

Avaliação do número de células caliciformes nas criptas da mucosa colônica com e sem trânsito intestinal

Evaluation of the number of goblet cells in crypts of the colonic mucosa with and without fecal transit

RODRIGO DE OLIVEIRA MELLO¹; CAMILA MORAIS GONÇALVES DA SILVA²; FÁBIO PIOVEZAN FONTE¹; DANIELE LUCHINITZ FERRAZ SILVA¹; JOSÉ AIRES PEREIRA³; NELSON FONTANA MARGARIDO, TCBC-SP⁴; CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ, TCBC –SP⁵

R E S U M O

Objetivo: Medir a espessura das criptas e quantificar o número de células caliciformes comparando a mucosa cólica com e sem trânsito intestinal, relacionando-as ao tempo de exclusão. **Métodos:** Sessenta ratos Wistar, foram distribuídos em três grupos com 20 animais segundo a operação final para a retirada dos cólons, realizadas em seis, 12 ou 18 semanas. Em cada grupo, 15 animais foram submetidos à derivação do trânsito por colostomia proximal no cólon esquerdo e fístula mucosa distal e cinco apenas à laparotomia (controle). Os cólons com e sem trânsito fecal foram removidos, processados, submetidos a cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina. A altura das criptas colônicas e o número de células caliciformes foram mensurados por morfometria computadorizada. Foram utilizados os testes t de *Student* e Kruskal-Wallis para comparação e análise de variância, estabelecendo-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). **Resultados:** A altura das criptas diminui nos segmentos sem trânsito fecal ($p = 0,0001$), reduzindo entre seis e 12 semanas de exclusão ($p = 0,0003$), estabilizando-se após este período. O número de células caliciformes nas criptas é menor nos segmentos sem trânsito após 12 e 18 semanas ($p = 0,0001$), porém aumenta com o decorrer do tempo de exclusão ($p = 0,04$). **Conclusão:** A exclusão do trânsito intestinal diminui a espessura das criptas colônicas e o número de células caliciformes nos segmentos sem trânsito. Existe aumento do número de células caliciformes com o decorrer do tempo de exclusão.

Descritores: Colo. Colite. Células caliciformes. Processamento de imagem assistida por computador. Ácidos graxos voláteis.

INTRODUÇÃO

O epitélio cólico representa a mais perfeita barreira funcional do corpo humano¹. Uma única camada de células justapostas, aderidas umas às outras e à membrana basal, separa o interior da luz intestinal, com grande concentração bacteriana, das camadas internas estéreis que formam a parede intestinal². Essa barreira funcional é composta por diversas linhas de defesa representadas, principalmente, pela camada de muco que recobre a superfície epitelial, as membranas apicais e basolaterais das células, o complexo sistema de junções intercelulares, e a membrana basal^{1,3-5}.

O muco que recobre o epitélio intestinal, secretado por células caliciformes presentes nas glândulas de todo tubo digestivo, forma a primeira linha de defesa da mucosa cólica. As células caliciformes variam em número ao longo dos diferentes segmentos do intestino gros-

so, aumentando à medida que se progride em direção aos segmentos mais caudais onde ocupam, praticamente, toda a extensão das glândulas. Modificações na população de células caliciformes ao comparar-se os diferentes segmentos cólicos, encontram-se relacionadas às distintas funções fisiológicas exercidas pela mucosa de cada porção intestinal⁶. No cólon a camada de muco, além da função lubrificante facilitando a progressão do conteúdo fecal, confere proteção química contra a agressão ocasionada por antígenos, toxinas e enzimas digestivas existentes no interior da luz intestinal^{3,4}. O muco possui, ainda, propriedades bactericidas, pois reduz a população bacteriana em contato direto com a superfície epitelial, dificultando a translocação para o meio interno^{1,3,4,7}.

Anormalidades na secreção, composição e padrão de distribuição das mucinas nas criptas intestinais vêm sendo demonstradas em diversas doenças inflamatórias que acometem o cólon^{6,8}. Um dos exemplos é a colite de ex-

Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, Bragança Paulista e no Laboratório de Investigação Médico-Cirúrgica (LIM-02) do Hospital das Clínicas da FMUSP, São Paulo.

1. Acadêmicos do Curso de Medicina da Universidade São Francisco, Bragança Paulista – SP – BR; 2. Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, Bragança Paulista- SP – BR; 3. Professor Assistente Mestre da Disciplina de Patologia do Curso de Medicina da Universidade São Francisco, Bragança Paulista-SP – BR; 4. Professor Titular do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo- SP –BR; 5. Professor Adjunto do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, Bragança Paulista-SP-BR.

clusão, enfermidade caracterizada pelo desenvolvimento de processo inflamatório crônico na mucosa de segmentos desprovidos de trânsito fecal^{9,10}. Nos doentes com colite de exclusão, uma das queixas mais frequente é a constante eliminação de muco pelo segmento excluído de trânsito, sugerindo que exista uma maior produção de muco nesses segmentos⁹. Estudos em modelos de colite de exclusão mostraram que ocorrem alterações do conteúdo tecidual e modificações no padrão de expressão dos principais subtipos de mucinas nas criptas colônicas quando se comparam segmentos com e sem trânsito fecal¹⁰⁻¹². Todavia, existem dúvidas se essas alterações encontram-se relacionadas às modificações na população de células caliciformes ou a maior capacidade de produção de muco pelas células do epitélio cronicamente inflamado. Há evidências que ocorre atrofia das criptas intestinais nos segmentos excluídos quando se comparam segmentos com e sem trânsito intestinal, porém existem controvérsias em relação à população de células. Da mesma forma, ainda não está bem estabelecido a influência do tempo de exclusão fecal no número de células caliciformes. Acredita-se que com o decorrer do tempo de exclusão, existe aumento proporcional do número dessas células no cólon excluído¹⁰. Todavia, poucos estudos mensuraram a população de células caliciformes nas criptas colônicas comparando segmentos com e sem trânsito fecal em diferentes períodos de exclusão relacionando-a a espessura das criptas intestinais^{9,13,14}. A quantificação do número de células caliciformes com um método preciso de análise poderia esclarecer se, apesar da atrofia das criptas encontrada nos segmentos sem trânsito, existiria aumento proporcional no número de células caliciformes que pudesse explicar a sintomatologia dos doentes.

Assim sendo, os objetivos do presente estudo foram quantificar o número de células caliciformes e relacionar com a espessura das criptas colônicas comparando segmentos com e sem trânsito intestinal, verificando ainda, a influência do tempo de exclusão na população dessas células.

MÉTODOS

Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem Wistar, SPF, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP), com peso variando entre 300 e 320g e média de idade de quatro meses. Até a data da operação, todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado com controle de temperatura e umidade, com ciclos claro/escuro de 12 horas. No dia anterior ao procedimento cirúrgico foram mantidos em jejum, exceto água, por 12 horas. As gaiolas foram identificadas com o número do animal, grupo e subgrupo aos quais pertenciam e esses mesmos dados foram tatuados na cauda de cada roedor.

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em três grupos experimentais de 20 animais, segundo o sacrifício ser realizado em seis, 12 e 18 semanas após o procedimento cirúrgico. Em cada grupo, 15 animais foram submetidos à derivação do trânsito, por meio de colostomia proximal no cólon esquerdo e fístula mucosa distal (subgrupo experimento) e cinco, apenas à laparotomia isolada, sem derivação do trânsito intestinal (subgrupo controle). No dia da intervenção, foram pesados e anestesiados com o emprego de cloridrato de xilazina + cloridrato de quetamina na dose de 0,1ml/100g, administrados por via intramuscular na pata traseira esquerda.

A cavidade abdominal foi aberta por incisão longitudinal mediana, com três centímetros de extensão, sendo identificada a placa de Peyer, situada na borda antimesenterial na transição retossigmoideana. A distância entre a placa de Peyer e o local escolhido para a secção do cólon esquerdo, quatro centímetros acima da extremidade superior da placa, foi aferida com auxílio de um paquímetro. Após ligadura dos vasos da arcada marginal, em todos os animais do grupo experimento após a secção do cólon esquerdo, o segmento proximal foi exteriorizado como colostomia terminal no hipocôndrio esquerdo. O segmento distal do intestino grosso seccionado foi cateterizado com sonda de polivinil 12F e irrigado com 40ml de solução salina 0,9%, a 37°C, até que o efluente drenado pelo ânus não apresentasse mais saída de material fecal. Concluída a irrigação, o cateter foi removido e o cólon distal exteriorizado como colostomia (fístula mucosa distal) na face inferior esquerda do abdome. A fixação dos estomas à pele foi realizada com o emprego de pontos separados de fio absorvível monofilamentar 4-0 nos quatro pontos cardinais e, entre eles, sempre amarrados com três nós. A parede abdominal foi fechada em dois planos de sutura: peritônio e aponeurose, com pontos contínuos de fio de ácido poliglicólico 4-0 e a pele com pontos separados de nylon 4-0.

Concluída a operação, os animais foram mantidos aquecidos por 10 minutos e, após recuperação anestésica, alojados nas respectivas gaiolas, sendo liberados para ingestão de água e ração padronizada, após recuperarem o estado de vigília. Durante todo o período pós-operatório foram isolados e mantidos no mesmo ambiente climatizado até a data do sacrifício. Não foi tomado nenhum cuidado adicional em relação à ferida operatória e aos estomas confeccionados, nem foram administrados analgésicos ou antimicrobianos. Na véspera do dia programado para a retirada dos cólons, foram novamente pesados e mantidos em jejum por 12 horas, exceto para água. Para o procedimento foram anestesiados, com a mesma técnica anteriormente descrita, submetidos à tricotomia abdominal e antisepsia. A parede abdominal foi reaberta através de incisão mediana ampla. Nos animais do subgrupo experimental o cólon provido e todo o segmento desprovido de trânsito fecal, incluindo o ânus, foram removidos. Nos ani-

mais do subgrupo controle o cólon esquerdo foi ressecado a partir da flexura esquerda.

Os segmentos de cólon extirpados foram abertos pela borda antimesocólica no sentido longitudinal e, posteriormente, dispostos e presos sobre fragmento de cortiça com a superfície mucosa voltada para cima. A seguir foram, fixados por 72 horas em solução de formaldeído tamponado a 10%, desidratados em concentrações crescentes de álcool e clarificados em xilol. Terminada esta etapa foram inclusos em blocos de parafina e submetido a cortes histológicos longitudinais, com 5 μ de espessura para a confecção das lâminas histológicas, coradas pela técnica da hematoxilina-eosina (HE). O diagnóstico de colite foi estabelecido sempre por um mesmo patologista, com experiência em doenças inflamatórias intestinais, que desconhecia a origem do material e os objetivos do estudo.

As mensurações foram sempre realizadas por morfometria computadorizada. O técnico que realizou as medidas desconhecia a origem do espécime, assim como, o grupo experimental ao qual o animal pertencia. A medida da espessura das criptas colônicas e a quantificação do número de células caliciformes foram sempre realizadas em local onde havia, pelo menos, três criptas intestinais contíguas e íntegras, em seis campos aleatórios, perfazendo um total de 18 criptas estudadas em cada segmento. Para a medida da espessura das criptas e a contagem das células caliciformes a imagem selecionada foi focada por um microscópio óptico comum e capturada por uma câmera de vídeo, previamente acoplada ao corpo do microscópio. A imagem capturada foi digitalizada, transferida para microcomputador e analisada pelo programa NIS-Elements (Nikon Corporation, Japão). Para a medida da espessura das criptas nos animais do grupo controle e nos segmentos com e sem trânsito do subgrupo experimento, o programa marcava com uma cruz, os limites apical e basal de cada cripta. Após a mensuração das 18 criptas, o programa fornecia, automaticamente, a média dos valores mensurados com o respectivo erro padrão de cada segmento. Os valores médios encontrados foram transferidos para uma planilha de dados. Imediatamente após a mensuração da espessura, o número de células caliciformes foi quantificado na mesma cripta e também transferido para mesma planilha. Dessa forma, os valores para as duas variáveis estudadas foram obtidos sempre na mesma cripta. Após a avaliação dos segmentos cólicos de todos os animais, nos diferentes tempos de exclusão, os valores finais encontrados para a espessura das criptas e população de células caliciformes em cada grupo, também foram calculados e expressos pela média, com o respectivo erro padrão.

Utilizou-se o teste t de *Student* para analisar a espessura das criptas intestinais e número de células caliciformes, comparando segmentos com e sem trânsito fecal e o cólon obtido dos animais do grupo controle. O teste foi aplicado separadamente para cada período de exclusão estabelecido (seis, 12 e 18 semanas). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar a influência do tempo

de exclusão nas variáveis estudadas. Todos os dados obtidos foram analisados adotando-se nível de significância de 5% em todos os testes. Os valores significativos foram marcados com asterisco.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade São Francisco (2211/2007), e obedeceu às diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – (COBEA) e a Lei Federal 11.794 de 08/10/1008 (Lei Sérgio Arouca).

RESULTADOS

A figura 1A mostra a parede do cólon provido de trânsito intestinal em um animal submetido à derivação intestinal por seis semanas, enquanto a figura 1B a parede cólica desprovida de trânsito fecal do mesmo animal. Verificou-se que após seis semanas de exclusão a espessura das criptas diminuía nos segmentos desprovidos de trânsito fecal quando comparado aos animais do grupo controle e aos segmentos providos de trânsito dos animais do subgrupo experimento ($p=0,0001$). Ao analisar-se a variação da espessura das criptas colônicas em relação ao tempo de exclusão constatou-se que, no cólon sem trânsito, havia redução da espessura entre seis e 12 semanas ($p=0,0003$), não ocorrendo variação após esse período ($p=0,056$). Verificou-se, ainda, que após 12 e 18 semanas de exclusão o número de células caliciformes foi menor nos segmentos desprovidos de trânsito fecal quando comparado aos animais do grupo controle e aos segmentos providos de trânsito dos animais do grupo experimento ($p=0,00001$).

Os animais do grupo controle e nos segmentos providos de trânsito dos animais do grupo experimento, o número de células caliciformes aumentou com o decorrer do tempo ($p=0,001$). Nos segmentos desprovidos de trânsito fecal verificou-se que o número de células caliciformes aumentou após 18 semanas de derivação fecal ($p=0,04$).

DISCUSSÃO

A colite de exclusão é doença inflamatória que compromete a mucosa do cólon ou reto desprovida de trânsito intestinal⁹. A enfermidade é uma síndrome de deficiência nutricional ocasionada pela deficiência do suprimento regular de ácidos graxos de cadeia curta, o principal substrato energético para o adequado trofismo e metabolismo das células do epitélio cólico¹⁵⁻¹⁹. Com a derivação do trânsito as células da mucosa cólica, impossibilitadas de metabolizar os ácidos graxos de cadeia curta como fonte energética, passam a utilizar, alternativamente, a glutamina fornecida pela circulação sanguínea¹⁴. Contudo, o suprimento sistêmico de glutamina parece ser incapaz de manter a nutrição adequada do epitélio, ocasionando modificações nos mecanismos produtores de energia das células da mucosa intestinal²⁰. Essas alterações metabólicas levam

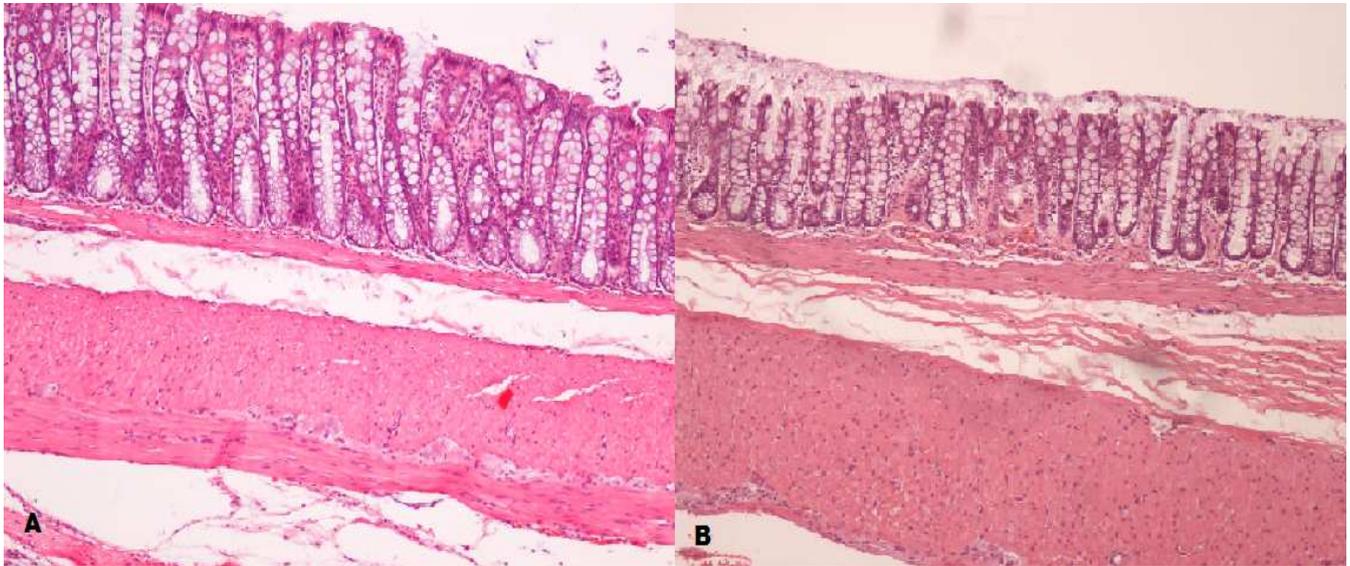


Figura 1 - A) Fotomicrografia da parede cólica de segmento provido de trânsito fecal após seis semanas de derivação intestinal; B) Fotomicrografia da parede cólica de segmento desprovido de trânsito fecal após seis semanas de derivação intestinal. (HE 200x).

ao aumento na produção de radicais livres de oxigênio pelas células epiteliais, moléculas que vem sendo responsabilizadas pelo dano inicial à mucosa em modelos experimentais de colite de exclusão, assim como em portadores de colite ulcerativa^{2,20}. A importância de um suprimento regular de ácidos graxos de cadeia curta para nutrição celular pode ser melhor avaliada pelos resultados de estudos demonstrando que a administração de substâncias que inibem o metabolismo dos ácidos graxos de cadeia curta são capazes de deflagrar o aparecimento de colite^{15,21}. Sua importância para adequada nutrição celular fica mais evidente com os resultados de estudos mostrando que o restabelecimento do trânsito intestinal, normalizando o suprimento de ácidos graxos de cadeia curta, ou a aplicação de clisteres contendo soluções ricas deles nos segmentos excluídos de trânsito, é capaz de reverter o processo inflamatório^{10,22,23}. Eles são capazes de modular a proliferação de células caliciformes e, quando instilados no cólon sem trânsito fecal, estimulam a produção e eliminação de mucinas^{24,25}. Dentre os ácidos graxos de cadeia curta, o butirato parece ser o mais eficaz na manutenção do trofismo epitelial, produção e liberação de muco pela mucosa cólica^{26,27}. Estudos mostraram a importância da manutenção do fornecimento destes ácidos para a expressão de genes relativos à formação dos diferentes subtipos de mucina sintetizadas pelas células caliciformes^{4,28}.

Estudos utilizando modelos experimentais de colite de exclusão descrevem uma série de alterações histológicas na parede cólica, semelhantes às que ocorrem no ser humano, representadas, principalmente, por erosões ou ulcerações na mucosa intestinal, redução significativa na espessura das criptas intestinais, infiltrado inflamatório, hiperplasia nodular focal, congestão vascular da submucosa, modificações no número de células caliciformes e alterações na síntese de mucinas¹⁰⁻¹⁵. Uma das queixas

mais comum nos portadores desta colite é a constante eliminação de muco pelo segmento excluído de trânsito. A maior eliminação de muco sugere que possa existir aumento na sua produção por aumento da população de células caliciformes nesses segmentos¹⁰. Todavia, paradoxalmente, estudos experimentais e em seres humanos mostraram que nos segmentos cólicos excluídos de trânsito fecal, existe significativa atrofia da camada mucosa, principalmente das criptas intestinais, conseqüente à falta do suprimento regular de ácidos graxos de cadeia curta. Para justificar esses achados aparentemente contraditórios, alguns estudos sugerem que, apesar da redução das criptas intestinais pela deficiência nutricional, a população de células caliciformes não se modifica ocorrendo, até mesmo, aumento proporcional em relação às demais células constituintes das criptas colônicas^{7,10}. Entretanto, nenhum estudo quantificou o número de células caliciformes comparando segmentos com e sem trânsito fecal e relacionando-o com a espessura epitelial e com o tempo de exclusão fecal.

O número de células caliciformes, indiretamente, reflete a capacidade de secreção de muco e a atividade das glândulas colônicas, cuja função é produzir e secretar mucinas ao longo de todo trato gastrointestinal⁹. Keli *et al.*¹⁰ analisando a população de células caliciformes e mensurando a espessura da camada mucosa cólica, em segmentos sem trânsito fecal, encontraram redução da espessura da camada mucosa com manutenção da população de células caliciformes. Diante desses achados sugeriram que, em números absolutos, na realidade ocorreria aumento na população de células caliciformes. Para eles é possível que esse aumento proporcional possa ser responsabilizado pela maior produção de muco. Contudo, avaliaram a população de células caliciformes de modo subjetivo não descrevendo no artigo qualquer método de

quantificação que assegurasse maior confiabilidade aos resultados encontrados¹⁰.

Outros autores avaliaram a população de células caliciformes nos segmentos excluídos de trânsito fecal comparando animais submetidos à derivação intestinal por diferentes períodos de tempo utilizando métodos histoquímicos para identificação e morfometria para posterior quantificação do número de células caliciformes ricas em mucinas neutras e ácidas¹³. Verificaram que não havia diferença significativa, com relação à quantidade total de células caliciformes ao compararem fragmentos cólicos colhidos no momento da derivação intestinal (grupo controle) e provenientes dos segmentos sem trânsito fecal independente do tempo de exclusão. Contudo, encontraram redução das células caliciformes ricas em mucinas ácidas com o decorrer do tempo de exclusão e, apesar de terem utilizado análise computacional para quantificação das células caliciformes, os autores não fazem menção ao emprego de qualquer método de limpeza mecânica antes de realizarem a exclusão fecal¹³. Já se demonstrou que a limpeza mecânica é uma etapa importante quando se utiliza modelos experimentais de colite de exclusão, pois quando não realizada é impossível assegurar que o cólon excluído esteja completamente livre de resíduos fecais que manteriam algum suprimento de ácidos graxos de cadeia curta²⁹. Pesquisas que utilizaram rotineiramente o preparo mecânico anterógrado do cólon, verificaram que o tanto o conteúdo de mucinas neutras quanto ácidas é menor no cólon desprovido de trânsito, porém existe aumento do conteúdo total com o decorrer do tempo de exclusão¹¹. Posteriormente, o mesmo grupo, utilizando técnicas histoquímicas que permitem identificar os subtipos de mucinas ácidas verificou que no cólon excluído, existe aumento no conteúdo tecidual das mucinas ácidas, entretanto, exclusivamente, à custa de mucinas sulfatadas, uma vez que as ricas em ácido siálico praticamente desapareciam¹². Os resultados desses dois estudos sugerem que, o aumento da produção de mucinas neutras e ácidas sulfatadas no cólon sem trânsito com o decorrer do tempo de exclusão possa estar relacionado ao aumento proporcional do número de células caliciformes com o decorrer do tempo de exclusão³⁰.

No presente estudo, com objetivo de poder mensurar a espessura das criptas intestinais e o número de células caliciformes de forma objetiva, optou-se pelo emprego da morfometria computadorizada por familiarização com o método^{11,12,15}. A morfometria computadorizada é metodologia disponível e de baixo custo, que permite a medida precisa de diferentes aspectos histológicos. Inicialmente, julgou-se interessante mensurar a espessura das criptas colônicas comparando segmentos com e sem trânsito intestinal, com o intuito de verificar se a falta do suprimento de ácidos graxos de cadeia curta era capaz de reduzir a altura das criptas colônicas. Verificou-se que em todos os animais, nos segmentos sem trânsito fecal havia redução significativa da altura das criptas colônicas, inde-

pendente do tempo de exclusão considerado. Estes achados confirmam que a falta de suprimento desses ácidos às células epiteliais ocasiona atrofia da superfície mucosa. Constatou-se ainda, que a atrofia das criptas colônicas nos segmentos sem trânsito ocorria, principalmente, nas primeiras 12 semanas de exclusão, não variando a partir de então. Estes achados, semelhantes aos encontrados por outros estudos, sugerem que após as primeiras 12 semanas de exclusão, considerado um período crítico, talvez ocorra uma adaptação gradativa das células epiteliais ao suprimento alternativo de glutamina fornecido pela circulação sistêmica¹⁴. No entanto, esse suprimento alternativo não é capaz de manter o trofismo das criptas intestinais à semelhança do que ocorria com os segmentos cólicos com trânsito preservado, pois, independente do tempo de exclusão, havia significativa atrofia das criptas nos segmentos desprovidos de ácidos graxos de cadeia curta.

Com o objetivo de verificar se o número de células caliciformes modificava-se nos segmentos sem trânsito fecal, também utilizou-se a morfometria computadorizada para quantificá-lo. Apenas dois estudos utilizaram a análise computacional para determinar o número de células caliciformes relacionando-o ao tempo de exclusão^{13,14}. No primeiro, a diferente metodologia empregada não permite a comparação com os resultados encontrados no presente estudo¹³. No segundo estudo, que não encontrou modificações no número de células com o decorrer do tempo, os autores não estabeleceram relação entre o número total de células caliciformes encontradas e a espessura das criptas, o que impossibilita verificar a ocorrência de um aumento proporcional^{10,14}. Utilizou-se em todos os animais do subgrupo experimento, a semelhança do que fora anteriormente proposto, o preparo mecânico anterógrado com solução salina²⁹. Apenas um estudo tinha avaliado a espessura das criptas intestinais e o número de células caliciformes em modelo de colite de exclusão que utilizou o preparo mecânico sistemático¹⁴. A importância do preparo anterógrado foi confirmada ao observar-se que, mesmo após o período de jejum proposto, em todos os animais submetidos à derivação do trânsito intestinal, havia saída, em média, de dois (1 a 5) cíbalos de fezes pelo ânus durante a realização da limpeza mecânica. Portanto, confirmou-se que, quando não se utiliza o preparo mecânico, é impossível assegurar a completa limpeza do cólon, o que, seguramente, interfere nos resultados encontrados.

Quando se comparou o número de células caliciformes entre os animais do grupo controle e experimento (segmentos com e sem de trânsito intestinal) constatou-se que havia diminuição nos segmentos sem trânsito fecal, independente do tempo de exclusão considerado. De modo inverso, nos segmentos cólicos com fornecimento de ácidos graxos de cadeia curta preservado encontrou-se aumento no número de células caliciformes após 12 e 18 semanas. Esses achados confirmam que o fornecimento regular de ácidos graxos de cadeia curta, é fator importante para manutenção do número de células caliciformes

ao longo do experimento. Da mesma forma, o ganho ponderal dos animais também pode ser considerado como um fator relacionado ao aumento da espessura das criptas e, conseqüentemente, do número de células caliciformes. Nos segmentos sem trânsito intestinal, o número de células caliciformes não se modificou nas 12 primeiras semanas do tempo de exclusão, embora tenha ocorrido redução da altura das criptas colônicas. Após 18 semanas, apesar de não haver variação na altura das criptas colônicas nos segmentos excluídos de trânsito, encontrou-se aumento do número de células caliciformes. Ao verificar-se que existe aumento no número de células caliciformes nos segmentos excluídos após 18 semanas e redução da espessura das criptas nesse mesmo período, sugere-se que o número de células caliciformes tenha aumentado, conforme proposto anteriormente¹⁰.

Vários fatores podem justificar o aumento proporcional das células caliciformes nos segmentos sem trânsito fecal com o decorrer do tempo de exclusão. É possível que a exclusão de trânsito fecal reduza a necessidade de absorção pelas glândulas colônicas, fazendo com que as células da zona proliferativa, priorizem a diferenciação em células caliciformes em detrimento às células com função absorptiva. Também é possível que, com a piora do processo inflamatório nos segmentos sem trânsito intestinal, exista maior necessidade de formação de células produtoras de muco, com o objetivo de reforçar a primeira linha de defesa da mucosa cólica contra o estresse oxidativo. Talvez a maior quantidade de muco encontrada nos segmentos sem trânsito fecal decorra da maior formação de células caliciformes pela zona proliferativa, do maior índice de apoptose de células caliciformes ma-

duros nas porções especializadas das criptas. O muco tem como uma de suas principais funções a lubrificação das fezes para facilitar o trânsito no interior do cólon. No cólon distal, como as fezes possuem maior consistência, esta função torna-se ainda mais importante, sendo a principal explicação para a maior concentração de células caliciformes nessa região. É possível que a ausência de trânsito fecal, decorrente da exclusão intestinal, faça com que o muco produzido e secretado em maior quantidade pelo segmento excluído, acumule-se no interior do cólon. Como o doente não elimina quantidade diária de muco devido à ausência de trânsito, o muco acumulado associado ao sangramento decorrente de erosões e ulcerações epiteliais, poderia ser a explicação para a sintomatologia dos portadores da colite de exclusão que se queixam da eliminação periódica de muco e sangue pelos segmentos desprovidos de trânsito.

Os resultados encontrados no presente estudo reforçam a importância do trânsito fecal para o adequado desenvolvimento das criptas colônicas. A exclusão do trânsito intestinal reduz a espessura das criptas e diminui na população de células caliciformes nas criptas intestinais. Contudo, com o decorrer do tempo de exclusão, apesar da redução das criptas colônicas, existe aumento proporcional no número de células caliciformes. Esses achados histológicos estão de acordo com a sintomatologia referida pelos doentes portadores colite de exclusão.

Em conclusão, existe redução no número de células caliciformes nos segmentos cólicos desprovidos de trânsito intestinal. O número proporcional de células caliciformes em relação à espessura das criptas aumenta nos segmentos cólicos sem trânsito após 18 semanas de exclusão fecal.

A B S T R A C T

Objective: To measure the thickness of the crypts and quantify the number of goblet cells of the colonic mucosa with and without intestinal transit, relating them to exclusion time. **Methods:** Sixty Wistar rats were divided into three groups of 20 animals each according to the time of the final operation for the removal of the colon, in six, 12 or 18 weeks. In each group 15 animals underwent colonic exclusion by left colon proximal colostomy and distal mucous fistula, and five underwent only laparotomy (control). The colons with and without fecal stream were removed, processed and submitted to histological sections stained with hematoxylin-eosin. The height of the colonic crypts and the number of goblet cells were measured by computerized morphometry. We used the Student t test and Kruskal-Wallis test for comparison and analysis of variance, using a significance level of 5% ($p < 0.05$). **Results:** The height of the crypts decreased in segments without fecal stream ($p = 0.0001$), reducing from six to 12 weeks of exclusion ($p = 0.0003$), stabilizing thereafter. The number of goblet cells in the crypts was smaller in segments without transit after 12 and 18 weeks ($p = 0.0001$), but increased as the time of exclusion progressed ($p = 0.04$). **Conclusion:** The exclusion of intestinal transit decreases the thickness of the colonic crypts and the number of goblet cells in the segments without transit. There is an increased number of goblet cells in the course of time exclusion.

Key words: Colon. Colitis. Image processing, computer-assisted. Fatty acids, volatile.

REFERÊNCIAS

1. Corfield AP, Myerscough N, Longman R, Sylvester P, Arul S, Pignatelli M. Mucins mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut*. 2000;47(4):589-94.
2. Pravda J. Radical induction theory of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2005;11(16):2371-84.
3. Hoebler C, Gaudier E, De Coppet P, Rival M, Cherbut C. MUC genes are differently expressed during onset, maintenance of inflammation in dextran sodium sulfate-treated mice. *Dig Dis Sci*. 2006;51(2):381-9.

4. Gaudier E, Rival M, Buisine MP, Robineau I, Hoebler C. Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. *Physiol Res*. 2009;58(1):111-9.
5. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002;122(1):44-54.
6. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.
7. Finnie IA, Dwarakanath AD, Taylor BA, Rhodes JM. Colonic mucins synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut*. 1995;36(1):93-9.
8. Filipe MI. Value of histochemical reactions for mucosubstances in the diagnosis of certain pathological conditions of the colon and rectum. *Gut*. 1969;10(7):577-86.
9. Glotzer DJ, Glick ME, Goldman H. Proctitis and colitis following diversion of fecal stream. *Gastroenterology*. 1981;80(3):438-41.
10. Keli E, Bouchoucha M, Devroede G, Carnot F, Ohrant T, Cugnenc PH. Diversion-related experimental colitis in rats. *Dis Colon Rectum*. 1997;40(2):222-8.
11. Nonose R, Spadari AP, Priolli DG, Máximo FR, Pereira JA, Martinez CA. Tissue quantification of neutral and acid mucins in the mucosa of the colon with and without fecal stream in rats. *Acta Cir Bras*. 2009;24(4):267-75.
12. Martinez CA, Nonose R, Spadari AP, Máximo FR, Priolli DG, Pereira JA, et al. Quantification by computerized morphometry of tissue levels of sulfomucins and sialomucins in diversion colitis in rats. *Acta Cir Bras*. 2010;25(3):231-40.
13. Biondo-Simões MLP, Greca FH, Abicalaffe MD, Colnaghi MC, Mattos e Silva E, Yamasaki ES, et al. Colite do cólon exclusivo: modelo experimental em ratos. *Acta Cir Bras*. 2000;15(supl 3):7-11.
14. Sousa MV, Priolli DG, Portes AV, Cardinalli IA, Pereira JA, Martinez CA. Evaluation by computerized morphometry of histopathological alterations of the colon wall in segments with and without intestinal transit in rats. *Acta Cir Bras*. 2008;23(5):417-24.
15. Agarwal VP, Schimmel EM. Diversion colitis: a nutritional deficiency syndrome ? *Nutr Rev*. 1989;47(9):257-61.
16. Guillemot F, Colombel JF, Neut C, Verplanck N, Lecomte M, Romond C, et al. Treatment of diversion colitis by short-chain fatty acids. Prospective and double-blind study. *Dis Colon Rectum*. 1991;34(10):861-4.
17. Kiely EM, Ajayi NA, Wheeler RA, Malone M. Diversion proctocolitis: response to treatment with short-chain fatty acids. *J Pediatr Surg*. 2001;36(10):1514-7.
18. Roediger WE. The starved colon-diminished mucosal nutrition, diminished absorption, and colitis. *Dis Colon Rectum*. 1990;33(10):858-62.
19. Giardiello FM, Lazenby AJ, Bayless TM. The new colitides, Collagenous, lymphocytic, and diversion colitis. *Gastroenterol Clin N Am*. 1995;24(3):717-29.
20. Martinez CA, Ribeiro ML, Gambero A, Miranda DD, Pereira JA, Nadal SR. The importance of oxygen free radicals in the etiopathogenesis of diversion colitis in rats. *Acta Cir Bras*. 2010;25(5):387-95.
21. Roediger WE, Millard S. Selective inhibition of fatty acid oxidation in colonocytes by ibuprofen: a cause of colitis ? *Gut*. 1995;36(1):55-9.
22. Butzner JD, Parmar R, Bell CJ, Dalal V. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. *Gut*. 1996;38(4):568-73.
23. Nassri CGG, Nassri AB, Favero E, Rotta CM, Martinez CAR, Margarido NF. Influência da irrigação de soluções nutricionais no colo exclusivo de trânsito intestinal: estudo experimental em ratos. *Rev bras colo-proctol*. 2008;28(3):306-14.
24. Blottière HM, Buecher B, Galmiche JP, Cherbut C. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. *Proc Nutr Soc*. 2003;62(1):101-6.
25. Shimotoyodome A, Meguro S, Hase T, Tokimitsu I, Sakata T. Short chain fatty acids but not lactate or succinate stimulate mucus release in the rat colon. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2000;125(4):525-31.
26. Barcelo A, Claustre J, Moro F, Chayvialle JA, Cuber JC, Plaisancié P. Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut*. 2000;46(2):218-24.
27. Finnie IA, Dwarakanath AD, Taylor BA, Rhodes JM. Colonic mucins synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut*. 1995;36(1):93-9.
28. Gaudier E, Forestier L, Gouyer V, Huet G, Julien R, Hoebler C. Butyrate regulation of glycosylation-related gene expression: evidence for galectin-1 upregulation in human intestinal epithelial goblet cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;325(3):1044-51.
29. Margarido NF, Nassri CGG, Nassri AB, Rotta CM, Soares LA. Método de limpeza mecânica anterógrada intra-operatória de colo excluído. Estudo experimental em ratos. *Rev Col Bras Cir*. 2003;30b:42.
30. Thomopoulos GN, Schulte BA, Spicer SS. Light and electron microscopic cytochemistry of glycoconjugates in the rectosigmoid colonic epithelium of the mouse and rat. *Am J Anat*. 1983;168(2):239-56.

Recebido em 04/08/2011

Aceito para publicação em 11/10/2011

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP). Projeto Nº: 2006/02306-6

Como citar este artigo:

Mello RO, Fonte FP, Silva CMG, Pereira JA, Margarido NF, Martinez CAR. Avaliação do número de células calciformes nas criptas da mucosa colônica com e sem trânsito intestinal. *Rev Col Bras Cir*. [periódico na Internet] 2012; 39(2). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

Endereço para correspondência:

Carlos Augusto Real Martinez

E-mail: caomartinez@uol.com.br