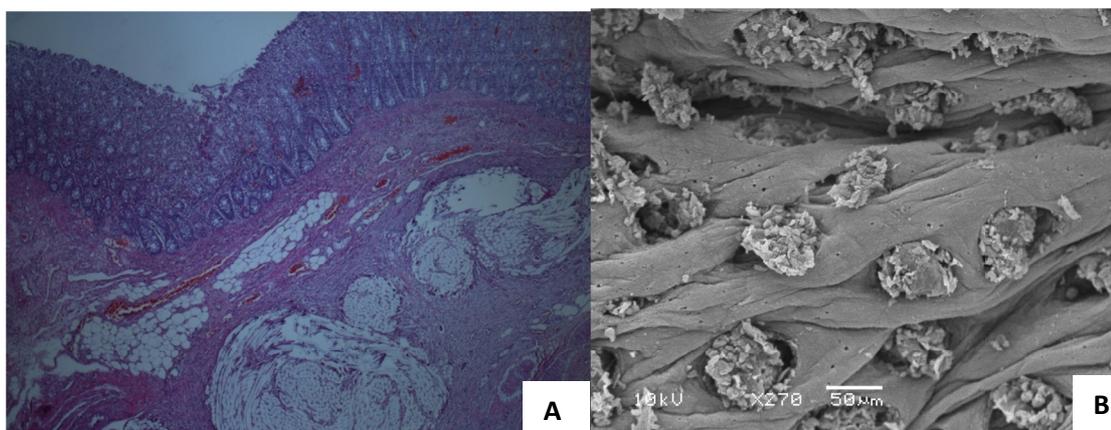
958

959

960

961

962



963

964

Figura 6- Análise histológica do sítio de incisão retal. **(A)** Observam-se as camadas mucosa, submucosa, e muscular do reto (HE). **(B)** Imagem da microscopia eletrônica de varredura do reto demonstrando cicatrização retal de forma tridimensional

5. CAPÍTULO 4

965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997

**Prolapso retal como complicação da NOTES transretal em modelo experimental
suíno**

Anelise Bonilla Trindade, Fernanda Soldatelli Valente, Priscila Domingues
Mörchbacher, Amanda Moreira Cezar Junqueira, Elizabeth Obino Cirne-Lima, Emerson
Antonio Contesini

Manuscrito a ser submetido para a revista
*Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e
Zootecnia*

998 **Prolapso retal como complicação da NOTES transretal em modelo experimental**999 **suíno**1000 *Rectal prolapse after transrectal NOTES experimentally performed in a pig*

1001

1002 Anelise Bonilla Trindade, Fernanda Soldatelli Valente, Priscila Domingues

1003 Mörchbacher, Amanda Moreira Cezar Junqueira, Elizabeth Obino Cirne-Lima, Emerson

1004 Antonio Contesini

1005

1006

1007 **Resumo**

1008 O prolapso retal é a protrusão de uma ou mais camadas do reto. Diferentes
1009 causas já foram atribuídas para esta alteração como o tenesmo, a endoparasitose,
1010 inflamações do intestino grosso e aumento da pressão intra-abdominal como ocorre em
1011 cirurgias endoscópicas. A cirurgia endoscópica por orifícios naturais (NOTES) é uma
1012 nova modalidade cirúrgica onde as cavidades corporais são abordadas através de
1013 orifícios naturais sem incisões cutâneas. Existem diferentes vias de acesso, porém a
1014 transretal ainda é pouco explorada. Desta maneira, o presente trabalho objetiva relatar
1015 um caso prolapso retal de um suíno, hígado, do sexo feminino, com três meses de idade,
1016 pesando 20 kg, submetido, experimentalmente, a NOTES transretal para
1017 peritoneoscopia. Sob anestesia geral, foi realizado pneumoperitônio a uma pressão de
1018 12mmHg e fluxo 2L/min. O suíno foi posicionado em decúbito lateral esquerdo e, na
1019 sequência, a mucosa retal foi tracionada e incisada para a introdução do endoscópio até
1020 a cavidade abdominal. Em seguida, desfez-se o pneumoperitônio e a mucosa retal foi
1021 suturada com fio poliglactina 910 em padrão contínuo simples. Observou-se leve edema
1022 da mucosa retal, o qual foi reduzido manualmente após lavagem com solução resfriada e
1023 lubrificação, recidivando no período de 24 horas após. Foi adicionada a sutura em bolsa
1024 de tabaco ao redor do ânus, porém ocorreu ruptura da sutura ao redor 72h após o
1025 procedimento endoscópico, com automutilação da região perineal sendo, então,
1026 realizada a eutanásia do suíno. Assim, o acesso transretal para NOTES pode ser um
1027 método promissor, todavia, ainda são necessários mais estudos experimentais a fim de
1028 conhecer suas reais complicações, sendo que o prolapso retal é uma destas.

1029 **Palavras-chave:** Acesso retal, cirurgia endoscópica, cirurgia sem cicatriz, lesão retal,
1030 peritoneoscopia

1031 **Abstract**

1032

1033 Rectal prolapse is the protrusion of one or more layers of the rectum through the anal
1034 sphincter. Among the causes are tenesmus, endoparasitism, large bowel inflammation,
1035 and increased intra-abdominal pressure, as with endoscopic procedures. Natural orifice
1036 transluminal endoscopic surgery (NOTES) comprise advanced techniques in which
1037 body cavities are accessed through natural openings without skin incisions being
1038 performed. Different entry sites may be used, yet, transrectal NOTES is not much
1039 reported. In this paper, a rectal prolapse after transrectal NOTES in a pig is presented. A
1040 healthy three-month old female swine, weighing 20 kg, was submitted to an
1041 experimental transrectal NOTES and peritoneoscopy. Under general anesthesia, after
1042 introduction of a Veress needle, the pneumoperitoneum with carbon dioxide was
1043 achieved at 12mmHg and 2L/min flow. With the animal at left lateral recumbency, the
1044 rectal mucosa was pulled and incised for introduction of the endoscope into the
1045 abdominal cavity. Subsequently, the cavity was deflated and the rectal wall was sutured
1046 with a polyglactin 910 in a continuous simple pattern. An edema of the rectal mucosa
1047 with a slight protrusion was noted and, after cold saline solution rinsing and lubrication,
1048 it was reduced manually. In the following 24 hours, the prolapse recidivated and a
1049 purse-string suture was applied around the anus. The suture ruptured at about 72 hours
1050 after the endoscopic procedure and an auto-mutilation of the perineal region aggravated
1051 the animal's condition, which was then euthanized. The transrectal NOTES can be a
1052 promising approach to endoscopic procedures, however, further studies are needed to
1053 assess the safety of the technique and possible complications like rectal prolapse.

1054

1055 **Key words:** Rectal access, endoscopic surgery, scarless surgery, rectal injury,
1056 peritoneoscopy

1057

1058

1059

1060

1061

1062

1063

1064

1065

1066 INTRODUÇÃO

1067

1068 O prolapso retal é uma alteração da região distal do intestino grosso onde ocorre
1069 a invaginação da parede do reto (Melton, 2013). Pode ser classificado como parcial
1070 quando apenas a mucosa do reto salienta-se a partir do ânus, ou completo quando se
1071 observa exteriorização de todas as camadas do reto através do orifício anal (Aronson,
1072 2007). Outros autores propõem a classificação como oculto ou interno: quando não há a
1073 saída do reto através do ânus e, classificado como completo, quando a mucosa é
1074 exteriorizada, observando-se a saída de toda a espessura do retal (Wexner et al., 2004).

1075 A exteriorização da mucosa retal ocorre secundariamente a diferentes situações
1076 como em casos de tenesmo, em decorrência de cirurgia urogenital ou anorretal, por
1077 endoparasitismo, a tiflíte, a colite, a proctite, às neoplasias e aos corpos estranhos
1078 (Aronson, 2007). Ainda é citado na literatura que o pneumoperitônio, em cirurgias
1079 laparoscópicas, pode ser causador desta alteração (Chiapponi et al., 2011).

1080 A cirurgia endoscópica é caracterizada como acesso cirúrgico minimamente
1081 invasivo, no qual a cavidade é visualizada por meio de um endoscópio. Recentemente, a
1082 cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais (NOTES) surgiu como uma
1083 nova perspectiva da cirurgia moderna, baseada no princípio da abordagem das
1084 cavidades corporais através de um orifício natural, sendo desprovida, portanto, de
1085 incisões cutâneas (Santos-Filho et al., 2009). Para esta modalidade, diferentes vias de
1086 acesso às cavidades corporais já foram estudadas como a via transgástrica, a
1087 transvaginal, a transuretral, a transcolônica e a via transretal, a qual tem sido pouco
1088 explorada (Pai et al., 2006; Denk et al., 2008; Bazzi et al., 2011).

1089 A abordagem transretal pode representar uma rota alternativa para os
1090 procedimentos NOTES pela capacidade de extrair grandes espécimes abdominais,
1091 permitir viscerorrafia sob visualização direta e possuir aplicabilidade para pacientes
1092 tanto do sexo masculino quanto feminino. Existem poucos estudos clínicos e
1093 experimentais sobre a utilização da via transretal para a NOTES (Bazzi et al., 2011;
1094 Santos et al., 2011). Desta maneira, o relato de complicações decorrentes desses
1095 procedimentos nas diferentes espécies é um passo importante no conhecimento dessa
1096 nova via de acesso para a cirurgia endoscópica.

1097 À vista disso, este trabalho objetiva relatar um prolapso retal ocorrido em um
1098 suíno submetido à cirurgia por orifícios naturais através do acesso transretal.

1099

1100

1101 **CASUÍSTICA**

1102

1103 Este trabalho foi avaliado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
1104 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob protocolo número 23376,
1105 seguindo princípios e normas para a utilização de animais experimentais. Todo o
1106 procedimento foi realizado no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da UFRGS.

1107 Um suíno mestiço (*Sus scrofa domestica*), hígado, do sexo feminino, com 20 kg
1108 de massa corporal e aproximadamente 90 dias de idade, proveniente do setor de
1109 suinocultura da UFRGS foi submetido a peritoneoscopia experimental pelo acesso
1110 transretal. O animal passou por um período de adaptação ambiental mínimo de 60 dias
1111 no HCV-UFRGS, onde foi mantido em baia recebendo como alimentação: ração
1112 comercial peletizada de crescimento específica para suínos e acesso ilimitado a água.

1113 O preparo intestinal constou de redução gradual da alimentação com dieta
1114 pastosa (300 g) no período compreendido de 36 horas antes do procedimento cirúrgico,
1115 sendo realizado jejum total de sólidos e sem jejum hídrico de 20 horas. Para a limpeza
1116 intestinal, o suíno recebeu bisacodil (0,5 mg.kg⁻¹) por via oral, e Manitol 0,5% (10 mL.
1117 kg⁻¹), 48 e 24 horas prévios ao procedimento cirúrgico.

1118 Como medicação pré-anestésica utilizou-se a associação de quetamina (15
1119 mg.kg⁻¹), midazolam (0,5 mg.kg⁻¹) e cloridrato de petidina (3 mg.kg⁻¹), todos
1120 administrados por via intramuscular. Em seguida, foi submetido à anestesia geral com
1121 propofol (5 mg.kg⁻¹, IV). Procedeu-se, então, a vaporização de isoflurano em oxigênio
1122 100% a 2 L.min⁻¹ para a manutenção do plano anestésico. Imediatamente, o reto foi
1123 esvaziado manualmente e realizando-se lavagem intestinal com 500 mL de solução de
1124 iodopovidona (PVPI) 0,1%.

1125 O animal foi inicialmente posicionado em decúbito dorsal para o
1126 pneumoperitônio com CO₂ medicinal via agulha de *Veress* inserida na parede
1127 abdominal 2 cm craniais a cicatriz umbilical, a uma pressão de 12 mmHg e fluxo de 2
1128 L.min⁻¹.

1129 O suíno foi posicionado em decúbito lateral esquerdo e, através da tração e
1130 exteriorização da mucosa retal, uma incisão transversal foi realizada. Um endoscópio
1131 flexível (Pentax®), medindo um metro e meio de comprimento e 14 mm de diâmetro
1132 com um canal de trabalho foi introduzido através da incisão retal e mantido na cavidade
1133 abdominal por 15 minutos sendo, posteriormente removido. Desfez-se o

1134 pneumoperitônio e realizou-se a sutura retal sob visualização direta, em plano único,
1135 extramucoso, com padrão contínuo simples na região muscular e submucosa com fio
1136 poliglactina 910 3-0. Após a sutura do reto, constatou-se leve edema e protrusão da
1137 mucosa retal, o qual foi reduzido por meio de lubrificação com lidocaína gel e lavagem
1138 com solução salina resfriada. No pós-operatório, o animal recebeu tramadol (3 mg.kg^{-1}
1139 VO, bid, três dias), meloxicam ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ VO, sid, dois dias) e lavagem da mucosa
1140 retal com solução NaCl 0,9%. O animal foi analisado e examinado diariamente quanto à
1141 defecação, e apetite, sendo a temperatura corporal aferida através de termômetro
1142 infravermelho. Mensurou-se a proteína C reativa no soro previamente ao procedimento,
1143 24 e 48 horas após a cirurgia. Dois dias após o procedimento NOTES, sob anestesia
1144 geral, foi realizada bolsa de tabaco ao redor do ânus com fio náilon 2-0 que rompeu 72
1145 horas após o procedimento endoscópico. O paciente havia apresentado automutilação da
1146 região perineal e do reto, conseqüentemente, foi eutanasiado 72 horas após a cirurgia
1147 NOTES.

1148

1149 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

1150

1151 O procedimento NOTES, pelo acesso transretal em um modelo experimental
1152 suíno, demonstrou que, apesar de ser procedimento minimamente invasivo com
1153 ausência de incisões cutâneas e passível de observação de todas as vísceras abdominais,
1154 pode culminar com uma importante complicação.

1155 A exteriorização da mucosa retal do suíno, verificada imediatamente após o
1156 término do procedimento cirúrgico sugeriu, inicialmente, um prolapso retal incompleto
1157 ou mucoso (Aronson, 2007; Fossum, 2008, Marjani et al., 2009) posto que, nestes casos,
1158 apenas a mucosa do reto é salientada a partir do ânus, à medida em que qualquer parte
1159 da circunferência anorretal pode ser comprometida (Aronson, 2007).

1160 O endoparasitismo intestinal está entre as principais causas de prolapso retal em
1161 animais jovens (Aronson, 2007; Fossum, 2008; Marjani et al., 2009; Melton et al.,
1162 2013), porém esta possibilidade pode ser descartada no presente relato, pelo fato de ter
1163 sido realizado, previamente ao procedimento cirúrgico, exame parasitológico de fezes
1164 no suíno, o qual demonstrou ausência de parasitas intestinais. Ainda, exames
1165 hematológicos também foram avaliados como hemograma (leucócitos totais: $9800/\mu\text{L}$;
1166 eritrócitos: $5,93 \times 10^6/\mu\text{L}$, hematócrito 30 g/dL), albumina (9,23 g/dL), alanina amino-

1167 transferase (83,8 UI/L), estando todos os parâmetros compatíveis com o fisiológico para
1168 a espécie.

1169 A causa provável desta alteração poderia estar relacionada ao aumento da
1170 pressão intra-abdominal decorrente do pneumoperitônio utilizado para distender a
1171 cavidade durante o procedimento de peritoneoscopia (Chiapponi et al., 2011; Melton e
1172 Kwaan, 2013). Reconhece-se que a insuflação-abdominal em cirurgia laparoscópica
1173 pode levar a alterações no trato gastrointestinal como refluxo passivo do conteúdo
1174 gástrico para o esôfago (Campos et al., 2003), no entanto, ainda não existem relatos da
1175 exteriorização da mucosa retal decorrente do pneumoperitônio. O abdômen do animal
1176 do presente estudo, foi drenado imediatamente ao término do procedimento, uma porção
1177 residual do CO₂ medicinal pode ter permanecido, porém acredita-se que este fato não
1178 tenha contribuído, de forma relevante, para a exteriorização da mucosa retal.

1179 Ainda, durante a criação do orifício na parede do reto possivelmente
1180 transeccionou-se ramos da artéria retal cranial e/ou artéria mesentérica caudal, as quais
1181 suprem a região distal do reto (Dyce, 1998). A possível resposta para este evento seria
1182 uma maior inflamação inicial local tornando a mucosa do reto edemaciada e
1183 exteriorizada através do ânus.

1184 A mensuração da proteína C reativa é utilizada como marcador precoce de
1185 inflamação. É produzida pelo fígado e sua função é ligar-se a patógenos e células
1186 lesadas e/ou apoptóticas e iniciar sua eliminação por meio da ativação do sistema
1187 complemento e de fagócitos (Tizzard, 2009). Reflete, também, a extensão do processo
1188 inflamatório, principalmente em infecções bacterianas, reações de hipersensibilidade,
1189 isquemia e necrose tecidual (Rosa Neto e Carvalho, 2009). Os valores deste
1190 biomarcador inflamatório, no suíno em questão, confirmam um aumento da resposta
1191 inflamatória aguda, visto que houve um aumento exagerado 24 horas após o
1192 procedimento em relação ao basal (valor basal: 0,34 mg.L⁻¹; valor 24h: 2,36 mg.L⁻¹) que
1193 manteve-se aumentado 48h após a cirurgia (2,17 mg.L⁻¹), mesmo o animal recebendo
1194 anti-inflamatório diariamente.

1195 O procedimento de lavagem com solução de NaCl 0,9% resfriada e lubrificação
1196 da mucosa retal promoveu uma diminuição parcial do edema, sendo possível a redução
1197 manual do prolapso sem intervenção cirúrgica durante o pós-operatório imediato.
1198 Aronson (2007), ainda recomendou a administração de furosemida intravenosa em
1199 pacientes com protrusão da mucosa retal como adjuvante na redução do edema. Este
1200 fármaco não foi utilizado em virtude de que o animal havia passado previamente ao

1201 procedimento cirúrgico por um rigoroso preparo intestinal e jejum de 20 horas e a
1202 administração de diurético poderia promover um maior equilíbrio hidroeletrólítico.

1203 A recidiva do prolapso ocorreu 24 horas após o procedimento endoscópico, por
1204 isso, o suíno foi novamente anestesiado para aplicação de uma sutura em bolsa de
1205 tabaco ao redor do ânus, procedimento este, recomendado pela maioria dos autores
1206 (Aronson, 2007; Fossum, 2008; Marjani et al., 2009; Gavioli et al., 2013).

1207 A justificativa encontrada para a automutilação do animal na região perineal é
1208 que, possivelmente, o paciente apresentava desconforto e/ou prurido da região retal
1209 devido à sutura aplicada no reto o que favoreceu a ruptura da sutura em bolsa de tabaco
1210 com conseqüente automutilação e traumatismo da região perineal. Nestas situações, o
1211 prognóstico passa a ser de reservado a desfavorável (Aronson, 2007). A gravidade da
1212 lesão encontrada e, sendo um animal submetido a um procedimento experimental, levou
1213 os autores a realizarem a eutanásia.

1214 Logo, a cirurgia transluminal por orifícios naturais, através do acesso transretal,
1215 pode ser um método promissor, entretanto, ainda são necessários mais estudos
1216 experimentais a fim de conhecer suas reais complicações, inclusive a possibilidade de
1217 ocorrência de prolapso retal.

1218

1219 REFERÊNCIAS

1220

1221 ARONSON L. Reto e ânus. In: Slatter D. (Ed). *Manual de Cirurgia de Pequenos*
1222 *Animais*. W.B. Saunders: Philadelphia, 2007. p. 682-707.

1223 BAZZI, W.M.; WAGNER, O.; STROUP, S.P. et al. Tranrectal hybrid natural orifice
1224 transluminal endoscopic surgery (NOTES) nephrectomy in a porcine model. *Urol.*, v. 3,
1225 p. 518-523, 2011.

1226 CHIAPPONI, C.; STOCKER, U.; KÖRNER, M.; LADURNER R. Emergency
1227 percutaneous needle decompression for tension pneumoperitoneum. *BMC*
1228 *Gastroenterology.*, v. 11, p. 1-5, 2011.

1229 DENK, P.M.; SWANSTRÖM, L.L.; WHITEFORD, M.H. Transanal endoscopic
1230 platform for natural orifice surgery. *Gastrointest endosc.*, v. 68, p. 954-959, 2008.

1231 DYCE, K.M., et al. O sistema digestório. In: _____. *Tratado de anatomia veterinária*. Rio
1232 de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 206-257.

1233 FOSSUM, T.W. Cirurgia do sistema digestório. In: _____. *Cirurgia de pequenos animais*.
1234 W.B. Saunders: Philadelphia, 2008. p. 339-572.

- 1235 MARJANI, M.; GHAFFARI, M.S.; MOOSAKHANI, F. Rectal prolapse secondary to
1236 antibiotic-associated colitis in a dog. *Comp Clin Pathol.*, v. 18, p. 473-475, 2009.
- 1237 MELTON, G.B; KWAAN, M.R. Rectal prolapse. *Surg Clin N Am.*, v. 93, p. 187-198,
1238 2013.
- 1239 PAI R.D.; FONG, M.D.; BUNDGA, M.E. et al. 2006. Transcolonic endoscopic
1240 cholecystectomy: a NOTES survival study in a porcine model (with video). *Gastrointest*
1241 *Endosc.*, v. 64, p.428-433, 2006.
- 1242 SANTOS-FILHO PV, SANTOS MP, MENEZES, J.E.M.T, ETTINGER TCBC-BA.
1243 Cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais: realidade atual. *Revista do*
1244 *Colégio Brasileiro de Cirurgia.*, v.36, p.167-172, 2009.
- 1245 TIZZARD, I.R. 2009. Como se inicia a inflamação. In:___ *Imunologia veterinária.*
1246 Elsevier: Rio de Janeiro, 2009. p. 11-27.
- 1247 WEXNER, S.D.; CERA, S.M. Section 32 - Procedures for rectal prolapse. In ACS
1248 Surgery Principles and practice.2004 WebMD, Inc.<http://www.acssurgery.com/acshome.htm>
1249 home.htm
- 1250 Acessado em 09-04-2013.
- 1251
- 1252
- 1253
- 1254
- 1255
- 1256
- 1257
- 1258
- 1259
- 1260
- 1261
- 1262
- 1263
- 1264

1265

1266

1267

1268

1269

1270

1271

1272

1273

1274



1275

Figura 1- Vista aproximada do prolapso retal de um suíno submetido a peritoneoscopia pelo acesso transrretal.

1276

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho no modelo animal utilizado, permitem concluir que:

- A cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais (NOTES) pelo acesso transretal para peritoneoscopia flexível, é factível de ser realizada;
- A utilização de terapia celular, por meio da inoculação de células-tronco mesenquimais, no sítio da sutura retal, promove aceleração da cicatrização retal, observada pela redução da quantidade de células inflamatórias na camada muscular do reto;
- Os efeitos imunomoduladores, tanto da técnica NOTES transretal quanto desta mesma técnica associada a inoculação de terapia celular são semelhantes, demonstrando níveis de IL-6 indetectáveis, proteína C ultrasensível reduzidos e de albumina dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie.
- A técnica NOTES transretal, realizada após preparo intestinal adequado apresenta menos chance de carrear contaminação do reto para a cavidade abdominal. Pode-se encontrar bactérias no fluído de lavagem peritoneal provenientes da flora bacteriana da pele. As Enterobacteriaceae, quando presentes, podem indicar uma possibilidade de punção inadvertida do intestino durante o procedimento de lavagem abdominal;
- A presença de prolapso retal no pós-operatório imediato é uma complicação séria passível de ocorrer na técnica NOTES transretal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, B.M.; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. **Gene Therapy**, v. 2, p.109-16, 2008.
- ALCARAZ, A.; PERI, L.; MOLINA, A.; GOICOECHEA, I.; et al. Feasibility of Transvaginal NOTES-Assisted Laparoscopic Nephrectomy. **European Urology**, v. 3205, p. 1-5, 2009.
- ALMEIDA, F.S.; RIGOBELLO, E.C.; MARIN, J.M.; et al. Diarreia suína: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados em leitões na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. **Ars Veterinaria**, v.23, p.151-157, 2007.
- ANVARI, M.; MARESCAUX, J. Natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES): the dawn of a new era. Disponível em: <<http://www.websurg.com/notes>> acesso em: maio 2008.
- BARON, T.H. Natural orifice transluminal endoscopic surgery. **British Journal of Surgery**, v.1, n. 94, p. 01-02, 2007.
- BASSO, P.C., RAISER, A.G., BRUN, M.V. Atualidades em videocirurgia na Medicina Veterinária: cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais (NOTES) e cirurgia laparoendoscópica por único portal (LESS). *Revista Científica de medicina Veterinária – Pequenos animais e animais de estimação – MEDVEP*, v. 10, n. 32, p. 82-89, 2012.
- BAZZI, W.M., et al. Transrectal Hybrid Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery (NOTES) Nephrectomy in a Porcine Model. *Urology*, v. 3, n. 77, p. 518-523, 2011.

BERMAN, S.; MELVIN, S. Natural orifice transluminal endoscopic surgery. *Surgical Clinics of North America*. v.88, p.1131-1148, 2008.

BEZUTTI, M.T.; FÉRES, O.; DORIVAL, A. et al. Cicatrização de anastomoses colônicas na vigência de obstrução intestinal. estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 17, p.109-115, 2002.

BYDŁOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **RBHH**, v.31, p.25-35, 2009.

BONIN, E.A.; CLAUS, C.M.P.; TORRES, M.F. et al. Evaluation of bacterial contamination after “pure” (totally) transvaginal NOTES diagnostic peritoneoscopy with biopsies in swine: a comparative study with laparoscopy. **Surgical Endoscopy**, v.2, p. 421-427, 2012.

BRANCO FILHO A.J.; NODA, R.J.; KONDO, W. et al. Initial experience with hybrid transvaginal cholecystectomy. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 66, p. 1245-1248, 2007.

BRUN, M.V.; SILVA, M.AM.; MARIANO, M.B.; et al. Ovariohysterectomy in a dog by a hybrid NOTES technique. **Canadian Veterinary Journal**, v. 52, p.637–640, 2011.

CAMPOS, F.G.C.M.; CAVARATTO, P.P.P.; ARAÚJO, S.E.A. Avaliação dos efeitos imunológicos em operações colo-retais minimamente invasivas. **Rev bras Coloproct**, v.3, p.285-292, 2005.

CAMPOS, F.G.C.M.; ROLL, S. Complicações do Acesso Abdominal e do Pneumoperitônio em Cirurgia Laparoscópica - Causas, Prevenção & Tratamento. **Rev. bras. vídeo-cir**, v.1, p.21-28, 2003.

CASTELO-BRANCO MTL, SOARES ID, LOPES DV. et al. Intraperitoneal but not intravenous cryopreserved mesenchymal stromal cells home to the inflamed colon and ameliorate experimental colitis. **Plos One** , v.7, p.1-12, 2012.

De CARLI. Cirurgia através de orifícios naturais – sem cicatrizes. *Tribuna Livre*. 3p., 2009.

COHEN, R.V.; PINHEIRO-FILHO, J.C.; SCHIAVON, C.A.; et al. Alterações Sistêmicas e Metabólicas da Cirurgia Laparoscópica. **Revista Brasileira de Videocirurgia**, v.1, n. 2, p. 77-81, 2003.

COLOMÉ, L.M.; GOMES, C.; CROSIGNANI, N. et al. Utilização de células-tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. **Ciência Rural**, v.38, p.2529-2534, 2008.

COVAS, D. T. Células-tronco mesenquimais. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Células-tronco: a nova fronteira da medicina. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 35-48.

DELLA FLORA, E., et al. A systematic review of natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES) for intra-abdominal surgery – *ASERNIP-S report* n. 62. Adelaide: ASERNIP-S, 2007.

DENK, P.M., et al. Transanal endoscopic microsurgical platform for natural orifice surgery. *Gastrointestinal endoscopy*, v. 68, n.5, p. 954-959, 2008.

DYCE KM. O sistema digestório. In: _____. Tratado de anatomia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap.8. p. 206-257.

GIDAY, S. A., et al. NOTES: the future. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, v. 18, p. 387-395, 2008.

GOMES, C.; PAZ, A.H.; BONILLA, A.T. et al. Bone regeneration in mandible defect with autograft bone and cell suspension from bone marrows in rabbit. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, p.836-843, 2011.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. In:_____ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th.ed. Baltimore, USA, 1994. p. 1134, 2004.

HOUSTON, D.M.; RADOSTITS, O.M. O exame clínico. In: RADOSTITS, O.M.; MAYHEW, I.G.J.; HOUSTON, D.M. **Exame clínico e diagnóstico em veterinária**. Vol, ed, p. 71-97, 2002

HERZUM, I.; RENZ, H. Inflammatory Markers in SIRS, Sepsis and Septic Shock. **Current Medicinal Chemistry**, v.15, p.581-587, 2008.

JAKEWAYS, M.S.R.; MITCHELL, V.; HASHIM, I.A. Metabolic and inflammatory responses after open or laparoscopic cholecystectomy. **BJS**, v.81, p.127-131, 1994.

JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. Pathology of domestic animals In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. Alimentary System. New York and London: Saunders, v.2, cap.1, p.2340, 2007.

JAGANNATH, S.B., et al. Peroral transgastric endoscopic ligation of fallopian tubes with long-term survival in a porcine model. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 3, n. 61, p. 449-453, 2005.

KALLOO A.N., et al. Flexible transgastric peritoneoscopy: a novel approach to diagnostic and therapeutic interventions in the peritoneal cavity. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 60, n.1, p. 114-7, 2004.

KANTSEVOY, S.V., et al. Endoscopic gastrojejunostomy with survival in a porcine model. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 2, n. 62, p. 287-292, 2005.

KO, C. W., et al. Preliminary pneumoperitoneum facilitates transgastric access into the peritoneal cavity for natural orifice transluminal endoscopic surgery: a pilot study in a live porcine model. *Endoscopy*. v.39, p.849-853, 2007.

LEE, LS. Desarrollo tecnológico actual de la cirugía endoscópica transluminal a través de orificios naturales. *Cirugía Española*, v. 80, n.5, p. 283-288, 2006.

LEE, L.S., et al. Transgastric cecectomy in canine models: natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES). *Surgical Endoscopy*, v. 24, p. 2387-92, 2010.

LIMA, E., et al. Transvesical endoscopic peritoneoscopy: a novel 5 mm port for intra-abdominal scarless surgery. *Journal of Urology*, v. 2, n. 176, p. 802-805, 2008.

LIMA, E., et al. Transvesical thoracoscopy: a natural orifice transluminal endoscopic approach for thoracic surgery. *Surgical Endoscopy*, v. 21, p. 854–858, 2007.

LUZ, M.J., et al. Ovariectomia por via laparoscópica em cadela com ovário remanescente. *Revista Científica de Medicina Veterinária (MEDVEP)*. v.7, n.22, p.372-376, 2009.

MARESCAUX, J. N.O.T.E.S editorials – Operation Anubis: a new step in NOTES history! [internet]. [cited 2007 june 2]. Disponível em: <http://www.websurg.com/editorials/media.php?doi=ed01en0018> Acessado em: 29 outubro/2009.

NESARGIKAR, P.N.; JAUNOO, S.S. Natural orifice transluminal endoscopic surgery (N.O.T.E.S). *International Journal of Surgery*. v.7, p.232-236, 2009.

ONDERS, R.P. et al. Natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES) as a diagnostic tool in the intensive care unit. *Surgical Endoscopy*, v. 21, n.4, p. 681-683, 2007.

PAI, R.D.; FONG, M.D.; BUNDGA, M.E. et al. Transcolonic endoscopic cholecystectomy: a NOTES survival study in a porcine model (with video). **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 4, p. 679-683, 2006.

PARK, P.O., et al. Experimental Studies of transgastric gallbladder surgery: cholecystectomy and cholecystogastric anastomosis (videos). **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 4, n. 61, p. 601-606, 2005.

PALANIVELU, C., et al. Transvaginal endoscopic appendectomy in humans: a unique approach to NOTESworld's first report. *Surgical Endoscopy*, v. 22, n.5, p. 1343-1347, 2008.

PEREIRA, I.S.O.; PONTES, P.; EÇA, L.P. et al. Protocolo piloto de separação e quantificação de células tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe. **ACTA ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia**, v.26, p.11-16, 2008.

PROPHET, E.B.; MILLS, R. Laboratory Methods in Histotechnology. **Armed Forces Institute of Pathology**, Washington, DC. p. 279, 1992.

ROSA NETO, N.L.; CARVALHO, J.F. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. **Rev Bras Reumatol** , v.49, p.413-30, 2009.

QUINN, P.J, et al. Veterinary microbiology and microbial disease. Second edition. Iowa, USA, 2011.

RAMOS, A.C, et al. NOTES Transvaginal videoassisted cholecystectomy: first series. *Endoscopy*, v. 40, n. 7, p. 572-575, 2008.

RATTNER, D.; KALLOO, A; ASGE/SAGES Working Group. ASGE/SAGES Working Group on Natural Orifice Translumenal Endoscopic Surgery. October 2005. *Surgical Endoscopy*, v. 20, n.2, p. 329-333, 2006.

REDDY, N.; RAO, P. Per oral transgastric endoscopic appendectomy in human. Abstract presented at 45th *Annual Conference of the Society of Gastrointestinal Endoscopy of India*. Jaipur, India, February, p. 28-29, 2004.

RYOU, M., et al. Evaluation of a novel access and closure device for NOTES applications: a transcolônica survival study in porcine model. *Gastrointestinal Endoscopy*, v. 67, n.6, p. 964-969, 2008.

SANTOS-FILHO, P.V., et al. Cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais: realidade atual. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia*, v. 36, n. 2, p. 167-172, 2009.

SCOTT, D.W., MILLER, W.H., GRIFFIN, C.E. Bacterial skin disease. In:___ Small animal dermatology. Pennsylvania: Saunders, 2001. cap. 4, p. 274-335.

SEID, V.E. et al. NOTES: presente e futuro – uma breve revisão. *Einstein*, v. 6, n. 1, p. 99-101, 2008.

SHAFI, B.M., et al. Natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES). *Seminars Pediatric Surgery*. v.15, n.4, p.251-258, 2006.

SHIN, E.J.; KALOO, A.N. Transcolonic NOTES: Current Experience and Potential Implications for Urologic Applications. *Journal of Endourology*, v. 23, n.5, p. 743-47, 2009.

SCHUSTER, M.D.; MARTENS, T.P.; ITESCU, S. Células-tronco mesenquimais para reparo cardíaco. **Rev. Bras. Cardiol. Invasiva**, v.16, p.95-11, 2008.

SOARES-JÚNIOR, C.; SOUZA, C.; GOMES, C.A. et al Fatores intervenientes e métodos de avaliação das anastomoses gastrointestinais. **Rev Med Minas Gerais**, v.3, p. 354-358, 2010.

SOOD, V.; COLLINS, C.; HARRINGTON, S. et al. Transgastric endoscopic pneumoperitoneum versus laparoscopy: effects on host systemic and peritoneal inflammatory responses in a porcine model. **Surg Endosc** 26:189-196, 2012.

TAZIMA, M.F.G.S.; VICENTE, Y.A.M.V.A.; MORIA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.3, 259-264, 2008.

TIZZARD, I.R. Como se inicia a inflamação. In:___ *Imunologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier. cap.2, p. 11-27, 2009.

TRINDADE, A.B.; ELIZEIRE, M.B.; SILVA, P.G. et al. Influência da fração mononuclear autóloga de medula óssea na evolução da marcha de coelhos submetidos a neurorrafia. **MedVep**, v.9, p.576-578, 2011.

TRUNZO JA, MCGEE MF, CAVAZZOLA LT. et al. Peritoneal inflammatory response of natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES) versus laparoscopy with carbon dioxide and air pneumoperitoneum. **Surg Endosc**, v.24, p.1727-1736, 2010.

VOSBURGH, K. G.; ESTEPAR, R. S. J. Natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES): an opportunity for augmented reality. *Studies in Health Technology and Informatics*, v.125, p.485-490, 2007.

ZAGO, M. A. Células-tronco: origens e propriedades. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Células-tronco: a nova fronteira da medicina. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 3-20.

ZORNIG, C., et al. Scarless cholecystectomy with combined transvaginal and transumbilical approach in a series of 20 patients. *Surgical Endoscopy*, v.22, p.1427-1429, 2008.

ZORRON, R. et al. NOTES Transvaginal cholecystectomy: Report of the first case. *Surgical Innovation*, v. 14, n.4, 279-283, 2007.

ZORRON, R.; et al. NOTES transvaginal cholecystectomy: preliminary clinical application. *Surgery Endoscopic*, v. 22, p. 542-547, 2008.

ZORRON, R., et al. Cirurgia por Orifícios Naturais Transcolônica: Acesso NOTES Peri-retal (PNA) para Excisão Mesorectal Total. *Revista Brasileira de Coloproctologia*, v. 30, n.1, p. 14-22, 2010.

WILLIAMS, K.J.; PICOU, A.A.; KISH, S.L. et al. Isolation and Characterization of Porcine Adipose Tissue-Derived Adult Stem Cells. **Cells Tissues Organs**, v.188, p. 251-258, 2008.

ANEXOS

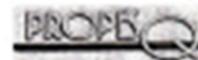
ANEXO I



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 23378

Título: CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA CICATRIZAÇÃO RETAL DE SUÍNOS SUBMETIDOS À BIÓPSIA HEPÁTICA VIA NOTES TRANSRETAL

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ELIZABETH OBINO CIRNE LIMA - coordenador desde 20/06/2012
EMERSON ANTONIO CONTESINI - coordenador desde 20/06/2012
MARISA RIBEIRO DE ITAPEMA CARDOSO - pesquisador desde 20/06/2012
CARLOS AFONSO DE CASTRO BECK - pesquisador desde 20/06/2012
DAVID DRIEMEIER - pesquisador desde 20/06/2012
DANIEL GUIMARÃES GERARDI - pesquisador desde 20/06/2012
FABIANA SCHIOCHET - Aluno de Doutorado desde 20/06/2012
Priscila Regina Guerra - Aluno de Mestrado desde 20/06/2012
ANELISE BONILLA TRINDADE - Aluno de Doutorado desde 20/06/2012
Micheli Westphal de Ataíde - Aluno de Mestrado desde 20/06/2012

Equipe Externa:

Priscila Zolotowski - pesquisador desde 20/06/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 20/08/2012 - Sala de Reuniões do 2º andar da Reitoria, Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 21 suínos mestiços, hípidos, fêmeas de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 3 de Setembro de 2012


FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética

ANEXO II



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 130148

Data da Versão do Projeto: 26/04/2013

Pesquisadores:

ELIZABETH OBINO CIRNE LIMA

ANA HELENA DA ROSA PAZ

PAULA BARROS TERRACIANO

ANELISE BONILLA TRINDADE

FERNANDA SOLDATELLI VALENTE

Título: CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA CICATRIZAÇÃO RETAL DE SUÍNOS
SUBMETIDOS À BIÓPSIA HEPÁTICA VIA NOTES TRANSRETAL

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 08 de maio de 2013.

Dr. Alessandro Gevaldt
Coordenador CEUA/HCPA