

**CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ**

**O ESTRESSE OXIDATIVO NA ETIOPATOGENIA DA COLITE DE EXCLUSÃO.  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de  
São Paulo para a obtenção do título de Doutor em  
Medicina.

**São Paulo  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ

**O ESTRESSE OXIDATIVO NA ETIOPATOGENIA DA COLITE DE EXCLUSÃO.  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Medicina.

Área de Concentração: **Cirurgia Geral**

Orientador: **Prof. Dr. Sidney Roberto Nadal**

**São Paulo  
2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**Preparada pela Biblioteca Central da**  
**Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**

Martinez, Carlos Augusto Real

O estresse oxidativo na etiopatogenia da colite de exclusão: estudo experimental em ratos./ Carlos Augusto Real Martinez. São Paulo, 2009.

Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Medicina.

Área de Concentração: Cirurgia Geral

Orientador: Sidney Roberto Nadal

1. Colite 2. Estresse oxidativo 3. Dano ao DNA 4. Ácidos graxos voláteis 5. Ensaio em cometa 6. Modelos animais de doenças

BC-FCMSCSP/54-09

## DEDICATÓRIA

À minha mãe **NICE** (*in memoriam*)

A dor da sua perda só não é maior,  
que o legado da sua vida.

Ao meu pai **ALDO**.

O maior Mestre. O maior Sábio.

Todo respeito de homem, todo orgulho de filho.

À **SÔNIA**

Amiga e companheira.

Mãe ímpar. Toda a gratidão por edificar nossas obras mais perfeitas,

Aldo e Rodrigo

Ao Advogado **ALDO AUGUSTO MARTINEZ NETO**

e ao Engenheiro **RODRIGO AUGUSTO MARTINEZ**, nossos filhos.

Homens raros. A certeza do dever cumprido.

*“A vida só pode ser compreendida, olhando-se para trás; mas só pode ser vivida, olhando-se para frente.”*

**Soren Kierkegaard**



## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Sidney Roberto Nadal**. Esta tese só foi possível graças a sua amizade, orientação segura e disponibilidade. Nossa gratidão pela confiança.

Ao **Prof. Dr. Nelson Fontana Margarido**. Um homem impecável. Toda gratidão pela defesa incondicional da nossa causa e privilégio da amizade. Nosso maior exemplo.

Ao **Prof. Dr. Fábio Schmidt Goffi** (*in memoriam*), com quem tivemos o privilégio de aprender a arte cirúrgica. Professor para sempre.

À **Prof<sup>a</sup>. Dra. Denise Gonçalves Priolli**. O que o genótipo separou o fenótipo uniu. A melhor de todas as parceiras.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro**, pela imprescindível colaboração no Laboratório de Biologia Molecular e Estresse Oxidativo da Universidade São Francisco.

À **Prof<sup>a</sup>. Dra. Alessandra Gambero**, pelos ensaios bioquímicos realizados na Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG) da Universidade São Francisco.

À **Prof<sup>a</sup>. Dra. Izilda Aparecida Cardinalli** e ao **Prof. Ms. José Aires Pereira**, pelas análises anatomopatológicas e técnicas histológicas realizadas neste estudo.

Ao **Prof. Ms. Marcos Vieira de Sousa** e aos acadêmicos do Curso de Medicina da Universidade São Francisco, **Felipe Rodrigues Máximo**, **Ana Paula Pimentel Spadari** e **Daniel Duarte da Conceição Miranda**, pelo inestimável auxílio em todas as etapas experimentais envolvidas no estudo.

Ao **Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior**, responsável pela Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG) da Universidade São Francisco pela possibilidade de utilizar toda infra-estrutura do Laboratório de Biologia Molecular.

Ao **Sr. Fabiano Sialovicks**, nosso braço direito no Laboratório de Pesquisa da Universidade São Francisco. Sem o seu dinamismo e cooperação, tudo teria sido mais difícil.

Ao **Dr. Claudio Luciano Penna Fernandes Filho** e ao **Prof. Ms. Ronaldo Nonose**, médicos assistentes do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Universitário São Francisco, pela fidelidade, amizade e dedicação.

À **Sra. Sabia Hussein Mustafa** bibliotecária da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pela revisão das referências bibliográficas e confecção da ficha catalográfica deste trabalho.

Ao **Sr. Daniel Gomes** secretário do **Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Geral da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, por todas as orientações e sugestões durante o Curso de Pós-graduação.

Aos funcionários do **Biotério Central da Universidade São Francisco**, pelo primoroso cuidado com os animais de experimentação.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo imprescindível apoio financeiro ao presente estudo.

À **Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo** e à **Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo**, pela oportunidade de poder cursar o Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Geral.

À **Universidade São Francisco** em Bragança Paulista, o motivo de tudo.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ácido clorídrico	HCL
Ácido 5-aminosalicílico	5-ASA
Ácido desoxirribonucléico	DNA
Ácidos graxos de cadeia curta	AGCC
Ácido ribonucléico	RNA
Água	H <sub>2</sub> O
Beta-catenina	$\beta$ -catenina
Brometo de etídio	EtBr
Catalase	CAT
Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica	CEMIB
Centímetros	cm
Comissão de Ética em Pesquisa	CEP
Cicloxigenase	COX
Cicloxigenase-1	COX-1
Cicloxigenase-2	COX-2
Cicloxigenase-3	COX-3
Cloreto de sódio	NaCl
Colite de exclusão	CE
Desvio Padrão	DP
Diacetato de fluoresceína	FDA
Dimetil sulfóxido	DMSO
Dióxido de carbono	CO <sub>2</sub>
Doenças inflamatórias intestinais	DII
<i>Dual core</i>	DC
Etileno-diamino tetracético	EDTA
Fator de transcrição nuclear <i>kappa-beta</i>	NF- $\kappa$ $\beta$
Fenilmetilsulfonil fluorídrico	PMSF
Ferro	Fe <sup>++</sup>
Figura	Fig
<i>French</i>	F
Gene <i>cicloxigenase-2</i>	COX-2

Gene <i>mucin 2</i>	<i>MUC-2</i>
Gramma	g
Graus centígrados	°C
Hematoxilina-eosina	HE
Hidróxido de sódio	NaOH
Horas	h
Quilo-dáltons	KDa
Maior	>
Maior ou igual	≥
Malondialdeído	MDA
Menor	<
Menor ou igual	≤
Micra	μ
Microlitros	μL
Micrometros	μm
Mieloperoxidase	MPO
Miliamper	mA
Miligrama	mg
Mililitros	ml
Milímetros	mm
Milimolar	mM
Molar	M
Nanômetros	nm
Nicotinamida adenina dinucleotídeo-p	NADPH
Óxido nítrico sintase induzível	iNOS
Oxigênio	O <sub>2</sub>
Peróxido de hidrogênio	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Peso/volume	p/v
Porcento	%
Significante	**
Sódio	Na <sup>++</sup>
Solução tampão de Hank's	HBSS
Solução tampão Tris em ácido clorídrico	Tris-HCl

Sulfato sódico de dextran	DSS
Sulfato sódico de dodecil	SDS
Radicais livres de oxigênio	RLO
Radical hidroxila	OH <sup>-</sup>
Retocolite ulcerativa inespecífica	RCUI
Tabela	Tab
<i>Tail moment</i>	<i>TM</i>
Tampão fosfato	PBS
Trifosfato de adenosina	ATP
Trinitrobenzenosulfônico	TNBS
Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia	UNIFAG
Unidades arbitrárias	UA
Unidades de beta-actina	U-β-actina
Unidades de grama elevadas a potência <sup>-1</sup>	U.g <sup>-1</sup>
Universidade Estadual de Campinas	UNICAMP
Veze	x
Volt	V

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Identificação da placa de Peyer na parede anterior da transição entre o reto e o cólon sigmóide.....	22
<b>Figura 2</b> - Ligadura da artéria marginal do cólon descendente no ponto determinado para a secção.....	22
<b>Figura 3</b> - Limpeza mecânica anterógrada do cólon distal a ser excluído de trânsito fecal.....	23
<b>Figura 4</b> - Aspecto final da parede abdominal após confecção dos estomas. Colostomia distal (seta).....	23
<b>Figura 5</b> - Fragmentos de mucosa cólica isolados por micro-dissecação para estudo dos níveis teciduais de MPO, COX-2 e estresse oxidativo.....	26
<b>Figura 6</b> - Conservação dos fragmentos cólicos removidos para quantificação dos níveis de MPO, COX-2 e estresse oxidativo.....	26
<b>Figura 7</b> - Avaliação dos níveis de estresse oxidativo pelo ensaio do cometa.....	30
<b>Figura 8</b> - Parede cólica no cólon provido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal.....	34
<b>Figura 9</b> - Parede cólica no cólon desprovido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal.....	35
<b>Figura 10</b> - Superfície mucosa cólica no cólon provido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal.....	36

<b>Figura 11</b> - Superfície mucosa cólica no cólon desprovido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal. Presença de úlcera no epitélio (seta vermelha) e infiltrado inflamatório na base das criptas (seta azul).....	36
<b>Figura 12</b> - Ulcerações da mucosa cólica comparando os subgrupos controle e experimento (cólon com e sem trânsito) nos diferentes períodos de exclusão.** significante (Sem trânsito x Controle e Com trânsito). Teste de Mann-Whitney....	37
<b>Figura 13</b> - Escore inflamatório comparando os subgrupos controle e experimento (cólon com e sem trânsito) nos diferentes períodos de exclusão. ** significante (Sem trânsito x Controle e Com trânsito). Teste de Mann-Whitney.....	38
<b>Figura 14</b> - Níveis de atividade da mieloperoxidase (MPO) comparando animais dos subgrupos controle e experimento (cólon com e sem trânsito) nos diferentes períodos de exclusão. ** significante (Sem trânsito x Controle; Sem trânsito x Com trânsito). Teste t de Student.....	40
<b>Figura 15</b> - Atividade da cicloxigenase-2 nas membranas de nitrocelulose após o <i>imunobloting</i> .....	40
<b>Figura 16</b> - Níveis de atividade da cicloxigenase-2 (COX-2) comparando os subgrupos controle e experimento (cólon com e sem trânsito) nos diferentes períodos de exclusão. ** significante (Sem trânsito x Controle; Sem trânsito x Com trânsito).* significante (Sem trânsito x Controle); Teste t de Student.....	41
<b>Figura 17</b> - Níveis de estresse oxidativo ao DNA comparando os subgrupos controle e experimento (cólon com e sem trânsito) nos diferentes tempos de exclusão. ** significante (Sem trânsito x Controle e Com trânsito). Teste t de Student.....	42

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Escala de graduação do escore de graduação inflamatório.....	27
<b>Tabela 1</b> - Variação dos valores médios mensurados para presença de úlceras, congestão vascular e escore inflamatório em segmentos desprovidos de trânsito fecal, em relação aos diferentes tempos de exclusão.....	43
<b>Tabela 2</b> - Variação dos valores médios mensurados para níveis de atividade de MPO, COX-2 e níveis de estresse oxidativo, no cólon desprovido de trânsito fecal, em relação aos diferentes tempos de exclusão.....	44
<b>Tabela 3</b> - Correlação entre a presença de úlceras, congestão vascular, grau de inflamação, no cólon excluído de trânsito em relação ao tempo de exclusão.	45
<b>Tabela 4</b> - Correlação entre níveis de teciduais de MPO e COX-2 e estresse oxidativo no cólon desprovido de trânsito intestinal com o tempo de exclusão..	46



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVO</b> .....	18
<b>3. MATERIAL E MÉTODO</b> .....	19
3.1 – Animal de experimentação.....	19
3.2 – Grupos experimentais.....	19
3.3 – Etapa pré-operatória.....	19
3.4 – Anestesia .....	20
3.5 – Técnica operatória .....	20
3.6 – Pós-operatório.....	21
3.7 – Coleta do material.....	24
3.8 – Técnica histológica.....	25
3.9 – Avaliação histológica.....	27
3.10 – Eletroforese em gel de célula isolada (ensaio do cometa).....	28
3.11 – Atividade tecidual de mieloperoxidase.....	30
3.12 – Atividade tecidual de ciclooxigenase-2.....	31
3.13 – Método estatístico.....	32
<b>4. RESULTADOS</b> .....	33
4.1 – Alterações histológicas.....	34
4.1.1 – Ulcerações da mucosa cólica.....	35
4.1.2 – Escore inflamatório.....	38
4.2 – Avaliações bioquímicas.....	39
4.2.1 – Níveis teciduais de mieloperoxidase.....	39
4.2.2 – Níveis teciduais de ciclooxigenase-2.....	39
4.3 – Avaliação dos níveis de estresse oxidativo.....	42
4.4. – Variações segundo o tempo de exclusão.....	43
4.5 – Correlações entre as variáveis.....	45
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	47
5.1 – Quanto ao método.....	47
5.2 – Quanto aos resultados.....	65
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	78
<b>7. ANEXOS</b> .....	79
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	80
<b>FONTES CONSULTADAS</b> .....	94
<b>RESUMO</b> .....	95
<b>ABSTRACT</b> .....	96
<b>APÊNDICE</b> .....	97

## 1. INTRODUÇÃO

A colite de exclusão (CE) é caracterizada pela presença de processo inflamatório na mucosa dos segmentos do intestino grosso desprovidos de trânsito fecal (Glotzer et al, 1981). A enfermidade foi descrita no início da década de oitenta e, a partir de então, estudos vêm chamando a atenção para a importância do diagnóstico correto, principalmente, nos doentes submetidos à derivação do trânsito por complicações decorrentes das doenças inflamatórias intestinais (DII) (Bosshardt e Abel, 1984; Geraghty e Talbot, 1991; Lavoine et al, 1996; Martinez et al, 2009; Sousa et al, 2009).

A CE acomete indivíduos submetidos à derivação intestinal por diferentes situações clínicas, representadas pelas neoplasias obstrutivas do cólon, moléstia diverticular complicada, DII, trauma anorretocólico, afecções neurológicas, malformações congênitas anorretais ou para reduzir a gravidade das fístulas surgidas nas anastomoses realizadas à jusante (Korelitz et al, 1985; Haas e Haas, 1988; Ordein et al, 1992; Keli et al, 1997; Edwards et al, 1999a; Edwards et al, 1999b; Frisbie et al, 2000; Bax e McNevin, 2007; Koutroubakis, 2008). A CE também foi descrita nos segmentos cólicos excluídos utilizados para reconstrução do trânsito urinário ou confecção de neovaginas (Toolenaar et al, 1993; Solomon et al, 1998; Syed et al, 2001; Desrayaud et al, 2003; Abbasakoor et al, 2004). Com o aumento da incidência do câncer colorretal, das vias urinárias, DII, diverticulite e, sobretudo, com a violência crescente nos grandes centros urbanos, a frequência da CE parece estar aumentando proporcionalmente à confecção de estomas para derivação intestinal (Habr-Gama et al, 1997; Curi et al, 2002; David et al, 2009).

O diagnóstico endoscópico de CE é realizado em 91% dos pacientes submetidos ao exame sistemático do cólon excluso, após três meses da realização do estoma, sendo de intensidade leve em 52%, moderada em 44% e acentuada em 4% deles (Haas e Haas, 1988; Haas et al, 1990; Whelan et al, 1994). No Brasil, revisões de casuística sugerem que a incidência da CE, provavelmente, encontra-se subestimada ao demonstrarem que o trânsito intestinal somente é restabelecido em 57% dos doentes submetidos à colostomias temporárias, condenando os demais a conviverem, pelo resto de suas vidas, com a enfermidade (Habr-Gama et al, 1997; Curi et al., 2002). Cabe destacar que nos doentes cujo trânsito é restabelecido, o intervalo de tempo médio para reconstrução varia de seis a oito meses, podendo chegar até 60 meses, tempo mais do que suficiente para o desenvolvimento da CE (Habr-Gama et al, 1997; Curi et al, 2002).

A incidência da CE vem aumentando nas últimas décadas. Recente artigo de revisão, avaliando 3.950 doentes submetidos à cirurgia de Hartmann por diferentes enfermidades mostrou que o trânsito intestinal foi restabelecido em apenas 18,63% dos doentes submetidos a estomas temporários (David et al, 2009). Os autores chamam a atenção para o fato de que 78,6% dos enfermos operados em caráter de urgência eram portadores de afecções benignas passíveis, portanto, de restabelecimento do trânsito intestinal. Destacam ainda que naqueles submetidos à reconstrução do trânsito, o intervalo de tempo médio para a intervenção foi de 9,5 meses (David et al, 2009).

O quadro clínico da CE é variável, estando diretamente relacionado à extensão da mucosa exclusa de trânsito e ao tempo decorrido desde a

confeção do estoma derivativo (Glotzer et al, 1981). Nos casos iniciais, quando o comprometimento mucoso é menor, pode evoluir de forma assintomática (Lu et al, 1995). Nos doentes sintomáticos, as queixas mais comuns incluem dor abdominal, eliminação de muco e sangue pelo segmento excluído. Nos casos mais graves, pode haver a formação de fissuras e fístulas perianais que dificultam o diagnóstico diferencial com as DII (Ona e Boger, 1985; Habr-Gama et al, 1997). Esses mesmos sintomas são referidos por aqueles cujo cólon foi interposto para reconstituição do trato urogenital (Syed et al, 2001; Desrayaud et al, 2003; Abbasakoor et al, 2004).

O diagnóstico da CE é feito pelo exame endoscópico e estudo histopatológico da mucosa excluída. Encontram-se alterações em 100% dos submetidos à derivação intestinal por mais de 36 meses (Lechner et al, 1990; Ferguson e Siegel, 1991). Macroscopicamente a mucosa cólica mostra-se hiperemiada, congesta, edemaciada, friável, com nítido apagamento dos vasos sanguíneos da submucosa e sangramento fácil ao contato do aparelho (Haas et al, 1990; Lechner et al, 1990). Nos casos graves, o cólon pode se apresentar tubuliforme, com úlceras aftóides na mucosa indistinguíveis daquelas encontradas na retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI), tornando difícil o diagnóstico diferencial (Lusk et al, 1984; Geraghty e Charles, 1994). O enema opaco com a técnica do duplo contraste, embora não permita o diagnóstico definitivo, pode ser sugestivo ao mostrar pequenas irregularidades nodulares na superfície mucosa, características da hiperplasia linfóide folicular, alteração histológica encontrada em mais de 80% dos doentes (Lechner et al, 1990). Estudos manométricos demonstraram redução significativa da capacidade retal de retenção de volume sem haver, contudo, alteração do reflexo evacuatório ou

da continência fecal (Roe et al, 1993).

O estudo microscópico mostra diferentes alterações histológicas (Geraghty e Talbot, 1991). A exclusão do trânsito provoca atrofia das criptas intestinais, bem como modificações na espessura das demais camadas da parede cólica acompanhadas ou não de depleção das células caliciformes (Geraghty e Talbot, 1991; Biondo-Simões et al, 2000; Lopes-Paulo, 2002; Greca et al, 2003 Sousa et al, 2008). Displasias nas criptas podem ser observadas, principalmente, nos doentes submetidos a períodos mais longos de exclusão intestinal (Keli et al, 1997). Na lâmina basal, encontra-se infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, linfócitos, macrófagos, plasmócitos e eosinófilos, (Roediger e Nance, 1986; Ma et al, 1990; Geraghty e Talbot, 1991). É possível identificar abscessos na base das criptas e áreas de hiperplasia linfóide nodular, considerada uma das alterações histológicas mais característica da doença (Murray et al, 1987; Komorowski, 1990; Yeong et al, 1991; Drut e Drut, 1992). Nessas áreas existe predomínio dos linfócitos B, em relação aos do tipo T, sugerindo que a resposta inflamatória da mucosa seja mais do tipo humoral, pela estimulação antigênica persistente, do que celular, pela infiltração bacteriana (Grant et al, 1997; Chetty et al, 2009). Excepcionalmente, podem aparecer microcarcinóides mucosos, sobretudo naqueles com maior tempo de exclusão. Todavia, o aparecimento de neoplasias de origem epitelial no segmento excluído de trânsito, de doentes submetidos à derivação intestinal por moléstias não relacionadas às DII e ao câncer colorretal é possibilidade extremamente rara (Griffiths e Dixon, 1992; Martinez et al, 2009).

A redução na população das células caliciformes e a modificação no

padrão de expressão das mucinas nas células epiteliais da mucosa são alterações descritas, constituindo-se em achados úteis para o diagnóstico da CE (Haque et al, 1993; Keli et al, 1997, Biondo-Simões et al, 2000; Martinez et al, 2008; Martinez et al, 2009; Nonose et al, 2009). A mensuração da quantidade tecidual das mucinas no epitélio cólico demonstrou depleção tanto das mucinas neutras quanto das ácidas (Keli et al, 1997; Martinez et al, 2008; Martinez et al, 2009; Nonose et al, 2009). Quando se estudou, isoladamente, os subtipos de mucinas ácidas (sialomucinas e sulfomucinas), comparando segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal, encontrou-se redução significativa na quantidade dos dois subtipos de mucinas, ao longo das criptas cólicas, havendo predomínio das sulfomucinas e tendência ao desaparecimento das sialomucinas (Keli et al, 1997; Martinez et al, 2009). Essas alterações, peculiares da CE, são opostas as que ocorrem na RCUI e no câncer colorretal e refletem as peculiaridades da modificação na síntese de proteínas observada na doença (Filipe, 1969; Swidsinski et al, 2007).

As bases fisiopatológicas para o desenvolvimento CE ainda não se encontram totalmente esclarecidas. Já se propôs que a enfermidade tenha origem isquêmica, ou se deva a mudanças na quantidade e nas características da flora do cólon excluso, com redução da população bacteriana e predomínio das bactérias redutoras de nitrato (Neut et al, 1989; Neut et al, 1997; Greca et al., 2003; Villanacci et al, 2007). Entretanto, a maioria dos autores propõe que a doença decorra da deficiência de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) na luz intestinal, provocada pelo desvio do trânsito fecal (Roediger e Truelove, 1979; Roediger e Rae, 1982; Harig et al, 1989; Neut et al, 1995; Christl et al, 1996; Mortensen e Clausen, 1996; Scheppach et al, 1997; Velazquez et al, 1997;

Cook e Sellin, 1998; Kiely et al, 2001; Greca et al, 2003; Oliveira-Neto e Aguilar-Nascimento, 2004; Scheppach e Weiler, 2004; Wong et al, 2006). Essa possibilidade fica mais evidente quando se demonstrou que a reconstituição do trânsito e a irrigação dos segmentos excluídos, com soluções nutricionais ricas em AGCC, regridem os sintomas clínicos e as alterações histopatológicas observadas (Scheppach, 1998; Greca et al, 2003 Wong et al, 2006; Nassri et al, 2008; Szczepkowski et al, 2008).

Os AGCC, representados pelo butirato, acetato e propionato, são formados a partir da fermentação das fibras vegetais dietéticas e dos carboidratos pelas bactérias anaeróbicas existentes na luz intestinal (*Clostridium sp.*, *Eubacterium sp* e *Fusobacterium sp.*). Os AGCC respondem por 90% de todo o substrato utilizado pelas células da mucosa cólica para a obtenção de energia (Roediger, 1982; Soergel, 1994; Jørgensen et al, 1997; Velazquez et al, 1997). Depois de formados, são rapidamente absorvidos para que essas células, através de reações oxidativas, produzam a energia necessária para seu funcionamento normal (Roediger, 1982; Velazquez et al, 1997; Sousa et al, 2008).

A presença dos AGCC na luz intestinal regula a expressão de genes relacionados à síntese de diferentes proteínas envolvidas na produção de muco, colágeno, na aderência entre as células epiteliais, na via de sinalização e, principalmente, na homeostase do binômio proliferação-apoptose. (Butzner et al, 1996; Scheppach e Weiler, 2004). Estudo analisando simultaneamente a expressão de 19.400 genes, nas células epiteliais da mucosa cólica, demonstrou que os AGCC são capazes de regular a expressão de 221 deles. (Daly e Shirazi-Beechey, 2006). Os AGCC aumentam a síntese das mucinas

pelo epitélio cólico, por estimularem a expressão dos genes que transcrevem a fração protéica da glicoproteína (Shimotoyodome et al, 2000). Elevam em cerca de 20 vezes a expressão do gene *mucin-2* (*MUC-2*), o principal relacionado à produção das mucinas cólicas (Finnie et al, 1995; Shimotoyodome et al, 2000; Ohata et al, 2005; Gaudier et al, 2009). Estudos recentes demonstraram que camundongos silenciados (*knockout-mice*) para o gene *MUC-2* desenvolveram quadros graves de colite, reafirmando a importância dos AGCC na adequada produção mucinas (Van der Sluis et al, 2006). A deficiência do butirato na luz intestinal altera a permeabilidade das firmes junções intercelulares, por modificar a expressão intercelular da  $\beta$ -catenina, principal proteína responsável pela adesão celular, facilitando a penetração de bactérias e antígenos existentes na luz intestinal para o interior da camada submucosa estéril (Ohata et al, 2005; Turecková, 2006). A ausência dos AGCC na luz intestinal induzindo a apoptose celular promove a liberação de enzimas citolíticas pelos lisossomos que desnaturam proteínas que compõem a membrana basal e a matriz extracelular (Hayman et al, 1982). A deficiência de AGCC reduz a produção de colágeno tecidual dificultando a reparação tecidual (Rolandelli et al, 1986; Greca et al, 2003) A redução no fornecimento de AGCC aumenta a formação de radicais livres de oxigênio (RLO) pelas células da mucosa cólica e pelos neutrófilos nos portadores de RCUI (Liu et al, 2001; Roediger e Babidge, 2000; Pravda, 2005). Todas essas evidências sugerem, em última análise, que a deficiência dos AGCC no interior da luz intestinal pode determinar disfunções nas diferentes linhas de defesa da barreira epitelial favorecendo o dano da mucosa e permitindo a infiltração bacteriana na parede cólica (Pravda, 2005).

Dentre todos os substratos existentes na luz intestinal, capazes de



serem utilizados pelos colonócitos como combustível energético, verificou-se que o butirato é o mais metabolizado, seguido pelo propionato, acetato, cetonas, aminoácidos e glicose (Roediger e Rae, 1982; Scheppach e Weiler, 2004). Há três décadas, demonstrou-se que células isoladas da mucosa cólica são capazes de aumentar intensamente seu metabolismo energético (oxidativo) quando o butirato é acrescido ao meio, confirmando ser o combustível preferencialmente utilizado por essas células (Roediger e Truelove, 1979; Velazquez et al, 1997). Quando é o único AGCC disponível, o butirato aumenta, significativamente, a taxa celular de consumo de oxigênio, confirmando sua importância como fonte de energia (Roediger e Truelove, 1979; Roediger, 1982; Roediger, 1990; Velazquez et al, 1997; Greca et al, 2003). Recentes estudos demonstraram os efeitos protetores dos AGCC contra o dano tecidual provocado pelos RLO por reduzirem os níveis de oxigênio tecidual (Liu et al, 2001; Rosignoli et al, 2001).

Estudos experimentais observaram que substâncias que inibem a oxidação dos AGCC pela mucosa cólica, impedindo seu metabolismo energético, tais como o 2-bromo-octanoato sódico, provocaram alterações histológicas características da colite, sugerindo que a deficiência energética seja um evento inicial na etiopatogenia da doença (Agarwal e Schimmel, 1989; Roediger, 1990). O desvio do trânsito intestinal, impedindo a passagem dos AGCC para o segmento excluído, faz com que as células da mucosa cólica não disponham de seu principal substrato nutritivo. Dessa forma, passam a usar a glutamina oferecida pela circulação sistêmica como fonte energética alternativa (Lopes-Paulo, 2002). Todavia, o suprimento sanguíneo de glutamina parece ser incapaz de fornecer todo substrato necessário, modificando,

substancialmente, os mecanismos celulares para produção de energia (fosforilação oxidativa) (Agarwal e Schimmel, 1989). Reforçam essas evidências, os resultados de estudos experimentais demonstrando que a administração intrarretal de glutamina em altas concentrações, provavelmente por seu efeito antioxidante, é capaz de reduzir a formação de RLO (Matés et al, 2002; Fillmann, 2007; Fillmann et al, 2007).

Apesar da deficiência dos AGCC ser responsabilizada pela inflamação que caracteriza a CE, os mecanismos moleculares pelos quais determina a agressão epitelial ainda não foram totalmente esclarecidos (Scheppach e Weiler, 2004). Várias teorias relacionando a etiopatogenia da CE a diferentes alterações moleculares vêm sendo propostas, entretanto, nenhuma delas apresenta bases experimentais concretas para esclarecer a modificação fisiológica que determina a agressão inicial ao epitélio mucoso, nem é capaz de explicar todos os aspectos histopatológicos e bioquímicos encontrados (Farrell e Peppercorn, 2002; Hendrickson et al, 2002; Pravda, 2005). A infiltração inflamatória epitelial que ocorre nos doentes com CE é evento secundário mediado pelas diferentes células de defesa presentes no organismo. Contudo, há dúvidas quanto aos motivos pelos quais ocorre a quebra da barreira epitelial e a conseqüente infiltração bacteriana e neutrofílica (Pravda, 2005). Nenhuma teoria explica, satisfatoriamente, o mecanismo inicial da quebra da barreira epitelial que possibilita a migração das bactérias para o interior da submucosa estéril, desencadeando a resposta inflamatória.

Diante dessas evidências, foi proposta a teoria de indução da colite por radicais livres (*Radical Induction Theory*) para explicar os fenômenos iniciais que precedem e desencadeiam a infiltração inflamatória da mucosa nos

portadores de RCUI (Pravda, 2005). A teoria propôs que a agressão inicial à mucosa intestinal se deve à maior formação de RLO pela própria célula epitelial da mucosa cólica com alterações no seu metabolismo energético oxidativo. Como são moléculas tóxicas para as células, a produção exagerada dos RLO ocasionando dano tecidual, determinaria quebra das diferentes linhas de defesa que compõem a barreira mucosa. A quebra funcional da barreira epitelial possibilitaria a migração das bactérias do interior da luz intestinal para a intimidade estéril da submucosa. (Pravda, 2005). Na tentativa de combater essa infiltração bacteriana, leucócitos migrariam para o interior da parede intestinal, dando origem ao processo inflamatório característico da doença (Millar et al, 1996; Sheridan et al, 1996; Pravda, 2005).

O termo radical livre refere-se ao átomo ou à molécula que contenha número ímpar de elétrons na sua última camada eletrônica (Halliwell e Gutteridge, 1990). A denominação RLO é adotada porque a maioria dos radicais livres é gerada a partir do metabolismo celular da molécula de oxigênio ( $O_2$ ). Os RLO são constantemente formados durante o metabolismo energético de todas as células vivas, contudo, sua produção excessiva é nociva às células, danificando proteínas, membranas, organelas e, mormente, as bases nitrogenadas dos ácidos desoxirribonucléicos (DNA) e ribonucléicos (RNA) (Halliwell e Gutteridge, 1986; Bondy e Le Bel, 1993; Halliwell e Gutteridge, 1997; Cadenas e Davies, 2000; Gutteridge e Halliwell, 2000, McCord, 2000; Møller, 2005; Møller, 2006; Ribeiro et al, 2008). As células possuem defesas antioxidantes naturais, enzimáticas e não-enzimáticas, que atuam contra essa toxicidade mantendo o equilíbrio entre a produção e neutralização (Neut et al, 1995; Mortensen e Clausen, 1996; Sheridan et al, 1996; McCord, 2000).

Todavia, em certas condições, quer pela diminuição do sistema antioxidante do organismo, quer pelo aumento exagerado na produção dos RLO, ocorre desequilíbrio, determinando o aparecimento do fenômeno conhecido como estresse oxidativo (Mortensen e Clausen, 1996; Scheppach et al, 1997; Chen e Schopfer, 1999; Gutteridge e Halliwell, 2000). Já se demonstrou que a capacidade dos sistemas antioxidantes das células do epitélio cólico é relativamente deficiente, quando comparada as de outros órgãos e tecidos, tornando-as particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo, que ocorre de forma mais freqüente e intensa quando comparado a outros órgãos (Fillmann, 2007).

A possibilidade de que os RLO danifiquem o epitélio mucoso já é conhecida há vários anos, quando se demonstrou que a instilação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), um potente formador de RLO, no interior do cólon era seguida por quadro grave de colite (Sheeham e Brynjolfsson, 1960; Chen e Schopfer, 1999; Thibaud et al, 2001; Cammarota et al, 2007; Almalouf et al 2008). A colite experimental induzida pelo  $H_2O_2$  apresenta aspectos clínicos, macroscópicos e microscópicos semelhantes aos encontrados em outras formas de colite (Sheeham e Brynjolfsson, 1960; Almalouf et al 2008). Relatos na literatura também descreveram em seres humanos casos graves de colite, alguns até mesmo fatais, após a instilação de  $H_2O_2$  na luz do cólon com os mais diferentes objetivos (Sheeham e Brynjolfsson, 1960; Meyer et al, 1981; Schwartz et al, 1995; Gan e Price, 2003; Lapeyre, 2005; Cammarota et al, 2007). Estudo também demonstrou que camundongos silenciados para genes relacionados à produção de enzimas dos sistemas antioxidantes celulares desenvolvem quadros graves de colite (Esworthy et al, 2001). Nos últimos

anos, vários estudos vêm demonstrando, de maneira inequívoca, que enemas com substâncias antioxidantes são utilizados com sucesso no tratamento da colite quimicamente induzida, RCUI e CE. (Roediger e Millard, 1995; Zingarelli et al, 1999; Nosál'ova et al, 2000; Cetinkaya et al, 2005; Pravda, 2005; Jiang et al, 2006; Damiani et al, 2007; Fillmann, 2007; Reis et al, 2008; Hanai e Sugimoto, 2009).

A CE, à semelhança da RCUI, apresenta como uma das alterações histológicas mais comuns a infiltração de neutrófilos na mucosa e submucosa, principalmente nos casos mais graves (Keli et al, 1997). Já se demonstrou que um dos mecanismos principais de ação dos neutrófilos contra bactérias é a capacidade de produzirem altos níveis de RLO, que são considerados poderosos agentes bactericidas (Vasina et al, 2009). Entretanto, a produção aumentada dos RLO pelos neutrófilos também é capaz de ocasionar as lesões teciduais encontradas na colite (Fillmann, 2007).

A avaliação do infiltrado neutrofílico tecidual nos modelos experimentais de colite pode ser feita por estudo histológico ou, mais freqüentemente, pela dosagem dos níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO), enzima essencialmente produzida, essencialmente, pelos neutrófilos. A dosagem tecidual da MPO vem sendo empregada como marcador fidedigno do infiltrado neutrofílico nos modelos experimentais de colite quimicamente induzida (Reis et al, 2008; Vasina et al, 2009). Recentes estudos demonstraram que os níveis de RLO nos tecidos aumentam, paralelamente com os de MPO (Reis et al, 2008). A relação entre os RLO e a infiltração neutrofílica tecidual fica evidente com os resultados de pesquisas, em modelos experimentais de colite quimicamente induzida, demonstrando que a administração de n-acetilcisteína,

deferoxamina, ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), glutamina e os extratos de *Garcinia cambogia* e *Curcuma longa* - potentes antioxidantes naturais - é capaz de diminuir os níveis de MPO nos tecidos por reduzir a produção dos RLO pelos neutrófilos (Damiani et al, 2007; Deguchi et al, 2007; Fillmann, 2007; Reis et al, 2008; Ancha et al, 2008; Ancha et al, 2009). Assim sendo, a dosagem tecidual da MPO vem sendo também utilizada como potencial marcador para o diagnóstico da colite ocasionada pela produção aumentada dos RLO (Fillmann, 2007; Reis et al, 2008).

Outros marcadores inflamatórios também vêm sendo empregados em estudos experimentais com modelos de colite quimicamente induzida. A avaliação da expressão tecidual da ciclooxigenase-2 (COX-2) é um dos marcadores mais utilizados (Fillmann, 2007; Fillmann et al, 2007; Kretzmann et al, 2008; Reis et al, 2008). Estudos realizados em modelos experimentais de colite, relacionando a expressão tecidual da COX-2 com diferentes parâmetros inflamatórios, tais como a infiltração neutrofilica e a atividade de MPO, demonstraram haver relação direta entre eles (Martin et al, 2005; Fillmann, 2007). Níveis elevados de RLO nos tecidos podem aumentar a expressão do *gene* COX-2 e, conseqüentemente da proteína por ele transcrita (Ancha et al, 2009). A avaliação dos níveis teciduais da enzima COX-2 na mucosa cólica reflete, indiretamente, a presença de atividade inflamatória (Martin et al, 2005; Fillmann, 2007; Fillmann et al, 2007; Kretzmann et al, 2008). Estudos recentes vêm notando que a utilização de substâncias com poder antioxidante, além de reduzir a inflamação tecidual nos portadores de colite e nos modelos experimentais, diminui a expressão tecidual da COX-2 (Fillmann, 2007; Reis et al, 2008; Hanai e Sugimoto, 2009). Esses achados sugeriram que a

quantificação da expressão tecidual da enzima COX-2 possa ser empregada como marcador fidedigno da presença da inflamação tecidual, bem como da resolução do processo inflamatório.

Vários métodos foram propostos para a avaliação dos níveis de estresse oxidativo tecidual mediado pelos RLO. A pesquisa dos aductos de oxigênio, como o malondialdeído (MDA), a capacidade de reação dos RLO com o ácido tiobarbitúrico, a quimiluminescência e a cromatografia líquida de alto desempenho, vem sendo utilizada como métodos bioquímicos para a determinação indireta dos níveis teciduais de estresse oxidativo em modelos experimentais de colite (Fillmann, 2007; Wong et al, 2008; Arafa et al, 2009). Contudo, a mensuração dos níveis de estresse oxidativo tecidual com esses métodos necessita de quantidade considerável de tecido, bem como não permite avaliar o estresse oxidativo sobre o DNA celular de uma única célula, um dos aspectos mais importantes da relação entre colite e carcinoma (Ribeiro et al, 2008). Da mesma forma, não permitem avaliar quebras simples e duplas nas fitas do DNA nuclear considerado uma das alterações mais peculiares do estresse oxidativo celular (Ribeiro et al, 2008). Por essa razão, encontram-se poucos estudos quantificando o estresse oxidativo ao DNA nuclear, nos portadores de colite, comparando os tecidos normais com os inflamados.

Com o advento da técnica da eletroforese em gel de célula única (ensaio do cometa) tornou-se possível quantificar os níveis de dano oxidativo tecidual e ao DNA nuclear em uma única célula (Møller, 2005; Møller, 2006; Gleit et al, 2009). Essa possibilidade reflete com muito mais clareza os níveis de agressão tecidual pelos RLO que cada célula venha sofrendo isoladamente (Pool-Zobel et al, 1999; Møller, 2006; Gleit et al, 2009; Ribeiro et al, 2008), e os níveis de

dano as bases nitrogenadas do DNA, o efeito mais problemático do estresse oxidativo (Møller, 2005; Møller, 2006; Ribeiro et al, 2008). Essas vantagens tornam o método atraente na quantificação do estresse oxidativo nos modelos experimentais de colite, comparando tecidos normais e inflamados com diversos graus de atipia celular (Ribeiro et al, 2008). A possibilidade de quantificar o dano oxidativo em pequenos fragmentos, permite a avaliar a eficácia de antioxidantes, tais como inibidores da COX-2, na prevenção do dano ao DNA celular nas diversas etapas da inflamação, bem como da carcinogênese colorretal (Jiang et al, 2006; Damiani et al, 2007; Ribeiro et al, 2008; Reis et al, 2008).

Apesar de serem consideradas entidades distintas, a CE e a RCUI apresentam vários aspectos semelhantes quando se consideram os sintomas, achados endoscópicos, histológicos e, principalmente, as propostas terapêuticas. O denominador comum entre ambas é o intenso processo inflamatório existente na mucosa cólica que se agrava com o passar do tempo (Lim et al, 1999; Jowett e Cobden, 2000; Lim e Lim, 2000). A estreita relação entre as duas enfermidades foi confirmada por artigos mostrando a possibilidade do desenvolvimento da RCUI nos segmentos providos de trânsito dos doentes previamente submetidos à derivação intestinal por outras moléstias e que desenvolveram CE no segmento excluído (Jowett e Cobden, 2000; Lim e Lim, 2000).

É possível que a alteração metabólica celular provocada pela deficiência dos AGCC nos segmentos sem trânsito possa aumentar a produção dos RLO, com todo o potencial efeito lesivo dessas substâncias à mucosa cólica. A melhora do padrão clínico e histológico da CE, após administração de enemas



com AGCC, glutamina ou substâncias antioxidantes, como o ácido 5-ASA, no segmento excluído, parece reforçar essas evidências (Agarwal e Schimmel, 1989; Löhr et al, 1989; Nobels et al, 1989; Lechner et al, 1990; Ferguson e Siegel, 1991; Guilemot et al, 1991; Haque e West, 1992; Giardello et al, 1995; Lavoine et al, 1996; Scheppach et al, 1996; Scheppach, 1998; Eggenberger e Farid, 2001; Bajka et al, 2008).

A maioria dos modelos experimentais de colite induz a quebra da barreira mucosa cólica, de modo artificial, pela infusão de substâncias tóxicas, tais como o ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), o ácido acético, o sulfato sódico de dextran (DSS) e o  $H_2O_2$  (Zingarelli et al, 1999; Damiani et al, 2007; Fillmann, 2007; Almalouf et al 2008; Reis et al, 2008). Nenhum desses modelos permite avaliar a teoria de indução da colite por radicais livres aonde a agressão inicial a barreira epitelial ocorre por alterações do metabolismo energético das próprias células da mucosa cólica (Pravda, 2005). Apesar da CE ocorrer, exclusivamente, pela alteração do metabolismo energético celular, nenhum estudo experimental avaliou a possibilidade de que as células dos segmentos desprovidos de trânsito fecal possam produzir maiores quantidades dos RLO, e que essa produção aumentada possa determinar o dano à mucosa cólica

Caso o estresse oxidativo esteja relacionado à etiopatogenia da CE, poderíamos esclarecer os mecanismos moleculares para o aparecimento da doença e propor novas estratégias terapêuticas, como o uso de antioxidantes para o tratamento e, até mesmo, prevenção da enfermidade. A demonstração experimental, de que o estresse oxidativo seja responsável pelos mecanismos iniciais da agressão à mucosa, possibilita a elaboração de novas propostas de

tratamento com o objetivo de reduzir o sofrimento daqueles que já enfrentam as dificuldades do convívio diário com um estoma.

## **2. OBJETIVO**

Este estudo tem como objetivo verificar se existe estresse oxidativo tecidual na colite de exclusão.

### **3. MATERIAL E MÉTODO**

A realização deste estudo obedeceu à Lei Federal 11.794 (Lei Sérgio Arouca) e às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade São Francisco, Bragança Paulista, recebendo o parecer de N°. 01.11.2007 (Apêndice).

#### **3.1. Animal de experimentação**

Utilizamos 60 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, SPF (*Specific Patogenic Free*) provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP), com peso variando entre 300 a 320g e média de idade de quatro meses.

#### **3.2. Grupos experimentais**

Constituímos, aleatoriamente, três grupos experimentais com 20 animais, divididos, equitativamente, segundo o sacrifício ter sido realizado seis, 12 e 18 semanas após a intervenção cirúrgica. Dividimos cada grupo em dois subgrupos denominados experimento e controle. No subgrupo experimento, com 15 animais, realizamos a derivação do trânsito intestinal o cólon esquerdo e no subgrupo controle, composto de cinco animais, realizamos apenas laparotomia sem derivação do trânsito.

#### **3.3. Etapa pré-operatória**

Durante o período de vigilância epidemiológica (sete dias), mantivemos os animais em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, com controle de temperatura, luminosidade, umidade e ruídos. Todos permaneceram em jejum

durante 12h, exceto para água, antes da intervenção cirúrgica. Identificamos cada gaiola com o número do animal, o grupo e o subgrupo experimental a que pertencia. Esses mesmos dados foram tatuados com tinta da China (tinta nanquim) na cauda de cada animal.

### **3.4. Anestesia**

No dia da intervenção, pesamos os animais para cálculo da dose de anestésico. Utilizamos, para tal, o cloridrato de xilazina 2% (Anasedan<sup>®</sup>)<sup>1</sup> e o cloridrato de quetamina (Dopalen<sup>®</sup>)<sup>1</sup> na dose de 0,1ml/100g, administradas por via intramuscular na pata traseira esquerda.

### **3.5. Técnica operatória**

Depois de anestesiados e fixos à mesa cirúrgica, em decúbito dorsal horizontal, realizamos tricotomia da região abdominal, da pelve até as rebordas costais, com aparelho elétrico de depilação. Utilizamos a polivinilpirolidona-iodo para anti-sepsia da área depilada, posteriormente, recoberta por campo cirúrgico fenestrado estéril. Abrimos a cavidade abdominal por meio de incisão longitudinal mediana com três centímetros de extensão. Terminada essa etapa, identificamos a placa de Peyer, estrutura linfóide situada na face anterior do cólon na transição entre o reto e o sigmóide (Fig.1). Com o auxílio de um paquímetro, medimos a distância entre a placa de Peyer e o local escolhido para a secção do cólon esquerdo, situado a quatro centímetros acima da extremidade superior da placa. Após ligadura dos vasos da arcada cólica marginal (Fig. 2), seccionamos o cólon no ponto escolhido e exteriorizamos o segmento proximal, como colostomia terminal, através de incisão circular, com

---

<sup>1</sup> Agribrands do Brasil Ltda. Brasil

três milímetros de diâmetro, realizada na região do hipocôndrio esquerdo. Fixamos a colostomia à pele com pontos separados de fio absorvível monofilamentar 4-0 (Monocryl<sup>®</sup>)<sup>2</sup> nos quatro pontos cardinais, e depois entre eles, amarrando com três nós.

Terminada a confecção da colostomia proximal, cateterizamos o segmento caudal do intestino grosso com sonda de polivinil medindo 12 F de diâmetro interno, e o irrigamos com 40 ml de solução fisiológica 0,9% aquecida a 37°C (Fig.3), até que o efluente drenado pelo ânus não apresentasse material fecal. Concluída a irrigação, removemos o cateter e exteriorizamos o cólon distal como colostomia (fístula mucosa distal) na face lateral inferior esquerda da parede abdominal (Fig.4). Fixamos a colostomia distal com a mesma técnica utilizada na colostomia proximal. Realizamos a síntese da parede abdominal em dois planos de sutura: peritônio e aponeurose com pontos contínuos de fio de ácido poliglicólico 4-0 (Vicryl<sup>®</sup>)<sup>3</sup> e a pele com pontos separados de nylon 4-0 (Mononylon<sup>®</sup>)

### **3.6. Pós-operatório**

Concluída a operação, mantivemos os animais por 10 minutos sob lâmpada aquecida e, após a recuperação anestésica, os alojamos nas gaiolas individuais previamente identificadas. Liberamos a ingestão de água e ração padronizada (Nuvilab CR1<sup>®</sup> autoclavável)<sup>4</sup>, após terem recuperado completamente o estado de vigília.

---

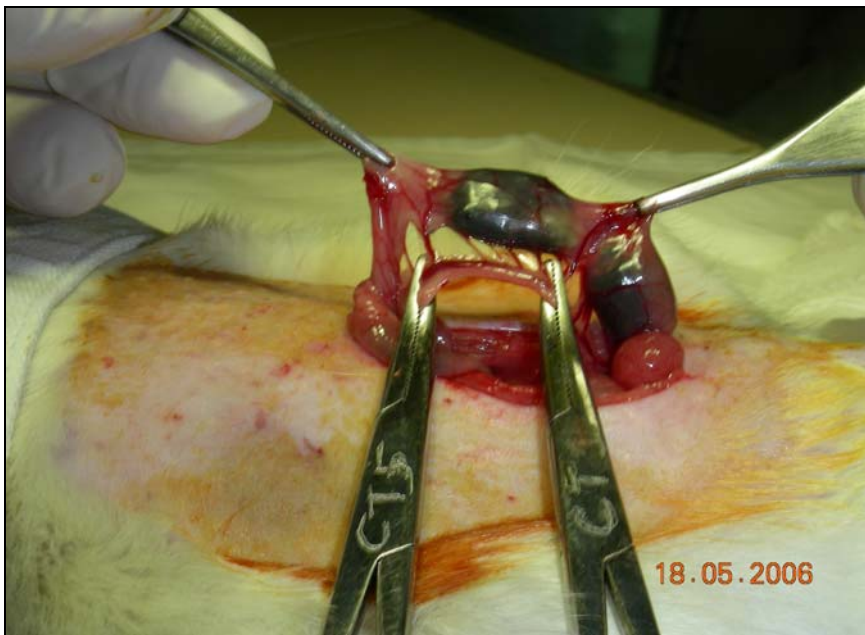
<sup>2</sup> Ethicon, Inc. Somerville, NJ, USA.

<sup>3</sup> Ethicon, Inc. Somerville, NJ, USA

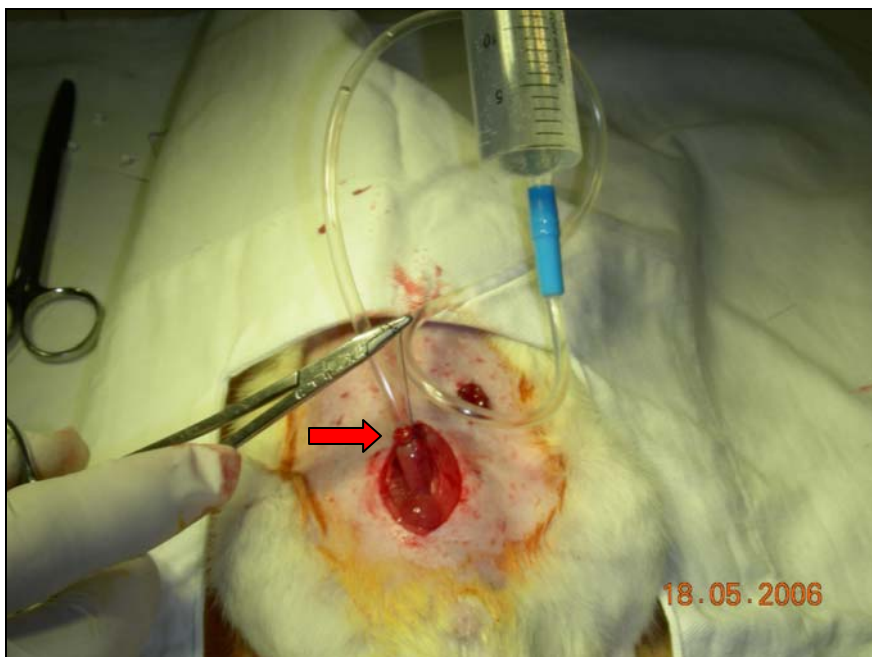
<sup>4</sup> Nuvital Nutrientes SA, São Paulo, Brasil



**FIGURA 1** – Identificação da placa de Peyer (seta) na parede anterior da transição entre o reto e o cólon sigmóide.



**FIGURA 2** – Ligadura da artéria marginal do cólon descendente no ponto determinado para secção.



**FIGURA 3** – Limpeza mecânica anterógrada do cólon distal a ser excluído de trânsito fecal (seta).



**FIGURA 4** – Aspecto final da parede abdominal após confecção dos estomas. Colostomia distal (seta).



Os animais permaneceram em gaiolas individuais até a data do sacrifício, nas mesmas condições ambientais de umidade, luminosidade e temperatura do período de vigilância epidemiológica. Após a intervenção, não tomamos qualquer cuidado adicional com relação à ferida operatória ou aos estomas, nem utilizamos analgésicos ou antimicrobianos.

### **3.7. Coleta do material**

Na véspera do dia programado para a coleta do material, os animais foram novamente pesados e mantidos em jejum por 12h, exceto para água. Para a remoção dos fragmentos cólicos a serem estudados, anestesiámos os animais com a mesma técnica anteriormente descrita, e realizamos incisão xifopúbica. Após liberação das aderências removemos o cólon provido, incluindo a colostomia, e todo o segmento caudal do cólon desprovido de trânsito fecal, incluindo o ânus. Nos animais do subgrupo controle, ressecamos todo cólon a partir da região cecal, também incluindo o ânus. Os animais anestesiados foram sacrificados com dose inalatória letal de éter.

Depois de removidos, abrimos longitudinalmente os segmentos do cólon, pela borda anti-mesocólica, e os lavamos, com soro fisiológico a 0,9% aquecido a 37°C, para remoção dos resíduos fecais ou muco. Retiramos oito fragmentos, medindo cada um deles 10 mm de extensão, interessando toda a parede intestinal. Eram quatro do cólon provido, quatro do desprovido de trânsito intestinal e quatro dos animais do subgrupo controle. Nos animais do subgrupo experimento colhemos os fragmentos do cólon provido de trânsito, para os estudos histológicos e bioquímicos, sempre de local padronizado, situado a partir de um centímetro da fixação do estoma no peritônio parietal. Desprezamos a porção terminal do cólon que incluía a colostomia. Nos animais

do subgrupo experimento, colhemos os fragmentos do cólon sem trânsito obedecendo aos mesmos cuidados, contudo desprezando também, os 5 mm situados acima do orifício anal. Nos animais do subgrupo controle colhemos, seqüencialmente, fragmentos do cólon esquerdo a partir de um ponto situado 5 mm acima da margem anal. Nos fragmentos destinados à mensuração dos níveis de MPO, COX-2 e estresse oxidativo, isolamos por microdissecação realizada com o auxílio de lupa entomológica, a mucosa das demais camadas (Fig.5). Para os estudos bioquímicos e o ensaio do cometa, a microdissecação dos fragmentos de mucosa do segmento sem trânsito fecal foi realizada em local que não continha a placa de Peyer. Terminada a dissecação acondicionamos os fragmentos em frasco com solução tampão e, após identificação refrigeramos a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Fig.6).

### **3.8. Técnica histológica**

Para a realização do estudo histopatológico, dispusemos e fixamos com alfinetes fragmentos com 10 mm de extensão, retirados dos cólons com e sem trânsito do subgrupo experimento e do cólon esquerdo dos animais do subgrupo controle, em superfície plana de isopor com a face mucosa voltada para cima. Após identificação, foram acondicionados em frascos contendo solução 20 ml de solução de formaldeído tamponado a 10%. Colocamos os fragmentos totalmente imersos na solução, onde permaneciam por 72h. Depois deste período os fragmentos foram retirados e lavados em água corrente e destilada, para em seguida serem desidratados em sucessivas concentrações crescentes de álcool e clarificados em xilol. Após essa etapa, o material foi incluído em parafina e, cada bloco, submetido a dois cortes longitudinais, com  $5\mu$  de espessura, para confecção das lâminas destinadas ao estudo

histológico. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e montadas em lâminulas com resina.



**FIGURA 5** – Fragmentos da mucosa cólica isolados por microdissecação para estudo dos níveis de MPO, COX-2 e estresse oxidativo.



**FIGURA 6** – Conservação dos fragmentos cólicos removidos para quantificação dos níveis de MPO, COX-2 e estresse oxidativo.

### 3.9. Avaliação histológica

Para o diagnóstico de colite a análise das lâminas foi feita com microscópio óptico comum, Nikon Eclipse DS-50<sup>5</sup>, com magnificação final de 200x, por patologista experiente em doenças colorretais que desconhecia a origem do material e os objetivos do estudo. As microfotografias foram feitas com câmera de vídeo-captura (DS-Fi-50)<sup>5</sup>, acoplada ao microscópio e, as imagens obtidas, posteriormente, digitalizadas em computador.

Para avaliar a gravidade da colite, consideramos os seguintes parâmetros histológicos: presença de ulcerações epitélio (ausente,  $\leq 2$  ou  $> 2$ ) no e infiltrado neutrofílico (ausente;  $< 50\%$  ou  $\geq 51\%$  das criptas;  $< 50\%$  ou  $\geq 51\%$  dos campos estudados) segundo escala anteriormente proposta por Grupta et al (2007) (Quadro 1).

<b>QUADRO 1 – Escala de graduação do escore inflamatório</b>		
<b>Grau de inflamação</b>	<b>Escore</b>	<b>Características histopatológicas</b>
Ausente	0	Sem infiltração neutrofílica tecidual
Leve	1-3	Infiltração neutrofílica ( $< 50\%$ das criptas) + Infiltração neutrofílica ( $< 50\%$ dos campos) + Ausência de erosões ou úlceras
Moderado	4-6	Infiltração neutrofílica ( $\geq 51\%$ das criptas) + Infiltração neutrofílica ( $\geq 51\%$ dos campos) + Ausência de erosões ou úlceras
Intenso	7-8	Presença de erosões ou úlceras

<sup>5</sup> Nikon Inc., Osaka, Nippon.

### 3.10. Eletroforese em gel de célula isolada (ensaio do cometa)

O ensaio do cometa foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Gastroenterologia da Universidade São Francisco, Bragança Paulista (UNIFAG).

Realizamos a quantificação dos níveis de estresse oxidativo pela eletroforese em gel de células isoladas (ensaio do cometa) segundo padronização técnica proposta Pool-Zobel et al (1994). Resumidamente, para a detecção dos níveis de estresse oxidativo, utilizamos amostras provenientes dos animais do subgrupo controle e experimento (região cólica provida e desprovida de trânsito intestinal). Todas as amostras foram colhidas e analisadas em triplicata. Os espécimes foram incubados em 3 ml de solução tampão de Hank's<sup>6</sup> contendo 5,5 mg de proteinase K<sup>7</sup> e 3 mg de colagenase tipo IV<sup>10</sup> por 45 min. a 37°C para a o isolamento das células da mucosa cólica. Alíquotas foram retiradas e a viabilidade celular avaliada.

Realizamos o ensaio do cometa apenas nas amostras que apresentassem viabilidade celular maior que 75%. Avaliamos a viabilidade celular com o método do diacetato de fluoresceína (FDA) / brometo de etídio (EtBr)<sup>8</sup>. Resumidamente, a solução de coloração celular foi preparada imediatamente antes da sua utilização e continha 30 ml de FDA em acetona (5mg/ml), 200 ml de EtBr em tampão fosfato (PBS; 200 mg/ml), e 4,8 ml de PBS<sup>9</sup>. A suspensão contendo células isoladas foi então misturada com 25 ml da solução corante, colocada sobre lâmina e recoberta com lamínula. As

---

<sup>6</sup> Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

<sup>7</sup> Sigma Chemical, CO, St. Louis, MO, USA

<sup>8</sup> Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

<sup>9</sup> Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

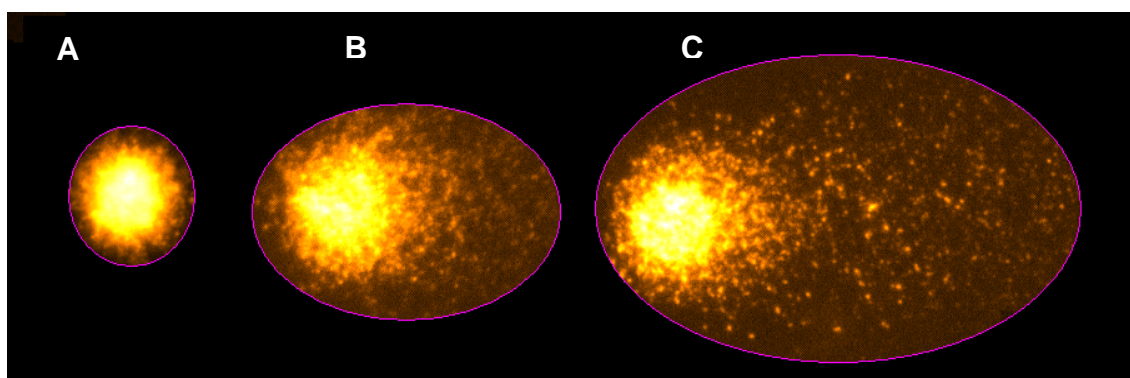
lâminas foram lidas no microscópio de imunofluorescência. O núcleo das células viáveis corava-se em verde, e em vermelho o das células inviáveis. Após análise das lâminas, selecionamos apenas amostras dos tecidos que apresentassem mais de 75% das células viáveis.

A versão alcalina do ensaio do cometa foi realizada de acordo com protocolo publicado por Ladeira et al (2005). Em resumo, 15 µl da suspensão celular previamente obtida foram misturados à agarose *low melting point* 0.5%<sup>9</sup>, postos sobre uma lâmina e cobertos com lamínula. Essas foram imersas em solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% SDS, pH 10 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) e permaneceram a 4°C por 12 horas. Subseqüentemente, foram expostas a um tampão alcalino (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH=13,4) por 40 min. a 4°C para lise da membrana citoplasmática, organelas celulares e primeira camada da carioteca, expondo somente a camada interna da carioteca e o DNA nuclear. A eletroforese dos núcleos isolados, contendo o DNA, foi realizada nesse tampão, no interior da geladeira, para inibir a ação das proteínas de reparo, a 4°C, por 30 minutos a 25V e 300 mA. Após a corrida da eletroforese, as lâminas foram então neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5), coradas com corante fluorófilo *Sybr Safe*<sup>10</sup>, e analisadas ao microscópio de fluorescência. Todo material foi processado e analisado simultaneamente para evitar variações da técnica empregada. Trezentas células foram aleatoriamente selecionadas (100 de cada segmento intestinal, provido, desprovido de trânsito e dos animais do subgrupo controle) e analisadas usando o programa *Komet 5.5*<sup>10</sup>. Com o auxílio do programa, foi

---

<sup>10</sup> Kinetic Imaging,, NY,USA

obtido o valor da extensão da cauda do cometa (*Tail moment*) sendo seus valores médios determinados. Segundo o manual do fabricante, o *Tail moment* (*TM*) é definido como o produto entre os fragmentos de DNA da cauda e a distância média da migração da cauda do cometa, e reflete a extensão das rupturas das hélices de DNA (estresse oxidativo), podendo ser quantificado por métodos de intensificação de imagem e análise computacional (Ribeiro et al, 2008) (Fig. 7). Para cada animal, utilizou-se a média dos valores obtidos com a leitura de 100 células de cada segmento estudado, realizada pelo mesmo técnico, que desconhecia a origem do material e os objetivos do estudo.



**Figura 7** – Avaliação dos níveis de estresse oxidativo (*Tail Moment*), pelo ensaio do cometa. **A** – Célula normal; **B** – Célula com dano oxidativo moderado; **C** – Célula com dano oxidativo intenso.

### 3.11. Atividade tecidual de mieloperoxidase (MPO)

Avaliamos os níveis teciduais de MPO com objetivo de confirmar bioquimicamente a presença de colite. A atividade da MPO foi avaliada como índice da infiltração neutrofílica da mucosa e da submucosa cólica, segundo método descrito por Bradley et al (1982). Resumidamente, as amostras dos segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito fecal e do grupo controle pesando 50mg foram homogeneizadas em solução de brometo de hexadexitrilmetilamônio e em 50mM de tampão de fosfato de potássio (PBS)

em pH 6 por 15 a 20 segundos. A seguir, cada amostra foi centrifugada por 10 min., a 4°C, e o sobrenadante separado e colocado em placa de 96 poços, mantendo-a no gelo.<sup>11</sup> Para a determinação dos níveis teciduais de MPO, em cada poço contendo 50µL de cada amostra, foi adicionado 200µL de solução de o-dianisidina [(0.167mg/mL o-dianisidina dihidroclorido, 0.0005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 50mM de PBS (pH 6.0)], imediatamente antes da leitura das mudanças da curva de absorvância a 460nm, de 30 em 30 segundos por três minutos.

### **3.12. Atividade tecidual de cicloxigenase-2 (COX-2)**

Os níveis de COX-2 também foram mensurados com o objetivo de assegurar, do ponto de vista bioquímico, a presença da colite. A determinação dos níveis de COX-2 foi realizada segundo metodologia adotada por Reis et al, (2008). Resumidamente, os fragmentos cólicos destinados a quantificação dos níveis teciduais de COX-2, obtidos dos animais dos subgrupos controle e experimento (segmentos com e sem trânsito intestinal), foram homogeneizados em solução tampão [1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100mM pirofosfato de sódio, 100mM sódio fluoridro, 10 mM EDTA, 10mM ortovanato de sódio, 2.0mM PMSF, e 0.1mg de aprotinina/ml] a 4°C. O material insolúvel foi removido por centrifugação durante 20min., a 9.000g, a 4°C. A concentração protéica do sobrenadante foi determinada pelo método do biureto. Os extratos foram tratados em amostra de solução tampão de Laemmli contendo 100 mM ditiotreitol, aquecida em banho-maria por 5 min., e após, submetidos ao SDS-PAGE em aparelho laboratorial de gel (Bio-Rad-Mini-Protean). Para o *imunoblot*, 0,15mg do extrato protéico de cada tecido foram separados por

---

<sup>11</sup> Multiscan MS, LabSystems, Chicago, USA



SDS-PAGE e transferidos para membranas de celulose e expostos aos anticorpos anti-COX-2 ou anti-beta-actina (anti- $\beta$ -actina)<sup>12</sup>. As membranas de nitrocelulose foram desenvolvidas usando *kit* comercial de quimiluminescência.<sup>13</sup> As intensidades das bandas foram quantificadas por densitômetro óptico.<sup>14</sup>

### 3.13. Método estatístico

Os resultados encontrados foram descritos pelo valor médio e respectivo desvio padrão, adotando nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para todos os testes. Utilizamos o teste t de Student pareado para comparar resultados encontrados na mensuração dos níveis teciduais de MPO, COX-2 e *TM* entre os segmentos providos e desprovidos de trânsito no subgrupo experimento e o teste t de Student para as mesmas variáveis comparando animais dos subgrupos controle e experimento. Adotamos o teste de Mann-Whitney para comparar os resultados encontrados quanto à presença de úlceras e escore inflamatório, entre os subgrupos controle e experimento, nos segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito, nos três períodos de exclusão fecal. Empregamos o teste de Kruskal-Wallis para análise de variância dos parâmetros estudados com relação ao tempo de exclusão do trânsito. Adotamos os testes de correlação de Pearson e Spearman para avaliar as correlações entre as variáveis consideradas. Todos os testes foram realizados com o programa estatístico SPSS<sup>15</sup> (versão 13.0) e os gráficos elaborados com o programa Microsoft Office Excel, 2007 para Windows.

---

<sup>12</sup> Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

<sup>13</sup> GE Healthcare, London, UK

<sup>14</sup> Scion Image software, ScionCorp, Frederick, MD

<sup>15</sup> SPSS Inc., Chicago, USA

#### 4. RESULTADOS

Os animais toleraram bem o procedimento cirúrgico e anestésico não ocorrendo óbitos durante a intervenção assim como no pós-operatório imediato. Dois deles apresentaram estenose da colostomia com impactação fecal e conseqüente obstrução intestinal, durante o acompanhamento pós-operatório, sendo substituídos. Dois outros, do subgrupo experimento, tiveram pequena deiscência cutânea que cicatrizou espontaneamente antes da data prevista para o sacrifício.

Durante a evolução pós-operatória, os animais, independente do subgrupo experimental a que pertenciam (controle ou experimento), apresentaram perda ponderal de  $30\pm 9$  g nas duas primeiras semanas de pós-operatório. Após esse período, recuperaram progressivamente o peso até a data do sacrifício (Anexo 1).

Após quatro semanas de exclusão, constatamos a eliminação de muco pelo ânus em todos os animais submetidos à exclusão intestinal e, após 18 semanas, notamos a presença de sangue nos pelos da região perianal em quatro deles. A colostomia distal obliterou-se a partir da 8ª semana de exclusão fecal. Nos animais submetidos à derivação por 18 semanas, o estoma distal não era mais encontrado e no seu local existia apenas pequena cicatriz.

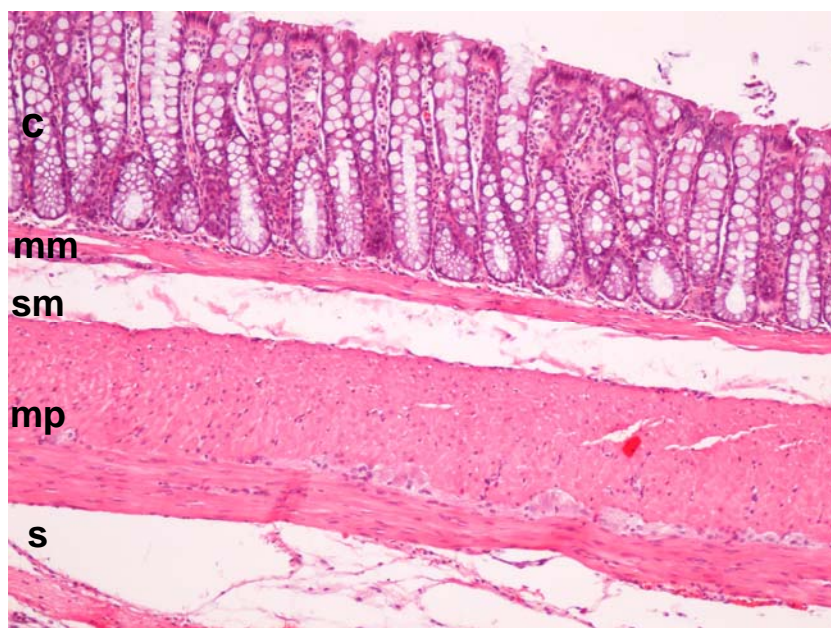
Durante a etapa de coleta do material, encontramos aderências frouxas entre as alças intestinais independente do grupo experimental considerado. Apesar de não mensurarmos, verificamos, macroscopicamente, que nos animais submetidos à exclusão fecal o cólon sem trânsito apresentava-se contraído e encurtado quando comparado ao cólon com trânsito preservado,

independendo do tempo de exclusão considerado, mas com maior evidência naqueles submetidos à derivação por 18 semanas.

Durante a abertura dos segmentos cólicos a serem analisados, não encontramos resíduos fecais nas alças exclusas de trânsito, independente do tempo de exclusão proposto. Em todos os segmentos cólicos excluídos de trânsito, encontramos cilindro espesso de muco que ocupava a luz intestinal mais evidente no grupo submetido à exclusão por 18 semanas.

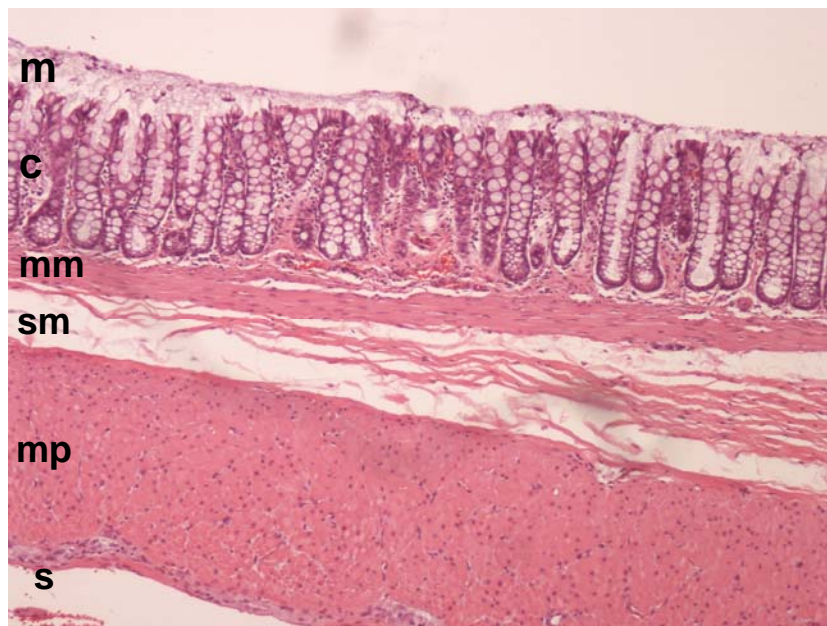
#### 4.1 - Alterações histológicas

A Fig. 8 mostra as camadas da parede cólica no segmento provido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal.



**FIGURA 8** – Parede cólica no cólon provido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal. (H.E.100x). **c** = criptas; **mm** = muscular da mucosa; **sm** = submucosa; **mp** = muscular própria; **s**= serosa.

A Fig. 9 mostra as camadas da parede cólica em segmento desprovido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal.

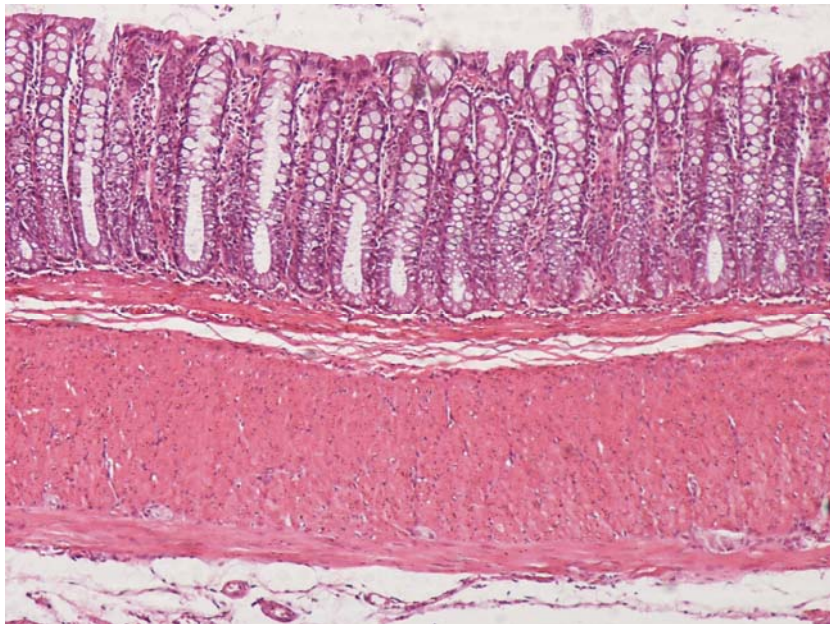


**FIGURA 9** – Parede cólica no cólon desprovido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal (H.E.100x). **m** = muco; **c** = criptas; **mm** = muscular da mucosa; **sm** = submucosa; **mp** = muscular própria; **s** = serosa.

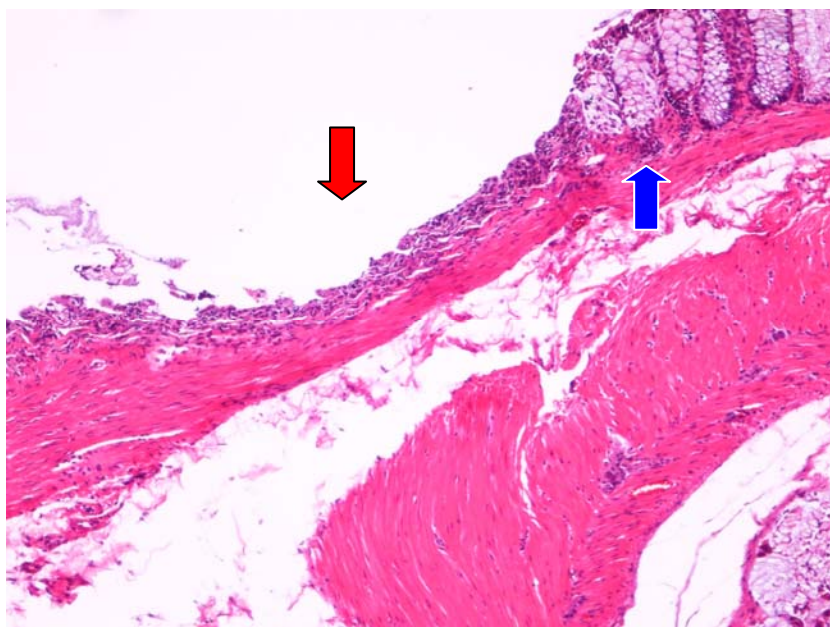
#### 4.1.1 - Ulcerações na mucosa cólica

A Fig. 10 mostra a superfície mucosa cólica de segmento provido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal. Verificamos que as criptas cólicas encontravam-se preservadas sem a formação de úlceras epiteliais. Identificamos pequena infiltração de neutrófilos na base das criptas e no interior de vasos da camada submucosa.

A Fig. 11 mostra a superfície mucosa cólica de segmento desprovido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal. Verificamos a presença de infiltrado inflamatório intenso na mucosa e submucosa, congestão vascular da submucosa e ulcerações com tamanho variável que atingiram a camada muscular da mucosa em dois animais.

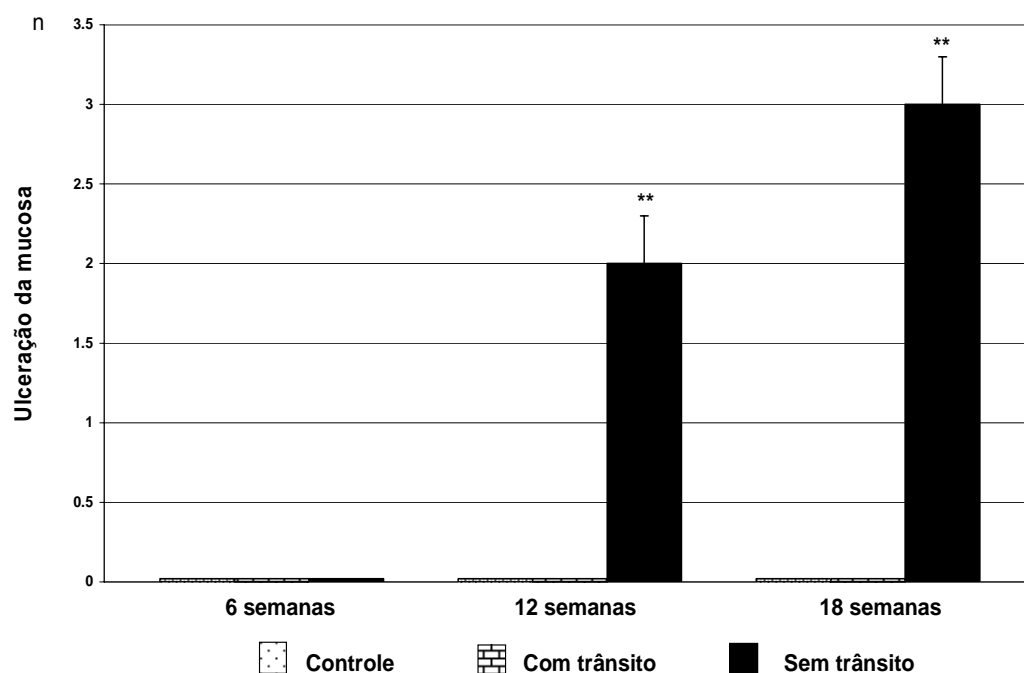


**FIGURA 10** – Superfície mucosa cólica no cólon provido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal. (H.E.100x).



**FIGURA 11** – Superfície mucosa no cólon desprovido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal. (H.E.100x). Presença de úlcera no epitélio (seta vermelha) e infiltrado inflamatório na base das criptas (seta azul).

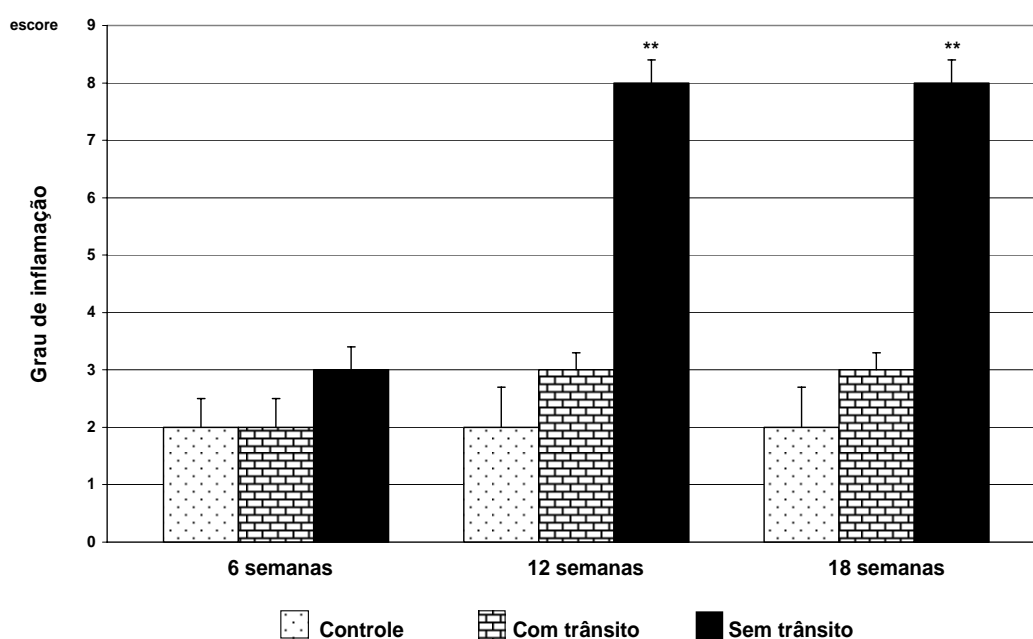
A Fig. 12 mostra a média com o respectivo desvio padrão, dos valores encontrados para o número de ulcerações na mucosa cólica, comparando animais dos subgrupos controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal) nos diferentes períodos de exclusão propostos. Não encontramos úlceras epiteliais nos animais do subgrupo controle, segmentos providos de trânsito e desprovidos de trânsito após seis semanas de exclusão. Verificamos ulcerações, na mucosa cólica nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, a partir da 12<sup>a</sup> semana aumentando em número com o progredir do tempo de derivação. Nos segmentos excluídos após 12 semanas o número de úlceras era de  $2,0 \pm 0,30$ , enquanto após 18 semanas de 2,9 $\pm$ 0,30. Comparando segmentos cólicos com e sem trânsito e animais do subgrupo controle, verificamos que após 12 e 18 semanas o número de úlceras era significativamente maior ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 12** – Ulcerações da mucosa cólica comparando os subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão. \*\* significante (distal x controle e proximal). Teste de Mann-Whitney.

#### 4.1.2 - Escore inflamatório

A Fig. 13 mostra, em média com o respectivo desvio padrão, os valores encontrados para o escore inflamatório, comparando animais dos subgrupos controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal) nos diferentes períodos de exclusão propostos. Comparando os segmentos providos de trânsito e os animais do subgrupo controle o escore de graduação inflamatório não apresentava diferença independente do tempo de exclusão. No subgrupo experimento, encontramos maior escore inflamatório nos segmentos desprovidos de trânsito independente do tempo de exclusão considerado. O valor do escore inflamatório no cólon desprovido de trânsito por seis semanas era de  $3 \pm 0,40$  e após 12 e 18 semanas de exclusão intestinal esses valores aumentaram para  $8,0 \pm 0,37$ , apresentando significância estatística quando comparado ao cólon com trânsito preservado e aos animais do subgrupo controle ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 13** – Escore inflamatório comparando os subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão. \*\* significativa (distal x controle e proximal). Teste de Mann-Whitney.

## 4.2 - Avaliações bioquímicas

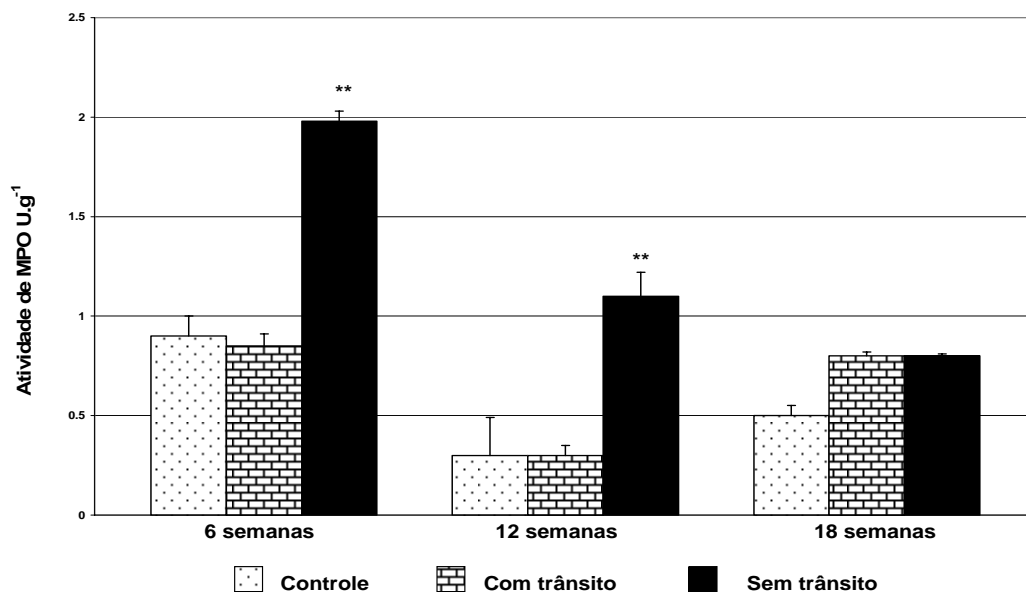
### 4.2.1 - Níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO)

A Fig. 14 mostra, em média, com o respectivo desvio padrão, os níveis teciduais de MPO, comparando os subgrupos controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal) nos diferentes períodos de exclusão de trânsito fecal. Os níveis de MPO eram semelhantes nos animais do subgrupo controle e nos segmentos provido de trânsito dos animais do subgrupo experimento, independente do tempo de exclusão proposto. No cólon excluído por seis semanas os níveis de MPO foram de  $1,96 \pm 0,51 \text{ U.g}^{-1}$ , enquanto nos animais submetidos à derivação por 12 e 18 semanas de  $1,09 \pm 0,12 \text{ U.g}^{-1}$  e  $0,70 \pm 0,12 \text{ U.g}^{-1}$ , respectivamente. Encontramos níveis teciduais mais elevados de MPO no cólon desprovido de trânsito fecal após seis e 12 semanas de exclusão ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos dos segmentos com trânsito preservado e aos animais do subgrupo controle. Após 18 semanas de exclusão, os níveis de MPO nos segmentos sem trânsito reduziam tornando-se idênticos aos do cólon provido de trânsito fecal e semelhantes aos dos animais do grupo controle.

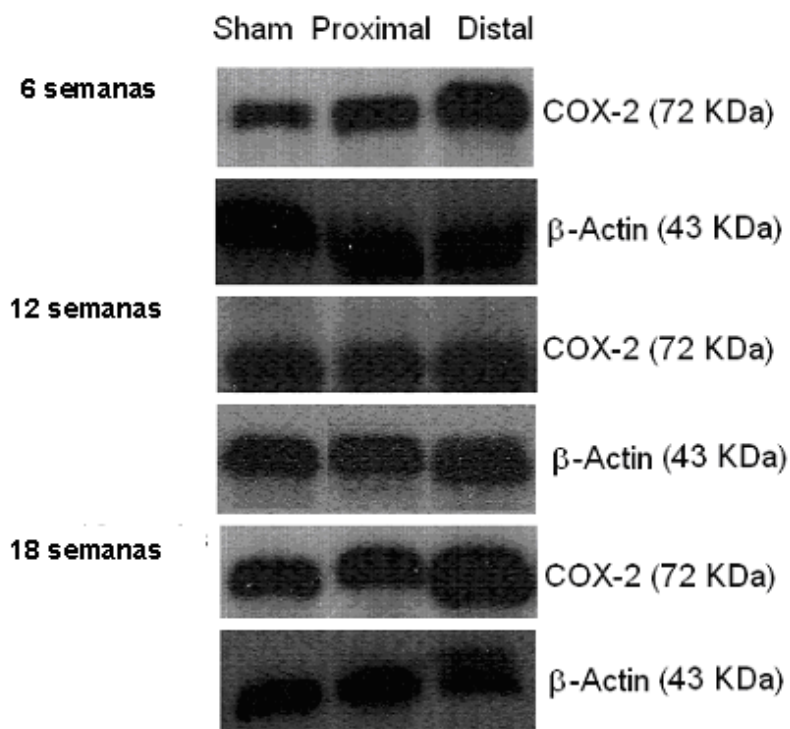
### 4.2.2 - Níveis teciduais de cicloxigenase-2 (COX-2)

A Fig. 15 mostra as membranas de nitrocelulose após *imunoblot* e eletroforese das enzimas COX-2 e  $\beta$ -actina comparando animais do subgrupo controle e experimento após seis, 12 e 18 semanas. A densitometria mostrou aumento dos níveis de COX-2 nos fragmentos removidos do cólon sem trânsito quando comparados aos segmentos obtidos dos animais do subgrupo controle e dos animais do subgrupo experimento com trânsito preservado.



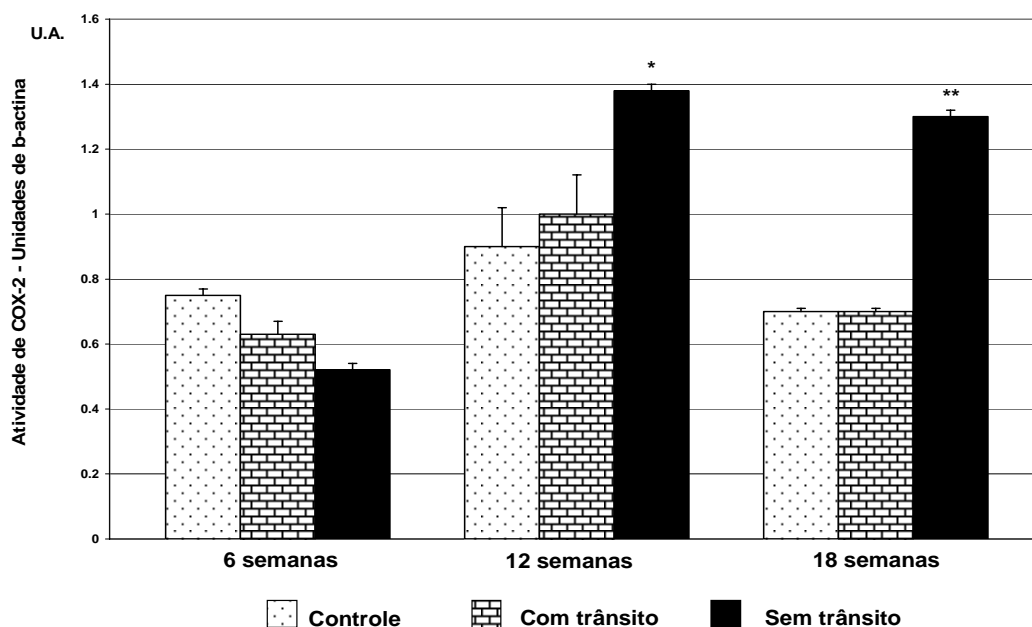


**FIGURA 14** – Níveis de atividade da mieloperoxidase (MPO) comparando animais dos subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão do trânsito intestinal. \*\* significante (Sem trânsito x Controle; Sem trânsito x Com trânsito). Teste t de student e t de student pareado.



**FIGURA 15** – Atividade da cicloxigenase-2 nas membranas de nitrocelulose após o imunoblotting. COX-2 = cicloxigenase-2;  $\beta$ -actin = beta-actina; KDa = quilo-dáltons.

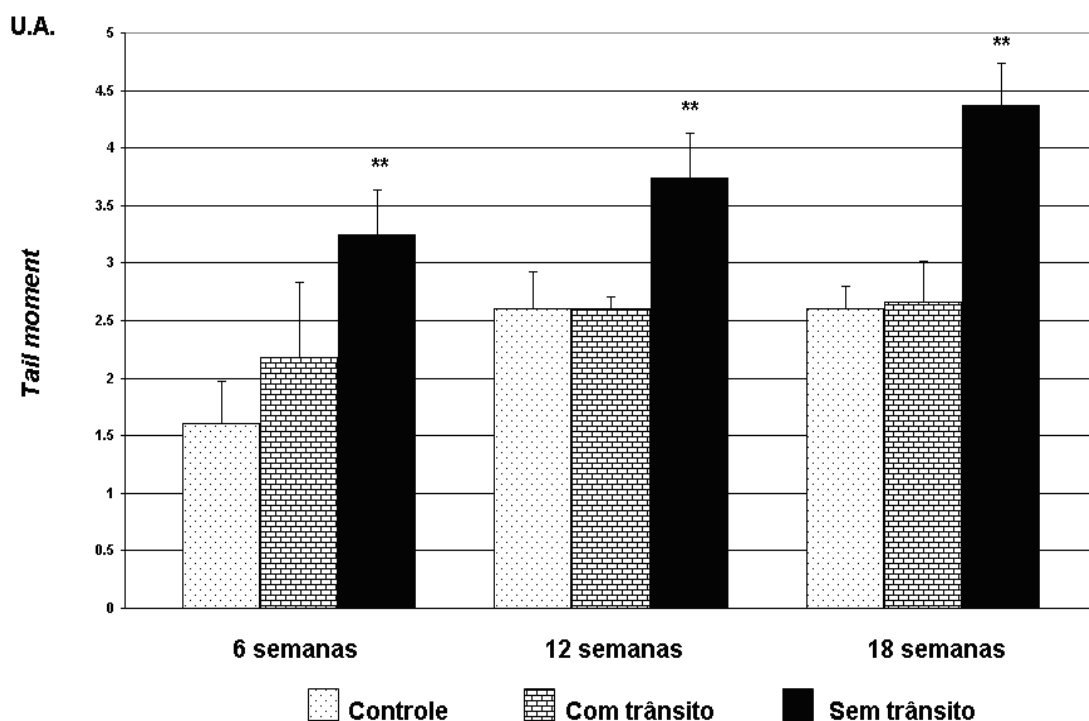
A Fig. 16 mostra em média, com o respectivo desvio padrão, os níveis de teciduais de COX-2, comparando os subgrupos controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal) nos diferentes períodos de exclusão do trânsito fecal. Os níveis de COX-2, nos segmentos sem trânsito fecal após seis semanas,  $0,57 \pm 0,02$  U $\beta$ -actina, foram semelhantes aos dos segmentos providos de trânsito e aos do subgrupo controle. Constatamos que após 12 e 18 semanas de exclusão fecal os níveis de COX-2 nos segmentos desprovidos de trânsito eram de  $1,38 \pm 0,01$  U $\beta$ -actina e  $1,31 \pm 0,02$  U $\beta$ -actina, respectivamente. Esses valores após 12 semanas eram significativamente mais elevados nos cólons desprovidos de trânsito quando comparados aos animais do subgrupo controle e, após 18 semanas, aos dos animais do subgrupo controle nos segmentos com trânsito preservado dos animais do subgrupo experimento ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 16** – Níveis de cicloxigenase-2 (COX-2) comparando os subgrupos controle e experimento (cólons proximal e distal) nos diferentes períodos de exclusão intestinal. \*\* significante (Sem trânsito x Controle; Sem trânsito x Com trânsito). \* significante (Sem trânsito x Controle); Teste t de student e teste t de student pareado.

### 4.3 – Avaliação dos níveis de estresse oxidativo

A Fig. 17 mostra, em média, com o respectivo desvio padrão, os valores encontrados para os níveis de estresse oxidativo tecidual, comparando animais dos subgrupos controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal) nos diferentes tempos de exclusão do trânsito. Os níveis de estresse foram semelhantes no subgrupo controle e segmentos com trânsito, independente do tempo de exclusão considerado. Encontramos níveis de estresse oxidativo significativamente maiores nos segmentos sem trânsito quando comparados aos segmentos com trânsito preservado e ao subgrupo controle, independente do tempo ( $p < 0,05$ ). No cólon sem trânsito por seis semanas, esses valores eram de  $3,24 \pm 0,44 TM$ , enquanto após 12 e 18 semanas os valores eram de  $3,74 \pm 0,40 TM$  e  $4,37 \pm 0,32 TM$ , respectivamente.



**FIGURA 17** – Níveis de estresse oxidativo comparando os subgrupos controle e experimento (cólon proximal e distal) nos diferentes tempos de exclusão. \*\* significante (Sem trânsito x Controle e Com trânsito). Teste t de student e teste t de student pareado.

#### 4.4 - Variações segundo o tempo de exclusão

Não encontramos variações no número ulcerações da mucosa cólica, bem como no escore inflamatório, nos animais do subgrupo controle e nos segmentos com trânsito preservado dos animais do subgrupo experimento, independente tempo de exclusão considerado.

A Tab. 1 mostra a variação da presença de úlceras na mucosa cólica, e escore inflamatório no cólon desprovido de trânsito fecal, em relação aos tempos de exclusão propostos. Verificamos que a o número de ulcerações no epitélio cólico nos segmentos sem trânsito aumentava com o decorrer do tempo de exclusão ( $p=0,001$ ). Do mesmo modo, constatamos que o grau de inflamação nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal aumentava com o progredir do tempo de exclusão intestinal ( $p=0,001$ ).

**TABELA 1** - Variação dos valores médios mensurados para presença de úlceras, congestão vascular e escore inflamatório em segmentos desprovidos de trânsito fecal, em relação aos diferentes tempos de exclusão.

	Cólon sem trânsito intestinal			p
	(Média ± Desvio Padrão)			
	6 semanas	12 semanas	18 semanas	
<b><i>Ulcerações da mucosa</i></b>	0 ± 0	2,0 ± 0,30	2,9 ± 0,30	0,001*
<b><i>Escore inflamatório</i></b>	3 ± 0,40	8,0 ± 0,37	8,0 ± 0,37	0,001*

\* = significante; Teste de Kruskal-Wallis

Não encontramos variação nos níveis de MPO, COX-2 e de estresse oxidativo nos animais do subgrupo controle e nos segmentos com trânsito preservado com o decorrer do tempo do experimento.

A Tab. 2 mostra a variação dos níveis de atividade de MPO, COX-2 e níveis teciduais de estresse oxidativo no cólon sem trânsito fecal, em relação aos diferentes tempos de exclusão propostos. Verificamos que nesses segmentos os níveis teciduais de MPO diminuíam, significativamente, com o decorrer do tempo de exclusão fecal ( $p=0,00001$ ). Os níveis teciduais de COX-2 e estresse oxidativo nos segmentos desprovidos de trânsito aumentavam, significativamente, com o progredir do tempo de exclusão intestinal ( $p=0,0001$  e  $p=0,0007$ , respectivamente).

**TABELA 2** - Variação dos valores médios mensurados para níveis de atividade de MPO, COX-2 e níveis de TM, no cólon desprovido de trânsito fecal, em relação aos diferentes tempos de exclusão.

<b>Cólon sem trânsito intestinal</b>				
<b>Média ± D.P.</b>				
	<b>6 semanas</b>	<b>12 semanas</b>	<b>18 semanas</b>	<b>p</b>
<b>MPO</b> ( $U.g^{-1}$ )	1,96 ± 0,51	1,09 ± 0,12	0,70 ± 0,12	0,00001*
<b>COX-2</b> ( $U-\beta-actina$ )	0,57 ± 0,02	1,38 ± 0,01	1,31 ± 0,02	0,00001*
<b>TM</b> ( $U.A.$ )	3,24 ± 0,44	3,74 ± 0,40	4,37 ± 0,32	0,0007*

MPO = Mieloperoxidase; COX-2 = Cicloxigenase-2; TM = *Tail moment*; D.P. = Desvio padrão; \* = significante; Teste de Kruskal-Wallis.

#### 4.5 - Correlações entre as variáveis

Não encontramos correlação entre presença de úlceras, escore inflamatório e tempo de exclusão intestinal, nos animais do grupo controle e nos segmentos providos de trânsito fecal.

A Tab. 3 mostra a correlação entre úlceras e escore inflamatório (grau de inflamação), no cólon desprovido de trânsito em relação ao tempo de exclusão. Encontramos correlação entre a presença de úlceras no epitélio cólico e o escore inflamatório e o decorrer do tempo de exclusão intestinal ( $p=0,0001$  com  $r_s$  de 0,967 e  $p=0,0001$  com  $r_s$  de 0,799, respectivamente).

**TABELA 3** - Correlações entre a presença de úlceras, congestão vascular, grau de inflamação, no cólon sem transito intestinal em relação ao tempo de exclusão.

	<b>Coeficiente</b>	<b>Tempo de</b>	<b>Úlcera</b>	<b>Escore</b>
	<b>Valor de p</b>	<b>exclusão</b>		<b>inflamatório</b>
<b>Tempo de exclusão</b>	rs		0,967	0,799
	p		0,0001*	0,0001*
<b>Úlcera</b>	rs	0,967		0,799
	p	0,0001*		0,0001*
<b>Escore inflamatório</b>	rs	0,799	0,799	
	p	0,0001*	0,0001*	

rs = Coeficiente de Spearman; \* = Significante.

As correlações entre os níveis de atividade de MPO, COX-2 e níveis teciduais de estresse oxidativo nos cólons sem trânsito fecal, em relação ao tempo de exclusão, são mostradas na Tab. 4. Verificamos que os níveis teciduais de MPO estavam inversamente relacionados ao tempo de exclusão ( $p=0,00001$  com  $r= -0,9679$ ). Os níveis teciduais de COX-2 e estresse oxidativo ao DNA encontravam-se diretamente relacionados ao tempo de exclusão intestinal ( $p=0,00001$  com  $r= 0,8207$  e  $p=0,00001$  com  $r= 0,7721$ , respectivamente. Os níveis de COX-2 e estresse oxidativo mostraram-se inversamente relacionados aos níveis teciduais de MPO ( $p=0,00001$  com  $r= -0,9143$  e  $p=0,00001$  com  $r= -0,7173$ , respectivamente).

**TABELA 4** – Correlações entre níveis de teciduais de MPO e COX-2 e RLO no cólon desprovido de trânsito intestinal com o tempo de exclusão.

	<b>Coefficiente</b>	<b>Tempo</b>	<b>MPO</b>	<b>COX-2</b>	<b>TM</b>
	<b>Valor de p</b>				
<b>Tempo</b>	r =		-0,9679	0,8207	0,7721
	p =		0,00001*	0,00001*	0,00001*
<b>MPO</b>	r =	-0,9679		-0,9143	-0,7173
	p =	0,00001*		0,00001*	0,00001*
<b>COX-2</b>	r =	0,821	-0,9143		0,6049
	p =	0,0001*	0,00001*		0,00001*
<b>TM</b>	r =	0,7721	-0,7173	0,6049	
	p =	0,00001*	0,00001*	0,00001*	

MPO= mieloperoxidase; COX-2 = cicloxigenase-2; TM = *Tail moment*; r = Coeficiente de Pearson; \* = correlação significativa

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 – Quanto ao método

Os ratos são os animais mais freqüentemente utilizados nos modelos experimentais para o estudo da colite. Pesquisas avaliando a colite quimicamente induzida por ácido acético, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TNBS e DSS, mostraram que as alterações histopatológicas encontradas nos ratos são semelhantes às descritas na RCUI (Schwartz et al, 1995; Gan e Price, 2003; Hoffmann et al, 2003; Seguí et al, 2004; Cetinkaya et al, 2005; Damiani et al, 2007; Fillmann, 2007; Fillmann et al, 2007; Ancha et al, 2008; Reis et al, 2008; Ancha et al, 2008; Ancha et al, 2009; Kretzmann et al, 2008). Revisando a literatura verificamos que, todos os trabalhos experimentais avaliando a colite pós-derivação intestinal utilizaram o *Rattus norvegicus albinus* da linhagem Wistar como animal de experimentação. Estes estudos demonstraram que as alterações histológicas encontradas, também são semelhantes às que ocorrem em seres humanos com CE (Keli et al, 1997; Biondo-Simões et al, 2000; Lopes-Paulo, 2002; Greca et al, 2003; Pinto Jr et al, 2007; Martinez et al, 2008; Nasri et al, 2008; Sousa et al, 2008). Baseados nesses aspectos também optamos pela utilização dessa espécie.

Utilizamos apenas animais *SPF* com o objetivo de evitar que parasitoses intestinais pudessem determinar o aparecimento de colite infecciosa. À semelhança de outros autores, selecionamos apenas animais machos com o objetivo de eliminar quaisquer variações significantes com relação ao reparo anatômico adotado (placa de Peyer) na padronização do local, no cólon esquerdo, onde seria realizada a secção e posterior confecção dos estomas (Sousa et al, 2008; Nonose et al, 2009; Martinez et al., 2009). Em artigo



recentemente encaminhado para publicação, confirmamos que ocorrem diferenças na distância com relação à reflexão peritoneal ao comparar animais pertencentes a diferentes sexos (Priolli et al, 2009). Acreditamos que, excluindo as fêmeas, estaríamos reduzindo os efeitos das mudanças fisiológicas que ocorrem durante o ciclo hormonal que poderiam interferir nos resultados dos ensaios bioquímicos realizados (Sousa et al, 2008).

Seguindo as diretrizes, da Lei Federal 11.794 (Lei Sérgio Arouca), elaboramos grupos experimentais com o menor número de animais possível após teste de seleção de amostra. O número de animais que adotamos foi semelhante aos utilizados em estudos anteriores que empregaram o rato como animal de experimentação (Greca et al, 2003; Sousa et al, 2008) Dedicamos especial atenção para que os mesmos fossem mortos segundo as recomendações preconizadas pelo COBEA com relação aos métodos de sacrifício para roedores (dose letal de veículo anestésico inalatório sob anestesia).

Durante todo o período do experimento os ratos foram mantidos em gaiolas individuais até a data do sacrifício, permanecendo em ambiente climatizado com temperatura variando entre 20°C e 24°C, umidade relativa do ar entre 40% e 60%, com exposição à luz durante 12 horas/dia. Esses cuidados favoreceram a diminuição do estresse dos animais que se mostravam, invariavelmente, fáceis de manusear. A manutenção em ambientes climatizados e o manuseio cuidadoso são medidas importantes uma vez que estudos já demonstraram que o estresse físico pode provocar dano oxidativo ao DNA celular, o que poderia interferir nos resultados do presente estudo (König et al, 2001; Mayr et al, 2002).

Os estudos que avaliaram as principais alterações histológicas em modelos experimentais de CE consideram o rato um bom animal para o estudo da doença. O cólon excluso desenvolve atrofia de criptas cólicas, criptites, congestão vascular da submucosa, infiltrado neutrofílico na lâmina própria, ulcerações da mucosa e hiperplasia nodular linfóide, comparáveis às descritas nos seres humanos (Keli et al, 1997; Lopes-Paulo, 2002; Pinto Jr et al, 2007; Nasrri et al, 2008; Sousa et al, 2008). No entanto, outros autores julgaram que não seja um animal de experimentação adequado para o estudo da CE, pois a frequência com que desenvolvem as alterações histológicas que caracterizam a CE é muito baixa (Biondo-Simões et al, 2000). É possível que essas opiniões divergentes estejam relacionadas aos diferentes modelos experimentais adotados para indução da CE.

No presente estudo, entendemos que o rato revelou-se um animal de experimentação adequado, pois além da fácil manipulação e resistência ao procedimento cirúrgico, desenvolveu alterações histológicas no cólon excluso de trânsito fecal que permitiram o diagnóstico de colite em todos os animais do grupo experimento.

Optamos por manter os animais em jejum de 12 horas antes do procedimento, com intuito de diminuir o conteúdo fecal no interior do cólon. O acondicionamento em gaiolas individuais com identificação (número do animal e grupo experimental) para o acompanhamento pós-operatório, assim como as anotações na ficha individualizada, tornou possível o controle das características das fezes e os aspectos relacionados à ferida cirúrgica e ao estoma. O isolamento também evitou que um animal agredisse o estoma do outro, fato que observamos durante a elaboração do estudo piloto para

padronização das etapas experimentais desenvolvidas na presente pesquisa.

Revisando a literatura recente, os autores fazem pouca menção com relação aos cuidados dispensados no preparo pré-operatório (Keli et al, 1997; Biondo-Simões et al, 2000; Lopes-Paulo, 2002; Pinto Jr et al, 2007). Um estudo isolou os animais em gaiolas individuais, uma semana antes do procedimento cirúrgico, porém não adotou o jejum pré-operatório empregado em nossa pesquisa (Keli et al, 1997). Outro autor não faz menção em relação aos cuidados pré-operatórios, mas utilizou, assim como no presente estudo, período de jejum de 12 horas (Greca et al, 2003). Acreditamos que o jejum, iniciado 12 horas antes do procedimento cirúrgico, evita a privação prolongada de substrato fecal, que poderia interferir nos resultados histológicos e bioquímicos caso adotássemos período mais prolongado. Cabe lembrar que um dia de vida em ratos Wistar corresponde, aproximadamente, a um ano de vida no homem (Araújo, 2007).

De modo semelhante ao anteriormente proposto, optamos pelo fornecimento de ração padronizada autoclavada nos dias que antecederam a intervenção cirúrgica (Keli et al, 1997). Desta forma, foi possível o controle das fezes de cada roedor, diminuindo as chances de se selecionar para o experimento animal com qualquer tipo de doença intestinal prévia. Durante o período pré-operatório, não observamos diarreia ou outro sinal que sugerisse a presença de colite em qualquer dos animais selecionados. A padronização de ração que contém 8% de fibras dietéticas na sua composição assegurou que todos os animais recebessem o mesmo conteúdo de fibras, mantendo uniforme o fornecimento de AGCC para o cólon provido de trânsito.

Optamos por utilizar como agente anestésico a xilazina 2% associada ao

cloridrato de quetamina na dose de 0,1ml/100g, administradas por via intramuscular. Em estudo semelhante, foi utilizado o éter inalatório como agente anestésico, porém, os autores descreveram complicações respiratórias que levaram à morte de um animal durante o procedimento cirúrgico (Keli et al, 1997). No grupo piloto idealizado para a padronização técnica do presente estudo, quando utilizamos a anestesia inalatória com éter, notamos maior ocorrência de depressão respiratória que culminou com a perda de três animais. Outros autores que utilizaram a anestesia inalatória com éter etílico, não encontraram complicações, mas também não expressaram os benefícios relacionados ao anestésico empregado (Biondo-Simões et al, 2000; Greca et al, 2003). Estudo que utilizou a anestesia geral intraperitoneal com tiopental na dose de 50 mg/kg de peso, não referiu complicações relacionadas à droga ou à via de administração (Lopes-Paulo, 2002). Evitamos a via intraperitoneal por acreditarmos que traumatismos viscerais acidentais assim como a presença do anestésico na cavidade peritoneal poderiam interferir nos resultados das variáveis bioquímicas analisadas. Constatamos que a via intramuscular foi bem tolerada por todos os animais, não ocorrendo depressão respiratória ou necessidade de complementação anestésica durante a operação. A recuperação anestésica ocorreu de forma progressiva e os roedores se apresentavam calmos ao recuperarem o estado de vigília.

Realizamos a abertura da cavidade através de incisão mediana infra-umbilical longitudinal de três centímetros de extensão para a identificação da porção retossigmoideana do intestino grosso. A extensão e a localização da incisão na parede abdominal permitiram, com facilidade, a localização do cólon esquerdo situado a frente do epidídimo, a identificação da placa de Peyer,

reparo anatômico adotado para a secção do cólon, bem como a confecção dos estomas. A extensão da incisão cirúrgica, também facilitou a utilização do paquímetro para a identificação do ponto exato de secção cólica.

A colostomia proximal e a fístula mucosa distal foram realizadas no hipocôndrio e na fossa ilíaca esquerda, respectivamente, para evitar que o animal alcançasse o estoma com a boca, o que poderia ocasionar complicações pós-operatórias. A confecção de dois estomas terminais separados evitou a migração de fezes da colostomia proximal para a distal, o que poderia fornecer algum grau de substrato energético (AGCC) para o cólon excluído. Ao realizar-se a colostomia em alça, a completa exclusão fecal, em algumas oportunidades, pode não ser alcançada (Keli et al, 1997). Acreditamos que essa opção foi válida à medida que não encontramos material fecal em nenhum animal quando do sacrifício e abertura do cólon excluído. A exclusão do cólon distal à Hartmann também assegura boa exclusão fecal, todavia torna difícil a sua identificação e liberação durante o sacrifício, fato anteriormente descrito e que tivemos a oportunidade de confirmar durante a fase de padronização do nosso estudo (Keli et al, 1997; Curi et al, 2002; Greca et al, 2003; Sousa et al, 2008). A técnica adotada para fixação cutânea da colostomia e da fístula mucosa distal provocou boa cooptação das bordas do estoma à pele e não observamos necrose ou deiscência da fixação da colostomia. Da mesma forma, a síntese da parede abdominal, em dois planos, também se mostrou adequada não ocorrendo casos de deiscência total da parede abdominal ou evisceração.

Acreditamos que a limpeza mecânica do cólon, em modelos experimentais propostos para CE, é etapa fundamental e imprescindível para

assegurar a completa eliminação de todo conteúdo fecal residual no segmento cólico a ser excluído. A limpeza mecânica do segmento excluído de trânsito em modelos experimentais de CE já havia sido preconizada anteriormente (Margarido et al, 2003; Nassri et al, 2008; Sousa et al, 2008). Todavia, poucos trabalhos experimentais com modelos de CE mencionaram que tal cuidado tenha sido tomado (Greca et al, 2003; Margarido et al, 2003; Nassri et al, 2008; Sousa et al, 2008; Martinez et al, 2009; Nonose et al, 2009). No presente estudo, realizamos, em todos os animais, o preparo mecânico anterógrado intra-operatório pela instilação de soro fisiológico 0,9% pela colostomia distal, até que o efluente drenado pelo ânus do animal não mais apresentasse saída de material fecal. Com isso, podíamos assegurar a inexistência de resíduos fecais no cólon distal, fato confirmado durante o sacrifício. Um estudo adotou a limpeza mecânica do cólon excluído estimulando o reflexo evacuatório nos animais, entretanto não descreve o método (Greca, et al, 2003). Outros não descreveram qualquer método de limpeza mecânica do cólon antes da exclusão intestinal (Keli et al, 1997; Biondo-Simões et al, 2000; Lopes-Paulo, 2002). É importante ressaltar que a presença de conteúdo fecal residual no segmento intestinal excluído pode alterar os resultados encontrados, pois as fezes remanescentes, ricas em AGCC, ainda continuariam servindo de substrato energético para a porção do cólon excluído de trânsito intestinal interferindo no desenvolvimento da CE (Greca et al, 2003). Sendo assim, os estudos que não efetuaram a limpeza mecânica prévia no segmento excluído de trânsito, e que não descreveram alterações histopatológicas compatíveis com desenvolvimento da CE, podem ter encontrado resultados pouco fidedignos. Essa possibilidade é mais comum do que se imagina, uma vez que em todos

os animais do subgrupo experimento independente do tempo de exclusão considerado, verificamos a saída de fezes formadas pelo ânus durante a realização da lavagem anterógrada com solução fisiológica. Ao elaborarmos um grupo controle, onde não realizamos o preparo mecânico, possibilitamos a comparação com resultados encontrados no cólon provido de trânsito nos animais do subgrupo experimento. Tomamos esse cuidado com o intuito de verificar se o preparo poderia influenciar nas alterações histológicas e bioquímicas por um efeito sistêmico. Os resultados semelhantes encontrados comparando-se os dois subgrupos permitem assegurar que o preparo intra-operatório não modificou os resultados dos testes bioquímicos e de estresse oxidativo. Quanto ao cólon excluído de trânsito, como o preparo mecânico foi realizado com antecedência mínima de seis semanas antes da coleta dos espécimes, acreditamos que não influenciou nas análises histológicas e bioquímicas.

Para determinar o ponto aonde seria realizada a secção cólica para confecção dos estomas, adotamos a placa de Peyer como reparo anatômico. Outros autores adotaram a reflexão peritoneal ou realizaram a colostomia em local determinado pela introdução de cateter graduado em centímetros por via anal marcando a distância para confeccionar a colostomia (Kissmeyer-Nielsen et al 1994; Lopes-Paulo, 2002; Greca et al, 2003). A introdução de cateter via anal, em algumas oportunidades, provoca traumatismos à mucosa anorretocólica levando ao aparecimento de soluções de continuidade na mucosa. Como pretendíamos adotar a presença de úlceras epiteliais, como uma das variáveis selecionadas para elaboração do escore de graduação inflamatória, evitamos esse método de mensuração. Além do mais, as úlceras

traumáticas da mucosa cólica poderiam determinar quebra da barreira epitelial possibilitando a translocação bacteriana para a submucosa estéril, e o conseqüente desenvolvimento de infiltrado inflamatório, o que também poderia interferir na graduação inflamatória, bem como na avaliação das variáveis bioquímicas estudadas.

A placa de Peyer é estrutura singular localizada na altura da transição retossigmoideana e foi descrita como estrutura linfóide, invariavelmente, localizada na região terminal do cólon dos ratos (Junqueira et al, 1947). Encontra-se anteriormente ao epidídimo, em machos, ou ao útero, em fêmeas. A placa de Peyer aparece como área de conformação ovalada, esbranquiçada, ligeiramente espessada, na parede anterior do cólon, contralateral à linha de inserção do mesentério e mais cranial à reflexão peritoneal. Quando adotada como reparo anatômico permite que a medida do local exato, escolhido para a secção do cólon, seja mais facilmente encontrada quando comparado reflexão peritoneal (Priolli et al, 2009). Acreditamos que a adoção da placa de Peyer, como reparo anatômico em detrimento à reflexão peritoneal, facilitou a identificação do ponto de secção do cólon. Sua localização foi prontamente realizada em todos os animais e o auxílio do paquímetro foi útil para uniformizar o ponto exato padronizado para realização do estoma. Entretanto, é importante salientar que a placa de Peyer é estrutura rica em células inflamatórias capazes de produzir RLO. Para o estudo dos níveis de MPO, COX-2 e estresse oxidativo, sempre tivemos o cuidado de coletar os fragmentos fora da região cólica que continha a placa. Com isso acreditamos que os níveis de MPO, COX-2 e estresse oxidativo foram mensurados sempre na mucosa cólica, e não sobre uma estrutura rica em células capazes de



alterar os resultados bioquímicos encontrados. Estudos que adotaram a reflexão peritoneal como reparo anatômico e avaliaram aspectos relacionados à resistência de anastomoses retocólicas, ou a quantificação de colágeno na linha de sutura podem ter realizado as avaliações sobre a placa de Peyer, estrutura composta por tecido diferente do restante da parede cólica (Greca et al, 2003; Biondo-Simões et al, 2004; Priolli et al, 2009)

A maioria dos estudos publicados, avaliando a CE, foi feita a partir de espécimes retirados de doentes, submetidos a exclusão fecal por enfermidades variadas e com diferentes tempos de exclusão intestinal (Glotzer et al, 1981; Ferguson e Siegel, 1991; Frisbie et al, 2000). Assim sendo, não é possível comparar de modo uniforme os diferentes aspectos histológicos, bem como medir o tempo necessário para o desenvolvimento da doença. De modo semelhante, revisando os estudos experimentais com modelos de CE, verificamos diferenças com relação ao tempo adotado para promover a exclusão intestinal (Keli et al 1997; Biondo-Simões et al, 2000; Lopes-Paulo, 2002; Greca et al, 2003; Pinto Jr et al 2007; Sousa et al, 2008). Essa falta de uniformidade dificulta a comparação com os resultados encontrados nos diferentes estudos. Alguns constituíram grupos experimentais excluindo o trânsito fecal por uma, duas, quatro e doze semanas e adotando como grupo controle animais sacrificados logo no início do experimento. (Kissmeyer-Nielsen et al, 1994). Outros elaboraram dois grupos experimentais, sacrificados imediatamente após a operação e depois de 17 semanas adotando como grupo controle fragmentos cólicos obtidos do segmento provido de trânsito removido no início do experimento (Keli et al, 1997). Outro autor utilizou dois grupos experimentais, sacrificando alguns animais no início do experimento e

retirando uma porção do cólon para análise comparativa com o segundo grupo, sacrificado após quatro semanas (Lopes-Paulo, 2002). Outro estudo avaliou animais submetidos à exclusão, sacrificando-os após uma, duas, quatro e oito semanas, porém, diferente dos demais, adotando espécimes obtidos do cólon provido de trânsito dos mesmos animais como controle (Biondo-Simões et al, 2000).

Percebe-se, portanto, que não existe consenso com relação ao tempo de exclusão nos modelos propostos, bem como a forma de se constituir o grupo controle. Apesar de termos adotado um subgrupo controle e um subgrupo experimento, acreditamos que as diferentes intervenções realizadas nos dois subgrupos poderiam determinar alterações histológicas, bioquímicas e níveis de estresse oxidativo tecidual distintas, tornando os resultados difíceis de serem comparados. Foi por esta razão que propusemos, também, a comparação entre espécimes retirados do cólon com trânsito preservado do mesmo animal do subgrupo experimento. Desta forma, avaliamos dois segmentos cólicos obtidos de animais submetidos à mesma operação, sem a interferência da técnica cirúrgica adotada.

Em nosso estudo, à semelhança de outros autores, optamos por excluir o trânsito fecal por seis, 12 e 18 semanas (Sousa et al, 2008; Nonose et al, 2009). Com essa padronização, encontramos alterações histológicas nos segmentos desprovidos de trânsito de todos os animais, independentemente do tempo de exclusão, permitindo concluir que com tempo de exclusão adotado ocorreram alterações histológicas que permitiram o diagnóstico de CE. Em recente estudo utilizando o mesmo modelo experimental e avaliando a espessura das diferentes aspectos da parede cólica, encontramos atrofia das

criptas da mucosa cólica, aumento da espessura das camadas muscular da mucosa e submucosa, maior congestão vascular submucosa e maior grau de infiltrado inflamatório nos segmentos desprovidos de trânsito fecal, alterações histológicas comumente descritas na CE (Sousa et al, 2008).

A padronização do local de coleta dos espécimes para o estudo histológico e bioquímico é determinante para comparação entre diferentes grupos experimentais e animais. Quando não se define o local, retirando-se material de diferentes regiões do cólon, pelas variações existentes, não é possível assegurar uma comparação adequada. Para minimizar esse viés de coleta, padronizamos não só o local da colostomia, bem como o local no cólon de onde seria retirado o fragmento destinado para as avaliações histológicas e bioquímicas. Dessa forma, encaminhamos para as avaliações histológicas e bioquímicas fragmentos obtidos sempre de uma mesma região, independente do animal pertencer a um dos grupos ou subgrupos elaborados. Somente um único estudo experimental descreveu este mesmo cuidado (Kissmeyer-Nielsen et al, 1994).

Para a realização do estudo histopatológico, todos os espécimes previamente fixados, foram submetidos a cortes de  $5\mu$ , sempre no sentido longitudinal em relação às camadas da parede cólica. Esse cuidado permitiu a confecção das lâminas sempre com a mesma disposição do espécime, facilitando a interpretação das variáveis histológicas estudadas. Cortes transversais ou mais espessos dificultam a avaliação da presença de ulcerações no epitélio cólico e da intensidade do infiltrado inflamatório na mucosa e submucosa.

Utilizamos a técnica de coloração pela HE por acreditarmos ser o

método de coloração mais utilizado em laboratórios de anatomia patológica para o diagnóstico de colite. Durante a análise das lâminas, em nenhum momento o patologista foi informado quanto ao local de onde o fragmento tinha sido removido, bem como de que grupo ou subgrupo experimental o fragmento provinha. Com isso, acreditamos ter tornado a interpretação dos resultados histopatológicos mais fidedigna.

O infiltrado neutrofílico é uma característica comumente encontrada nos portadores de colite (Yamada e Grisham, 1981; Nosál'ova et al, 2000). Constitui-se no tipo mais proeminente de infiltrado inflamatório e, vem sendo sugerido, que contribui significativamente para a lesão tecidual (Nosál'ova et al, 2000). Os neutrófilos são células inflamatórias capazes de produzir altos níveis de RLO e, portanto, capazes de determinar estresse oxidativo aos tecidos. A produção desses radicais geralmente aumenta com a gravidade e o tempo da inflamação (Fillmann, 2007). Os neutrófilos ativados produzem o radical superóxido através da reação com a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo oxidase (NADPH) a qual reduz o O<sub>2</sub> molecular em superóxido, RLO capaz de determinar considerável nível de dano oxidativo tecidual. A produção do radical superóxido é essencial para degradação bacteriana (Fillmann, 2007).

O infiltrado neutrofílico é encontrado nos modelos de colite quimicamente induzida assim como nos modelos experimentais de CE (Keli et al, 1997; Greca et al, 2003; Biondo-Simões et al, 2004; Seguí et al, 2004; Fillmann, 2007; Naito et al, 2007; Reis et al, 2008; Sousa et al, 2008). A avaliação do infiltrado neutrofílico tecidual pode ser feita por técnicas histológicas e bioquímicas. A pesquisa da MPO é um dos métodos mais freqüentemente utilizado para avaliar a intensidade do infiltrado inflamatório

mediado por neutrófilos. A MPO é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos estimando-se que mais de 95% do seu total está presente nessas células. Os restantes 5% são encontrados nos monócitos circulantes (Naito et al, 2007). Como o maior contingente de MPO é oriundo dos neutrófilos, a dosagem dos níveis da enzima nos tecidos é utilizada como fiel marcador da presença de infiltração tecidual por essas células (Fillmann, 2007; Naito et al, 2007). A maioria dos estudos experimentais adotou a quantificação dos níveis teciduais de MPO para avaliar o grau de infiltração neutrofílica em modelos de colite induzida por TNBS (Yamada e Grisham, 1991; Seguí et al, 2004; Reis et al, 2008), DSS (Jiang et al, 2006; Aoi et al, 2008) e ácido acético (Butzner et al, 1996; Cetinkaya et al, 2005; Damiani et al, 2007; Almalouf et al, 2008). Esses estudos mostraram que existem altos níveis de atividade de MPO nos tecidos cólicos inflamados, fazendo com que sua determinação possa ser considerada como índice fidedigno da presença de colite (Nosá'lova et al, 2000; Aoi et al, 2008; Reis et al, 2008). A dosagem da atividade da MPO também vem sendo utilizada para avaliar o potencial de resposta terapêutica de várias substâncias em modelos de colite (Schwartz et al, 1995; Reis et al, 2008). Estudo recente demonstrou que ratos com colite induzida, quando tratados com enemas de AGCC, apresentaram melhora no escore histológico de inflamação e redução nos níveis teciduais de MPO, concluindo que os AGCC podem ser utilizados, com sucesso no tratamento da colite (Cetinkaya et al, 2005).

Existem vários métodos para a quantificação da atividade da MPO (Bradley et al, 1982; Reis et al., 2009). O método que utilizamos vem sendo adotado nos estudos mais recentes que avaliaram sua expressão tecidual em

modelos experimentais de colite (Reis et al, 2008; Arafa et al, 2009). Em nosso estudo optamos por avaliar a intensidade do infiltrado neutrofílico associando a avaliação histológica aos níveis teciduais de MPO com o intuito de conferir maior fidedignidade aos resultados quanto à presença de infiltrado neutrofílico em todos os períodos propostos de exclusão do trânsito fecal. Apesar da quantificação da atividade de MPO ser considerado parâmetro útil para a avaliação da atividade inflamatória mediada por neutrófilos, do melhor do nosso conhecimento, nenhum estudo tinha avaliado os níveis teciduais de MPO em modelos experimentais de CE. Acreditamos que a avaliação do grau de infiltração neutrofílica associando análise histológica e determinação dos níveis teciduais de MPO, em modelos experimentais de CE, seja uma contribuição inédita.

Já se demonstrou que nas afecções inflamatórias do cólon existe aumento da síntese e liberação tecidual de diferentes mediadores pró-inflamatórios, incluindo interleucinas, eicosanóides, prostanóides, e fator nuclear de transcrição *kappa-beta* ( $NF-\kappa\beta$ ) (Fillmann, 2007; Fillmann et al, 2007). Esses mediadores contribuem para a cascata patogênica que inicia e perpetua a resposta inflamatória da mucosa cólica (Camuesco et al, 2004; Sanchez-Muñoz et al, 2008). A cicloxigenase (COX) é a enzima mais importante na formação dos mediadores biológicos conhecidos como prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano). A COX converte o ácido araquidônico em prostaglandina  $H_2$ , substância precursora dos demais prostanóides (Fillmann, 2007; Fillmann et al, 2007). A COX é composta por três isoformas, representadas pela cicloxigenase-1 (COX-1), COX-2 e a cicloxigenase-3 (COX-3). Os tecidos expressam níveis variáveis de COX-1 e

COX-2. A COX-1 é considerada como uma enzima constitutiva, encontrada na maior parte das células. A COX-2, por sua vez, é indetectável na maior parte dos tecidos em condições fisiológicas. É considerada uma enzima induzível e encontrada em grande quantidade em macrófagos ativados e nos tecidos inflamados (Meyer et al, 1981; Fillmann, 2007; Fillmann et al, 2007).

A localização e a expressão tecidual da COX-1 e da COX-2, no intestino grosso normal e inflamado, já são conhecidas (Fillmann, 2007). A COX-1 é expressa da mesma maneira e em quantidades equivalentes tanto no cólon normal quanto no inflamado. Localiza-se, preferencialmente, na base das criptas cólicas. A COX-2, por sua vez, não se expressa no cólon normal, sendo apenas induzida na região apical das células inflamadas do cólon (Fillmann, 2007; Fillmann et al, 2007). Pesquisas anteriores demonstraram haver importante aumento da expressão de COX-2 na colite experimental quimicamente induzida (Martin e Villegas 2005; Fillmann, 2007; Fillmann et al, 2007). Demonstrou-se importante aumento da expressão da COX-2 nas colites induzidas por DSS e TNBS, tanto na fase aguda quanto crônica, relacionando-se diretamente com a intensidade de inflamação (Martin e Villegas, 2005; Reis et al, 2008). Estudos avaliando a atividade da COX-2 na colite experimental, comparando-a com diferentes parâmetros inflamatórios tais como a infiltração leucocitária, mostraram importante aumento da sua atividade, que se encontrava relacionada, diretamente, com o aumento dos demais marcadores inflamatórios. (Martin e Villegas, 2005). Dessa forma, a medida da expressão da COX-2 serve como parâmetro para a avaliação da gravidade do processo inflamatório e a sua mensuração vem sendo realizada para demonstrar o grau de inflamação do tecido. À semelhança do que ocorre com relação à dosagem

dos níveis teciduais de MPO, a atividade tecidual da COX-2 vem sendo empregada para avaliar o efeito de diferentes substâncias utilizadas no tratamento da colite (Martin e Villegas, 2005; Fillmann, 2007; Reis et al, 2008). Do mesmo modo ao que descrevemos em relação à dosagem tecidual da MPO, do melhor do nosso conhecimento, até a presente data, a quantificação tecidual da COX-2 ainda não foi avaliada em modelos experimentais de CE.

Um dos principais mecanismos de destruição tecidual nas colites é decorrente da excessiva síntese e liberação dos RLO pelos neutrófilos e, provavelmente, pelas próprias células epiteliais da mucosa cólica com alterações de seu metabolismo energético (Roediger e Nance, 1986; McCord, 2000; Liu et al, 2001; Nieto et al, 2002; Damiani et al, 2007; Fillmann, 2007; Fillmann et al, 2007). Embora a formação desses radicais seja essencial para a defesa do hospedeiro no combate a infecção bacteriana, sua produção excessiva, durante o processo inflamatório, pode causar extensa destruição tecidual por estresse oxidativo (Liu et al, 2001; Pravda, 2005; Møller, 2006; Damiani et al, 2007; Roessner et al, 2008).

Até a última década, a quantificação dos níveis de estresse oxidativo envolvia técnicas bioquímicas sofisticadas que necessitavam considerável quantidade de tecido para a sua quantificação. (Møller, 2005; Møller, 2006; Ribeiro et al, 2008). Em virtude dos limites relacionados com a obtenção de material suficiente para análise, essas técnicas não podiam ser aplicadas em pequenas quantidades de tecido, como aqueles obtidos durante os procedimentos endoscópicos (Ribeiro et al, 2008). Por essa razão, encontram-se poucos estudos avaliando o estresse oxidativo, em portadores de colite, comparando os tecidos normais e inflamados em diferentes fases evolutivas da



doença (Pool-Zobel et al, 1999; Blau et al, 2000; Gleib et al, 2009). Com o advento da técnica da eletroforese em gel de célula única (ensaio do cometa), tornou-se possível quantificar a agressão pelos RLO ao DNA de uma única célula, o que reflete de maneira mais precisa os níveis de estresse oxidativo em todo o tecido (Møller, 2006; Gleib et al, 2009). O ensaio do cometa possibilita a medida dos níveis de estresse oxidativo em pequenos fragmentos de tecido. Além disso, permite a comparação entre células obtidas da mucosa normal com as obtidas do epitélio inflamado. Da mesma forma permite a comparação dos níveis de dano nas células obtidas de tecidos com diferentes graus de displasia ou, até mesmo, nas células neoplásicas. (Pool-Zobel et al, 1999; Blau et al, 2000; Møller, 2005; Møller, 2006; Ribeiro et al, 2008 ; Gleib et al, 2009).

Essas propriedades tornaram o método atraente para quantificação do nível de estresse oxidativo comparando tecidos normais e inflamados (Pool-Zobel et al, 1999). A quantificação dos níveis de estresse oxidativo em pequenos fragmentos teciduais também possibilita a avaliação da eficácia de agentes antioxidantes, AGCC e inibidores de COX-2, na prevenção da agressão inflamatória mediada pelos RLO nas diversas fases da colite e na progressão do epitélio inflamado para carcinoma (Ribeiro et al, 2008; Arafa et al, 2009).

O método do ensaio do cometa não é a única técnica utilizada para avaliar os níveis teciduais de estresse oxidativo, mas é um dos métodos mais sensíveis, apresentando maior acurácia quando comparado a outras técnicas (Gleib et al, 2009). Sua alta sensibilidade aliada ao seu baixo custo faz com que venha sendo cada vez mais empregado (Abrahamse et al, 1999; Pool-Zobel et al, 1999; Møller, 2005; Møller, 2006; Ribeiro et al, 2008; Reis et al, 2008; Gleib et

al, 2009). Apesar da quantificação dos níveis de estresse oxidativo tecidual já ter sido utilizada em modelos experimentais de colite quimicamente induzida por TNBS, demonstrando níveis progressivamente maiores e relacionados ao grau de inflamação tecidual, do melhor do nosso conhecimento, ainda não tinha sido empregada em modelos experimentais de CE (Reis et al, 2008).

## **5.2 – Quanto aos resultados**

Avaliações microscópicas realizadas em tecidos obtidos de enfermos com CE mostraram uma variedade de aspectos, porém sem nenhuma alteração característica (Keli et al 1997; Biondo-Simões et al, 2000; Lopes-Paulo, 2002; Pinto Jr et al 2007; Sousa et al, 2008). A maioria dos autores encontrou ulcerações no epitélio e infiltrado inflamatório na mucosa do cólon excluso, acompanhado ou não de atrofia das criptas de Lieberkühn, abscesso glandular ou hiperplasia linfóide nodular, considerada a alteração histológica mais específica (Lusk et al, 1984; Komorowski, 1990; Ma et al, 1990; Kissmayer-Nielsen et al,1994; Sousa et al, 2008).

A presença de erosões e ulcerações da mucosa cólica é um dos achados endoscópicos e histológicos mais freqüentes. (Geraghty e Charles, 1994). Estudo anterior encontrou úlceras na mucosa intestinal em 100% dos doentes estudados, relacionando-as ao tempo de exclusão (Glotzer et al,1981). Outros autores encontraram erosões na superfície epitelial dos segmentos excluídos somente após 17 semanas de exclusão sem, contudo, haver relação significativa com o tempo de exclusão (Keli et al1997). Outra pesquisa experimental relatou o aparecimento de úlceras superficiais em apenas 31,43% dos segmentos cólicos sem trânsito, referindo comprometimento apenas da camada mucosa e não relacionada ao tempo de exclusão (Biondo-Simões et

al, 2000). Cabe destacar que nesses dois últimos estudos, os autores não descrevem qualquer cuidado que pudesse garantir a ausência de resíduos fecais no cólon derivado, pois não realizaram limpeza mecânica. Talvez, a presença de fezes nesses segmentos possa ter mantido algum grau de suprimento de AGCC à mucosa cólica, interferindo no aparecimento das ulcerações epiteliais.

Apesar da presença de úlceras epiteliais ser considerado achado comum na CE, nenhum estudo explicou os mecanismos pelos quais elas se desenvolvem. Estudos demonstraram que pode ocorrer a formação de ulcerações epiteliais e destruição da membrana basal antes mesmo que exista infiltração neutrofílica na mucosa cólica, sugerindo que a lesão epitelial possa ser provocada por alterações metabólicas das próprias células do epitélio cólico (Riedle e Kerjaschki, 1997; Pravda, 2005). A formação de úlceras na mucosa dos segmentos desprovidos de trânsito ocasiona ruptura na barreira epitelial funcional, apesar de alguns autores demonstrarem que essa alteração não aumenta, necessariamente, a translocação bacteriana em modelos de CE (Pinto Jr et al, 2007). É possível que a menor translocação na CE decorra da exclusão fecal que diminui, consideravelmente, a população bacteriana no segmento sem trânsito intestinal (Pinto Jr et al, 2007).

No presente estudo, verificamos que nos animais do subgrupo controle e nos segmentos providos de trânsito fecal dos animais do subgrupo experimento, não houve formação de ulcerações no epitélio mucoso independente do tempo considerado, embora fosse possível encontrar algum grau de infiltrado neutrofílico (Fig.12 e Fig.13). Da mesma forma, não encontramos formação de úlceras nos segmentos desprovidos de trânsito por

seis semanas, apesar de já encontrarmos níveis teciduais elevados de MPO (Fig.12 e Fig.14). De modo diferente, encontramos úlceras na mucosa cólica dos segmentos desprovidos de trânsito a partir de 12 semanas de exclusão, período em que também constatamos maior de infiltração neutrofílica avaliada tanto pelo escore inflamatório, quanto pelos níveis de MPO (fig. 12 e Fig. 14). É possível que a formação das úlceras epiteliais, após 12 semanas de exclusão fecal, ainda pudesse estar relacionada à maior formação de RLO pelos neutrófilos, uma vez que os níveis de MPO nesse segmento ainda encontravam-se elevados (Fig.14). Contudo, nos animais submetidos à exclusão por 18 semanas, apesar de ocorrer normalização dos níveis de MPO e praticamente não encontrarmos mais neutrófilos na avaliação histológica, o número de úlceras aumentou, elevando o escore inflamatório e sugerindo outra origem etiopatogênica (Fig.12, Fig. 13 e Fig.14). Em dois animais, submetidos a 18 semanas de exclusão, identificamos, nos segmentos sem trânsito, úlceras profundas que atingiam a camada muscular da mucosa. Ambos os animais apresentavam níveis de MPO, nos segmentos desprovidos de trânsito, semelhantes aos dos segmentos com trânsito preservado, sugerindo que a formação dessas úlceras não estava relacionada à infiltração neutrofílica, e sim a outro tipo de agressão inflamatória confirmada pelos valores elevados de COX-2 (Fig.16). Nesses animais, os níveis de estresse oxidativo no segmento excluído foram significativamente mais elevados quando comparados aos dos animais do subgrupo controle e aos segmentos providos de trânsito sugerindo que o estresse oxidativo talvez pudesse estar relacionado à lesão epitelial e conseqüente formação dessas úlceras (Fig.17).

A infiltração de células inflamatórias na lâmina própria é outro achado

freqüente no homem e nos modelos experimentais de CE (Glotzer et al, 1981; Keli et al, 1997; Sousa et al, 2008). A quantificação do infiltrado inflamatório da lâmina própria é passível de ceticismo, pelo fato de já existir na mucosa cólica normal algum grau de infiltrado inflamatório celular (Keli et al, 1997). Com o objetivo de diminuir a subjetividade dessa interpretação, alguns autores propuseram a análise quantitativa e qualitativa de todas as células presentes no infiltrado inflamatório (Jenkins et al, 1988). Entretanto, esse método é trabalhoso, de difícil quantificação e sofre a subjetividade da interpretação por diferentes patologistas.

No presente estudo, para melhor caracterizar histologicamente a presença de CE, optamos por utilizar a escala de graduação inflamatória, previamente validada, que considera duas das alterações histológicas mais freqüentemente descritas nas colites: a presença de úlceras epiteliais e o número de neutrófilos presentes numa determinada cripta ou em diferentes campos estudados (Gupta et al, 2007). Acreditamos que o emprego da escala validada, que considera conjuntamente as alterações histológicas mais prevalentes, proporciona maior acuidade no diagnóstico histopatológico da doença.

Constatamos que nos segmentos providos de trânsito e nos animais do subgrupo controle, independente do tempo de exclusão, havia presença de algum grau de infiltrado neutrofílico sem, contudo, identificarmos ulcerações epiteliais (Fig. 12 e Fig.13). De modo diferente, nos segmentos sem trânsito fecal, constatamos que após 12 e 18 semanas de exclusão, além do infiltrado inflamatório mais evidente, encontramos a formação de úlceras, que aumentou o escore de graduação adotado (Fig.13). Verificamos ainda, que o maior

escore inflamatório nos segmentos desprovidos de trânsito fecal apresentou correlação com o tempo de exclusão, sugerindo que com o passar das semanas aumentava o grau de inflamação na parede cólica (Tab.1). Constatamos que o maior escore nos segmentos excluídos de trânsito após 12 e 18 semanas encontrava-se mais relacionado à presença de úlceras epiteliais do que a infiltração neutrofílica (Fig.12, Fig.13 e Fig. 14). A maior graduação inflamatória mostrou-se diretamente relacionada aos níveis de COX-2 e de estresse oxidativo e, inversamente aos níveis de MPO, confirmando os achados histológicos (Tab.3 e Tab.4). Cabe destacar que os níveis de MPO foram significativamente mais elevados nos segmentos desprovidos de trânsito, após seis e 12 semanas de exclusão, normalizando-se após 18 semanas (Fig. 14). Esses achados sugerem que o processo inflamatório até 12 semanas de exclusão se deve, principalmente, a presença de neutrófilos e que, após esse período, talvez esteja relacionado à outra forma de agressão (Fig.14). Os níveis teciduais de COX-2 elevados nos segmentos excluídos de trânsito após 18 semanas e a diminuição dos níveis de MPO, sugerem que o maior grau de inflamação possa estar relacionado aos maiores níveis de estresse oxidativo encontrados (Fig.15, Fig.16 e Fig.17).

O infiltrado neutrofílico, avaliado pelos níveis de atividade tecidual da MPO, é uma característica comumente encontrada em modelos experimentais de colite quimicamente induzida, assim como nas DII (Wallace, 1988; Naito et al, 2007). Constitui-se no tipo mais proeminente de infiltrado celular e vem sendo sugerido que contribua, significativamente, para o dano tecidual (Naito et al, 2007). Essas suposições foram confirmadas quando se verificou, em modelos experimentais de colite quimicamente induzida por TNBS, que existem

altos níveis teciduais de MPO, fazendo com que sua determinação possa ser considerada como índice fidedigno para a quantificação do infiltrado neutrofílico e, indiretamente, da presença de colite aguda (Reis et al, 2008).

No presente estudo, verificamos após seis e 12 semanas de exclusão fecal, que os segmentos desprovidos de trânsito fecal apresentaram níveis de atividade da MPO significativamente mais elevados quando comparados aos dos segmentos cólicos com trânsito preservado, sugerindo a presença de processo inflamatório agudo determinado pela infiltração neutrofílica (Fig.13 e Fig.14). Contudo, após 18 semanas, o índice de atividade da MPO, no segmento excluído de trânsito, retornou a valores semelhantes aos dos segmentos providos de trânsito fecal e aos dos animais do subgrupo controle (Fig.14). Esses achados sugerem que no modelo experimental de CE que propusemos no presente estudo ocorreu inflamação aguda nas primeiras semanas de exclusão, e que, a partir daí, houve redução progressiva no infiltrado neutrofílico, sugerindo a presença de inflamação crônica (Fig.14). Apesar da redução na infiltração de neutrófilos nos segmentos excluídos de trânsito, não encontramos linfócitos ou monócitos em maior quantidade no tecido, embora os níveis teciduais de COX-2 permanecessem elevados, sugerindo que a manutenção da agressão crônica esteja relacionada a outro mecanismo. (Fig.15 e Fig.16). Cabe destacar que os níveis de estresse oxidativo mantinham-se elevados nesses segmentos após 18 semanas de derivação fecal, sugerindo que os RLO estejam relacionados à manutenção da agressão inflamatória crônica (Fig.17). É possível que as células desprovidas de seu principal substrato energético possam sofrer alterações no seu metabolismo energético e produzir maior quantidade de RLO, como suspeitado

pela teoria de indução da colite por radicais livres (Pravda, 2005).

Hipóteses podem ser levantadas para explicar a presença do infiltrado neutrofilico nas primeiras semanas de exclusão. A mucosa intestinal funciona como importante mecanismo de barreira, não permitindo a translocação das bactérias e endotoxinas para a intimidade da parede cólica (Pravda, 2005). Já se demonstrou que os RLO podem destruir as diferentes linhas de defesa do epitélio cólico permitindo a migração de bactérias para o interior da parede cólica. (Pravda, 2005) Os resultados encontrados no presente estudo, mostrando níveis elevados de estresse oxidativo nos segmentos excluídos de trânsito nas primeiras semanas de derivação, parecem confirmar essa possibilidade (Fig.17). A quebra da barreira funcional pelos RLO pode facilitar a translocação bacteriana determinando resposta inflamatória inicialmente aguda, mediada por neutrófilos, para combater as bactérias e, posteriormente, pela redução progressiva do conteúdo bacteriano, resposta inflamatória humoral decorrente da infiltração tecidual de substâncias com poder antigênico. A maior proliferação de linfócitos do tipo B nas fases mais tardias da inflamação na CE, em detrimento aos linfócitos T parece reforçar essa possibilidade (Sedman et al, 1994; Grant et al, 1997; Chetty et al, 2009).

A lesão tecidual produzida pelos neutrófilos tem sido atribuída à capacidade dessas células em formar e liberar uma variedade de RLO e nitrogênio (Liu et al, 2001). Pesquisas recentes vêm demonstrando que os RLO estão envolvidos nos mecanismos de proliferação celular, sinalização e expressão gênica (Tannickal e Fanburg, 2000; Ancha et al, 2009). Os RLO podem ativar diferentes vias de sinalização como a do NF- $\kappa$ B, que modula uma série de etapas da reação inflamatória, pela produção de citocinas,



interleucinas e algumas proteínas, tais como a COX-2, importantes na determinação da inflamação ao epitélio cólico (Hollenbach et al, 2005; Fillmann, 2007).

No presente estudo, encontramos aumento nos níveis teciduais de COX-2 nos segmentos desprovidos de trânsito fecal (Fig. 15 e Fig.16). A expressão dessa proteína nas fases iniciais e tardias do desenvolvimento da CE confirmou a presença do processo inflamatório, semelhante ao que é encontrado na colite quimicamente induzida (Fillmann, 2007; Reis et al, 2008). É provável que nas primeiras semanas, os níveis elevados de COX-2 estejam relacionados à infiltração neutrofílica (Fig.14 e Fig.16). Todavia, é possível que a manutenção dos níveis elevados de COX-2, nos segmentos desprovidos de trânsito por 18 semanas, possa estar relacionada à maior presença de estresse oxidativo (Fig.16 e Fig.17). Corroborando com essa possibilidade, já se demonstrou acentuado aumento na expressão de COX-2 após a resolução da colite induzida por TNBS (Zamuner et al, 2005) e redução nos seus níveis após o uso de substâncias antioxidantes (Damiani et al, 2007; Fillmann, 2007; Fillmann et al, 2007; Reis et al, 2008). No presente estudo, também encontramos expressão elevada de COX-2 no cólon sem trânsito após 18 semanas de exclusão quando o infiltrado neutrofílico, avaliado histologicamente e pelos níveis de atividade tecidual de MPO, já não era tão intenso. Cabe lembrar que os níveis teciduais de estresse oxidativo nesse período encontravam-se elevados sugerindo que a manutenção da agressão tecidual possa estar sendo ocasionada pela própria célula com alterações no suprimento de AGCC. Esta possibilidade fica evidente quando encontramos aumento na expressão de COX-2 e maior estresse oxidativo com o decorrer do

tempo de exclusão enquanto o infiltrado neutrofílico reduzia-se significativamente (Tab.2). Reforça ainda mais essa possibilidade o fato de termos encontrados correlação direta entre o tempo de exclusão e níveis teciduais de COX-2 e estresse oxidativo e inversa com os níveis de MPO (Tab.4).

Nos últimos anos, uma importância cada vez maior vem sendo dada ao papel desempenhado pelos RLO na iniciação e na progressão da agressão inflamatória à mucosa cólica nas DII (Kruidenier e Verspaget, 2002; Dryden et al, 2005; Pravda, 2005; Fillmann, 2007; Rezaie et al, 2007). Da mesma forma, estudos experimentais também confirmaram a importância do estresse oxidativo no desenvolvimento da colite quimicamente induzida por ácido acético, TNBS e DSS (Grisham et al, 1991; Chamulitrat e Spitzer, 1997; Damiani et al, 2007; Fillmann, 2007; Fillmann et al, 2007; Reis et al, 2008). Não obstante os níveis de dano oxidativo tecidual terem sido avaliados com diferentes métodos, todos eles demonstraram relação direta entre a maior produção de RLO e o dano epitelial à mucosa cólica.

O método do ensaio do cometa não é a única técnica para mensurar os níveis de estresse oxidativo, mas é um dos mais sensíveis, apresentando maior acurácia quando comparado a outros ensaios (Abrahamse et al, 1999; Møller, 2005; Ribeiro et al 2008). O método nunca havia sido empregado na quantificação do estresse oxidativo em modelos experimentais de CE, tornando a comparação com outros estudos difícil de ser estabelecida.

Verificamos que animais submetidos à exclusão de trânsito fecal, durante seis semanas, apresentaram níveis de estresse oxidativo significativamente mais elevados no cólon excluído quando comparados aos dos segmentos providos de

trânsito e aos animais do grupo controle (*TM* de 3,24, 2,18 e 1,60, respectivamente;  $p=0,00001$ ; I.C.95%:-1,9888 a -0.9687). Quando comparamos segmentos providos de trânsito do subgrupo experimento com segmentos de mucosa cólica dos animais do subgrupo controle, os níveis de estresse ao DNA foram maiores, porém sem significância estatística (Fig.17). Os níveis de dano mais elevados no cólon sem trânsito mostraram que nas primeiras semanas de exclusão intestinal já existe estresse suficiente para determinar ulcerações ao epitélio cólico e maior infiltração neutrofílica (Fig.12 e Fig.14). Contudo, não é possível afirmar que esses maiores níveis se devem apenas às modificações energéticas nas células do epitélio cólico desprovidas dos AGCC, pois a maior presença de neutrófilos, avaliado pela análise histológica e pela atividade tecidual de MPO, também poderia ser responsabilizada pela produção aumentada de RLO (Fig.13 e Fig.14).

Nos animais submetidos a 12 semanas de exclusão de trânsito encontramos níveis de estresse oxidativo significativamente mais elevados no cólon excluído quando comparado aos segmentos providos de trânsito e aos animais do subgrupo controle (*TM* de 3,74, 2,60 e 2,60, respectivamente;  $p=0,00001$ ; I.C.95%:-1,5622 a -1.1031). Verificamos, comparando segmentos providos de trânsito aos dos animais do subgrupo controle, que os níveis de estresse oxidativo ao DNA apresentavam valores semelhantes (Fig.17). Nesses animais, a infiltração neutrofílica nos segmentos desprovidos de trânsito já era menor que naqueles submetidos à exclusão por seis semanas e mesmo assim os níveis de COX-2 e estresse oxidativo mantiveram-se elevados, sugerindo menor participação dos neutrófilos na produção de RLO (Fig.14, Fig.16 e Fig.17).

Nos animais submetidos à exclusão por 18 semanas, encontramos

níveis de estresse oxidativo tecidual significativamente mais elevados nos segmentos cólicos desprovidos de trânsito quando comparado aos segmentos providos e ao subgrupo controle (*TM* de 4,37, 2,61 e 2,63, respectivamente;  $p=0,00001$ ; I.C.95%:-1,3335 a -0.8315). De forma semelhante ao grupo com 12 semanas de exclusão, não encontramos diferença significativa ao se comparar segmentos providos de trânsito com os dos animais do subgrupo controle (Fig.17). Nestes animais, encontramos níveis de MPO no cólon desprovido de trânsito, semelhantes aos dos segmentos providos de trânsito e aos dos animais do subgrupo controle, mas os níveis de estresse oxidativo e COX-2 permaneciam elevados (Fig.14, Fig.16 e Fig.17). Esses achados sugerem que os maiores níveis de RLO possam estar sendo formados pelas próprias células epiteliais cólicas desprovidas de substrato energético (AGCC) por um longo período.

Nos segmentos providos de trânsito intestinal dos animais do grupo experimento assim como nos animais do grupo controle, verificamos que com o progredir do tempo de exclusão não existia variação nos níveis de estresse oxidativo após seis, 12 e 18 semanas de exclusão fecal ( $p=0,77$ ). Estes achados sugerem que a manutenção do substrato alimentar em segmentos providos de trânsito faz com que as células epiteliais mantenham equilíbrio metabólico e, conseqüentemente produzam menor quantidade de RLO.

Quando analisamos a variação nos níveis de estresse oxidativo nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, comparando animais submetidos à exclusão por seis, 12 e 18 semanas, verificamos que esses valores aumentavam com o progredir do tempo de exclusão fecal ( $p=0,0007$ ) (Tab.2). Esses achados sugerem que as células desprovidas de trânsito fecal produzem

níveis cada vez mais elevados de RLO à medida que a deficiência do suprimento de AGCC se agrava.

Os resultados que encontramos sugerem que células da mucosa cólica desprovidas de trânsito fecal onde existe interrupção do fornecimento dos AGCC, encontram-se submetidas à maior estresse oxidativo. Mostram ainda, que nos segmentos cólicos sem trânsito, as alterações histológicas são idênticas às descritas na CE humana e semelhante às encontradas nos modelos experimentais de colite quimicamente induzida. Os maiores níveis de estresse oxidativo nas fases mais tardias da exclusão fecal sugerem que os RLO possam estar sendo formados pelas próprias células epiteliais, com modificações do seu metabolismo energético, conseqüente a deficiências no fornecimento dos AGCC. Os resultados que encontramos demonstram que os maiores níveis de estresse oxidativo aumentam com o decorrer do tempo de exclusão e encontram-se relacionados alterações histopatológicas e bioquímicas encontradas nas colites. Essas evidências sugerem, pela primeira vez na literatura, que o estresse oxidativo possa ser responsável pelo dano tecidual que não só deflagra, mas perpetua a CE, referendando a teoria de indução da colite por radicais livres.

Do ponto de vista prático, os resultados que encontramos sugerem que o uso de substâncias com atividade antioxidante talvez possa ser eficaz na prevenção e tratamento da CE. Recentemente, com o objetivo de testar essa possibilidade, delineamos um novo estudo utilizando o mesmo modelo experimental de CE proposto, para verificar se o ácido 5-ASA, substância com reconhecida atividade antioxidante, era capaz de reduzir os níveis de estresse oxidativo em segmentos melhorando as alterações histológicas e bioquímicas (Máximo et al, 2009a; Máximo et al, 2009b). Os resultados encontrados

mostram que a aplicação de enemas com ácido 5-ASA nos segmentos excluídos de trânsito reduziu, significativamente, os níveis de dano oxidativo ao DNA nas células mucosas obtidas de segmentos excluídos de trânsito. Da mesma forma, mostraram que animais tratados com o ácido 5-ASA apresentam significativa melhora do escore inflamatório, menor atividade tecidual de MPO e redução dos níveis teciduais de COX-2, quando comparados aos animais tratados com enemas contendo, apenas solução fisiológica a 0,9%. A redução dos níveis de dano mantinha-se mesmo após o desafio *in vitro* com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, um potente agente oxidante sugerindo um efeito protetor da substância (Máximo et al, 2009a; Máximo et al, 2009b).

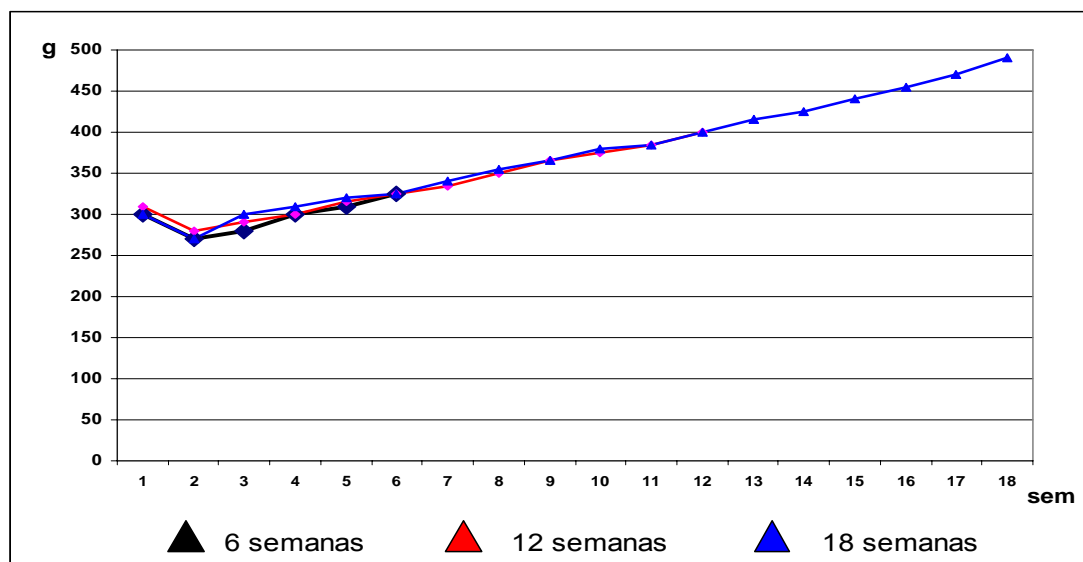
Novos ensaios, utilizando substâncias com diferentes potenciais antioxidantes, fácil biodisponibilidade e baixo custo, ainda são necessários para oferecer a opção terapêutica com melhor custo-benefício, a um número crescente de indivíduos submetidos a operações de derivação de trânsito e que terão que conviver com os limitantes sintomas da doença.

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos nas condições de execução do presente estudo permitem concluir que o estresse oxidativo encontra-se relacionado às alterações histológicas e bioquímicas que caracterizam a colite de exclusão.

## 7. ANEXOS

### ANEXO 1: Evolução ponderal dos animais





## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbasakoor F, Mahon C, Boulos PB. Diversion colitis in sigmoid neovagina. *Colorectal Dis.* 2004; 6(4):290-1.

Abrahamse SL, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis.* 1999; 20(4):629-34.

Agarwal VP, Schimmel EM. Diversion colitis: a nutritional deficiency syndrome? *Nutr Rev.* 1989; 47(9):257-61.

Almalouf P, Shehab TM, Daniel AM, Robinson EA, Barnett JL. Therapeutic hydrogen peroxide enema causing severe acute colitis. *Int J Colorectal Dis.* 2008; 23(11):1139-40.

Ancha HR, Kurella RR, McKimmey CC, Lightfoot S, Harty RF. Luminal antioxidants enhance the effects of mesalamine in the treatment of chemically induced colitis in rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008; 233(10):1301-8.

Ancha HR, Kurella RR, McKimmey CC, Lightfoot S, Harty RF. Effects of N-acetylcysteine plus mesalamine on prostaglandin synthesis and nitric oxide generation in TNBS-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci.* 2009; 54(4):758-66.

Aoi Y, Terashima S, Ogura M, Nishio H, Kato S, Takeuchi K. Roles of nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of dextran sulfate sodium-induced rat colitis. *J Physiol Pharmacol.* 2008; 59(2):315-36.

Arafa HM, Hemeida RA, El-Bahrawy AI, Hamada FM. Prophylactic role of curcumin in dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis murine model. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47(6):1311-7.

Araújo AL. Correlação entre dieta lipídica polinsaturada e aterogênese. *Rev Angiol Cir Vasc.* 2007; 5(5):15-22.

Bajka BH, Clarke JM, Cobiac L, Topping DL. Butyrylated starch protects colonocyte DNA against dietary protein-induced damage in rats. *Carcinogenesis.* 2008; 29(11):2169-74.

Bax TW, McNevin MS. The value of diverting loop ileostomy on the high-risk colon and rectal anastomosis. *Am J Surg.* 2007; 193(5):585-7.

Biondo-Simões MLP, Grecca FH, Ioshi S, Abicalaffe MD, Colnaghi MC, Mattos e Silva E, et al. Colite do cólon excluído: modelo experimental em ratos. *Acta Cir Bras.* 2000; 15(Suppl 3):7-11.

Biondo-Simões MLP, Ioshii SO, Kimura L, Martynetz F, Lemos M. Effect of aging on the healing of colonic anastomoses in rats. *Acta Cir Bras.* 2004; 19(2):89-93.

Blau S, Kohen R, Bass P, Rubinstein A. Relation between inflammation and total low-molecular-weight antioxidants profiles in experimental colitis. *Dig Dis Sci.* 2000; 45(6):1180-7.

Bondy SC, LeBel CP. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. *Free Radic Biol Med.* 1993; 14(6):633- 42.

Bosshardt RT, Abel ME. Proctitis following fecal diversion. *Dis Colon Rectum.* 1984; 27(9):605-7.

Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982; 78(3):206-9.

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.

Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29(3-4):222-30.

Cammarota G, Cesaro P, Cazzato A, Fedeli P, Riccioni ME, Sparano L, et al. Hydrogen peroxide-related colitis (previously known as "pseudolipomatosis"): a series of cases occurring in an epidemic pattern. *Endoscopy.* 2007; 39(10):916-9.

Camuesco D, Comalada M, Rodríguez-Cabezas ME, Nieto A, Lorente MD, Concha A, et al. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol.* 2004; 143(7):908-18.

Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Ciralik H, Kantarceken B, Buyukbese MA. Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2005; 206(2):131-9.

Chamulitrat W, Spitzer JJ. Generation of nitro and superoxide radicals anions from 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid by rat gastrointestinal cells. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1336(1):73-82.

Chen SX, Schopfer P. Hydroxyl radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *Eur J Biochem.* 1999; 260(3):726-35.

Chetty R, Hafezi S, Montgomery E. An incidental enterocolic lymphocytic phlebitis pattern is seen commonly in the rectal stump of patients with diversion colitis superimposed on inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol.* 2009; 62(5): 464-7.

Christl SU, Eisner HD, Dusel G, Kasper H, Scheppach W. Antagonistic effects of sulfide and butyrate on proliferation of colonic mucosa: a potential role for these agents in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci.* 1996; 41(12):2477-81.

Cook SI, Sellin JH. Review article: short-chain fatty acids in healthy and disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1998; 12(6):499-507.

Curi A, Mascrenhas JCS, Moreira Junior H, Almeida AC, Moreira JPT, Azevedo IF, et al. Morbimortalidade associada à reconstrução do trânsito intestinal - Análise de 67 casos. *Rev Bras Colo-Proctol.* 2002; 22(2):88-97.

Daly K, Shirazi-Beechey SP. Microarray analysis of butyrate regulated genes in colonic epithelial cells. *DNA Cell Biol.* 2006; 25(1):49-62.

Damiani CR, Benetton CA, Stoffel C, Bardini KC, Cardoso VH, Di Giunta G, et al. Oxidative stress and metabolism in animal model of colitis induced by dextran sulfate sodium. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22(11):1846-51.

David GG, Al-Sarira AA, Willmott S, Cade D, Corless DJ, Slavim JP. Use of Hartmann's procedure in England. *Colorectal Dis.* 2009; 11(3):308-12.

Deguchi Y, Andoh A, Inatomi O, Yagi Y, Bamba S, Araki Y, Hata K, Tsujikawa T, Fujiyama Y. *Dig Dis Sci.* 2007;52(11):2993-8.

Desrayaud F, Valvin V, Marcato N, Combes R, Bouscavel AM, Gourbeyre N. Sigmoid neo-vaginal inflammation. Haemorrhagic rectocolitis or diversion colitis? *Presse Med.* 2003; 32(30):1417-8.

Drut R, Drut RM. Hyperplasia of lymphoglandular complexes in colon segments in Hirschsprung's disease: a form of diversion colitis. *Pediatr Pathol.* 1992; 12(4):575-81.

Dryden GW Jr, Deaciuc I, Arteel G, McClain CJ. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. *Curr Gastroenterol Rep.* 2005; 7(4): 308-16.

Edwards CM, George B, Warren B. Diversion colitis – new light through old windows. *Histopathology.* 1999a; 34(1):1-5.

Edwards CM, George B, Warren BF. Diversion colitis – new light through old windows. [Letter - Authors' reply] *Histopathology.* 1999b; 35(1):86-7.

Eggenberger JC, Farid A. Diversion Colitis. *Curr Treat Options Gastroenterol.* 2001; 4(3):255-9.

Esworthy RS, Aranda R, Martín MG, Doroshov JH, Binder SW, Chu FF. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(3):G848-855.

Farrell RF, Peppercorn MA. Ulcerative colitis. *Lancet.* 2002; 359(9303):331-40.

Ferguson CM, Siegel RJ. A prospective evaluation of diversion colitis. *Am Surg.* 1991; 57(1):46-9.

Filipe MI. Value of histochemical reactions for mucosubstances in the diagnosis of certain pathological conditions of the colon and rectum. *Gut*. 1969; 10(7):577-586.

Fillmann HS. O efeito protetor da glutamina na colite experimental induzida por ácido acético. Tese (Doutorado). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.

Fillmann H, Kretzmann NA, San-Miguel B, Llesuy S, Marroni N, González-Gallego J, et al. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicology*. 2007; 236(3):217-26.

Finnie IA, Dwarakanath AD, Taylor BA, Rhodes JM. Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut*. 1995; 36(1):93-9.

Frisbie JH, Ahmed N, Hirano I, Klein MA, Soybel DI. Diversion colitis in patients with myelopathy: clinical, endoscopic, and histopathological findings. *J Spinal Cord Med*. 2000; 23(2):142-9.

Gan SI, Price LM. Waiting-list induced proctitis: the hydrogen peroxide enema. *Can J Gastroenterol*. 2003; 17(12):727-9.

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.

Geraghty JM, Talbot IC. Diversion colitis: histological features in the colon and rectum after defunctioning colostomy. *Gut*. 1991; 32(9):1020-3.

Geraghty JM, Charles AK. Aphthoid ulceration in diversion colitis. *Histopathology*. 1994; 24(4):395-7.

Giardiello FM, Lazenby AJ, Bayless TM. The new colitides. Collagenous, lymphocytic, and diversion colitis. *Gastroenterol Clin North Am*. 1995; 24(3):717-29.

Glei M, Hovhannisyan G, Pool-Zobel BL. Use of Comet-FISH in the study of DNA damage and repair: review. *Mutat Res*. 2009; 681(1):33-43.

Glotzer DJ, Glick ME, Goldman H. Proctitis and colitis following diversion of fecal stream. *Gastroenterology*. 1981; 80(3):438-41.

Grant NJ, Van Kruiningen HJ, Haque S, West AB. Mucosal inflammation in pediatric diversion colitis: a quantitative analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1997; 25(3):273-80.

Greca FH, Biondo-Simões MLP, Martins VDM, Araújo FH, Milano JB. Os ácidos graxos de cadeia curta na cicatrização de anastomoses colônicas: Estudo experimental em ratos. *Rev Col Bras Cir*. 2003;30(4):268-74.

Griffiths AP, Dixon MF. Microcarcinoids and diversion colitis in a colon defunctioned for 18 years. Report of a case. *Dis Colon Rectum*. 1992; 35(7):685-8.

Grisham MB, Volkmer C, Tso P, Yamada T. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. *Gastroenterology*. 1991; 101(2):540-7.

Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, Hossain S, Matula S, Kornbluth A, et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology*. 2007; 133(4):1099-105.

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.

Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 899:136-47.

Haas PA, Haas GP. A critical evaluation of the Hartmann's procedure. *Am Surg*. 1988; 54(6):380-5.

Haas PA, Fox TA Jr, Szilagy EJ. Endoscopic examination of the colon and rectum distal to a colostomy. *Am J Gastroenterol*. 1990; 85(7):850-4.

Habr-Gama A, Teixeira MG, Vieira MJF, Miléu LF, Laurino Neto R, Pinotti HW. Operação de Hartmann e suas conseqüências. *Rev Bras Colo-Proctol*. 1997; 17(1):5-10.

Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*. 1986; 246(2):501-14.

Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 1990; 280(1):1-8.

Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem*. 1997; 69(3):1330-1.

Hanai H, Sugimoto K. Curcumin has bright prospects for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des*. 2009; 15(18):2087-94.

Haque S, West AB. Diversion colitis--20 years a-growing. *J Clin Gastroenterol*. 1992; 15(4):281-3.

Haque S, Eisen RN, West AB. The morphologic features of diversion colitis: studies of a pediatric population with no other disease of the intestinal mucosa. *Hum Pathol*. 1993; 24(2):211-9.

Harig JM, Soergel KH, Komorowski RA, Wood CM. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. *N Engl J Med*. 1989; 320(1):23-8.

Hayman EG, Oldberg A, Martin GR, Ruoslahti E. Codistribution of heparan sulfate proteoglycan, laminin, and fibronectin in the extracellular matrix of normal rat kidney cells and their coordinate absence in transformed cells. *J Cell Biol.* 1982; 94(1):28-35.

Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(1):79-94.

Hoffmann JC, Pawlowski NN, Kühl AA, Höhne W, Zeitz M. Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. *Pathobiology.* 2002-2003;70(3):121-130.

Hollenbach E, Vieth M, Roessner A, Neumann M, Malfertheiner P, Naumann M. Inhibition of RICK/nuclear factor-kappaB and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn disease. *J Biol Chem.* 2005; 280(15):14981-8.

Jenkins D, Goodall A, Drew K, Scott BB. What is colitis? Statistical approach to distinguishing clinically important inflammatory change in rectal biopsy specimens. *J Clin Pathol.* 1988; 41(1):72-9.

Jiang H, Deng CS, Zhang M, Xia J. Curcumin-attenuated trinitrobenzene sulphonic acid induces chronic colitis by inhibiting expression of cyclooxygenase-2. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(24):3848-53.

Jørgensen JR, Clausen MR, Mortensen PB. Oxidation of short and medium chain C2-C8 fatty acids in Sprague-Dawley rat colonocytes. *Gut.* 1997; 40(3):400-5.

Jowett SL, Cobden I. Diversion colitis a trigger for ulcerative colitis. *Gut.* 2000; 46 (2): 294.

Junqueira LCU, Martins EO. Aparelho digestivo. In: Junqueira LCU, Martins EO. Atlas de anatomia microscópica do rato. São Paulo: Rossolillo; Universidade de São Paulo; 1947. p 40-56.

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.

Kiely EM, Ajayi NA, Wheeler RA, Malone M. Diversion procto-colitis: response to treatment with short-chain fatty acids. *J Pediatr Surg.* 2001; 36(10):1514-7.

Kissmeyer-Nielsen P, Christensen H, Laurberg S. Diverting colostomy induces mucosal and muscular atrophy in rat distal colon. *Gut.* 1994; 35(9):1275-81.

Komorowski RA. Histologic spectrum of diversion colitis. *Am J Surg Pathol.* 1990; 14(6):548-54.

König D, Wagner KH, Elmadfa I, Berg A. Exercise and oxidative stress: significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress. *Exerc Immunol Rev.* 2001; 7:108-33.

Korelitz BI, Cheskin LJ, Sohn N, Sommers SC. The fate of the rectal segment after diversion of the fecal stream in Crohn's disease: its implications for surgical management. *J Clin Gastroenterol*. 1985; 7(1):37-43.

Koutroubakis IE. Spectrum of non-inflammatory bowel disease and non-infectious colitis. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(48):7277-9.

Kretzmann NA, Fillmann H, Mauriz JL, Marroni CA, Marroni N, González-Gallego J, et al. Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14(11):1504-13.

Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease: radicals or ridiculous. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002; 16(12):1997-2015.

Ladeira MS, Rodrigues MA, Freire-Maia DV, Salvadori DM. Use of Comet assay to assess DNA damage in patients infected by *Helicobacter pylori*: comparisons between visual and image analyses. *Mutat Res*. 2005; 586(1):76-86.

Lapeyre B. The "frost sign" and the "snow white sign": intramucosal air injection or peroxide colitis? *Endoscopy*. 2005; 37(7):679.

Lavoine E, Vissuzaine C, Cadiot G, Sobhani I, Benhamou G, Mignon M, et al. Proctitis of diversion on an excluded rectum in patients with hemorrhagic rectocolitis. *Gastroenterol Clin Biol*. 1996; 20(3):243-7.

Lechner GL, Frank W, Jantsch H, Pichler W, Hall DA, Waneck R, et al. Lymphoid follicular hyperplasia in excluded colonic segments: a radiologic sign of diversion colitis. *Radiology*. 1990; 176(1):135-6.

Lim AG, Langmead FL, Feakins RM, Rampton DS. Diversion colitis: a trigger for ulcerative colitis in-stream colon? *Gut*. 1999; 44(2):279-82.

Lim AG, Lim W. Diversion colitis: a trigger for ulcerative colitis in the in stream colon. *Gut*. 2000; 46(3):441.

Liu Q, Shimoyama T, Suzuki K, Umeda T, Nakaji S, Sugawara K. Effect of sodium butyrate on reactive oxygen species generation by human neutrophils. *Scand J Gastroenterol*. 2001; 36(7):744-50.

Löhr HF, Mayet WJ, Singe CC, Ramadori G, Meyer zum Büschenfelde KH. Diversion colitis in Crohn disease. A case report and review of the literature. *Z Gastroenterol*. 1989; 27(4):221-4.

Lopes-Paulo F. Alterações estruturais na mucosa do cólon derivado. Estudo estereológico experimental em ratos. *Rev Bras Colo-Proctol*. 2002; 22(3):164-9.

Lu ES, Lin T, Harms BL, Gaumnitz EA, Singaram C. A severe case of diversion colitis with large ulcerations. *Am J Gastroenterol*. 1995; 90(9):1508-10.

Lusk LB, Reichen J, Levine JS. Aphthous ulceration in diversion colitis. Clinical implications. *Gastroenterology*. 1984; 87(5):1171-3.

Ma CK, Gottlieb C, Haas PA. Diversion colitis: a clinicopathologic study of 21 cases. *Hum Pathol*. 1990; 21(4):429-36.

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; 30(Pt 2):42.

Martin AR, Villegas I, Alarcón de la Lastra C. The COX-2 inhibitor, rofecoxib, ameliorates dextran sulphate sodium induced colitis in mice. *Inflamm Res*. 2005; 54(4):145-51.

Martinez CAR, Nonose R, Margarido NF, Spadari APP, Pereira JA, Priolli DG, et al. Quantificação da expressão de mucinas na mucosa cólica de segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos. *Rev Bras Colo-Proctol*. 2008; 28(Suppl 1):47-8.

Martinez CAR, Nonose R, Pereira JA, Spadari APP, Máximo FR, Margarido NF, Priolli DG. Quantification by computerized morphometry of tissue levels of sulfomucins and sialomucins in diversion colitis in rats. Experimental study in rats. *Acta Cir Bras*. 2009. [No prelo]

Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I, Asenjo M, Márquez J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002; 34(5):439-58.

Mayr M, Hu Y, Hainaut H, Xu Q. Mechanical stress-induced DNA damage and rac-p38MAPK signal pathways mediate p53-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells. *FASEB J*. 2002; 16(11):1423-5.

Máximo FR, Spadari APP, Priolli DG, Miranda DDC, Ribeiro ML, Martinez CAR. Avaliação dos efeitos antioxidantes da mesalazina na colite de exclusão. Estudo experimental em ratos com o ensaio do cometa. In: XXVIII Congresso Brasileiro de Cirurgia; 2009. [Anais] São Paulo. [CD-ROM]: São Paulo: TVMED; 2009a.

Máximo FR, Spadari APP, Priolli DG, Miranda DDC, Ribeiro ML, Martinez CAR. Efeitos protetores da mesalazina contra o dano oxidativo ao DNA nuclear de células da mucosa cólica submetidas ao desafio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Avaliação pelo ensaio do cometa na colite de exclusão. In: XXVIII Congresso Brasileiro de Cirurgia; 2009. [Anais] São Paulo. [CD-ROM]: São Paulo: TVMED; 2009b.

McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*. 2000; 108(8):652-9.

Meyer CT, Brand M, DeLuca VA, Spiro HM. Hydrogen peroxide colitis: a report of three patients. *J Clin Gastroenterol*. 1981; 3(1):31-5.



Millar AD, Rampton DS, Chander CL, Claxson AW, Blades S, Coumbe A, et al. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut*. 1996; 39(3):407-15.

Møller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005; 96 (Suppl1):1-42.

Møller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006; 98(4):336-45.

Mortensen PB, Clausen MR. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1996; 216:132-48.

Murray FE, O'Brien MJ, Birkett DH, Kennedy SM, LaMont JT. Diversion colitis: Pathologic findings in a resected sigmoid colon and rectum. *Gastroenterology*. 1987; 93(6):1404-8.

Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. *J Clin Biochem Nutr*. 2007; 41(1):18-26.

Nassri CGG, Nassri AB, Favero E, Rotta CM, Martinez CAR, Margarido NF. Influência da irrigação de soluções nutricionais no colo excluído de trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos. *Rev Bras Colo-Proctol*. 2008; 28(3):306-14.

Neut C, Colombel JF, Guillemot F, Cortot A, Gower P, Quandalle P, et al. Impaired bacterial flora in human excluded colon. *Gut*. 1989; 30(8):1094-8.

Neut C, Guillemot F, Gower-Rousseau C, Biron N, Cortot A, Colombel JF. Treatment of diversion colitis with short-chain fatty acids. Bacteriological study. *Gastroenterol Clin Biol*. 1995; 19(11):871-5.

Neut C, Guillemot F, Colombel JF. Nitrate-reducing bacteria in diversion colitis: a clue to inflammation? *Dig Dis Sci*. 1997; 42(12):2577-80.

Nieto N, Torres MI, Ríos A, Gil A. Dietary polyunsaturated fatty acids improve histological and biochemical alterations in rats with experimental ulcerative colitis. *J Nutr*. 2002; 132(1):11-9.

Nobels F, Colemont L, Van Moer E. A case of diversion rectitis. *Acta Clin Bel*. 1989; 44(3):202-4.

Nonose R, Spadari APP, Priolli DG, Máximo FR, Pereira JA, Martinez CAR. 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.

Nosál'ová V, Cerná S, Bauer V. Effect of N-acetylcysteine on colitis induced by acetic acid in rats. *Gen Pharmacol*. 2000; 35(2):77-81.

Ohata A, Usami M, Miyoshi M. Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxygenase activation. *Nutrition*. 2005; 21(7-8):838-47.

Oliveira-Neto JP, Aguilar-Nascimento JE. Intraluminal irrigations with fibers improves mucosal inflammation and atrophy in diversion colitis. *Nutrition*. 2004; 20(2):197-9.

Ona FV, Boger JN. Rectal bleeding due to diversion colitis. *Am J Gastroenterol*. 1985; 80(1):40-1.

Ordein JJ, Di Lorenzo C, Flores A, Hyman PE. Diversion colitis in children with severe gastrointestinal motility disorders. *Am J Gastroenterol*. 1992; 87(1):88-90.

Pinto FE Jr, Brandt CT, Medeiros AC, Oliveira AJ, Jerônimo SM, Brito HM. Bacterial translocation in rats nonfunctioning diverted distal colon. *Acta Cir Bras*. 2007; 22(3):195-201.

Pool-Zobel BL, Lotzmann N, Knoll M, Kuchenmeister F, Lambertz R, Leucht U, et al. Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. *Environ Mol Mutagen*. 1994; 24(1):23-45.

Pool-Zobel BL, Abrahamse SL, Collins AR, Kark W, Gugler R, Oberreuther D, et al. Analysis of DNA strand breakes, oxidized bases, and glutathione S-transferase P1 in human colon cells from biopsies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999; 8(7):609-14.

Pravda J. Radical induction theory of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(16):2371-84.

Priolli DG, da Silva PLE, Betini AM, Pereira JA, Margarido NF, Martinez CAR. Is the peritoneal reflection the best anatomical repair landmark in experimental colorectal surgery in rats. *Acta Cir Bras*. 2009. [No prelo]

Reis SB, Oliveira CC, Acedo SC, Miranda DD, Ribeiro ML, Pedrazzoli J Jr, et al. Attenuation of colitis injury in rats using *Garcinia cambogia* extract. *Phytother Res*. 2008; 23(3):324-9.

Rezaie A, Parker RD, Abdollahi M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease an epiphenomenon or the cause. *Dig Dis Sci*. 2007; 52(9):2015-21.

Ribeiro ML, Priolli DG, Miranda DD, Arçari DP, Pedrazzoli J Jr, Martinez CA. Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2008; 7(4):267-72.

Riedle B, Kerjaschki D. Reactive oxygen species cause direct damage of Englebreth-Holm-Swarm matrix. *Am J Pathol* 1997; 151(1):215-31

Roe AM, Warren BF, Brodribb AJ, Brown C. Diversion colitis and involution of the defunctioned anorectum. *Gut*. 1993; 34(3):382-5.

Roediger WE, Truelove SC. Method of preparing isolated colonic epithelial cells (colonocytes) for metabolic studies. *Gut*. 1979; 20(6):484-8.

Roediger W. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology*. 1982; 83(2):424-9.

Roediger WE, Rae DA. Trophic effect of short chain fatty acids on mucosal handling of ions by the defunctioned colon. *Br J Surg*. 1982; 69(1):23-5.

Roediger WE, Nance S. Metabolic induction of experimental ulcerative colitis by inhibition of fatty acid oxidation. *Br J Exp Pathol*. 1986; 67(6):773-82.

Roediger WE. The starved colon – diminished mucosal nutrition, diminished absorption, and colitis. *Dis Colon Rectum*. 1990; 33(10):858-62.

Roediger WE, Millard S. Selective inhibition of fatty acid oxidation in colonocytes by ibuprofen: a cause of colitis? *Gut*. 1995; 36(1):55-9.

Roediger WE, Babidge WJ. Nitric oxide effect on colonocyte metabolism: co-action of sulfides and peroxide. *Mol Cell Biochem*. 2000; 206(1-2):159-67.

Roessner A, Kuester D, Malfertheiner P, Schneider-Stock R. Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathol Res Pract*. 2008; 204(7):511-24.

Rolandelli RH, Koruda MJ, Settle RG, Rombeau JL. Effects of intraluminal infusion of short-chain fatty acids on the healing of colonic anastomosis in the rat. *Surgery*. 1986;100(2):198-204.

Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeu A, Spinozzi F, Agea E, Pelli MA, et al. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis*. 2001; 22(10):1675-80.

Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(27):4280-8.

Scheppach W, Dusel G, Kuhn T, Loges C, Karch H, Bartram HP, et al. Effect of L-glutamine and n-butyrate on the restitution of rat colonic mucosa after acid induced injury. *Gut*. 1996; 38(6):878-85.

Scheppach W, Christl SU, Bartram HP, Richter F, Kasper H. Effects of short-chain fatty acids on the inflamed colonic mucosa. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1997; 222:53-7.

Scheppach W. Short-chain fatty acids: good for the colon , good also for the urothelium? *J Lab Clin Med*. 1998; 132(4):242-3.

Scheppach W, Weiler F. The butyrate story: old wine in new bottles? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004; 7(5):563-7

Schwartz E, Dabezies MA, Krevsky B. Hydrogen peroxide injury to the colon. *Dig Dis Sci.* 1995; 40(6):1290-1.

Sedman PC, Macfie J, Sagar P, Mitchell CJ, May J, Mancey-Jones B, et al. The prevalence of gut translocation in humans. *Gastroenterology.* 1994; 107(3):643-9.

Seguí J, Gironella M, Sans M, Granell S, Gil F, Gimeno M, et al. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *J Leukoc Biol.* 2004; 76(3):537-44.

Sheehan JF, Brynjolfsson G. Ulcerative colitis following hydrogen peroxide enema. Case report and experimental production with transient emphysema of colonic wall and gas embolism. *Lab Invest.* 1960; 9:150-68.

Sheridan AM, Fitzpatrick S, Wang C, Wheeler DC, Lieberthal W. Lipid peroxidation contributes to hydrogen peroxide induced cytotoxicity in renal epithelial cells. *Kidney Int.* 1996; 49(1):88-93.

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.

Soergel KH. Colonic fermentation: metabolic and clinical implications. *Clin Investig.* 1994; 72(10):742-8.

Solomon LZ, Jennings AM, Sharpe P, Cooper AJ, Malone PS. Effects of short-chain fatty acids on primary urothelial cells in culture: implications for intravesical use in enterocystoplasties. *J Lab Clin Med.* 1998; 132(4):279-83.

Sousa MV, Priolli DG, Portes AV, Cardinali IA, Pereira JA, Martinez CAR. 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.

Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, Engelhardt H, Bengmark S, Koch S, et al. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut.* 2007; 56(3):343-50.

Syed HA, Malone PS, Hitchcock RJ. Diversion colitis in children with colovaginoplasty. *BJU Int.* 2001; 87(9):857-60.

Szczepkowski M, Kobus A, Borycka K. How to treat diversion colitis? Current state of medical knowledge, own research and experience. *Acta Chir Iugosl.* 2008; 55(3):77-81.

Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279(6):L1005-28.

Thibaud D, Kouate M, Wiser I, le Lorier B, Ploussard JP. Rectal bleeding: complication of hydrogen peroxide enemas. *Arch Pediatr.* 2001; 8(11):1267-8.

Toolenaar TA, Freundt I, Huikeshoven FJ, Drogendijk AC, Jeekel H, Chadha-Ajwani S. The occurrence of diversion colitis in patients with a sigmoid neovagina. *Hum Pathol.* 1993; 24(8):846-9.

Turecková J, Kucerová D, Vojtechová M, Sloncová E, Tuháčková Z. Expression of beta-catenin is regulated by PI-3 kinase and sodium butyrate in colorectal cancer cells. *Int J Mol Med.* 2006; 17(1):69-75.

Vasina V, Broccoli M, Ursino MG, Bellot SF, Soleti A, Paolini M, et al. Effects of the non-peptidyl low molecular weight radical scavenger IAC in DNBS-induced colitis in rats. *Eur J Pharmacol.* 2009; 614(1-3):137-45.

Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology.* 2006; 131(1):117-29.

Velazquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and colonocyte. Production, absorption, metabolism and therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 427:123-34.

Villanacci V, Talbot IC, Rossi E, Bassotti G. Ischaemia: a pathogenetic clue in diversion colitis? *Colorectal Dis.* 2007; 9(7):601-5.

Wallace JL. Release of platelet-activating factor (PAF) and accelerated healing induced by a PAF antagonist in an animal model of chronic colitis. *Can J Physiol Pharmacol.* 1988; 66(4):422-5.

Whelan RL, Abramson D, Kim DS, Hashmi HF. Diversion colitis. A prospective study. *Surg Endosc.* 1994; 8(1):19-24.

Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol.* 2006; 40(3):235-243.

Wong VK, Yu L, Cho CH. Protective effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on ulcerative colitis in rats. *Inflammopharmacology.* 2008; 16(4):162-7.

Yamada T, Grisham MB. Role of neutrophil-derived oxidants in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Klin Wochenschr.* 1991; 69(21-23):988-994.

Yeong ML, Bethwaite PB, Prasad J, Isbister WH. Lymphoid follicular hyperplasia – a distinctive feature of diversion colitis. *Histopathology.* 1991; 19(1):55-61.

Zamuner SR, Bak AW, Devchand PR, Wallace JL. Predisposition to colorectal cancer in rats with resolved colitis: role of cyclooxygenase-2-derived prostaglandin d2. *Am J Pathol.* 2005; 167(5):1293-300.

Zingarelli B, Szabó C, Salzman AL. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. *Gut*. 1999; 45(2):199-209.

**FONTES CONSULTADAS**

Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR-6023: Informação e documentação, referências-elaboração. Rio de Janeiro; 2000.

Ayres M, Ayres Júnior M, dos Santos AS. In: Ayres M, Ayres Júnior M, Santos AS. Bioestat 2.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; 2000. 227p.

Brasil. Presidência da República. Lei Federal n. 11.794 de 8 de outubro de 2008. [online]. Estabelece critérios para a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo território nacional. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm) (02 jul. 2009)

CIOMS - Council for International Organization of Medical Sciences. Ethical code for animal experimentation. WHO Chronicle. 1985;39(2):51-6.

Cunha AC. Estrutura e apresentação de dissertações e teses. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1991. 48p.

Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Pós Graduação. Normalização para apresentação de dissertações e teses. São Paulo. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2004.

Guedes MLS, Guedes JS. Descrição da Amostra: Tabelas e Gráficos. In: Guedes MLS, Guedes JS. Bioestatística para profissionais da saúde. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico; 1988. p.43-58.

Guimarães CA. Normas para manuscritos submetidos às revistas biomédicas: Escrita e edição da publicação biomédica (tradução integral do texto). Rev Col Bras Cir. 2008;35(6):425-41.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. N Eng J Med. 1997;336(4):309-16.

International Committee of Medical Journal Editors. Requisitos uniformes para manuscritos apresentados a periódicos biomédicos. Rev Saúde Pública. 1999; 33:6-15

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. São Paulo, 2001. 85p.

Walker JR MLA. Style citations of eletronic sources. [online]. Available from: <http://www.cas.usf.edu/english/walker/mla.html>. (25 jan. 2009)

Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Princípios éticos para o uso de animais de laboratório. [online]. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20eticos>. (25 jan. 2009)

Martinez CAR. O estresse oxidativo na etiopatogenia da colite de exclusão. Estudo experimental em ratos. Tese [Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2009.

## RESUMO

A etiopatogenia da colite de exclusão vem sendo relacionada a deficiências no suprimento de ácidos graxos de cadeia curta às células epiteliais da parede cólica. A doença apresenta aspectos clínicos, endoscópicos e histopatológicos semelhantes à colite ulcerativa, porém, até a presente data, não se estudou a importância do estresse oxidativo como fenômeno inicial relacionado à etiopatogenia da colite de exclusão. **OBJETIVO:** O objetivo do presente estudo foi verificar se o estresse oxidativo poderia ocasionar a colite de exclusão. **MÉTODOS:** Sessenta ratos Wistar foram submetidos à derivação do trânsito intestinal por meio de colostomia proximal esquerda e fístula mucosa distal. Os animais foram divididos em três grupos experimentais segundo o sacrifício ter sido realizado seis, 12 e 18 semanas após o procedimento cirúrgico. Para cada grupo, cinco animais foram submetidos exclusivamente a laparotomia (grupo controle). Avaliou-se histologicamente a presença de colite com escala de graduação inflamatória. Estudou-se a infiltração neutrofílica tecidual pelos níveis de mieloperoxidase e a presença de inflamação pelos níveis teciduais de cicloxigenase-2. A medida do estresse oxidativo foi feita pela técnica do ensaio do cometa. Foram utilizados testes t de Student, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, correlação de Pearson e Spearman, estabelecendo-se nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). **RESULTADOS:** Nos segmentos desprovidos de trânsito fecal existe maior grau histológico de inflamação quando comparado aos tecidos com trânsito fecal preservado ( $p = 0,001$ ). Os níveis de mieloperoxidase nos segmentos desprovidos de trânsito fecal reduzem com o progredir do tempo de exclusão ( $p = 0,00001$ ). Os níveis de cicloxigenase-2 nos segmentos sem trânsito aumentam com o decorrer do tempo de exclusão intestinal ( $p = 0,00001$ ). Os níveis de estresse oxidativo foram significativamente maiores nos segmentos desprovidos de trânsito ( $p < 0,0001$ ) quando comparados aos segmentos providos de trânsito e aumentavam com o progredir do tempo de exclusão ( $p = 0,007$ ). Os níveis de estresse oxidativo encontram-se diretamente relacionados ao tempo de exclusão grau de inflamação tecidual, e níveis teciduais de cicloxigenase-2 e inversamente relacionados aos níveis de mieloperoxidase ( $p = 0,0001$ ). **CONCLUSÃO:** Os resultados do presente estudo permitem concluir que o estresse oxidativo encontra-se relacionado às alterações histológicas e bioquímicas que caracterizam a colite de exclusão.

**Palavras chave:** Colite, Estresse oxidativo, Dano ao DNA, Ácidos graxos voláteis, Ensaio em cometa, Modelos animais de doenças.



Martinez CAR. Oxidative stress in the etiopathogenesis of diversion colitis. Experimental study on rats. Thesis [Doctorate]. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2009.

## ABSTRACT

The etiopathogenesis of diversion colitis has been related to deficiencies of short-chain fatty acids supply to cells of colon mucosa. The disease presents clinical, endoscopic and histopathological features that are similar to those of ulcerative colitis, but there have not been any studies on the importance of oxidative stress as an initial phenomenon related to the etiopathogenesis of diversion colitis. **OBJECTIVE:** The aim of this study was to determine if oxidative stress could cause diversion colitis. **METHODS:** Sixty Wistar rats were subjected to deviation of fecal stream by means of a left proximal colostomy and a distal mucosal fistula. The animals were divided into three experimental groups that were sacrificed six, 12 and 18 weeks after the surgical procedure. In each of these three groups, five animals underwent laparotomy alone (control group). The histopathological diagnosis of colitis was made by inflammatory grade validated scale. The presence of neutrophilic infiltrate was studied by the measure of the tissue levels of myeloperoxidase. The presence of tissue inflammation was evaluated by the tissue levels of cyclooxygenase-2. The oxidative stress level was evaluated using the comet assay. The Student t test, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Pearson and Spearman correlation test were used and the significance level was set at 5% ( $p < 0.05$ ). **RESULTS:** In segments without fecal stream we found greater degree of histological inflammation compared to tissues with preserved fecal stream ( $p = 0.001$ ). The levels of myeloperoxidase activity in segments excluded of the fecal stream decrease with the time of intestinal exclusion ( $p = 0.00001$ ). The tissue levels of cyclooxygenase-2 in the segments without fecal stream increase with the time of the intestinal diversion ( $p = 0.00001$ ). The levels of oxidative stress were significantly higher in segments without fecal stream when compared to the segments with fecal stream ( $p = 0.0001$ ) and increase with the time of intestinal diversion ( $p = 0.007$ ). The levels of oxidative stress, are directly related to the time of intestinal diversion, higher histological grade of tissue inflammation, tissue levels of cyclooxygenase-2 and inversely related to levels of myeloperoxidase ( $p = 0.0001$ ). **CONCLUSION:** The results of this study show that oxidative stress is related to histological and biochemical changes that characterize the diversion colitis.

**Key words:** Colitis; Oxidative stress; DNA damage; Fatty acids, volatile; Comet assay; Disease models, animal

## APÊNDICE



**Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**

Bragança Paulista, 22 de Novembro 2007.

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**Projeto de Pesquisa:** "Avaliação da correlação entre as alterações histológicas, histoquímicas, expressão tecidual da proteína p53 e o dano oxidativo do DNA nas células da mucosa cólica de ratos submetidos à colite de exclusão".

**Autor(es):** Dr. Carlos Augusto Real Martinez; Dr. Marcelo Lima Ribeiro; Ms. Denise G Priolli; Ms. Carlos Alves Fontes de Souza; Ms. José Aires Pereira.

**Instituição:** Universidade São Francisco

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, em reunião ordinária realizada no dia 22 de Novembro de 2007, analisou o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

**Parecer:** Aprovado

Atenciosamente,

**José Pedrazzoli Júnior**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Universidade São Francisco



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)