

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas**

**A fluoresceinoscopia como método preditivo  
de deiscência de anastomose intestinal isquêmica:  
estudo experimental em ratos**

Autora: Laura Moschetti

Orientador: Prof. Dr. Oly Campos Corleta

**Dissertação de Mestrado**

**2014**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas**

**A fluoresceinoscopia como método preditivo  
de deiscência de anastomose intestinal isquêmica:  
estudo experimental em ratos**

Autora: Laura Moschetti

Orientador: Prof. Dr. Oly Campos Corleta

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**Dissertação de Mestrado**

**2014**

## CIP - Catalogação na Publicação

Moschetti, Laura

A fluoresceinoscopia como método preditivo de deiscência de anastomose intestinal isquêmica: estudo experimental em ratos / Laura Moschetti. -- 2014.

62 f.

Orientador: Oly Campos Corleta.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Anastomose. 2. Fluorescência. 3. Perfusão intestinal. 4. Deiscência de anastomose. I. Campos Corleta, Oly, orient. II. Título.

*Dedico esta dissertação à minha família, em especial aos meus pais, **Humberto e Rosana**,  
por me estimularem a buscar meus sonhos;  
aos meus irmãos **Vicente e Fernando**, pelo exemplo e amizade;  
e ao meu esposo **Guilherme**, pelo incansável apoio e dedicação.*

## AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Oly Campos Corleta*, pela confiança, por estimular a concretização deste projeto, pela inspiração na busca pelo conhecimento, pela disponibilidade e amizade.

Aos integrantes da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), em especial à veterinária *Fabiola Meyer* e à enfermeira *Marta Justina Giotti Cioato*, que não mediram esforços para nos ajudar e criaram as condições necessárias para trabalharmos com profissionalismo e ética.

Aos integrantes da Unidade de Patologia Experimental do Centro de Pesquisas do HCPA, em especial à *Profa. Dra. Luise Meurer*, pela dedicação ao nosso projeto e pela disponibilidade em ajudar e ensinar.

À *Dra. Belisa Müller*, pela importante contribuição na coleta de dados e pelo plano de dar seguimento a esta linha de pesquisa.

Ao acadêmico de Medicina *Adriano Basso Dias*, pelo trabalho indispensável na coleta de dados, sempre com extremo interesse.

À *Dra. Daniela Cerqueira Koppe*, por ter me estimulado a buscar esse sonho e pela paciência nos mais diversos momentos, sendo amiga e conselheira.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

À UFRGS e ao HCPA, por disponibilizarem a base para minha formação acadêmica e profissional e investir em pesquisa, provendo uma estrutura admirável em qualquer âmbito e

incentivando financeiramente a pesquisa através do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE).

Aos membros do Serviço de Coloproctologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC), por proporcionarem minha formação como especialista, sempre com muita dedicação e interesse; e por me estimularem a buscar a excelência, não somente na prática cirúrgica-clínica, mas também na formação acadêmica.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Desenho do estudo .....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 2. Padrões da fluoresceinoscopia: A) homogêneo; B) reticular; C) em manchas; D) não fluorescente .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 3. Incidência de deiscência de anastomose por grupo de intervenção (p &lt; 0,001) .....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 4. Incidência de deiscência de anastomose por padrão de fluoresceinoscopia (p &lt; 0,001) .....</b>	<b>34</b>
<b>Figure 1. Study design .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Figure 2. Fluorescein fluorescence patterns: A) homogeneous; B) reticular; C) patchy; D) nonfluorescent.....</b>	<b>49</b>
<b>Figure 3. Incidence of anastomosis dehiscence according to intervention group (p &lt; 0.001).....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Figure 4. Incidence of anastomosis dehiscence according to fluorescence pattern (p &lt; 0.001).....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1. Caracterização da amostra .....</b>	<b>32</b>
<b>Tabela 2. Resultado do teste de fluoresceinoscopia nos grupos de intervenção (p &lt; 0,001).....</b>	<b>33</b>
<b>Tabela 3. Resultados diagnósticos do teste de fluoresceinoscopia para deiscência de anastomose .....</b>	<b>35</b>
<b>Tabela 4. Resultados do exame anatomopatológico .....</b>	<b>36</b>

<b>Table 1. Sample characteristics .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Table 2. Fluorescein fluorescence results according to type of intervention (p &lt; 0.001).....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Table 3. Diagnostic accuracy of fluorescein fluorescence for anastomosis dehiscence .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Table 4. Results of histological examination .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
2.1 Epidemiologia das cirurgias colorretais .....	12
2.2 Cicatrização e perfusão das anastomoses intestinais.....	12
2.3 Viabilidade intestinal e métodos de avaliação da perfusão intestinal.....	14
2.4 Fluoresceinoscopia.....	16
<b>3 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 Objetivo geral .....	23
4.2. Objetivos específicos.....	23
<b>5 ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS .....</b>	<b>24</b>
<b>6 ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS .....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As cirurgias colorretais são realizadas com grande frequência. Complicações associadas a essas cirurgias podem ser relacionadas à doença primária, à técnica cirúrgica ou à condição clínica do paciente. As complicações relacionadas às anastomoses são especialmente temidas.

A literatura médica é abundante em estudos experimentais e clínicos sobre a cicatrização das anastomoses e sobre formas de diminuir as taxas de deiscência. A avaliação da viabilidade circulatória intestinal da área anastomosada durante a cirurgia é considerada uma etapa muito importante. Tradicionalmente, ela é realizada através de parâmetros clínicos subjetivos. No entanto, a acurácia da avaliação clínica feita pelos cirurgiões para prever a deiscência de anastomose é muito baixa.

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de encontrar um método confiável e objetivo de avaliação da viabilidade intestinal durante o ato operatório. Até o presente momento, não há uma técnica considerada padrão-ouro. No entanto, métodos que utilizam a fluorescência vêm se destacando como promissores. Um deles, a fluoresceinoscopia, foi validado em diversos estudos como forma de diagnóstico de isquemia do intestino.

Apesar de a isquemia intestinal poder ser diagnosticada com clareza pela fluoresceinoscopia, esse método não foi estudado na avaliação do desfecho de anastomoses colorretais. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar o valor da

fluoresceinoscopia como método preditivo da ocorrência de deiscência de anastomose em um modelo animal de anastomose isquêmica.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Epidemiologia das cirurgias colorretais**

As cirurgias colorretais são realizadas com alta frequência em nosso meio (1). Anualmente são realizadas aproximadamente 260.000 cirurgias colorretais nos Estados Unidos. Recentemente, o índice de complicações dessas cirurgias foi estimado em 30% (2).

As complicações associadas às cirurgias colorretais podem ser locais ou sistêmicas, relacionadas ao ato operatório ou à condição clínica do paciente. As complicações podem ser divididas em não infecciosas (eventos cardíacos, tromboembólicos, insuficiência respiratória, entre outros) e infecciosas (infecção urinária e respiratória, infecção de ferida operatória e abscesso abdominal, por exemplo). Esses eventos diferem em sua incidência, porém todos são relevantes por ocasionarem um aumento da morbidade e mortalidade cirúrgica. Nesse contexto, as anastomoses têm lugar de destaque, uma vez que estão diretamente associadas a uma das mais temidas e danosas complicações: a deiscência, cicatrização incompleta com extravasamento do conteúdo intestinal (3-5).

### **2.2 Cicatrização e perfusão das anastomoses intestinais**

A cicatrização de uma anastomose intestinal pode sofrer influência negativa das condições gerais do paciente, tais como obesidade, desnutrição, anemia, diabetes, pneumopatia e imunodeficiência. Condições cirúrgicas locais, como sangramento, isquemia, infecção e inadequada técnica cirúrgica também interferem na cicatrização. Os fatores inerentes do paciente e de sua doença são dificilmente modificáveis. Assim, tornam-se

muito importantes os cuidados com a técnica da confecção da anastomose. Entre esses cuidados, a avaliação da vascularização das bordas intestinais, a aposição correta destas, a obtenção de uma adequada tensão da sutura e a hemostasia são frequentemente citados como fundamentais (6-8). A perfusão intestinal adequada é extremamente importante para que a cicatrização da anastomose ocorra sem intercorrências (4,9).

Avanços nas técnicas cirúrgicas, nos cuidados perioperatórios e um melhor entendimento das patologias levaram a uma melhora no tratamento das doenças colorretais. Apesar disso, a deiscência de anastomose permanece sendo um problema relevante. A literatura médica é abundante em estudos experimentais e clínicos sobre a cicatrização das anastomoses e sobre formas de diminuir as taxas de deiscência (3,10-14). A avaliação da viabilidade nutricional das bordas anastomóticas é considerada uma etapa muito importante nesse contexto. A determinação intraoperatória da viabilidade intestinal é sempre um desafio para os cirurgiões (15).

O aporte sanguíneo intestinal é essencial para uma adequada cicatrização da anastomose; sua deficiência leva a isquemia e necrose, com deiscência da sutura. Microcirculação insuficiente na área da anastomose é o fator responsável por uma grande parcela das deiscências e estenoses (16).

As deiscências têm incidência variando de 1,2 a 39%, com necessidade de revisão cirúrgica em 88 a 95% das vezes. Até 32% desses pacientes morrem (4,5,8,16). Deiscências estão associadas com a necessidade de procedimentos invasivos ou reintervenções cirúrgicas, íleo adinâmico prolongado, insuficiência ventilatória, internação em unidade de terapia intensiva, aumento do tempo e do custo de internação hospitalar, além de complicações crônicas, como estenose anastomótica e a necessidade de colostomias definitivas (17,18). Vinte e cinco por cento dos pacientes que sobrevivem às complicações pós-operatórias acabam com estomas permanentes (4,16).

### 2.3 Viabilidade intestinal e métodos de avaliação da perfusão intestinal

A microcirculação intestinal e sua viabilidade são geralmente estimadas pela cor da superfície da serosa, presença de peristalse intestinal, pulsação e sangramento ativo das artérias marginais. Essa avaliação é subjetiva e baseada na experiência do cirurgião, podendo ser errônea. A presença de uma cor escurecida na alça intestinal, por exemplo, pode ocorrer devido a insuficiência venosa transitória, sem necessariamente comprometer sua viabilidade. Por outro lado, nas fases iniciais da insuficiência arterial, o intestino pode apresentar um aspecto normal. A ausência de pulso pode ser secundária a hipotensão ou espasmo. A peristalse pode estar presente mesmo em alças grosseiramente isquêmicas (16). Assim, a acurácia da avaliação clínica realizada pelos cirurgiões para prever a deiscência de anastomose é muito baixa, com taxa de falha de até 60% (5,19,20). Apesar disso, continua sendo o recurso mais utilizado na avaliação da viabilidade intestinal (9,17).

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de encontrar um método confiável e objetivo de avaliação do fluxo sanguíneo intestinal durante uma cirurgia. O emprego clínico de tal método transcende a avaliação de anastomoses e inclui a avaliação da viabilidade de segmentos intestinais com isquemia transitória ou definitiva, como, por exemplo, após o encarceramento de uma hérnia ou na isquemia mesentérica (19,21-25).

Entre as diversas técnicas testadas na avaliação da perfusão intestinal estão a oximetria de pulso na parede intestinal, a microscopia vital, a medida polarográfica da tensão de oxigênio, a ecografia com Doppler, o *clearance* de gás hidrogênio, os estudos com radioisótopos, as medidas de contratilidade da parede intestinal, a tonometria, a microdiálise, a detecção de imagem térmica e a avaliação de propriedades elétricas da parede intestinal. Devido a múltiplas limitações, baixa acurácia ou custo elevado, nenhuma dessas técnicas encontrou aplicabilidade na prática clínica (16,19).

Recentemente, alguns métodos de melhor aplicabilidade clínica vêm se destacando na literatura médica. A espectrofotometria utiliza o princípio de transmissão e absorção de luz para medir a oxigenação dos tecidos. Ela pode ser realizada através de duas técnicas:

espectrofotometria por luz visível e espectrofotometria por infravermelho, na qual se utiliza um corante endovenoso. Uma baixa saturação de oxigênio nas bordas da anastomose está relacionada a aumento do risco de complicações anastomóticas. Entretanto, essa técnica é relativamente nova, com importantes limitações e um custo elevado (16).

A fluxometria por *laser* Doppler quantifica o número de células sanguíneas circulantes na região examinada. Sua utilidade para a detecção de isquemia intestinal já foi demonstrada. No entanto, o resultado pode ser afetado por artefatos no local da medição e por alterações cardiovasculares sistêmicas, como uso de drogas vasoativas e anestesia peridural, o que limita bastante seu uso clínico (16).

As técnicas com emprego de fluorescência têm dois principais métodos: a fluoresceinoscopia e a angiografia fluorescente por *laser* infravermelho. A fluoresceinoscopia é realizada mediante administração intravenosa de fluoresceína sódica e iluminação do tecido por luz ultravioleta. Na angiografia, injeta-se o corante indocianina verde por via intravenosa e ilumina-se o intestino com *laser* infravermelho. Kudzus et al. demonstraram a aplicabilidade dessa técnica, com diminuição das taxas de reintervenção cirúrgica por deiscência de anastomose em até 60% (4). As desvantagens da angiografia são seu custo mais elevado e a possibilidade de os conteúdos intestinais interferirem no resultado, podendo simular áreas de necrose intestinal (4,9,16,26,27).

Até o presente momento, não há uma técnica considerada padrão-ouro na avaliação da viabilidade intestinal (16). Horgan e Gorey estabeleceram cinco critérios básicos que devem ser alcançados pelos testes: 1) o equipamento deve ser de fácil alcance na sala cirúrgica; 2) o instrumento não deve ser complicado ou exigir a presença de uma pessoa especializada; 3) o método deve ter boa acurácia, com baixos índices de resultados falso-positivos e falso-negativos; 4) o método deve ser objetivo e reproduzível; e 5) o custo deve ser baixo (24). A técnica de fluoresceinoscopia atende esses critérios.

## 2.4 Fluoresceinoscopia

Adolf von Bayer sintetizou a fluoresceína em 1871. Em 1960, Novothy e Alvis desenvolveram a técnica de angiografia de fundo ocular para o diagnóstico de transtornos coriorretinianos, método que continua sendo amplamente utilizado até o momento (28). Herrlin et al. foram os primeiros a analisar fluorescência sob uma lâmpada ultravioleta para avaliar a viabilidade intestinal intraoperatória (29). Vários outros autores seguiram os seus passos, publicando estudos semelhantes e refinando a técnica (15,22-25).

A fluoresceína sódica é um corante orgânico de baixo custo e de uso seguro para administração endovenosa. Encontra-se disponível no mercado em ampolas de 2 e 3 ml a 25%, ou de 5 ml a 10%, em solução aquosa estéril. Tem a capacidade de absorver luz de determinado comprimento de onda e emitir um fóton de luz de comprimento de onda diferente. Aproximadamente 80% da fluoresceína na circulação se liga às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina. Os restantes 20% circulam livremente e são os responsáveis pela fluorescência visível durante a realização do exame (30).

A fluoresceína tem difusão rápida. Alguns minutos após a administração endovenosa, mucosas, urina e tecidos bem perfundidos já apresentam a coloração fluorescente. A metabolização do corante é predominantemente renal, uma pequena quantidade é metabolizada pelo fígado. A fluoresceína é eliminada pela urina entre 24 e 36 horas após sua administração (30).

Recentemente, um estudo multicêntrico demonstrou que o risco de efeitos adversos associados à administração de fluoresceína (náusea, vômitos, hipotensão transitória, eritema no local da punção, *rash* difuso e epigastralgia) é de 1,4%. Eventos adversos graves não foram relatados (31). Relatos de reações anafilactoides são extremamente raros, estimando-se a taxa de óbito em 1 para cada 220.000 pacientes submetidos à administração de fluoresceína sódica endovenosa (28).

A técnica da fluoresceinoscopia consiste na administração endovenosa da fluoresceína sódica e observação dos tecidos iluminados por luz ultravioleta em ambiente



escuro. A luminescência diferencia claramente os tecidos perfundidos, que aparecem com aspecto amarelo esverdeado brilhante, dos isquêmicos, que permanecem escuros. O padrão de fluorescência é facilmente identificado, a técnica é reprodutível e confiável para o diagnóstico de isquemia intestinal (23). A sensibilidade e a especificidade do método se aproximam de 100% (22,25).

A fluoresceinoscopia pode ser empregada durante a laparotomia, com o uso de uma lâmpada de Wood (ultravioleta) ou durante a videolaparoscopia, com o uso de filtros ópticos junto à fonte de luz, para produzir luz ultravioleta (16,21,32). Além disso, a técnica de fluorescência vem ganhando destaque pelo seu emprego na cirurgia robótica (5,33). Nesse tipo de cirurgia, a técnica de fluorescência é realizada antes da confecção de anastomoses intestinais com a finalidade de avaliar objetivamente a microcirculação das bordas intestinais, uma vez que a avaliação intraoperatória de segmentos intestinais isquêmicos realizada por parâmetros subjetivos pode ser falha. A técnica de fluorescência possibilita ao cirurgião escolher o melhor ponto para realizar a secção do intestino, confeccionando anastomoses mais seguras (33). Jafari et al. recentemente publicaram um estudo caso-controle em que demonstraram uma redução de 12% no risco de deiscência em pacientes submetidos a avaliação com fluorescência (5). Em um estudo retrospectivo, Kudzus et al. demonstraram uma redução de 60% no risco de reintervenção cirúrgica por deiscência de anastomose em pacientes submetidos a cirurgia eletiva com a utilização de técnica de fluorescência (4). Finalmente, Sherwinter et al. demonstraram a possibilidade de realizar o exame de fluorescência por via transanal para avaliar a perfusão da anastomose durante uma cirurgia (26).

Até o presente momento, vários estudos demonstraram a capacidade da fluoresceinoscopia de identificar áreas de isquemia e avaliar a perfusão de anastomoses. No entanto, a relação dos achados com a deiscência de anastomoses não foi investigada prospectivamente. Há carência de estudos que demonstrem o impacto da fluoresceinoscopia na cicatrização das anastomoses (5,27,33). O presente estudo foi

desenvolvido no intuito de contribuir com dados preliminares para o preenchimento desta lacuna da literatura.

### 3 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Irkorucu O, Ucan BH, Cakmak GK, Emre AU, Tascilar O, Ofluoglu E, et al. Does sildenafil reverse the adverse effects of ischemia on ischemic colon anastomosis: yes, 'no'. *Int J Surg*. 2009;7(1):39–43.
2. Arriaga AF, Lancaster RT, Berry WR, Regenbogen SE, Lipsitz SR, Kaafarani HMA, et al. The better colectomy project: Association of evidence-based best-practice adherence rates to outcomes in colorectal surgery. *Ann Surg*. 2009;250(4):507–13.
3. Santos JCM Jr. Post-surgical complications of the colorectal anastomosis. *Rev Bras Coloproct*. 2011;31(1):98–106.
4. Kudzus S, Roesel C, Schachtrupp A, Höer JJ. Intraoperative laser fluorescence angiography in colorectal surgery: A noninvasive analysis to reduce the rate of anastomotic leakage. *Langenbecks Arch Surg*. 2010;395(8):1025–30.
5. Jafari MD, Lee KH, Halabi WJ, Mills SD, Carmichael JC, Stamos MJ, et al. The use of indocyanine green fluorescence to assess anastomotic perfusion during robotic assisted laparoscopic rectal surgery. *Surg Endosc*. 2013;27(8):3003–8.
6. Abbas MA. Anastomotic leak: Should we continue to accept the risks? *Dis Colon Rectum*. 2010;53(6):859–60.
7. Attard J-AP, Raval MJ, Martin GR, Kolb J, Afrouzian M, Buie DW, et al. The effects of systemic hypoxia on colon anastomotic healing: An animal model. *Dis Colon Rectum*. 2005;48(7):1460–70.
8. Nivatvongs S. Complications of anorectal and colorectal operations. In: Gordon PH, Nivatvongs S, editors. *Principles and practice of surgery for the colon, rectum, and anus*. 3rd ed. New York: Informa Healthcare; 2007. pp. 1165–90.
9. Davis B, Rivadeneira DE. Complications of colorectal anastomoses. *Surg Clin N Am*. 2013;93(1):61–87.

10. Koruda MJ, Rolandelli RH. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. *J Surg Res.* 1990;48(5):504–15.
11. Hendriks T, Mastboom WJ. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. *Dis Colon Rectum.* 1990;33(10):891–901.
12. Uzun H, Konukoglu D, Nuri MK, Ersoy EY, Özçevik S, Yavuz N. The effects of sildenafil citrate on ischemic colonic anastomotic healing in rats: its relationship between nitric oxide and oxidative stress. *World J Surg.* 2008;32(9):2107–13.
13. Pasma LAE, Bleichrodt RP, van Goor H, Hendriks T. Transient profound mesenteric ischemia strongly affects the strength of intestinal anastomoses in the rat. *Dis Colon Rectum.* 2007;50(7):1070–9.
14. Kaya Y, Coskun T, Ayhan S, Kara E, Sakarya A, Var A. The effect of tadalafil on anastomotic healing in ischemic small intestine in rats. *Surg Today.* 2010;40(6):555–60.
15. Carter MS, Fantini GA, Sammartano RJ, Mtsudo S, Silverman DG, Boley SJ. Qualitative and quantitative fluorescein fluorescence in determining intestinal viability. *Am J Surg.* 1984;147(1):117–23.
16. Urbanavicius L, Pattyn P, Van de Putte D, Venskutonis D. How to assess intestinal viability during surgery: A review of techniques. *World J Gastrointest Surg.* 2011;3(5):59–69.
17. Karliczek A, Benaron DA, Zeebregts CJ, Wiggers T, van Dam GM. Intraoperative ischemia of the distal end of colon anastomoses as detected with visible light spectroscopy causes reduction of anastomotic strength. *J Surg Res.* 2009;152(2):288–95.
18. Dietz DW. Postoperative complications. In: Wolff BG, Fleshman JW, Beck DE, Pemberton JH, Wexner SD, editors. *The ASCRS textbook of colon and rectal surgery.* 2nd ed. New York: Springer; 2011. pp. 157–75.
19. Malafaia O, Brioschi ML, Aoki SMS, Dias FG, Gugelmin BS, Aoki MS, et al. Infrared imaging contribution for intestinal ischemia detection in wound healing. *Acta Cir Bras.* 2008;23(6):511–9.
20. Karliczek A, Harlaar NJ, Zeebregts CJ, Wiggers T, Baas PC, van Dam GM. Surgeons lack predictive accuracy for anastomotic leakage in gastrointestinal surgery. *Int J Colorectal Dis.* 2009;24(5):569–76.
21. Paral J, Subrt Z, Lochman P, Ferko A, Dusek T, Slaninka I, et al. Peroperative

- diagnostics of acute bowel ischemia using ultraviolet light and fluorescein dye. *Rozhl Chir.* 2009;88(10):590–5.
22. Paral J, Jiri P, Ferko A, Alexander F, Plodr M, Michal P, et al. Laparoscopic diagnostics of acute bowel ischemia using ultraviolet light and fluorescein dye: An experimental study. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2007;17(4):291–5.
  23. Stolar CJ, Randolph JG. Evaluation of ischemic bowel viability with a fluorescent technique. *J Pediatr Surg.* 1978;13(3):221–5.
  24. Horgan PG, Gorey TF. Operative assessment of intestinal viability. *Surg Clin North Am.* 1992;72(1):143–55.
  25. Bulkley GB, Zuidema GD, Hamilton SR, O'Mara CS, Klacsmann PG, Horn SD. Intraoperative determination of small intestinal viability following ischemic injury: A prospective, controlled trial of two adjuvant methods (doppler and fluorescein) compared with standard clinical judgment. *Ann Surg.* 1981;193(5):628.
  26. Sherwinter DA, Gallagher J, Donkar T. Intra-operative transanal near infrared imaging of colorectal anastomotic perfusion: A feasibility study. *Colorectal Dis.* 2012;15(1):91–6.
  27. Iinuma Y, Hirayama Y, Yokoyama N, Otani T, Nitta K, Hashidate H, et al. Intraoperative near-infrared indocyanine green fluorescence angiography (NIR-ICG AG) can predict delayed small bowel stricture after ischemic intestinal injury: Report of a case. *J Pediatr Surg.* 2013;48(5):1123–8.
  28. Balbino M, Silva G, Correia G. Anaphylaxis with convulsions following intravenous fluorescein angiography at an outpatient clinic. *Einstein.* 2012;10(3):374–6.
  29. Herrlin JO, Glasser ST, Lange K. New methods for determining the viability of bowel: Preliminary report with clinical cases. *Arch Surg.* 1942;45(5):785–91.
  30. Prall FR, Olson JL, Barnett CJ, mandava N. Fluorescein angiography, indocyanine green angiography and optical coherence tomography. In: Yanoff M, Duker JS, editors. *Ophthalmology.* 3rd ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2009. pp. 536–44.
  31. Wallace MB, Meining A, Canto MI, Fockens P, Miehlke S, Roesch T, et al. The safety of intravenous fluorescein for confocal laser endomicroscopy in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;31(5):548–52.
  32. Cahill RA, Ris F, Mortensen NJ. Near-infrared laparoscopy for real-time intra-operative arterial and lymphatic perfusion imaging. *Colorectal Dis.* 2011;13 (Suppl 7):12–7.

33. Bae SU, Baek SJ, Hur H, Baik SH, Kim NK, Min BS. Intraoperative near infrared fluorescence imaging in robotic low anterior resection: Three case reports. *Yonsei Med J.* 2013;54(4):1066–9.

## **4 OBJETIVOS**

Neste capítulo, serão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos que guiaram a elaboração do estudo.

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar o valor da fluoresceinoscopia como método preditivo da ocorrência de deiscência de anastomose em um modelo animal de anastomose isquêmica em ratos.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Definir a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia do teste de fluoresceinoscopia para avaliação de deiscência de anastomose.
- Definir os índices de deiscência de anastomose em um modelo de anastomose isquêmica em ratos.
- Descrever os resultados do teste de fluoresceinoscopia.
- Descrever os achados do exame anatomopatológico da peça cirúrgica.
- Correlacionar os índices de deiscência de anastomose com os resultados do teste de fluoresceinoscopia.
- Correlacionar os resultados do teste de fluoresceinoscopia com os achados anatomopatológicos da peça cirúrgica.

## 5 ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS

### **Teste de fluorescência prediz com acurácia deiscência de anastomose intestinal isquêmica: um estudo experimental em ratos**

Laura Moschetti<sup>1</sup>, Oly Campos Corleta<sup>1,2</sup>, Luise Meurer<sup>3</sup>, Belisa Müller<sup>4</sup>, Adriano Basso Dias<sup>5</sup>, Fabíola Schons Meyer<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Serviço de Cirurgia Geral, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Serviço de Patologia Experimental, HCPA, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup> Residência Médica em Coloproctologia, HCPA, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>5</sup> Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>6</sup> Unidade de Experimentação Animal, HCPA, Porto Alegre, RS, Brasil.

#### **Autor correspondente:**

Laura Moschetti

Av. Mariland, 720/603, Auxiliadora, CEP 90440-190 - Porto Alegre, RS - Brasil

Tel.: +55 (51) 3737.7775, Fax: +55 (51) 3737.7772, E-mail: lauramoschetti@gmail.com



## RESUMO

**Introdução:** A deiscência de anastomose é um problema de grande magnitude na cirurgia colorretal, provavelmente influenciada pela diminuição da vascularização sanguínea nas bordas anastomóticas. A avaliação da vascularização das bordas anastomóticas com fluoresceinoscopia pode reduzir complicações.

**Objetivo:** Avaliar o valor da fluoresceinoscopia como método preditivo da ocorrência de deiscência de anastomose em um modelo animal de anastomose isquêmica em ratos.

**Métodos:** Estudo experimental, randomizado, cegado, com grupo controle. Um total de 55 ratos foram alocados a quatro grupos de procedimentos cirúrgicos distintos. Os animais foram submetidos à confecção de anastomose colocolônica em segmento intestinal sem desvascularização (grupo controle) ou em segmento desvascularizado com 1, 2 ou 3 cm de extensão (grupos 1, 2 e 3, respectivamente), e, a seguir, à injeção de fluoresceína e exame sob luz ultravioleta (fluoresceinoscopia). Sete dias após, os animais foram reoperados, e verificou-se a presença ou ausência de deiscência de anastomose.

**Resultados:** A fluoresceinoscopia demonstrou sensibilidade de 96,3%, especificidade de 89,3%, valor preditivo positivo de 89,7%, valor preditivo negativo de 96,2% e acurácia de 92,7% para deiscência de anastomose. Vinte e sete animais (49,1%) apresentaram deiscência, sendo um (3,7%) do grupo 1 e 26 (96,3%) do grupo 3 ( $p < 0,001$ ). Houve 92,7% de concordância entre os resultados da fluoresceinoscopia e a deiscência de anastomose (Kappa = 0,86;  $p < 0,001$ ) e de 90,9% entre o grupo intervenção e a fluoresceinoscopia (Kappa = 0,82;  $p < 0,001$ ).

**Conclusão:** A fluoresceinoscopia apresenta ótimo valor preditivo para deiscência de anastomose em um modelo animal de anastomose isquêmica.

**Palavras-chave:** anastomose, fluorescência, perfusão intestinal, deiscência de anastomose.

## INTRODUÇÃO

Cirurgias envolvendo anastomoses de intestino grosso e reto estão entre as intervenções abdominais mais realizadas no mundo ocidental (1). Avanços na técnica cirúrgica e nos cuidados perioperatórios e o progresso no entendimento das patologias têm levado a melhores resultados do tratamento das doenças colorretais. Entretanto, a frequência de complicações é estimada em 30%, e a deiscência de anastomose permanece sendo um problema relevante (2,3,4).

A literatura médica é abundante em estudos experimentais e clínicos sobre a cicatrização de anastomoses e sobre formas de diminuir a ocorrência de deiscência (5-10). A avaliação da viabilidade perfusional das bordas anastomóticas é considerada uma etapa importante para a prevenção da deiscência (1,11). No entanto, a acurácia da avaliação clínica para prever a deiscência de anastomose é muito baixa, com taxa de falha de até 60% (2,12-14).

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de encontrar um método confiável e objetivo de avaliação da perfusão intestinal durante uma cirurgia (3,4,12,15-19). Até o presente momento, não há uma técnica considerada padrão-ouro na avaliação da viabilidade intestinal, porém os métodos de fluorescência vêm ganhando destaque (5-10,20).

A técnica da fluoresceinoscopia consiste na administração endovenosa de fluoresceína sódica e observação dos tecidos iluminados por luz ultravioleta em ambiente escuro. O padrão de luminescência diferencia os tecidos perfundidos dos isquêmicos (17). A sensibilidade e especificidade do método se aproximam de 100% (16,19). A fluoresceinoscopia pode ser empregada durante uma laparotomia ou videolaparoscopia (15,20,21). A técnica de fluorescência vem ganhando destaque pelo seu emprego na cirurgia robótica, sendo realizada antes da confecção de anastomoses intestinais com a finalidade de avaliar objetivamente a microcirculação das bordas intestinais (14,22).

Vários estudos já demonstraram a capacidade da fluoresceinoscopia de identificar

áreas de isquemia e avaliar a perfusão de anastomoses. Por outro lado, a relação desses achados com a deiscência de anastomose não foi demonstrada prospectivamente (14,22,23).

O presente estudo tem como objetivo avaliar o valor da fluoresceinoscopia como método preditivo da ocorrência de deiscência de anastomose em um modelo animal de anastomose isquêmica em ratos.

## **MÉTODOS**

### **Ética e animais**

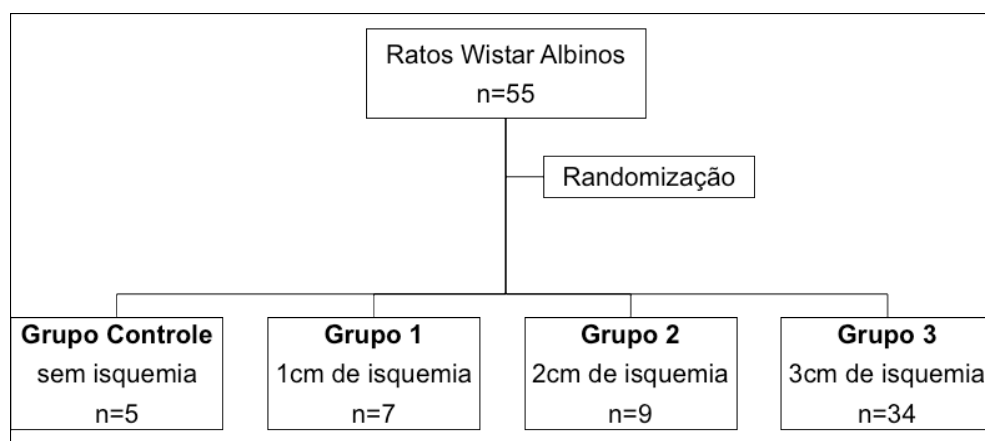
Este trabalho segue as normas propostas para projetos experimentais envolvendo animais e teve seu protocolo de pesquisa aprovado sob número 110668 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEUA/HCPA) vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

O estudo foi conduzido na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram utilizados 55 ratos Wistar albinos, machos, adultos, provenientes de ninhadas contemporâneas. Os animais foram armazenados em grupos de quatro animais por gaiola, em temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C), com ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo ração padrão para ratos e livre acesso a água.

### **Desenho do estudo**

Estudo experimental, randomizado, cegado, com grupo controle. Os ratos foram alocados por distribuição casual aleatória em quatro grupos de procedimentos cirúrgicos distintos, seguidos da realização do teste de fluoresceinoscopia no transoperatório. O tamanho da amostra de cada grupo foi determinado previamente à randomização, de acordo

com a prevalência de deiscência esperada em cada grupo, esta baseada nos cálculos de estudo piloto. Utilizou-se o menor número possível que permitisse análise estatística (Figura 1). Quatro grupos foram formados: o grupo controle teve confecção de anastomose colocolônica sem desvascularização; os grupos 1, 2 e 3 tiveram anastomoses em segmentos com desvascularização de 1, 2 e 3 cm de comprimento, respectivamente.



**Figura 1.** Desenho do estudo

### **Anestesia**

Os animais foram pesados e submetidos a anestesia geral com cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal. Após a verificação da perda do reflexo de retirada da pata, foi realizada a tricotomia da região abdominal.

### **Procedimento cirúrgico**

Os animais foram fixados em mesa aquecida e foi realizada a antisepsia do campo operatório com iodopovidona tópica a 10%. Foram utilizados instrumentais cirúrgicos estéreis para a realização do procedimento (24).

Todos os animais foram submetidos a laparotomia mediana, revisão da cavidade abdominal e exposição do cólon ascendente. O grupo controle foi submetido à secção transversal do cólon ascendente e confecção da anastomose colocolônica em plano único,

com sutura contínua com fio monofilamentar de polipropileno 6-0 (25). Os grupos 1, 2 e 3 foram submetidos à desvascularização seletiva de um segmento do cólon ascendente com 1, 2 e 3 cm de extensão, respectivamente (26). A técnica consiste na desvascularização da artéria marginal em dois pontos do cólon ascendente e dos vasos retos entre esses dois pontos com a utilização de um cautério bipolar (1). No ponto central do segmento desvascularizado o cólon foi seccionado, e foi confeccionada anastomose colocolônica.

Após a confecção da anastomose, todos os grupos foram submetidos ao teste de fluoresceinoscopia. Inicialmente foi realizada administração endovenosa de fluoresceína sódica (1,5 mg/100 mg de peso, diluída em soro fisiológico numa solução de 3 mg/ml). Após um tempo de espera de 3 minutos, o ambiente foi escurecido e o campo cirúrgico iluminado com luz ultravioleta (lâmpada de Wood com 16 Watts - Ramsor<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil). O segmento do intestino distando 2 cm de cada lado da anastomose foi avaliado quanto ao seu padrão de fluorescência (descrição a seguir), com o auxílio de uma lupa de quatro dioptrias.

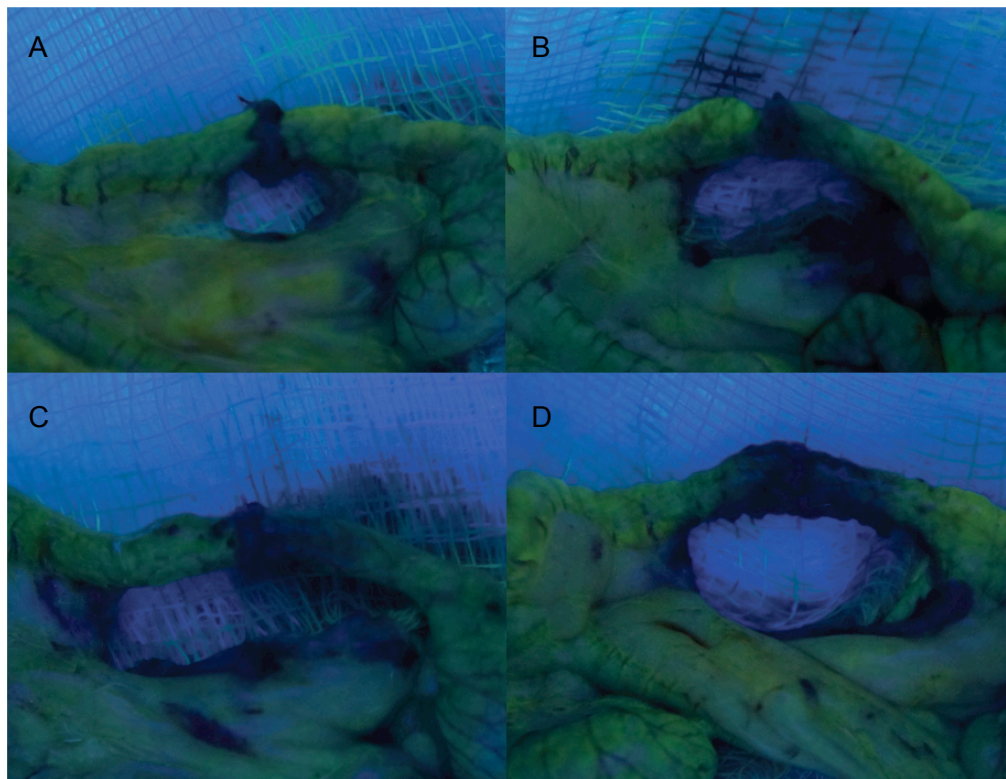
A síntese da parede abdominal foi realizada com sutura contínua em dois planos com fio de náilon 4-0. Ao término do procedimento, foi administrado cloridrato de tramadol (5 mg/kg) por via intraperitoneal para analgesia pós-operatória.

Após sete dias, os ratos foram submetidos a novo procedimento cirúrgico, com a realização dos seguintes passos: revisão da cavidade abdominal; revisão da área de anastomose com lise cuidadosa de aderências; ressecção do segmento colônico correspondente à área da anastomose; morte dos animais por exsanguinação; encaminhamento da peça cirúrgica para exame anatomopatológico.

### **Teste de fluoresceinoscopia**

O teste foi realizado no primeiro tempo cirúrgico, logo após a confecção da anastomose. Cada anastomose foi analisada na área distando 2 cm de cada lado e

categorizada segundo os padrões descritos na literatura, como homogêneo, reticular, em manchas, ou não fluorescente (17,19,27) (Figura 2).



**Figura 2.** Padrões da fluoresceinoscopia: A) homogêneo; B) reticular; C) em manchas; D) não fluorescente

### **Deiscência de anastomose e achados cirúrgicos**

Na reintervenção cirúrgica foi realizada a revisão da cavidade abdominal e do segmento colônico correspondente à anastomose. Os achados cirúrgicos foram categorizados de acordo com os seguintes graus de alteração: grau 1 - cólon ascendente com aparência normal até edema discreto; grau 2 - edema acentuado ou sinais de isquemia (coloração arroxeadada, áreas enegrecidas); grau 3 - deiscência parcial bloqueada ou abscesso em torno da anastomose; grau 4 - deiscência total bloqueada ou peritonite por deiscência total ou parcial.

## **Estudo histopatológico**

O segmento de cólon de 2 cm contendo a anastomose no seu ponto médio foi ressecado. Foi realizada a abertura da peça pela borda antimesentérica e fixação em formol a 10% por 48 horas. Após, o segmento foi embebido em parafina, seccionado em cortes com 5  $\mu\text{m}$  de intervalo e corado pela técnica de hematoxilina-eosina.

As lâminas foram avaliadas através de microscopia óptica (aumento de 100x) por um patologista, sendo registrado o tamanho ( $\mu\text{m}$ ) da área de ulceração e regeneração junto à anastomose. O tamanho foi definido através das medidas da área de ulceração e de regeneração a partir da linha de anastomose até a borda proximal e distal do cólon, sendo registrada a maior medida encontrada.

## **Considerações estatísticas**

O desfecho primário foi o valor preditivo da fluoresceinoscopia para deiscência de anastomose. Os desfechos secundários foram a sensibilidade, a especificidade e a acurácia da fluoresceinoscopia em predizer deiscência de anastomose, os resultados do teste de fluoresceinoscopia, a incidência de deiscência de anastomose, os achados cirúrgicos e a avaliação anatomopatológica através da técnica de hematoxilina-eosina.

Foi realizado um estudo piloto com 20 animais para cálculo do tamanho da amostra, uma vez que a frequência de deiscência no modelo experimental era desconhecida. Considerando que o objetivo era estabelecer um modelo com frequência esperada de 45% de deiscência, uma amostra de 55 animais foi suficiente para obter sensibilidade de 99% e especificidade de 91%, com precisão de 5% para sensibilidade e 10% para especificidade e nível de confiança de 95%.

Os resultados das análises descritivas das variáveis contínuas foram expressos através de média e desvio padrão ou mediana e amplitude interquartilica. Os resultados das variáveis qualitativas foram expressos através de frequências absolutas e proporções.

Para a análise de concordância de duas ou mais variáveis qualitativas, foi utilizado o

teste de Kappa, e para análise de comparação entre os grupos, foi empregado o teste do qui-quadrado. Para as variáveis contínuas de distribuição assimétrica, foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

## RESULTADOS

As características principais da amostra encontram-se descritas na Tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à idade, peso e tempo cirúrgico. Houve duas mortes no grupo 3, após o primeiro tempo cirúrgico. Nos dois casos, foi evidenciada deiscência de anastomose durante a necropsia.

**Tabela 1.** Caracterização da amostra

<b>Variáveis</b>	<b>n=55</b>
Idade (dias) – média ± DP	77,8 ± 4,0
Peso inicial (g) – média ± DP	319,4 ± 34,7
Intervenção – n (%)	
Grupo controle	5 (9,1)
Grupo 1	7 (12,7)
Grupo 2	9 (16,4)
Grupo 3	34 (61,8)
Tempo cirúrgico 1 (min) – média ± DP	24,6 ± 3,1
Fluoresceinoscopia – n (%)	
Homogêneo	13 (23,6)
Reticular	13 (23,6)
Em manchas	19 (34,6)
Não fluorescente	10 (18,2)
Morte – n (%)	2 (3,6)
Deiscência de anastomose – n (%)	27 (49,1)



Achados cirúrgicos na reintervenção – n (%)

Grau 1	15 (27,3)
Grau 2	13 (26,6)
Grau 3	26 (47,3)
Grau 4	1 (1,8)
Tempo cirúrgico 2 (min) – média ± DP	10,5 ± 2,9

Achados anatomopatológicos (µm)

Regeneração (100x) – md (P25-P75)	0,5 (0,5-0,75)
Ulceração (100x) – md (P25-P75)	1,3 (1-2)

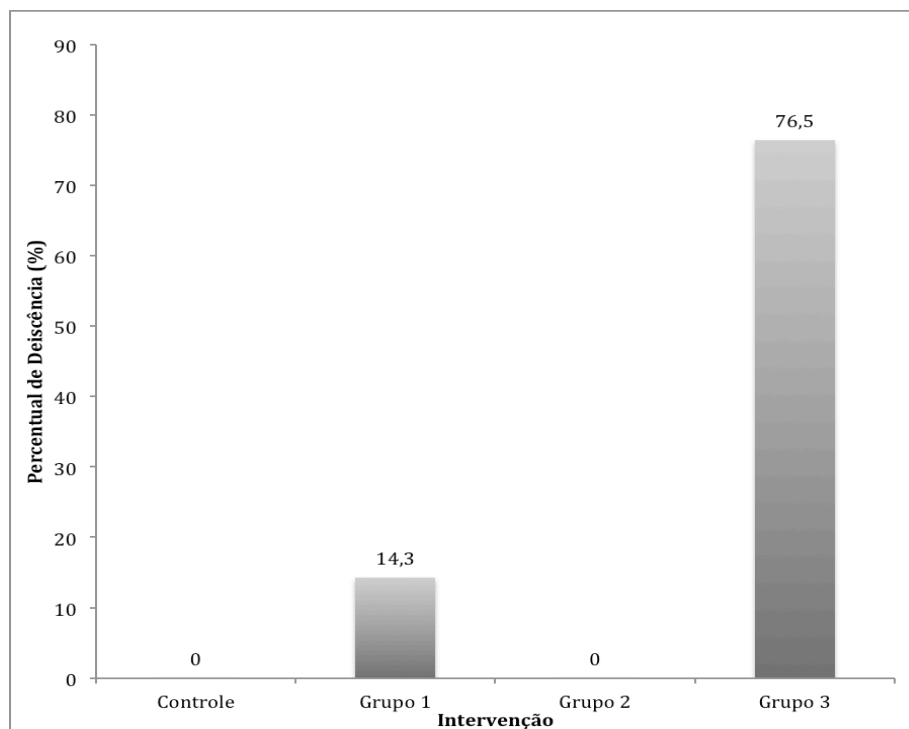
DP = desvio padrão; md = mediana; P25-P75 = percentil 25 e 75.

Os resultados do teste de fluoresceinoscopia por grupo estão descritos na Tabela 2.

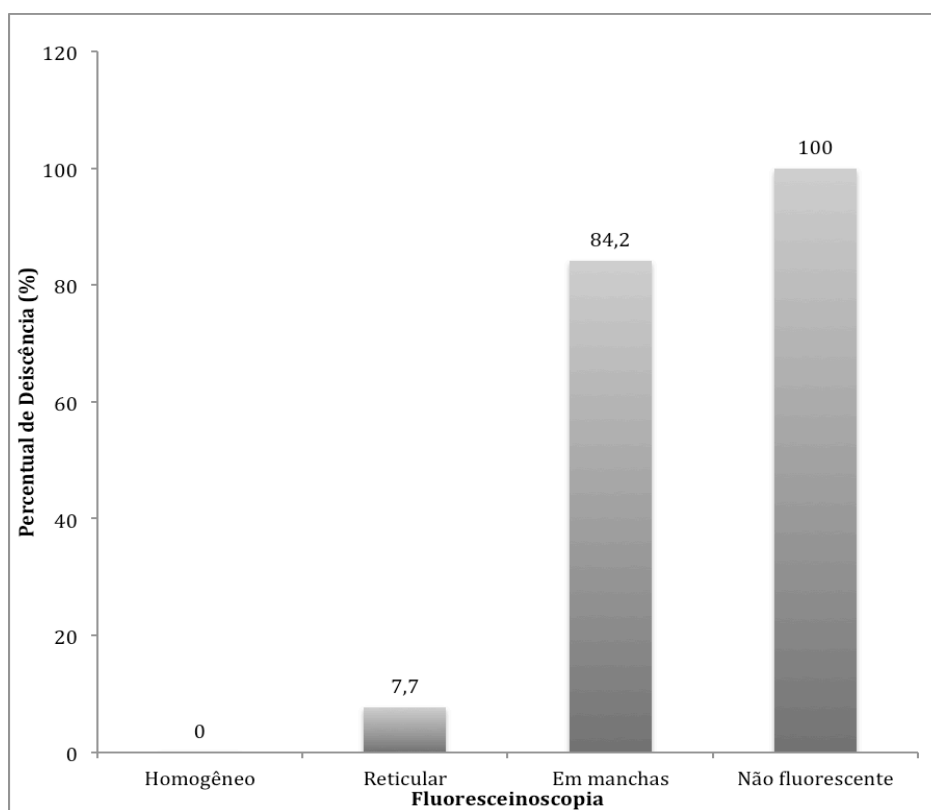
**Tabela 2.** Resultado do teste de fluoresceinoscopia nos grupos de intervenção (p < 0,001)

Intervenção	Homogêneo	Reticular	Em manchas	Não fluorescente
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Controle	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Grupo 1	6 (85,7)	1 (14,3)	0 (0)	0 (0)
Grupo 2	2 (22,2)	7 (77,8)	0 (0)	0 (0)
Grupo 3	0 (0)	5 (14,7)	19 (55,9)	10 (29,4)

Vinte e sete animais (49,1%) apresentaram deiscência de anastomose. Desses, um rato (3,7%) pertencia ao grupo 1 e 26 ratos (96,3%) pertenciam ao grupo 3 (p < 0,001). A incidência de deiscência dentro de cada grupo encontra-se descrita na Figura 3. A incidência de deiscência por padrão de fluoresceinoscopia está descrita na Figura 4.



**Figura 3.** Incidência de deiscência de anastomose por grupo de intervenção ( $p < 0,001$ )



**Figura 4.** Incidência de deiscência de anastomose por padrão de fluoresceinoscopia ( $p < 0,001$ )

Para fins de cálculo, devido às semelhanças apresentadas nos resultados e ao mesmo significado clínico, os padrões homogêneo e reticular foram agrupados, assim como foram os padrões em mancha e não fluorescente. A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia do teste de fluoresceinoscopia para prever deiscência de anastomose estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Resultados diagnósticos do teste de fluoresceinoscopia para deiscência de anastomose

	<b>Proporção (%)</b>	<b>IC95%</b>
Sensibilidade	96,3	83,1-99,8
Especificidade	89,3	73,5-97,2
VPP	89,7	74,4-97,3
VPN	96,2	82,5-99,8
Acurácia	92,7	83-4-97,6

IC95% = intervalo de confiança de 95%; VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo.

Os achados anatomopatológicos da técnica de coloração hematoxilina-eosina estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados do exame anatomopatológico

	Ulceração		Regeneração	
	md (P25-P75)	p	md (P25-P75)	p
Fluoresceinoscopia		0,003		0,489
Homogêneo/Reticular	1,0 (0,37-1,57)		0,5 (0,43-1,0)	
Em manchas/Não fluorescente	2,0 (1,0-3,0)		0,5 (0,5-0,75)	
Intervenção		0,006		0,41
Grupo controle	1,0 (0,62-1,25)		0,5 (0,25-0,75)	
Grupo 1	1,0 (0,5-1,8)		0,5 (0,25-0,5)	
Grupo 2	0,37 (0,31-1,5)		0,5 (0,37-1,0)	
Grupo 3	1,75 (1,0-3,0)		0,5 (0,5-0,75)	
Deiscência de anastomose		0,001		0,921
Ausente	1,0 (0,4-1,5)		0,5 (0,5-1,0)	
Presente	2,0 (1,0-3,0)		0,5 (0,5-0,62)	

md = mediana; P25-P75 = percentil 25 e 75.

Foi realizada análise de concordância entre o resultado do teste de fluoresceinoscopia e a incidência de deiscência, e entre o grupo de intervenção e o resultado da fluoresceinoscopia. Houve 92,7% de concordância entre os resultados da fluoresceinoscopia e a deiscência de anastomose (Kappa = 0,86;  $p < 0,001$ ) e de 90,9% entre o grupo de intervenção e a fluoresceinoscopia (Kappa = 0,82;  $p < 0,001$ ).

## DISCUSSÃO

A deiscência de anastomose segue sendo problema de grande magnitude na cirurgia colorretal, pois resulta em altas taxas de morbidade, custos hospitalares elevados e maior mortalidade. Apesar de existirem vários estudos abordando o assunto e diversos fatores de

risco reconhecidos, até o momento não há uma ferramenta disponível capaz de prever a deiscência de anastomose (3,4,28).

Entre as diversas técnicas testadas na avaliação da perfusão intestinal estão a medida da oximetria de pulso na parede intestinal, a microscopia vital, a medida polarográfica da tensão de oxigênio, a ecografia com Doppler, o *clearance* de gás hidrogênio, os estudos com radioisótopos, as medidas de contratilidade da parede intestinal, a tonometria, a microdiálise, a detecção de imagem térmica e a avaliação de propriedades elétricas da parede intestinal. Devido a múltiplas limitações, baixa acurácia ou custo elevado, nenhuma dessas técnicas encontrou aplicabilidade na prática clínica (12,20).

Recentemente, alguns métodos têm sido referidos na literatura como sendo de maior aplicabilidade clínica, por exemplo, a espectrofotometria por luz visível ou por infravermelho, a fluxometria por *laser* Doppler e os métodos com emprego de fluorescência. Todas essas técnicas já tiveram sua utilidade demonstrada na detecção de isquemia intestinal. Entretanto, a espectrofotometria é uma técnica relativamente nova, com limitações e custo elevado. A fluxometria por *laser* Doppler, por sua vez, pode ter seu resultado afetado por artefatos no local de medição e alterações cardiovasculares sistêmicas, como uso de drogas vasoativas e anestesia peridural, o que limita seu uso (20).

Existem dois principais tipos de técnicas com emprego de fluorescência: a fluoresceinoscopia e a angiografia fluorescente por *laser* infravermelho. A primeira é realizada mediante administração intravenosa de fluoresceína sódica e iluminação do tecido por luz ultravioleta. Na angiografia, injeta-se o corante indocianina verde por via intravenosa e ilumina-se o intestino com *laser* infravermelho. Kudzus et al. demonstraram a aplicabilidade dessa técnica, com diminuição das taxas de reintervenção cirúrgica por deiscência de anastomose em até 60% (29). As desvantagens da técnica de angiografia são seu custo mais elevado e a possibilidade de os conteúdos intestinais interferirem no resultado, podendo simular áreas de necrose intestinal (20,23,29-31).

Os métodos de avaliação da viabilidade intestinal que utilizam a técnica de fluorescência têm tido crescente menção na literatura (14,20,21,29). Horgan e Gorey estabeleceram cinco critérios básicos que devem ser alcançados pelos testes: 1) o equipamento deve ser de fácil alcance na sala cirúrgica; 2) o instrumento não deve ser complicado ou exigir a presença de uma pessoa especializada; 3) o método deve ser preciso, com baixos índices de resultados falso-positivos e falso-negativos; 4) o método deve ser objetivo e reprodutível; e 5) o custo deve ser baixo (18). A técnica de fluoresceinoscopia demonstrou ter as características supracitadas durante o presente estudo.

Diversos autores já haviam demonstrado o emprego da fluoresceinoscopia para a avaliação da viabilidade intestinal, com valores de sensibilidade e especificidade próximos a 100% (12,15-17,19). Porém, em nossa revisão, não foram encontrados estudos descrevendo a acurácia do método para prever deiscência em uma anastomose isquêmica.

No presente estudo, foram utilizados quatro grupos de intervenção, incluindo um grupo controle, com a intenção de criar um espectro maior de graus de isquemia. Durante o estudo piloto, verificou-se que o grupo com 3 cm de desvascularização apresentaria o maior índice de deiscência de anastomose. Assim, conforme orientação dos comitês de ética, o grupo 3 teve um maior número de animais, para que os resultados fossem obtidos com o menor número possível de mortes. Essa estratégia ensejou que se obtivesse uma amostra com uma frequência de deiscência de anastomose de 49,1%, com variados graus de isquemia e diferentes observações à fluoresceinoscopia.

Em nossa amostra, o teste de fluoresceinoscopia apresentou forte valor preditivo para deiscência de anastomose em um modelo de anastomose isquêmica em ratos. A sensibilidade do método foi de 96,3%, a especificidade de 89,3%, o valor preditivo positivo de 89,7%, o valor preditivo negativo de 96,2% e a acurácia de 92,7%.

Para verificar a independência entre os dados, realizamos a avaliação da concordância entre os resultados da fluoresceinoscopia, os índices de deiscência e a extensão da desvascularização. Os valores de concordância encontrados foram superiores a 90%, com Kappa > 0,8 ( $p < 0,001$ ), o que demonstra excelente concordância entre os resultados da fluoresceinoscopia, grau de desvascularização e desfecho de deiscência de anastomose.

Alguns autores já haviam demonstrado a aplicabilidade do método de fluorescência na videolaparoscopia convencional e com auxílio da robótica. A técnica tem sido utilizada antes da confecção das anastomoses intestinais, com a finalidade de avaliar a vascularização das bordas. Isso possibilita ao cirurgião escolher o melhor ponto para realizar a secção do intestino, ressecando partes isquêmicas e, assim, confeccionando anastomoses mais seguras (22). Em um estudo retrospectivo, incluindo 402 pacientes, Kudzus et al. demonstraram uma redução de 4% nas reoperações por deiscência de anastomose nos pacientes avaliados com fluorescência. Ao analisar o subgrupo de pacientes submetidos a cirurgias eletivas, essa redução foi de 60% (29). Recentemente, Jafari et al. publicaram um estudo caso-controle com 40 pacientes submetidos a ressecção de sigmoide em cirurgia auxiliada por robô. Os autores demonstraram uma redução de 12% no risco de deiscência de anastomose naqueles que tiveram as margens de ressecção avaliadas por fluorescência (14). Sherwinter et al. publicaram um trabalho no qual sugerem a possibilidade de realizar o exame de fluorescência por via endoscópica transanal para avaliar a perfusão da anastomose durante o procedimento cirúrgico (31).

Os resultados encontrados em nosso estudo reforçam os achados mencionados acima, a saber, de que a avaliação da vascularização das bordas anastomóticas por fluoresceinoscopia pode reduzir a taxa de complicações operatórias (14,29). Além disso, demonstramos que a fluoresceinoscopia não só é um excelente método para a identificação de segmentos intestinais isquêmicos, como também, e por consequência disso, apresenta ótimo valor preditivo para deiscência de anastomose. São necessários mais estudos clínicos

para confirmar se os resultados encontrados em um modelo animal de anastomose isquêmica podem ser reproduzidos e trazer benefícios em humanos.

## **AGRADECIMENTOS E FONTES DE FINANCIAMENTO**

Este estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA). Não há conflitos de interesse relacionados à publicação deste estudo.

Agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à equipe da Unidade de Experimentação Animal e da Unidade de Patologia Experimental do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.



## REFERÊNCIAS

1. Irkorucu O, Ucan BH, Cakmak GK, Emre AU, Tascilar O, Ofluoglu E, et al. Does sildenafil reverse the adverse effects of ischemia on ischemic colon anastomosis: yes, 'no'. *Int J Surg*. 2009;7(1):39–43.
2. Arriaga AF, Lancaster RT, Berry WR, Regenbogen SE, Lipsitz SR, Kaafarani HMA, et al. The better colectomy project: Association of evidence-based best-practice adherence rates to outcomes in colorectal surgery. *Ann Surg*. 2009;250(4):507–13.
3. Shogan BD, Carlisle EM, Alverdy JC, Umanskiy K. Do we really know why colorectal anastomoses leak? *J Gastrointest Surg*. 2013;17(9):1698–707.
4. Sultan R, Chawla T, Zaidi M. Factors affecting anastomotic leak after colorectal anastomosis in patients without protective stoma in tertiary care hospital. *J Pak Med Assoc*. 2014;64(2):166–70.
5. Santos JCM Jr. Post-surgical complications of the colorectal anastomosis. *Rev Bras Coloproct*. 2011;31(1):98–106.
6. Koruda MJ, Rolandelli RH. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. *J Surg Res*. 1990;48(5):504–15.
7. Hendriks T, Mastboom WJ. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. *Dis Colon Rectum*. 1990;33(10):891–901.
8. Uzun H, Konukoglu D, Nuri MK, Ersoy EY, Özçevik S, Yavuz N. The effects of sildenafil citrate on ischemic colonic anastomotic healing in rats: its relationship between nitric oxide and oxidative stress. *World J Surg*. 2008;32(9):2107–13.
9. Posma LAE, Bleichrodt RP, van Goor H, Hendriks T. Transient profound mesenteric ischemia strongly affects the strength of intestinal anastomoses in the rat. *Dis Colon Rectum*. 2007;50(7):1070–9.
10. Kaya Y, Coskun T, Ayhan S, Kara E, Sakarya A, Var A. The effect of tadalafil on anastomotic healing in ischemic small intestine in rats. *Surg Today*. 2010;40(6):555–60.
11. Carter MS, Fantini GA, Sammartano RJ, Mtsudo S, Silverman DG, Boley SJ. Qualitative and quantitative fluorescein fluorescence in determining intestinal viability. *Am J Surg*. 1984;147(1):117–23.

12. Malafaia O, Brioschi ML, Aoki SMS, Dias FG, Gugelmin BS, Aoki MS, et al. Infrared imaging contribution for intestinal ischemia detection in wound healing. *Acta Cir Bras.* 2008;23(6):511–9.
13. Karliczek A, Harlaar NJ, Zeebregts CJ, Wiggers T, Baas PC, van Dam GM. Surgeons lack predictive accuracy for anastomotic leakage in gastrointestinal surgery. *Int J Colorectal Dis.* 2009;24(5):569–76.
14. Jafari MD, Lee KH, Halabi WJ, Mills SD, Carmichael JC, Stamos MJ, et al. The use of indocyanine green fluorescence to assess anastomotic perfusion during robotic assisted laparoscopic rectal surgery. *Surg Endosc.* 2013;27(8):3003–8.
15. Paral J, Subrt Z, Lochman P, Ferko A, Dusek T, Slaninka I, et al. Peroperative diagnostics of acute bowel ischemia using ultraviolet light and fluorescein dye. *Rozhl Chir.* 2009;88(10):590–5.
16. Paral J, Jiri P, Ferko A, Alexander F, Plodr M, Michal P, et al. Laparoscopic diagnostics of acute bowel ischemia using ultraviolet light and fluorescein dye: An experimental study. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2007;17(4):291–5.
17. Stolar CJ, Randolph JG. Evaluation of ischemic bowel viability with a fluorescent technique. *J Pediatr Surg.* 1978;13(3):221–5.
18. Horgan PG, Gorey TF. Operative assessment of intestinal viability. *Surg Clin North Am.* 1992;72(1):143–55.
19. Bulkley GB, Zuidema GD, Hamilton SR, O'Mara CS, Klacsmann PG, Horn SD. Intraoperative determination of small intestinal viability following ischemic injury: A prospective, controlled trial of two adjuvant methods (doppler and fluorescein) compared with standard clinical judgment. *Ann Surg.* 1981;193(5):628.
20. Urbanavicius L, Pattyn P, Van de Putte D, Venskutonis D. How to assess intestinal viability during surgery: A review of techniques. *World J Gastrointest Surg.* 2011;3(5):59–69.
21. Cahill RA, Ris F, Mortensen NJ. Near-infrared laparoscopy for real-time intra-operative arterial and lymphatic perfusion imaging. *Colorectal Dis.* 2011;13 (Suppl 7):12–7.
22. Bae SU, Baek SJ, Hur H, Baik SH, Kim NK, Min BS. Intraoperative near infrared fluorescence imaging in robotic low anterior resection: Three case reports. *Yonsei Med J.* 2013;54(4):1066–9.
23. Iinuma Y, Hirayama Y, Yokoyama N, Otani T, Nitta K, Hashidate H, et al. Intraoperative near-infrared indocyanine green fluorescence angiography (NIR-ICG

- AG) can predict delayed small bowel stricture after ischemic intestinal injury: Report of a case. *J Pediatr Surg.* 2013;48(5):1123–8.
24. Marjanovic G, Holzner P, Kulemann B, Kuesters S, Karcz WK, Timme S, et al. Pitfalls and technical aspects during the research of intestinal anastomotic healing in rats. *Eur Surg Res.* 2010;45(3-4):314–20.
  25. Brito MV, Brito NM, Maneschy RB. Procedimentos básicos em animais. In: Marques RG, editor. *Técnica operatória e cirurgia experimental.* 1st ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. pp. 742–55.
  26. Griffen TS, Hagihara PF. Ischemic colitis in rats. *Dis Colon Rectum.* 1982;25(7):638–40.
  27. Pruinelli R. Comparação entre o exame clínico e a fluorsceinoscopia na determinação da viabilidade de segmento intestinal (jejuno) preparado para esofagoplastias: Estudo experimental em ratos [dissertação de mestrado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre; 1997.
  28. Dekker JWT, Liefers GJ, de Mol van Otterloo JC, Putter H, Tollenaar RA. Predicting the risk of anastomotic leakage in left-sided colorectal surgery using a colon leakage score. *J Surg Res.* 2011;166(1):e27–34.
  29. Kudzusz S, Roesel C, Schachtrupp A, Höer JJ. Intraoperative laser fluorescence angiography in colorectal surgery: A noninvasive analysis to reduce the rate of anastomotic leakage. *Langenbecks Arch Surg.* 2010;395(8):1025–30.
  30. Davis B, Rivadeneira DE. Complications of colorectal anastomoses. *Surg Clin N Am.* 2013;93(1):61–87.
  31. Sherwinter DA, Gallagher J, Donkar T. Intra-operative transanal near infrared imaging of colorectal anastomotic perfusion: A feasibility study. *Colorectal Dis.* 2012;15(1):91–6.

## 6 ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS

### **Fluorescent test accurately predicts leak of ischemic colon anastomosis in rats<sup>1</sup>**

Laura Moschetti<sup>I</sup>, Tiago Leal Ghezzi<sup>II</sup>, Belisa Gomes Müller<sup>III</sup>, Adriano Basso Dias<sup>IV</sup>, Oly Campos Corleta<sup>V</sup>

<sup>I</sup>MSc, Postgraduate Program in Surgical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brazil. Conception and design of the study; surgical procedures; acquisition, data, analysis and interpretation of data; statistical analysis, manuscript preparation and writing; critical revision; final approval.

<sup>II</sup>PhD, Division of Coloproctology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil. Analysis and interpretation of data, statistical analysis, manuscript writing, critical revision, final approval.

<sup>III</sup>MD, Postgraduate Program in Surgical Sciences, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil. Surgical procedures, acquisition of data, statistical analysis, critical revision, final approval.

<sup>IV</sup>Graduate student, Medical School, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil. Surgical procedures, acquisition of data.

<sup>V</sup>Associate Professor, PhD, Division of General Surgery, Department of Surgery, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil. Conception and design of the study, analysis and interpretation of data, manuscript preparation and writing, critical revision, final approval.

---

**Abstract**

**Purpose:** To investigate if fluorescein fluorescent test can predict dehiscence in a model of ischemic colonic anastomosis in rats.

**Methods:** This experimental controlled trial randomly assigned 55 rats to four groups. Anastomoses were performed in non-ischemic colon segments (control group) and in ischemic colon segments measuring 1, 2 or 3 cm long (groups 1, 2 and 3, respectively). Fluorescein was injected and the tissues were examined under ultraviolet light. Seven days later, a second-look surgery was performed to check for the presence or absence of anastomosis dehiscence.

**Results:** Twenty-four rats presented anastomotic dehiscence during the second-look surgery. Reticular and nonfluorescent patterns were significantly associated with the occurrence of anastomotic dehiscence. Fluorescein fluorescence had a sensitivity of 95.8%, specificity of 89.2%, positive predictive value of 88.4%, negative predictive value of 96.2%, and accuracy of 92.3% to predict anastomotic dehiscence.

**Conclusion:** Fluorescein fluorescent test can accurately predict leak in a model of ischemic colonic anastomosis in rats.

**Key words:** Anastomosis, Surgical. Anastomotic Leak. Fluorescence. Blood Supply. Rats.

---

**Introduction**

Surgeries that require anastomosis of the large bowel are among the most commonly performed abdominal procedures in the western world<sup>1</sup>. Ongoing advances in terms of perioperative care and surgical techniques have provided better results in the surgical treatment of patients with colorectal diseases. However, the rate of complications after colorectal surgeries is still high - around 30% -, and anastomotic dehiscence remains a relevant unsolved problem<sup>2-5</sup>.

There is a general consensus on the key role of blood supply, mainly at the bowel margins, for the proper healing of intestinal anastomosis. Therefore, a rigorous intraoperative evaluation of the intestinal perfusion is essential for the prevention of anastomotic dehiscence<sup>1,6</sup>. Clinical tests to predict the occurrence of anastomotic dehiscence have very low accuracy, with a failure rate up to 60%<sup>4,7-9</sup>. Several studies have been conducted to find an objective and reliable method of intraoperative evaluation of intestinal blood supply in the last four decades<sup>2,3,7,10-14</sup>. To present date, no method has been accepted as the standard for this matter, however fluorescence tests have gained some attention<sup>16-22</sup>.

Fluorescein fluorescence test is done by means of injection of intravenous sodium fluorescein, followed by examination of target tissues under ultraviolet light in a darkened room. Luminescence clearly differentiates well perfused from ischemic tissues<sup>12</sup>. The sensitivity and specificity of this technique are close to 100%<sup>11,14</sup>. Currently, fluorescence method to evaluate the perfusion of intestinal anastomoses has been increasingly used in robotic-assisted and laparoscopic colorectal resections, such as left colectomies and rectal resections.

The aim of this study was to determine the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of fluorescein fluorescence test to predict anastomotic dehiscence.

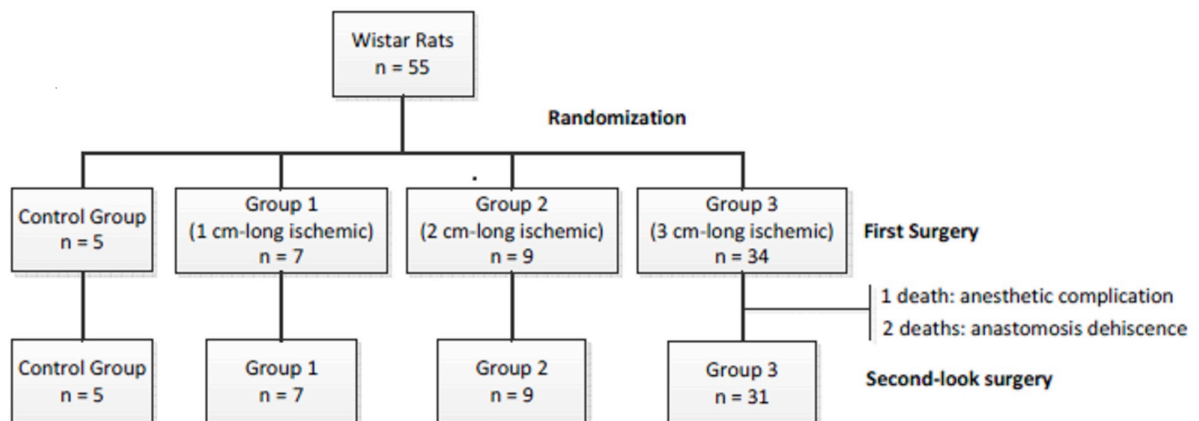
## **Methods**

This study was approved by the Research Ethics Committee and the Ethics Committee for the Use of Animals (Protocol 110668) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. This study has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

Surgical procedures were conducted in the Animal Experimentation Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (AEU-HCPA). **Male Wistar rats, 10 to 12 weeks** old, from contemporary litters (275 – 340 g) were purchased from the Vivarium of the Federal

University of Pelotas (Pelotas, Brazil). Animals were maintained in groups of four in separate cages in a temperature-controlled room ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 12 hour light-dark cycle. All the animals received free access of water and standard rat chow. The rats were daily monitored by veterinarians from the AEU-HCPA.

This experimental controlled trial randomly assigned rats to four groups. The sample size of each group was calculated based on the results of a pilot study conducted with 20 rats to investigate the rate of anastomotic dehiscence according to the different lengths of intestinal devascularization. With regard to the expected frequency of 45% of overall anastomosis dehiscence in that study, a sample size of 55 rats was considered sufficient to achieve a sensitivity of 99% and a specificity of 91%, at 5% precision for sensitivity and 10% for specificity and a level of confidence of 95%. The minimum number of rats required for statistical analysis was used in each of the following groups: control group (nonischemic colocolonic anastomosis), and groups 1, 2 and 3 (colocolonic anastomosis in ischemic segments of 1, 2 and 3 cm-long, respectively) (Figure 1).



**Figure 1** - Study design and randomization of groups.

#### *Anesthesia and surgical procedure*

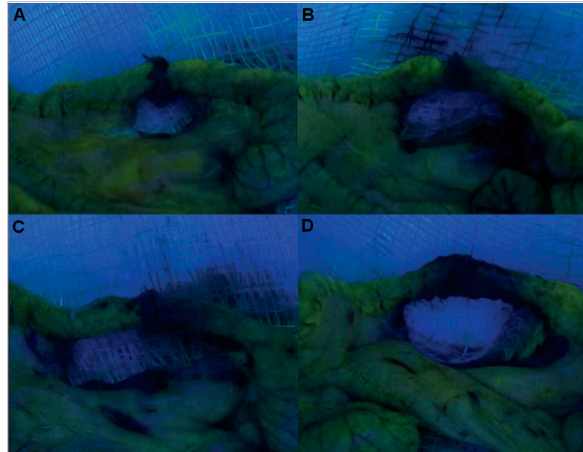
The rats were weighed and given intraperitoneal injection of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After loss of paw withdrawal reflex was confirmed, the animals were

fixed to a temperature-controlled operating table and had the abdomen region shaved and aseptically cleaned with 10% topical povidone-iodine. Sterilized surgical instruments were used for the surgical procedures<sup>23</sup>. All animals underwent midline laparotomy, abdominal exploration and exposure of ascending colon. The control group underwent transversal section of the ascending colon. A straight colocolonic anastomosis was performed with a single layer of continuous suture with 6-0 polypropylene monofilament. In groups 1, 2 and 3, a colon segment of 1-, 2- and 3-cm long, respectively, underwent selective devascularization, as previously described by Griffen<sup>24</sup>. This method consists of devascularization of the marginal artery at two points, as well as the *vasa recti* located in-between, using a bipolar cautery<sup>1</sup>. At the midpoint of the devascularized segment, the colon was sectioned and an anastomosis was performed in the same way as described in control group. None of the anastomoses showed **clinical signs suggestive** of an immediate anastomotic ischemia.

#### *Fluorescein fluorescence test*

All animals underwent fluorescein fluorescence test. Fluorescein fluorescence test is done by injecting fluorescein sodium (1.5 mg/100 mg diluted in saline solution at 3 mg/mL) intravenously, followed by examination of target tissues under ultraviolet light (16 watts Wood lamp, Ramsor<sup>®</sup>, São Paulo, Brazil) in a darkened room. The test was conducted immediately after the performance of the anastomosis. The 2-cm colon segments in each side of the anastomosis were evaluated to access the fluorescence pattern using a +4-diopter lens. The fluorescence patterns were classified as homogeneous, reticular, patchy or nonfluorescent<sup>12,14</sup> (Figure 2).





**Figure 2** - Fluorescein fluorescence patterns: **A)** homogeneous; **B)** reticular; **C)** patchy; **D)** nonfluorescent.

The abdominal wall was then closed with two layers of continuous suture with 4-0 nylon and thereafter an intraperitoneal injection of tramadol hydrochloride (5 mg/kg) was administered for postoperative analgesia. Seven days later, the rats underwent a second-look surgery for macroscopic re-evaluation of the anastomosis and reassessment of the fluorescein fluorescence test. Surgical findings were classified according to the following degrees: grade 1 - ascending colon with normal appearance or minor edema; grade 2 - marked edema or signs of ischemia (purplish color, darkened areas); grade 3 - partially blocked dehiscence or abscess around anastomosis; grade 4 - totally blocked dehiscence or peritonitis due to total or partial dehiscence. Subsequently, the animals were killed by exsanguination.

#### *Statistical analysis*

The results of the descriptive analyses for continuous variables were expressed as means and standard deviations (SD). The results for qualitative variables were reported as absolute frequencies and proportions. Chi-square test was used to analyze comparisons between groups. Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to analyze asymmetrically distributed continuous variables. The level of significance was set at 5%.

## Results

A total of 55 rats were used in this study: five rats in control group, seven rats in group 1, nine rats in group 2, and 34 rats in group 3. Table 1 presents general data for each group. Rats in group 3 were significantly younger than those in the other groups (78 vs. 78.7 vs. 78.3 vs. 74.2-days-old;  $p < 0.001$ ). There were no statistically significant differences between the groups in terms of baseline and re-intervention weights and surgery duration.

**Table 1** - General data for each intervention group.

	<b>Control Group</b> mean (25-75 <sup>th</sup> )	<b>Group 1</b> mean (25-75 <sup>th</sup> )	<b>Group 2</b> mean (25-75 <sup>th</sup> )	<b>Group 3</b> mean (25-75 <sup>th</sup> )
<b>Age</b> (days)	78 (77-79.5)	78.7 (77-80)	78.3 (77-79.5)	74.2 (71.3-79)*
<b>Baseline weight</b> (g)	309.2 (282-335)	322.3 (286-368)	333.5 (305-364.5)	316.6 (291.5-332.5)
<b>Surgery duration</b> (min)	24 (22-26.5)	22.4 (20-24)	25.9 (22.5-28.5)	24.8 (23-26.3)
<b>Re-intervention weight</b> (g)	291.4 (269.5-314)	293 (242-340)	311.7 (283.5-345)	293.8 (268-322.3)
<b>Re-intervention duration</b> (min)	10.2 (9-11)	9.9 (8-11)	10.7 (9-11)	10.6 (9-12)

\* $p < 0.001$

Three rats died in group 3; one as consequence of anesthetic complication after the first surgery and two due sepsis secondary to anastomotic dehiscence, confirmed at the necropsy. These rats were excluded from the statistical analysis. The fluorescein fluorescence patterns in the first surgery, as well as the surgical findings and fluorescein fluorescence patterns in the second-look surgery are demonstrated in Table 2. All rats in the control group had homogenous fluorescence pattern in both surgeries and normal appearance or minor edema (grade 1) in the second-look surgery. All rats in group 1, except one (reticular pattern), presented homogeneous fluorescence pattern and normal appearance or minor edema of colon (grade 1). This sole rat with reticular pattern experienced anastomotic dehiscence and was classified as grade 3 (partially blocked dehiscence or abscess around anastomosis) during the second-look surgery. The majority (77.8%) of the rats in group 2 presented reticular fluorescence pattern in the first surgery ( $p <$

0.01). Most of these rats (85.7%) maintained the same fluorescence pattern during the second-look surgery ( $p < 0.01$ ) and none experienced anastomotic dehiscence. Rats in group 3 presented mostly patchy or nonfluorescent patterns both in the first and the second-look surgery, respectively (55.9% and 29.4%,  $p < 0.05$ ; 58.1% and 25.8%,  $p < 0.01$ ). Twenty-three (74.2%) rats in group 3 presented partially blocked dehiscence or abscess around anastomosis (grade 3) during the second-look-surgery ( $p < 0.01$ ).

**Table 2** - Fluorescein fluorescence pattern and surgical results for each intervention group.

	<b>Control Group</b>	<b>Group 1</b>	<b>Group 2</b>	<b>Group 3</b>
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>First surgery fluorescein fluorescence pattern (n = 55)</b>				
Homogeneous	5 (100)*	6 (85.7)*	2 (22.2)	0 (0)
Reticular	0 (0)	1 (14.3)	7 (77.8)*	5 (14.7)
Patchy	0 (0)	0 (0)	0 (0)	19 (55.9)*
Nonfluorescent	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (29.4)*
<b>Second-look surgery fluorescein fluorescence pattern (n = 52)</b>				
Homogeneous	5 (100)*	6 (85.7)*	3 (33.3)	0 (0)
Reticular	0 (0)	1 (14.3)	6 (67.7)*	5 (16.1)
Patchy	0 (0)	0 (0)	0 (0)	18 (58.1)*
Nonfluorescent	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (25.8)*
<b>Second-look surgical findings (n = 52)</b>				
Grade 1	5 (100)*	6 (85.7)*	4 (44.4)	0 (0)
Grade 2	0 (0)	0 (0)	5 (55.6)*	8 (25.8)
Grade 3	0 (0)	1 (14.3)	0 (0)	23 (74.2)*
Grade 4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Anastomosis dehiscence</b>	0 (0)	1 (14.3)	0 (0)	23 (74.2)

\* $p < 0.001$

As shown in Table 3, the homogeneous and reticular fluorescence patterns immediately after the anastomosis construction were significantly associated with anastomotic integrity during the second-look surgery. In contrast, the reticular and nonfluorescent patterns were significantly associated with the occurrence of anastomotic dehiscence.

**Table 3** - Incidence of anastomotic dehiscence according to fluorescence pattern in the first surgery.

	<b>Homogeneous</b>	<b>Reticular</b>	<b>Patchy</b>	<b>Nonfluorescent</b>
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>No dehiscence</b>	13 (46.4)*	12 (42.9)*	3 (10.7)	0 (0)
<b>Dehiscence</b>	0 (0)	1 (4.2)	14 (58.3)*	9 (37.5)*

\*p<0.001

Due to the similarity of data and same clinical meaning, the results of homogeneous and reticular patterns, as well as those of patchy and nonfluorescent patterns, were combined for calculations of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and accuracy of fluorescein fluorescence for anastomosis dehiscence. Data are shown in Table 4.

**Table 4** - Diagnostic accuracy of fluorescein fluorescence test for anastomotic dehiscence.

	<b>Result (%)</b>	<b>95% CI</b>
<b>Sensitivity</b>	95.8	76.9 – 99.8
<b>Specificity</b>	89.2	70.6 – 97.2
<b>Positive Predictive Value</b>	88.4	68.7 – 96.8
<b>Negative Predictive Value</b>	96.2	78.4 – 99.8
<b>Accuracy</b>	92.3	83.1 – 100

## Discussion

Anastomotic dehiscence is the "Achilles heel" for colorectal surgery, despite the many technical advances achieved in recent decades. This can be explained by its high incidence and negative impact on the health of the patient (increased morbidity and mortality rates, length of hospital stay, risk of permanent ostoma, poor prognosis in cancer patients, damage on quality of life) and on the socio-economic status of the population (increased health costs and workplace absence)<sup>25</sup>. So far, there is no technique or cost-effective method for

predicting the occurrence of colorectal anastomotic dehiscence<sup>2,3,26</sup>. Clinical parameters, such as intestine color, the presence of peristalsis, mesenteric pulse, active bleeding have historically demonstrated low accuracy to assess the viability of ischemic bowel<sup>12</sup>. More sophisticated evaluation methods of intestinal perfusion, such as laser Doppler fluxometry, intramural pH, intestinal electromyography, intra-arterial injection of dye and radioactive microspheres, have also been tested<sup>12</sup>. However, these techniques are invasive, expensive or require specialized equipment<sup>12</sup>. The ideal evaluation method of intestinal perfusion should be easily accessed in the operating room, quick to use, have good accuracy, low cost and be minimally-invasive<sup>12</sup>. The fluorescence method with intravenous administration of fluorescein and examination under ultraviolet light meet all these criteria<sup>7,10-12,14</sup>.

The present study comprised a control group (non-ischemic anastomosis) and three intervention groups with varying degrees of ischemic colonic anastomosis in rats. The objective was to analyze the immediate and delayed patterns of fluorescein fluorescence in each group and to associate these findings with the occurrence of ischemic damage to the large intestine. We described, for the first time in the literature, an accurate method for the evaluation of perfusion of the ischemic colon segments in an experimental model to predict anastomosis dehiscence in rats. This pilot study showed that 3 cm long segment of the ischemic colon resulted in higher rates of anastomotic dehiscence. Following the recommendations of the Ethics Committee for the Use of Animals, group 3 had a greater number of rats than the others to ensure that the objective of this study was achieved with reduced **number** of deaths.

The rats in group 3 were significantly younger compared to the other groups. No significant differences were observed between the average weight of the animals, which is an indirect indicator of nutritional status, a factor involved in the occurrence of anastomotic dehiscence in rats<sup>27</sup>. However, the highest rate of anastomotic dehiscence in group 3 could not be attributed to the fact that these rats were younger compared to those in the other groups. On the contrary, this finding can be attributed to the greater extent of colonic

ischemia resulting from the intervention in group 3, as objectively described using the fluorescein fluorescence method. In fact, more than 80% of the rats in group 3 showed signs of critical tissue ischemia (patchy or non fluorescent pattern) both in immediate and late evaluation of anastomosis perfusion. These fluorescence patterns represent the total and regional disruption of blood flow of the colon, respectively. Both patterns were statistically associated with the finding of ischemic tissue damage in second-look surgery, particularly the anastomotic dehiscence. The analysis of the fluorescence test results showed high levels of sensitivity, specificity, PPV, NPV and accuracy of fluorescein fluorescence for anastomotic dehiscence.

This performance makes the fluorescein fluorescence test an appropriate method to indicate correctly the revision and re-confection of an ischemic colonic anastomosis, therefore, decreasing the rate of anastomotic dehiscence. It also allows the surgeon to accurately judge the adequacy of the perfusion of a colonic anastomosis, avoiding unnecessary revision and re-confection. It should be reminded that these results were observed in colonic anastomosis without clinical evidence of ischemic suffering immediately after its confection and should not be extrapolated to cases of clinically detectable ischemia.

In the last decades, several authors have investigated the use of fluorescence techniques to evaluate the feasibility of anastomosis in the left colon and rectum in both conventional and minimally-invasive surgeries (laparoscopic and robotic)<sup>9,28</sup>. These publications corroborate our findings that the fluorescence technique is able to accurately identify colonic anastomosis with critical ischemia, which requires modifications of surgical procedures (e.g. confection of a temporary deviation ostoma or, more often, an extension of the bowel resection and confection of a new anastomosis) to reduce the rate of anastomotic dehiscence<sup>9</sup>. Unlike the intraoperative near infrared fluorescence adopted in minimally-invasive surgery, especially the imaging **platform** - named **Firefly system** - integrated into the **da Vinci robot**<sup>28</sup>, the fluorescein fluorescence technique under ultraviolet light is extremely cheap, making it an **affordable** diagnostic **test** to be used in developing countries.

The study has some limitations. First, we did not perform a histopathological study of the anastomosis for comparative analysis with the fluorescence test findings. Second, no other evaluation method of intestinal perfusion was used for comparison with the fluorescence test. Finally, there was no study on the eventual outcomes of the possible changes in surgical procedures, resulting from the interpretation of the fluorescence test findings. Even with these limitations, our study validated an easy to use, low cost and highly accurate method to predict ischemic colonic anastomosis in rats. Further studies are required to confirm whether these findings may be reproduced and are beneficial for humans.

## Conclusion

Fluorescein fluorescent test accurately predicts leaks in a model of ischemic colonic anastomosis in rats. Notably, the reticular and nonfluorescent patterns are associated with the occurrence of anastomotic dehiscence.

## References

1. Irkorucu O, Ucan BH, Cakmak GK, Emre AU, Tascilar O, Ofluoglu E, [Bahadir B](#), [Karakaya K](#), [Demirtas C](#), [Ankarali H](#), [Kertis G](#), [Pasaoglu H](#), [Comert M](#). Does sildenafil reverse the adverse effects of ischemia on ischemic colon anastomosis: yes, 'no'. *Int J Surg*. 2009 Feb;7(1):39–43. doi: 10.1016/j.ijssu.2008.10.003.
2. Shogan BD, Carlisle EM, Alverdy JC, Umanskiy K. Do we really know why colorectal anastomoses leak? *J Gastrointest Surg*. 2013 Sep;17(9):1698–707. doi: 10.1007/s11605-013-2227-0.
3. Sultan R, Chawla T, Zaidi M. Factors affecting anastomotic leak after colorectal anastomosis in patients without protective stoma in tertiary care hospital. *J Pak Med Assoc*. 2014 Feb;64(2):166–70. PMID: 24640806.
4. Arriaga AF, Lancaster RT, Berry WR, Regenbogen SE, Lipsitz SR, Kaafarani HMA, [Elbardissi AW](#), [Desai P](#), [Ferzoco SJ](#), [Bleday R](#), [Breen E](#), [Kastrinakis WV](#), [Rubin MS](#), [Gawande AA](#). The better colectomy project: association of evidence-based best-practice adherence rates to outcomes in colorectal surgery. *Ann Surg*. 2009 Oct;250(4):507–13. doi: 10.1097/SLA.0b013e3181b672bc.

5. Hammond J, Lim S, Wan Y, Gao X, Patkar A. The burden of gastrointestinal anastomotic leaks: an evaluation of clinical and economic outcomes. *J Gastrointest Surg.* 2014 Jun;18:1176–85. doi: 10.1007/s11605-014-2506-4.
6. Carter MS, Fantini GA, Sammartano RJ, Mttsudo S, Silverman DG, Boley SJ. Qualitative and quantitative fluorescein fluorescence in determining intestinal viability. *Am J Surg.* 1984 Jan;147(1):117–23. PMID: 6691537.
7. Malafaia O, Brioschi ML, Aoki SMS, Dias FG, Gugelmin BS, Aoki MS, Aoki YS. Infrared imaging contribution for intestinal ischemia detection in wound healing. *Acta Cir Bras.* 2008 Nov-Dec;23(6):511–9. PMID: 19030750.
8. Karliczek A, Harlaar NJ, Zeebregts CJ, Wiggers T, Baas PC, Dam GM. Surgeons lack predictive accuracy for anastomotic leakage in gastrointestinal surgery. *Int J Colorectal Dis.* 2009 May;24(5):569–76. doi: 10.1007/s00384-009-0658-6.
9. Jafari MD, Lee KH, Halabi WJ, Mills SD, Carmichael JC, Stamos MJ, [Pigazzi A](#). The use of indocyanine green fluorescence to assess anastomotic perfusion during robotic assisted laparoscopic rectal surgery. *Surg Endosc.* 2013 Aug;27(8):3003–8. doi: 10.1007/s00464-013-2832-8.
10. Paral J, Subrt Z, Lochman P, Ferko A, Dusek T, Slaninka I, [Cecka F](#), [Louda M](#), [Romzová M](#), [Jon B](#), [Kaska M](#). Peroperative diagnostics of acute bowel ischemia using ultraviolet light and fluorescein dye. *Rozhl Chir.* 2009 Oct;88(10):590–5. PMID: 20052943.
11. [Paral J](#), [Ferko A](#), [Plodr M](#), [Raupach J](#), [Hadzi-Nikolov D](#), [Dolezal D](#), [Chovanec V](#). Laparoscopic diagnostics of acute bowel ischemia using ultraviolet light and fluorescein dye: an experimental study. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2007 Aug;17(4):291–5. doi: 10.1097/SLE.0b013e3180dc9376.
12. Stolar CJ, Randolph JG. Evaluation of ischemic bowel viability with a fluorescent technique. *J Pediatr Surg.* 1978 Jun;13(3):221–5. PMID: 671186.
13. Horgan PG, Gorey TF. Operative assessment of intestinal viability. *Surg Clin North Am.* 1992 Feb;72(1):143–55. PMID: 1731381.
14. Bulkley GB, Zuidema GD, Hamilton SR, O'Mara CS, Klacsmann PG, Horn SD. Intraoperative determination of small intestinal viability following ischemic injury: A prospective, controlled trial of two adjuvant methods (doppler and fluorescein) compared with standard clinical judgment. *Ann Surg.* 1981 May;193(5):628. PMID: 7016053.
15. Diana M, Agnus V, Halvax P, Liu Y-Y, Dallemagne B, Schlagowski A-I, [Geny B](#), [Diemunsch P](#), [Lindner V](#), [Marescaux J](#). Intraoperative fluorescence-based enhanced reality laparoscopic real-time imaging to assess bowel perfusion at the



- anastomotic site in an experimental model. *Br J Surg*. 2015 Jan;102:e169–76. doi: 10.1002/bjs.9725.
16. Santos Júnior JCM. Post-surgical complications of the colorectal anastomosis. *Rev Bras Coloproct*. 2011 Jan-Mar;31(1):98–106.
  17. Urbanavicius L, Pattyn P, Putte D, Venskutonis D. How to assess intestinal viability during surgery: a review of techniques. *World J Gastrointest Surg*. 2011 May;3(5):59–69. doi: 10.4240/wjgs.v3.i5.59.
  18. Koruda MJ, Rolandelli RH. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. *J Surg Res*. 1990 May;48(5):504–15. PMID: 2191171.
  19. Hendriks T, Mastboom WJ. Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. *Dis Colon Rectum*. 1990 Oct;33(10):891–901. PMID: 2209281.
  20. Uzun H, Konukoglu D, Nuri MK, Ersoy EY, Özçevik S, Yavuz N. The effects of sildenafil citrate on ischemic colonic anastomotic healing in rats: its relationship between nitric oxide and oxidative stress. *World J Surg*. 2008 Sep;32(9):2107–13. doi: 10.1007/s00268-008-9661-2.
  21. Posma LAE, Bleichrodt RP, van Goor H, Hendriks T. Transient profound mesenteric ischemia strongly affects the strength of intestinal anastomoses in the rat. *Dis Colon Rectum*. 2007 Jul;50(7):1070–9. doi: 10.1007/s10350-006-0822-9.
  22. Kaya Y, Coskun T, Ayhan S, Kara E, Sakarya A, Var A. The effect of tadalafil on anastomotic healing in ischemic small intestine in rats. *Surg Today*. 2010 Jun;40(6):555–60. doi: 10.1007/s00595-010-4229-9.
  23. Marjanovic G, Holzner P, Kulemann B, Kuesters S, Karcz WK, Timme S, [Zur Hausen A](#), [Baumann T](#), [Hopt UT](#), [Obermaier R](#), [Hoepfner J](#). Pitfalls and technical aspects during the research of intestinal anastomotic healing in rats. *Eur Surg Res*. 2010;45(3-4):314–20. doi: 10.1159/000320768.
  24. Griffen TS, Hagihara PF. Ischemic colitis in rats. *Dis Colon Rectum*. 1982 Oct;25(7):638–40. PMID: 7128361.
  25. Bruce J, Krukowski ZH, Al-Khairy G, Russell EM, Park KG. Systematic review of the definition of anastomotic leak after gastrointestinal surgery. *Br J Surg*. 2001 Sep;88:1157–68. doi: 10.1046/j.0007-1323.2001.01829.x.
  26. Dekker JWT, Liefers GJ, de Mol van Otterloo JC, Putter H, Tollenaar RA. Predicting the risk of anastomotic leakage in left-sided colorectal surgery using a colon leakage score. *J Surg Res*. 2011 Mar;166(1):e27–34. doi: 10.1016/j.jss.2010.11.004.
  27. Domínguez JGL, Athié AAJ, Mijares GJM, Cárdenas LE, Pérez RE. Effects of malnutrition on the colonic anastomosis in the rat. *Cir Gen*. 2001 Apr-Jun;23(2):81–6.

28. Bae SU, Baek SJ, Hur H, Baik SH, Kim NK, Min BS. Intraoperative near infrared fluorescence imaging in robotic low anterior resection: three case reports. *Yonsei Med J.* 2013 Jul;54(4):1066–9. doi: 10.3349/ymj.2013.54.4.1066.

#### **ACKNOWLEDGEMENT**

The staff of the Animal Experimentation Unit and Experimental Pathology Unit, Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre for their support.

---

#### **Correspondence:**

Tiago Leal Ghezzi  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Disciplina de Coloproctologia  
Rua Ramiro Barcelos, 2350/600  
90035-903 Porto Alegre – RS Brasil  
Tel.: (55 51)9725-6265  
Fax: (55 51)3311-8151  
tlghezzi@terra.com.br

Received: Feb 20, 2017

Review: Apr 18, 2017

Accepted: May 16, 2017

Conflict of interest: none

Financial source: FIPE/HCPA

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas. Artigo de Dissertação de Mestrado. Prof. Orientador Oly Campos Corleta.