

FELIPE DAVID MENDONÇA CHAIM

**AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO TECIDUAL DE MUCINAS NEUTRAS E
ÁCIDAS NA MUCOSA CÓLICA EXCLUSA DE TRÂNSITO INTESTINAL,
SUBMETIDA À APLICAÇÃO DE ENEMAS COM SUCRALFATO.
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade
São Francisco para a obtenção do Título de Mestre
em Ciências da Saúde.

Bragança Paulista

2014

FELIPE DAVID MENDONÇA CHAIM

**AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO TECIDUAL DE MUCINAS NEUTRAS E
ÁCIDAS NA MUCOSA CÓLICA EXCLUSA DE TRÂNSITO INTESTINAL,
SUBMETIDA À APLICAÇÃO DE ENEMAS COM SUCRALFATO.
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade
São Francisco para a obtenção do Título de Mestre
em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

Bragança Paulista

2014

ii

WI 522 Chaim, Felipe David Mendonça.
C425a Avaliação do conteúdo tecidual de mucinas neutras e ácidas na mucosa cólica exclusiva de trânsito intestinal, submetida à aplicação de enemas com sucralfato: estudo experimental em ratos / Felipe David Mendonça Chaim. -- Bragança Paulista, 2014.

94 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Carlos Augusto Real Martinez.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.



CHAIM, D.M., Felipe, "Avaliação do conteúdo tecidual de mucinas neutras e ácidas na mucosa cólica exclusiva de trânsito intestinal, submetida à aplicação de enemas com sucralfato. Estudo Experimental em ratos". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e seis de agosto de dois mil e quatorze pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Michelle Dartieux Sampaio Bertoncini
Universidade São Francisco

Prof. Dr. João José Fagundes
Universidade Estadual de Campinas

Campus Bragança Paulista
Campus Campinas - Unidade Cambuí
Campus Campinas - Unidade Swift
Campus Itatiba
Campus São Paulo

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825
R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambuí - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3370
R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321
R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015
R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do Ó - CEP 02925-160 / Tel.: 11 3411.2950 / Fax: 3411.2978

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

Membros Titulares:

1. Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

2. Prof. Dr. João José Fagundes

3. Prof. Dr. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini

Membros Suplentes:

1. Prof. Dr. Claudio Saddy Rodrigues Coy

2. Prof. Dr. Lucio Fabio Caldas Ferraz

**Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências da Saúde
da Universidade São Francisco.**

Data: 26/08/2014

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ**, exemplo de que é possível ao cirurgião associar pesquisa e assistência, minha sincera gratidão pela atenção e dedicação à minha formação desde a época da residência;

Ao Professor Mestre **JOSÉ AIRES PEREIRA**, pelas análises morfométricas e técnicas histológicas realizadas durante o estudo;

Aos acadêmicos **DANIELA TIEMI SATO** e **MURILO ROCHA RODRIGUES**, que abdicaram de dias de férias e descanso para auxiliar nas etapas experimentais envolvidas neste estudo;

Aos **FUNCIONÁRIOS** do Biotério Central da Universidade São Francisco pela dedicação no cuidado com os animais de experimentação.

À **FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP)** pelo financiamento do presente estudo.

Aos **PROFESSORES** e **FUNCIONÁRIOS** do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, pelo embasamento teórico indispensável para o desenvolvimento científico.

À sra **VILMA APARECIDA TESKE**, pelo auxílio na secretaria da pós-graduação ao longo do curso.

À **UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO**, por ceder sua infraestrutura para o desenvolvimento do estudo.

Resumo

Estudos demonstraram que a mucosa cólica excluída de trânsito intestinal desenvolve processo inflamatório crônico e modificações no conteúdo e padrão de expressão tecidual dos diferentes subtipos de mucinas. O sucralfato (SCF) apresenta eficácia como agente protetor do epitélio intestinal em diferentes formas de colite, além de aumentar a produção de muco pelas células caliciformes. Entretanto, a eficácia da aplicação tópica do SCF ainda não foi avaliada na colite de exclusão. **Objetivo:** Mensurar o conteúdo de mucinas neutras e ácidas na mucosa cólica sem trânsito intestinal submetida à intervenção com SCF. **Método.** Trinta e seis ratos foram submetidos à derivação do trânsito por colostomia proximal e fístula mucosa distal. Os animais foram divididos em três grupos segundo receberem enemas diários contendo solução fisiológica 0,9%, SCF 1,0 g/kg/dia ou 2,0 g/kg/dia. Cada grupo experimental foi dividido em dois subgrupos, segundo a eutanásia ser realizada após duas ou quatro semanas. O diagnóstico de colite foi estabelecido por estudo histopatológico pela técnica da hematoxilina-eosina (HE). A intensidade inflamatória da mucosa cólica foi avaliada por escala previamente validada. O grau de infiltração neutrofílica foi avaliado pelo conteúdo tecidual da enzima mieloperoxidase (MPO). As mucinas neutras e ácidas na mucosa excluída de trânsito intestinal foram identificadas por análise histoquímica utilizando-se as técnicas do Periódico Ácido de Schiff e do Azul de Alcian, respectivamente. A expressão de MPO nos tecidos foi determinada por imunohistoquímica. O conteúdo tecidual de ambos os subtipos de mucinas e MPO foi mensurado por análise de imagem assistida por computador (morfometria computadorizada). O valor final para o conteúdo de mucinas neutras e ácidas em cada animal foi determinado pela média da leitura de três campos distintos, onde existiam pelo menos três glândulas cólicas íntegras e contíguas. Para análise dos resultados utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney e o teste ANOVA (análise de variância), adotando-se para ambos, nível de significância de 5% ($p < 0,05$). **Resultados:** A intervenção com SCF diminuiu a atividade inflamatória, relacionando-se com a concentração empregada e com o tempo de intervenção ($p < 0,05$). Houve diminuição dos níveis teciduais de MPO nos animais irrigados com SCF independente da concentração utilizada e do tempo de intervenção ($p < 0,01$). A intervenção com SCF em ambas as concentrações aumentou o conteúdo tecidual de mucinas neutras e ácidas ($p < 0,001$), sendo que o conteúdo tecidual de mucinas ácidas mostrou-se relacionado à concentração utilizada. O conteúdo tecidual de mucinas neutras e ácidas relacionou-se com a melhora do processo inflamatório. **Conclusões:** A aplicação de clisteres com SCF no cólon excluído de trânsito intestinal aumenta o conteúdo tecidual de mucinas neutras e ácidas, melhora o processo inflamatório cólico e reduz os níveis de infiltração neutrofílica tecidual.

Palavras-chave: Cólon. Sucralfato. Mucinas. Ácidos graxos de cadeia curta. Peroxidase. Processamento de imagem assistida por computador. Ratos.

Abstract

Studies have shown that colonic mucosa without fecal stream develop a chronic inflammatory process and changes in the tissue content and in the expression pattern of the different subtypes of mucins. Sucralfate (SCF) is an effective protective agent of the intestinal epithelium in different forms of colitis, as well increasing the mucus production by goblet cells. However, the efficacy of SCF in topical application has not been assessed in diversion colitis. **Objective:** To measure the content of neutral and acid mucins in the colonic mucosa without fecal stream subjected to intervention with SCF. **Method:** Thirty-six rats were undergone to diversion of the fecal stream by proximal colostomy and distal mucous fistula. The animals were divided into three groups according receive daily enemas with 0.9% saline, SCF 1.0g/kg/day or 2.0g/kg/day. Each experimental group was divided into two subgroups, according to the euthanasia be performed after two or four weeks. The diagnosis of colitis was established on histological analysis with Hematoxylin and Eosin (H.E.) staining technique. The intensity of inflammation in colic mucosa was assessed by a formerly validated scale. The degree of neutrophilic infiltration was assessed by tissue myeloperoxidase enzyme (MPO) content. The neutral and acid mucins in the mucosa without fecal stream were identified by histochemical assay with Periodic Acid Schiff and Alcian Blue staining technique, respectively. Tissue MPO expression was assessed by immunohistoquimic test. The tissue content of both subtypes of mucins and MPO was measured using computer-assisted image analysis (computerized morphometry). The final value for the content of neutral and acid mucins in each animal was determined by the average reading of three distinct histological fields, with at least three intact and contiguous gland cells in each field. For data analysis were used the non-parametric test of Mann-Whitney and ANOVA (Analysis of Variance) test, adopting a significance level of 5% ($p < 0.05$) for both. **Results:** The intervention with SCF decreased inflammatory activity and was related to the concentration and the time of intervention ($p < 0.05$). There was MPO tissue depletion in animals irrigated with SCF with time and concentration independent manner. Intervention with SCF in both concentrations increased the tissue content of neutral and acid mucins ($p < 0.001$), and the tissue content of acid mucins were related to the concentration used. The content of neutral and acid mucins was related to the improvement of the inflammatory process. **Conclusions:** The use of enemas with SCF in colon without fecal stream increases the tissue content of neutral and acid mucins, improve colonic inflammation, and decreases tissue neutrophilic infiltration.

Key words: Colon. Sucralfate. Mucins. Fatty acids. Peroxidase. Image Processing, Computer-Assisted. Rats.

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	Alcian Blue
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
CE	Colite de exclusão
COX	Ciclooxigenase
DC	Dual core
DII	Doença inflamatória intestinal
F	French
FDA	Food and Drug Administration
Gb	Gigabyte
H.E.	Hematoxilina-Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
°C	Graus Celsius
mol/%	Moles por cento
MPO	Mieloperoxidase
PAS	Periódico Ácido de Schiff
RAM	Memória de acesso aleatório (<i>Random Access Memory</i>)
RCUI	Retocolite ulcerativa inespecífica
RLO	Radicais Livres de Oxigênio
SCF	Sucralfato
SF	Solução fisiológica

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1 Variação do conteúdo de mucinas neutras e ácidas nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9%, SCF1 e SCF2 após duas e quatro semanas.	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Fórmula estrutural completa do sucralfato. **28**
- Figura 2-** Subdivisão dos grupos experimentais. **40**
- Figura 3- A:** Mucosa do cólon desprovido de trânsito após irrigação com SF 0,9% por quatro semanas (HE-100x). **B:** Mucosa do cólon desprovido de trânsito após irrigação com SCF na concentração de 2,0g/kg/dia por quatro semanas. Camada de SCF recobrimdo a superfície mucosa (seta preta) (HE-200x). **47**
- Figura 4 –** Escore inflamatório no cólon sem trânsito dos animais dos grupos controle (SF 0,9%), SCF1 (SCF 1,0g/kg/dia) e SCF2 (2,0 g/kg/dia) por duas e quatro semanas. * $p < 0,05$ (SCF2 x Controle). Teste de Mann-Whitney. **48**
- Figura 5 –** Conteúdo de MPO no cólon sem trânsito dos animais dos grupos controle (SF 0,9%), SCF1 (SCF 1,0g/kg/d) e SCF2 (SCF 2,0g/kg/d) por duas e quatro semanas. **= $p < 0,001$ (SCF2 x Controle). Teste de Mann-Whitney. **49**
- Figura 6- A:** Expressão tecidual de mucinas ácidas no cólon desprovido de trânsito após irrigação com SF 0,9% por quatro semanas (AB-100x). **B:** Expressão tecidual de mucinas ácidas no cólon desprovido de trânsito após intervenção com SCF na concentração de 2,0g/kg/dia por quatro semanas (AB-200x). **50**

Figura 7 – Conteúdo tecidual de mucinas ácidas nos animais dos grupos controle, SCF1 e SCF2 submetidos a intervenção diária com SCF por duas e quatro semanas. ** = $p < 0,01$ (SCF1 x Controle; SCF2 x Controle); †† = $p < 0,01$ (SCF1 x SCF2). 51

Figura 8- A: Expressão tecidual de mucinas neutras no cólon desprovido de trânsito após irrigação com SF 0,9% por quatro semanas (PAS-200x). **B:** Expressão tecidual de mucinas neutras no cólon desprovido de trânsito após intervenção com SCF na concentração de 2,0g/kg/dia por quatro semanas (PAS-200x). 52

Figura 9 – Conteúdo tecidual de mucinas neutras nos animais dos grupos controle, SCF1 e SCF2 submetidos a intervenção diária com SCF por duas e quatro semanas. ** = $p < 0,01$ (SCF1 x Controle; SCF2 x Controle). 53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 - Colite de exclusão e expressão de mucinas na mucosa cólica	8
2.2 - Opções terapêuticas na colite de exclusão	15
2.3 - Modelos experimentais de colite de exclusão	16
2.4 - Mucinas	18
2.5 - Análise de Imagem Assistida por Computador	26
2.6 - Sucralfato	27
3. OBJETIVOS	36
4. MATERIAL E MÉTODO	37
4.1 - Animais de experimentação	37
4.2 - Anestesia	38
4.3 - Técnica cirúrgica	38
4.4 - Pós-operatório	39
4.5 - Grupos experimentais	39
4.6 - Coleta das amostras	40
4.7 - Confeção dos blocos de parafina e lâminas	40
4.8 - Técnicas de coloração	41
4.8.1 - Hematoxilina-Eosina	42
4.8.2 - Alcian-Blue	42
4.8.3 - Periódico Ácido de Schiff	43
4.9 - Análise histológica	43
4.10 - Quantificação do conteúdo de mucinas neutras e ácidas por análise de Imagem Assistida por Computador	44
4.11 - Técnica imunistoquímica para Mieloperoxidase (MPO)	44
4.12 - Análise estatística	46
5. RESULTADOS	47
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÃO	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
9. ANEXOS	92

1. INTRODUÇÃO

A mucosa constitui-se em importante mecanismo de defesa do cólon, separando a grande quantidade de bactérias de sua luz das camadas estéreis da parede intestinal (Pravda, 2005; Gaudier e Hoebler, 2006). O muco exerce papel primordial nesse mecanismo ao conferir uma proteção mecânica e química contra agressões de antígenos, toxinas e enzimas digestivas, protegendo as células epiteliais de um processo inflamatório ou infeccioso (Finnie *et al.*, 1995; Corfield *et al.*, 2000; Pravda, 2005; Swidsinski *et al.*, 2007; Gaudier *et al.*, 2009).

O muco é composto predominantemente por mucinas, classe de glicoproteínas responsáveis por sua função (Finnie *et al.*, 1995; Deplancke e Gaskins, 2001; Gaudier *et al.*, 2009).

Sabe-se que diversas afecções que acometem o cólon, dentre elas a colite de exclusão, causam anormalidades na secreção, composição ou padrão de distribuição das mucinas no epitélio intestinal (Filipe, 1969; Finnie *et al.*, 1995; Keli *et al.*, 1997; Martinez *et al.*, 2008).

A produção das mucinas é diretamente dependente do adequado fornecimento de substrato energético, sendo a principal fonte os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos pela fermentação de fibras ingeridas na dieta (Augenlicht *et al.*, 2003; Willemsen *et al.*, 2003; Gaudier *et al.*, 2004, Gaudier *et al.*, 2009). Tal relação foi confirmada por estudos experimentais que demonstraram que segmentos cólicos excluídos de trânsito, que desenvolvem colite de exclusão (CE), apresentam redução no conteúdo e modificações no padrão de expressão tecidual da proteína, relacionadas ao tempo de exclusão fecal (Keli *et al.*, 1997; Nonose *et al.*, 2009; Martinez, Bartocci *et al.*,

2010). Acredita-se que esta alteração na produção de muco e o desenvolvimento da CE esteja relacionada a modificações do processo de respiração celular que, desprovido de seu principal substrato energético, produza elevados níveis de radicais livres de oxigênio, responsáveis pelo dano oxidativo tecidual à camada de muco, que desencadeia o processo inflamatório à mucosa cólica (Martinez, Nonose *et al.*, 2010).

O restabelecimento do trânsito intestinal ou a infusão de AGCC no cólon excluso, melhorando o trofismo celular, reforça a importância dos AGCC na etiopatogenia da CE (Roediger, 1980; Roediger e Rae, 1982; Agarwal e Schimmel, 1989; Frankel *et al.*, 1994; Velasquez *et al.*, 1997; Nassri *et al.*, 2008).

Na impossibilidade da reconstrução do trânsito fecal, o processo inflamatório tende a agravar-se com o progredir do tempo de exclusão, podendo trazer repercussões sistêmicas ao paciente (Andreyev, 2007). Uma vez que o tratamento ou profilaxia das complicações deverão ser feitas por longo prazo, e que as opções terapêuticas sistêmicas disponíveis atualmente cursam com efeitos colaterais consideráveis e custos elevados, a procura de novas estratégias terapêuticas despertam interesse na literatura médica. Demonstrou-se que a aplicação de enema contendo substâncias com efeito antioxidante melhora as alterações inflamatórias teciduais encontradas nas diferentes formas das doenças inflamatórias intestinais (DII) (Denton *et al.*, 2002a; Leiper e Morris, 2007; Nassri *et al.*, 2008; Dorr, 2009; Fiorino *et al.*, 2009a, Fiorino *et al.*, 2009b; Caltabiano, 2010; Caltabiano *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2012; Pacheco *et al.*, 2012). Porém, essa estratégia terapêutica foi pouco estudada no tratamento da CE, traduzindo-se pela falta de melhores opções terapêuticas para o tratamento da enfermidade.

O uso do sucralfato (SCF), apesar de ter sido utilizado inicialmente no tratamento de doença ulcerosa péptica (Nagashima e Yoshida, 1979), já foi descrito no tratamento de diferentes formas de colite, uma vez que apresenta mecanismo de ação multifatorial (Kochhar *et al.*, 1990; Kochhar *et al.*, 1991; Kochhar *et al.*, 1999; Gul *et al.*, 2002; Denton *et al.*, 2002b). Por apresentar atividade antioxidante, estudos sugerem que a droga possa ser benéfica para o tratamento das colites. Porém, até a presente data, um único estudo avaliou os efeitos da aplicação tópica do SCF em modelo de CE, mostrando melhora no processo inflamatório da mucosa cólica. (Pereira *et al.*, 2013). Todavia, nesse estudo os autores não avaliaram os efeitos do SCF na preservação da camada de muco que recobre o epitélio cólico, que constitui-se na sua primeira linha de defesa. Por apresentar baixo custo e poucos efeitos colaterais, o SCF torna-se uma opção terapêutica interessante para o tratamento de doenças que cursam com ulcerações no epitélio do trato digestivo (Kochhar *et al.*, 1990; Kochhar *et al.*, 1991; Allison *et al.*, 1995; Kochhar *et al.*, 1999; Gul *et al.*, 2002; Denton *et al.*, 2002b).

Assim sendo, torna-se interessante avaliar os efeitos da aplicação tópica de clistéres com SCF na mucosa cólica exclusiva de trânsito intestinal que desenvolve CE. Caso a aplicação tópica da substância demonstre efeitos terapêuticos promissores poderia tornar-se uma estratégia terapêutica válida para o tratamento da CE.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O epitélio mucoso cólico constitui-se em importante barreira funcional, separando a luz do órgão com grande concentração bacteriana, das camadas estéreis que formam a parede intestinal (Pravda, 2005). Esta barreira é composta por diversos mecanismos de defesa, principalmente representados pelo muco que recobre o epitélio intestinal, as junções intercelulares formadas por diversas proteínas componentes dos mecanismos de adesão celular e a membrana basal (Pravda, 2005; Gaudier e Hoebler, 2006).

A fina camada de muco que recobre o epitélio constitui-se na primeira linha de defesa da mucosa cólica. A maior parte do efeito protetor fornecido por esta camada deve-se à presença de mucinas, glicoproteínas predominantes da composição dessa barreira (Finnie *et al.*, 1995; Deplancke e Gaskins, 2001; Gaudier *et al.*, 2009).

A principal função do muco é servir de proteção às células epiteliais (Corfield *et al.*, 2000; Gaudier *et al.*, 2009). O muco, secretado pelas células caliciformes, localizadas nas criptas intestinais ao longo da superfície mucosa, confere uma proteção química contra a agressão ocasionada por antígenos, toxinas e enzimas digestivas existentes no interior da luz intestinal (Finnie *et al.*, 1995; Pravda, 2005; Swidsinski *et al.*, 2007). A camada de muco, por apresentar propriedades bactericidas, reduz a população bacteriana dificultando a translocação para o meio interno (Finnie *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 1999; Gaudier *et al.*, 2009).

Anormalidades da secreção, composição e padrão de distribuição das mucinas no epitélio intestinal vêm sendo demonstradas em diversas afecções que acometem o intestino grosso, representadas principalmente pelas colites bacterianas, DII como retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) e doença de Crohn (DC), CE, pólipos

adenomatosos e o câncer colorretal (CCR) (Filipe, 1969; Finnie *et al.*, 1995; Keli *et al.*, 1997; Martinez *et al.*, 2008).

A produção das mucinas diminui consideravelmente nas condições clínicas que reduzem o fornecimento de substrato energético para as células epiteliais da mucosa cólica (Augenlicht *et al.*, 2003; Willemsen *et al.*, 2003; Gaudier *et al.*, 2004; Gaudier *et al.*, 2009). A importância dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) para a adequada síntese de mucinas foi confirmada por estudos experimentais, mostrando que segmentos cólicos excluídos de trânsito apresentam redução da produção e modificações no padrão de expressão tecidual da proteína (Keli *et al.*, 1997; Nonose *et al.*, 2009; Martinez, Bartocci *et al.*, 2010).

Os AGCC constituem-se no principal substrato energético utilizado pelas células da mucosa cólica, respondendo por 90% de todo o substrato metabolizado por essas células para a síntese proteica (Roediger, 1980; Soergel, 1994; Jorgensen *et al.*, 1997). Redução do fornecimento dos AGCC, como ocorre nas operações de derivação intestinal, são acompanhadas por alterações nos mecanismos responsáveis pela produção de energia e, conseqüentemente, síntese de diferentes proteínas (Frankel *et al.*, 1994; Brownlee *et al.*, 2007). Segmentos excluídos de trânsito intestinal quando não dispõem dos AGCC como principal substrato nutritivo, passam a utilizar como fonte energética alternativa a glutamina, fornecida pela circulação sanguínea (Lopes, 2002; Martinez, Bartocci *et al.*, 2010). Todavia, o suprimento sistêmico de glutamina parece ser incapaz de fornecer todo substrato necessário, ocasionando alterações importantes no mecanismo celular para obtenção de energia, que em última análise promove a produção de elevadas concentrações de radicais livres de oxigênio, que determinam o

estresse oxidativo tecidual, de forma diretamente relacionada ao tempo de exclusão do trânsito fecal (Martinez, Nonose *et al.*, 2010).

Os AGCC como nutrientes também exercem um efeito trófico para as células da mucosa intestinal. A redução do seu suprimento atrofia as criptas cólicas, reduzindo a população de células caliciformes, principal produtora das mucinas (Frankel *et al.*, 1994; Sousa *et al.*, 2008; Mello *et al.*, 2012). A melhora do trofismo celular quando o suprimento de AGCC é restabelecido, através da infusão de soluções ricas em AGCC ou restabelecimento do trânsito intestinal, parece reforçar a importância dessas substâncias na manutenção de uma população constante de células caliciformes capazes de sintetizar mucinas. (Roediger, 1980; Roediger e Rae, 1982; Agarwal e Schimmel, 1989; Frankel *et al.*, 1994; Velasquez *et al.*, 1997; Nassri *et al.*, 2008).

As mucinas pertencem a dois grupos histoquímicos principais quando se considera a sua fração glicídica: as mucinas neutras e as ácidas (Filipe, 1969; Filipe, 1979, Nonose *et al.*, 2009). As mucinas neutras são mais frequentes nos segmentos proximais do trato digestivo, podendo ser identificadas em menor concentração no intestino grosso, principalmente no ceco e cólon proximal, enquanto as mucinas ácidas são mais encontradas no cólon e reto, e apresentam dois subtipos principais, de acordo com a predominância de radicais de sulfato (sulfomucinas) ou de ácido siálico (sialomucinas) (Deplancke e Gaskins, 2001; Nonose *et al.*, 2009; Martinez, Bartocci *et al.*, 2010). Na mucosa cólica normal, a expressão de mucinas neutras e ácidas mantém proporção constante ao longo do tubo digestivo, podendo sofrer modificações em diversas enfermidades inflamatórias que acometem o intestino (Habib *et al.*, 1986).

O padrão de expressão das mucinas neutras e dos subtipos das mucinas ácidas difere em termos de localização no cólon e nas criptas da mucosa do intestino grosso (Keli *et al.*, 1997). Enquanto no cólon esquerdo as sulfomucinas ocupam os dois terços inferiores da cripta, no cólon direito localizam-se com maior intensidade em seu terço superior. As sialomucinas ocupam, complementarmente, o restante das criptas cólicas nos diferentes segmentos (Keli *et al.*, 1997).

Finnie *et al.* (1995) demonstraram que a capacidade do epitélio do intestino grosso em produzir mucinas depende do adequado suprimento de AGCC, formado a partir da fermentação de fibras ingeridas na dieta. Estudos mostraram que o fornecimento de AGCC às células mucosas, em particular o ácido butírico, é fundamental para a expressão de genes relacionados à transcrição da fração proteica das mucinas (Gaudier *et al.*, 2004; Gaudier *et al.*, 2009). Dessa forma, passou a se correlacionar o conteúdo de mucinas existentes nos tecidos ao fornecimento de adequado suprimento de AGCC e à capacidade da transcrição dos genes relacionados à sua produção.

Todavia, a mensuração do conteúdo produzido de mucinas pelo epitélio mucoso cólico era problemática. No passado, a avaliação do conteúdo dos subtipos de mucinas presentes no epitélio intestinal era realizada de forma subjetiva pelo observador. O conteúdo era expresso em cruzes, portanto passível de erros de quantificação que ora superestimavam ora subestimavam os valores encontrados (Sousa *et al.*, 2008). Com o advento de programas de análise de imagem assistida por computador, estudos demonstraram a possibilidade de se quantificar, de forma objetiva, diferentes parâmetros histológicos como, por exemplo, o conteúdo tecidual de diversas proteínas

existentes na parede cólica (Biondo-Simões *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2002; Priolli *et al.*, 2003; Priolli *et al.*, 2007). Com emprego da morfometria computadorizada aliada a técnicas histoquímicas, tornou-se possível quantificar de modo mais fidedigno a expressão individual dos diferentes subtipos de mucinas na mucosa cólica, comparando segmentos providos e desprovidos de trânsito. Com isso tornou-se possível avaliar a influência da deficiência do suprimento intestinal de AGCC, bem como o tempo de exclusão fecal, no conteúdo e padrão de expressão tecidual dessas glicoproteínas (Nonose *et al.*, 2009; Carvalho, 2013; Ferreira, 2013). Também tornou-se possível avaliar o efeito de diferentes substâncias químicas no conteúdo e expressão tecidual das mucinas do epitélio cólico.

2.1- Colite de exclusão e expressão de mucinas na mucosa cólica

Glotzer *et al.* (1981) descreveram, pela primeira vez, o desenvolvimento de processo inflamatório na mucosa de segmentos cólicos desprovidos de trânsito fecal. Os autores denominaram esta nova forma de doença inflamatória intestinal de CE, enfermidade que acomete segmentos distais do cólon ou reto de indivíduos submetidos a intervenções cirúrgicas que desviem o trânsito intestinal (Keli *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 1999). Com o aumento da incidência do câncer colorretal em todo mundo e o incremento da violência urbana nos grandes centros, a frequência da CE também parece estar aumentando proporcionalmente (Habr-Gama *et al.*, 1997; Reis *et al.*, 2001; Barreto *et al.*, 2002). A CE também é encontrada em segmentos cólicos excluídos de trânsito utilizados para reconstituição das vias urinárias, derivações ureterais ou para a confecção de neo-vaginas (Toolenaar *et al.*, 1993; Syed *et al.*, 2001).

A incidência da CE pode ser ainda maior do que o referido pela literatura ao constatar-se, em revisões de casuística, que o trânsito intestinal somente é restabelecido em 18,63% dos enfermos com colostomia temporária, condenando o restante dos enfermos a conviverem pelo resto de suas vidas com a doença (Haas e Haas, 1988; David *et al.*, 2009). Nos doentes cujo trânsito intestinal é restabelecido, o tempo médio para a reconstituição do trânsito é de oito meses, tempo este mais do que suficiente para o desenvolvimento da CE (Habr-Gama *et al.*, 1997). A CE é diagnosticada em 91% dos pacientes submetidos a exame endoscópico sistemático do intestino excluso de trânsito após três meses da confecção do estoma, sendo que desses, 52% apresentam-se com intensidade leve, 44% moderada e 4% grave (Haas e Haas, 1988; Whelan *et al.*, 1994).

Inicialmente, quando o comprometimento mucoso é menor, a colite pode apresentar-se de forma assintomática (Lu *et al.*, 1995). Nos doentes sintomáticos, as queixas mais freqüentes são dor abdominal, eliminação de muco e sangue pelo segmento excluso. 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).

As bases etiopatogênicas para o desenvolvimento CE ainda despertam polêmicas. Já se propôs que a enfermidade pudesse ter origem isquêmica (Villanacci *et al.*, 2007), ou relacionada a mudanças na quantidade e características da flora bacteriana encontrada do cólon excluso (Keli *et al.*, 1997), com redução da população bacteriana e predomínio de bactérias redutoras de nitrato (Neut *et al.*, 1989; Neut *et al.*, 1997). Entretanto, a maioria dos autores propõe que a doença desenvolva-se em

decorrência da deficiência de AGCC na luz intestinal, ocasionada pela derivação do trânsito fecal (Roediger, 1982; Roediger, 1990; Giardiello *et al.*, 1995; Neut *et al.*, 1995; Christl *et al.*, 1996; Mortensen e Clausen, 1996; Scheppach *et al.*, 1997; Cook e Selin, 1998; Kiely *et al.*, 2001; Oliveira-Neto *et al.*, 2004).

Os AGCC, representados pelo butirato, acetato e propionato, respondem por 90% do substrato energético utilizado pelas células da mucosa cólica. São formados a partir da fermentação de fibras e carboidratos por bactérias anaeróbicas existentes na luz intestinal (*Clostridium sp.*, *Eubacterium sp.* e *Fusobacterium sp.*). Dentre os AGCC produzidos, o butirato é a principal fonte de energia, representando 70% a 80% da energia metabolizada pelas células epiteliais do cólon, seguido pelo propionato e acetato, além de outras substâncias como cetonas, aminoácidos (glutamina) e glicose (Roediger, 1980; Roediger, 1982; Roediger e Rae, 1982; Soergel, 1994; Jorgensen *et al.*, 1997).

Apesar da deficiência dos AGCC parecer ser a principal causa da inflamação que caracteriza a CE, os mecanismos moleculares pelos quais a agressão epitelial ocorre ainda não foram totalmente esclarecidos (Scheppach e Weiler, 2004). Diversas teorias buscando relacionar 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 principal teoria vigente sugere que a infiltração inflamatória epitelial encontrada na mucosa exclusiva é secundária à quebra da barreira epitelial, sendo esta última a

responsável por desencadear todo o processo (Pravda, 2005). Assim, o mecanismo da quebra da barreira epitelial passou a ser o limite do conhecimento da fisiopatologia da doença. Possível mecanismo para a lesão da barreira epitelial pode ser a presença de radicais livres de oxigênio (RLO). Segundo a teoria, a agressão inicial ao epitélio ocorre pela maior formação de radicais livres de oxigênio pelas células da própria mucosa, devido a alterações no seu mecanismo energético oxidativo (Pravda, 2005). Sendo moléculas tóxicas para as células, a produção aumentada dos RLO ocasiona dano tecidual, permitindo quebra das diferentes linhas de defesa da mucosa, possibilitando a migração das bactérias da luz intestinal para a submucosa (Pravda, 2005). Como resposta à infiltração bacteriana, leucócitos migram para a parede intestinal, iniciando o processo inflamatório característico da doença (Millar *et al.*, 1996; Sheridan *et al.*, 1996; Pravda, 2005).

O termo radical livre refere-se á qualquer átomo que contenha número ímpar de elétrons na sua última camada eletrônica (Halliwell e Gutteridge, 1990). Convencionou-se denominar RLO pois a maioria dos radicais livres é gerada a partir do metabolismo celular da molécula de oxigênio. Considerável quantidade de RLO é formada constantemente no metabolismo energético de todas as células vivas, porém as células apresentam mecanismos antioxidantes próprios, mantendo o equilíbrio entre a produção e neutralização (Neut *et al.*, 1995; Mortensen e Clausen, 1996; Sheridan *et al.*, 1996; McCord, 2000). Contudo, quando a produção dos RLO excede a capacidade de neutralização, inicia-se o dano oxidativo, danificando proteínas, membranas, organelas e principalmente as bases nitrogenadas dos ácidos desoxirribonucléicos (DNA) e ribonucléicos (RNA) (Halliwell e Gutteridge, 1986; Bondy e Le Bel, 1993;

Halliwell e Gutteridge, 1997; Scheppach *et al.*, 1997; Chen e Schopfer, 1999; Cadenas e Davies, 2000; Gutteridge e Halliwell, 2000; Møller, 2006; Ribeiro *et al.*, 2008). Experimentalmente tal teoria pode ser comprovada ao instilar-se no cólon peróxido de hidrogênio (H₂O₂), um potente formador de RLO, induzindo quadro severo de colite (Sheeham e Brynjolfsson, 1960; Cammarota *et al.*, 2007; Almalouf *et al.*, 2008).

Além do epitélio lesado, os próprios neutrófilos aumentam sua produção de RLO para defesa do organismo, pois os RLO têm efeito bactericida (Vasina *et al.*, 2009). Assim, parte dos RLO encontrados na colite pode ter sido gerada pela infiltração neutrofílica, perpetuando o processo de lesão (Fillmann *et al.*, 2007).

O diagnóstico da CE geralmente é feito pelo exame endoscópico e estudo histopatológico da mucosa exclusiva de trânsito. O enema opaco, com a técnica do duplo contraste, apesar de não possibilitar o diagnóstico definitivo de colite de exclusão, pode ser muito sugestivo ao identificar pequenas irregularidades nodulares na superfície mucosa, característica da hiperplasia linfóide folicular, alteração encontrada na colite de exclusão em mais de 80% dos doentes (Lechner *et al.*, 1990). O exame endoscópico do segmento excluído de trânsito encontra-se alterado em até 90% dos portadores de CE (Haas *et al.*, 1990; Ferguson e Siegel, 1991), apresentando mucosa hiperemiada, congesta, edemaciada, friável, com nítido apagamento dos vasos sanguíneos da submucosa e sangramento espontâneo ao contato do endoscópio (Lechner *et al.*, 1990; Ferguson e Siegel, 1991), sendo a superfície cólica recoberta por uma camada mais espessa de muco, parcialmente aderida a ela (Glutzer *et al.*, 1981). Nos casos graves, ocorre formação de úlceras aftóides praticamente indistinguíveis, à avaliação endoscópica, daquelas encontradas na RCUI, tornando difícil o diagnóstico diferencial

(Lusk *et al.*, 1984; Nobels *et al.*, 1989; Geraghty e Charles, 1994). Estudos manométricos do segmento excluído de trânsito em doentes que desenvolveram CE demonstram redução significativa da capacidade receptiva do reto à infusão de volume, não havendo alterações no reflexo evacuatório ou na capacidade de continência fecal (Roe *et al.*, 1993).

Microscopicamente a CE leva a uma variedade de modificações histológicas, porém sem nenhuma alteração específica da doença (Geraghty e Talbot, 1991). Encontra-se infiltrado inflamatório misto na mucosa do cólon excluído, predominantemente composto por neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilos, acompanhado ou não de distorções na arquitetura das células epiteliais e, paradoxalmente, depleção das células caliciformes (Roediger e Nance, 1986; Ma *et al.*, 1990; Geraghty e Talbot, 1991; Pinto Júnior *et al.*, 2007). Porém, o achado mais característico é a identificação de áreas de hiperplasia linfóide nodular (Murray *et al.*, 1987; Komorowski, 1990; Yeong *et al.*, 1991; Drut e Drut, 1992). Apesar de serem descritas no epitélio do cólon excluído displasias de diferentes graus, o desenvolvimento de neoplasias de origem epitelial é extremamente raro nos doentes submetidos a operações de desvio de trânsito por enfermidades não relacionadas às DII (Kissmeyer-Nielsen *et al.*, 1994).

Em modelos experimentais, a redução na população de células caliciformes não é um achado constante nos estudos de CE. Porém, a maioria dos estudos que não encontrou diminuição na população de células caliciformes comparando segmentos com e sem trânsito intestinal, não realizou limpeza mecânica do cólon excluído (Keli *et al.*, 1997; Biondo-Simões *et al.*, 2000). Sousa *et al.* (2008) em estudo experimental

avaliaram a população de células caliciformes, verificando que, apesar de existir atrofia das criptas cólicas, a população de células caliciformes aumentava de forma diretamente proporcional às demais células do cólon excluído, e esse aumento relacionava-se ao tempo de exclusão. Apesar do modelo experimental adotado pela maioria dos autores não incluir o preparo mecânico anterógrado do cólon excluído no momento da intervenção cirúrgica, os achados foram parcialmente confirmados após o uso de modelo experimental que realizou tal preparo (Mello *et al.*, 2012).

O primeiro estudo que avaliou a expressão das mucinas comparando segmentos com e sem trânsito intestinal identificou, de modo inverso ao que ocorre na RCUI, um aumento na expressão de sulfomucinas e importante diminuição das sialomucinas à medida que o processo inflamatório agravava-se (Keli *et al.*, 1997). Contudo, nesse estudo o conteúdo tecidual foi avaliado de forma subjetiva, além de não ter sido realizado preparo mecânico do cólon excluído de trânsito quando os autores realizaram a derivação do trânsito intestinal (Keli *et al.*, 1997). Assim, não é possível assegurar que houve a completa eliminação de resíduos fecais no cólon excluído que, quando presentes, poderiam manter o fornecimento de substrato energético para as células da mucosa cólica (Keli *et al.*, 1997; Nasri *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2008).

Estudo subsequente, avaliando o conteúdo tecidual de mucinas com o auxílio de morfometria computadorizada e com o cuidado de realizar o preparo mecânico do cólon excluído, mostrou que existia redução nos níveis teciduais de mucinas neutras e ácidas (tanto sulfomucinas quanto sialomucinas) nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, porém de forma muito mais acentuada das sialomucinas (Nonose, 2009; Nonose *et al.*, 2009; Martinez, Bartocci *et al.*, 2010).

2.2- Opções terapêuticas na colite de exclusão

Estudos demonstram que a aplicação de enemas contendo substâncias naturais ou sintéticas com efeito antioxidante, ou soluções nutricionais ricas em AGCC, melhora as alterações inflamatórias teciduais encontradas nos modelos de CE (Nassri *et al.*, 2008; Caltabiano, 2010; Caltabiano *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2012; Pacheco *et al.*, 2012). De modo inverso, a exposição da mucosa cólica a substâncias com alto poder oxidante, tais como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), agravam o dano epitelial (Marques *et al.*, 2010).

Diversas opções terapêuticas tópicas já foram estudadas em processos inflamatórios do cólon, como na colite actínica, RCUI e doença de Crohn.

Na colite actínica, uma das formas de colite mais pesquisadas, a lesão ocorre por bloqueio da renovação epitelial na fase aguda, e fibrose e neoangiogênese na fase crônica. Dentre as opções terapêuticas, já foi descrito o uso tópico de derivados aminossalicílicos (5-ASA, mesalamina e sulfasalazina), antibióticos como o metronidazol, corticoesteróides, formalina, oxigênio hiperbárico, sucralfato, coagulação com plasma de argônio, ablação por radiofrequência, YAG (yttrium aluminum garnet) laser, análogos E1 da prostaglandina (misoprostol), vitamina C e E (Denton *et al.*, 2002a; Andreyev, 2007; Leiper e Morris, 2007; Dorr, 2009; Fiorino *et al.*, 2009a, Fiorino *et al.*, 2009b).

Contudo, considerando que na CE há maiores riscos de complicações cirúrgicas relacionadas ao restabelecimento do trânsito intestinal na vigência de processo inflamatório, e que em nosso meio há baixo índice de reconstrução de trânsito, existe um grande número de doentes em que a enfermidade se agrava com o decorrer do tempo de exclusão. Um número pequeno de estudos avaliou opções terapêuticas

medicamentosas para o tratamento da enfermidade. Talvez essa falta de estudos avaliando opções terapêuticas decorra da reduzida parcela de pacientes que desenvolva quadro sistemicamente grave, ou pela remissão do processo inflamatório mucoso após a reconstrução do trânsito fecal. Esse pequeno número de estudos se reflete na falta de opções terapêuticas para a prática clínica, geralmente considerada apenas nos casos mais graves, principalmente naqueles doentes que evoluem com sangramento ou perda de muco de maior monta. Atualmente a principal opção para o tratamento da CE ainda é a reconstrução do trânsito, indicada de forma mais precoce possível, com o objetivo de impedir ou reverter o processo inflamatório, diminuindo o risco de complicações tardias como as fístulas, sangramento constante, estenoses, etc. Todavia, permanece o desafio no manejo clínico dos pacientes que não são candidatos à reconstrução do trânsito intestinal por diferentes situações, grupo este que poderia ser favorecido com o desenvolvimento de novas opções terapêuticas com o intuito de reverter ou ao menos controlar o processo inflamatório na CE. Se possível essas drogas devem apresentar bom efeito terapêutico, baixo custo e poucos efeitos colaterais.

2.3 -Modelos experimentais de colite de exclusão

Há descrição na literatura de diversos modelos experimentais de CE, sendo que a maioria dos autores utiliza o rato como animal de experimentação. Contudo, diferentes técnicas são propostas para a derivação intestinal, como confecção de colostomia em alça, colostomia em dupla boca, colostomia proximal terminal e fístula mucosa distal, colostomia proximal terminal e sepultamento do coto distal (Hartmann). Do mesmo modo, nesses estudos são propostos diferentes períodos para exclusão do

trânsito intestinal para posterior avaliação das alterações histológicas encontradas. Esse período de exclusão na maioria dos artigos varia de uma a 18 semanas (Kissmeyer-Nielsen *et al.*, 1994; Keli *et al.*, 1997; Pinto Júnior *et al.*, 1999; Biondo-Simões *et al.*, 2000; Lopes, 2002; Margarido *et al.*, 2003; Nasrri *et al.*, 2003). Com isso, é difícil de empreender uma análise uniforme das alterações histológicas encontradas, pois foram adotados modelos experimentais diferentes. Some-se a isso o fato de que a maior parte desses estudos avaliou os resultados encontrados de forma subjetiva, adotando critérios distintos para graduar a intensidade do processo inflamatório, e até mesmo a expressão tecidual de mucinas (Keli *et al.*, 1997).

Outro fator importante relaciona-se à adequada limpeza do cólon a ser excluído, sendo o preparo mecânico rotineiro desse segmento de cólon no intra-operatório fundamental para a interpretação precisa das alterações histológicas encontradas em modelos experimentais de CE. Deve-se lembrar de que a presença de resíduos fecais permite a manutenção de um substrato rico em AGCC, nutrindo a mucosa cólica do segmento excluído de trânsito e, conseqüentemente, dificultando a instalação do processo inflamatório (Margarido *et al.*, 2003; Martinez, Bartocci *et al.*, 2010).

Depreende-se da literatura que apesar de diversos modelos experimentais de CE terem sido descritos, a maioria é passível de críticas metodológicas, o que dificulta a confiabilidade da sua interpretação. Apenas dois estudos analisaram a expressão das mucinas comparando segmentos com e sem trânsito, utilizando um modelo experimental adequado. Os estudos encontraram diminuição nos níveis de mucinas neutras e ácidas (sulfomucinas e sialomucinas) nos segmentos excluídos de trânsito, quando comparados a segmentos com trânsito fecal, porém com aumento posterior dos

níveis, relacionado ao tempo de exclusão intestinal (Nonose *et al.*, 2009; Martinez, Bartocci *et al.*, 2010).

A avaliação e quantificação da inflamação mucosa na colite pode ser realizada por meio de escores histológicos previamente validados, (Akgun *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2007) ou através da avaliação exclusiva do infiltrado neutrofílico tecidual, pela dosagem dos níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO), enzima produzida essencialmente pelos neutrófilos. Assim, a dosagem tecidual de MPO pode ser empregada como marcador fidedigno do infiltrado neutrofílico nos modelos experimentais de colite (Reis *et al.*, 2008; Vasina *et al.*, 2009), uma vez que os níveis de MPO aumentam de forma diretamente proporcional aos níveis de RLO (Reis *et al.*, 2008), sendo que alguns autores defendem seu uso como potencial marcador para o diagnóstico da colite ocasionada pela produção aumentada dos RLO (Fillmann, 2007; Reis *et al.*, 2008).

2.4 Mucinas

A mucosa cólica é revestida por epitélio do tipo colunar simples composto por diferentes tipos de células. Dentre elas destacam-se os enterócitos (colonócitos), células fonte, células enteroendócrinas, células de Paneth e, principalmente, células caliciformes (Junqueira e Carneiro, 2008).

As células caliciformes são encontradas em maior número e ocupam praticamente toda a extensão das criptas intestinais (glândulas de Lieberkühn). São células cilíndricas, produtoras de muco, que possuem dois domínios funcionais: apical e basal. O domínio apical, com formato de cálice, contém em seu citosol grandes vesículas repletas de muco que migram em direção a membrana celular, liberando seu

conteúdo para a superfície do epitélio cólico. O domínio basal, mais estreito, se prende à lâmina basal por proteínas de adesão celular. No domínio basal encontra-se o retículo endoplasmático rugoso, responsável pela síntese da porção proteica que compõe o muco cólico, e o aparelho de Golgi, que adiciona grupos oligossacarídeos ao muco produzido, diferenciando os subtipos de mucinas (Junqueira e Carneiro, 2008).

A proporção entre células caliciformes e as demais células que compõe o epitélio mucoso não é constante quando se comparam as diferentes regiões do cólon (Junqueira e Carneiro, 2008). As células caliciformes aumentam progressivamente em número à medida que se dirige do ceco para os segmentos caudais do intestino grosso. Essa diferença encontra-se relacionada às distintas funções fisiológicas exercidas pelo epitélio mucoso quando se compara o cólon proximal com o distal, tendo o cólon direito maior função na absorção de água e eletrólitos, e o esquerdo, pela maior consistência das fezes, necessita de maior produção de muco para melhor progressão do conteúdo fecal (Junqueira e Carneiro, 2008). Essas diferenças na população de células caliciformes ao longo do cólon se refletem no padrão e intensidade de expressão das mucinas quando se comparam segmentos cólicos distintos (Filipe, 1969).

O muco secretado pelas células caliciformes é formado principalmente por compostos glicoprotéicos, representados pelas mucinas. As moléculas de mucinas possuem alto peso molecular e apresentam em sua composição 20% de proteína e 80% de carboidrato. Após a liberação das células caliciformes para a superfície epitelial, as mucinas se hidratam formando uma cobertura gelatinosa que adere ao epitélio cólico, protegendo-o contra a abrasão mecânica e invasão bacteriana, sendo o principal fator na proteção do epitélio a esses agentes agressores (Gold *et al.*, 1981; Gaudier *et*

al., 2004). Alterações na expressão do gene ou composição da proteína podem prejudicar a função de barreira do muco, e desencadear diversas alterações na mucosa cólica.

Mucinas consistem em uma matriz proteica, com uma longa região central constituída de inúmeras repetições seriadas de aminoácidos, com grande quantidade de serina e treonina, nas quais as cadeias de oligosacarídeos se ligam por O-glicosilação (Allen *et al.*, 1988). Estudos avaliando a fração proteica da mucina mostraram que existem pelo menos 15 diferentes genes capazes de transcrevê-las (Wreschner *et al.*, 1990; Porchet *et al.*, 1999; Dekker *et al.*, 2002; Gaudier *et al.*, 2009).

Essas diferenças foram posteriormente confirmadas por estudos genéticos que encontraram diferenças na ordem com que os nucleotídeos se dispõem ao longo do gene codificador da proteína, permitindo identificar 21 subtipos de mucinas com relação à fração protéica, denominadas: MUC1, MUC2, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC5A, MUC5B, MUC5AC, MUC6, MUC7 e MUC8, MUC9, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC18, MUC19, MUC20 (Chen *et al.*, 2004; Higuchi *et al.*, 2004). Quatro dessas mucinas são expressas nas células secretoras pelo mesmo *locus* cromossômico, 11-p15.5, sendo elas MUC6, MUC2, MUC5AC e MUC5B (Pigny *et al.*, 1996). Três dos genes *MUC* já foram totalmente sequenciados, nomeados *MUC1*, no cromossomo 1q21-24 (Swallow *et al.*, 1987), *MUC7*, no cromossomo 4q13-21 e *MUC2*, no cromossomo 11p15.5 (Gum *et al.*, 1994), enquanto o gene *MUC3* foi identificado no cromossomo 7 (Gum *et al.*, 1990).

Apesar de identificadas como pertencentes à mesma classe de proteínas, as mucinas apresentam estrutura, localização e função diferentes (Dekker *et al.*, 2002),

sendo classificadas funcionalmente em: (1) mucinas secretoras, com função de defesa ao epitélio gastrointestinal, como a MUC2; (2) mucinas ligadas à membrana, com função de adesão, sinalização e crescimento celular, como a MUC3A (Gendler e Spicer, 1995; vanKlinken *et al.*, 1995) ; e (3) mucinas solúveis, sendo a única representante a MUC7, encontrada na saliva (Bobek *et al.*, 1993).

Na mucosa cólica as mucinas são transcritas principalmente pelo gene *MUC2*, e numa menor intensidade pelos genes *MUC1*, *MUC3* e *MUC4*. Todavia, independente do componente glicídico encontrado, o gene *MUC2* é o principal codificador das mucinas encontradas no epitélio cólico, tanto de humanos como de ratos (Ogata *et al.*, 1992; Tytgat *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1999).

A expressão dos genes produtores de mucinas encontra-se alterada em muitas doenças que acometem o intestino grosso. Alterações na expressão do gene *MUC2*, assim como anormalidades no mecanismo de sua transcrição vêm sendo descritas nas DII (Tytgat *et al.*, 1996). A expressão dos genes *MUC5AC* e *MUC6* encontra-se alterada nos pólipos adenomatosos (Bartman *et al.*, 1999). O gene *MUC2* apresenta maior expressão no CCR produtor de muco e menor expressão nos tumores não produtores (Gratchev *et al.*, 1998; Porchet *et al.*, 1999).

Estudos avaliando a influência dos AGCC, em particular do butirato, na expressão desses genes relacionados à síntese de mucinas demonstraram que o gene *MUC2* aumenta 23 vezes a sua expressão quando o butirato é acrescido em meios com cultura de células (Gaudier *et al.*, 2004). Esses achados confirmam a importância dos AGCC na manutenção da síntese proteica pelas células do epitélio cólico, em particular das mucinas.

Quanto à fração glicídica de sua molécula, as mucinas podem ser divididas em dois grandes grupos, representadas pelas mucinas neutras, ricas em glicogênio, e ácidas, ricas em ácido siálico ou radicais sulfatados (Spicer *et al.*, 1965; Leppi e Spicer, 1966). Apesar das diferenças químicas em seus constituintes glicídicos, os dois tipos de mucinas aparentemente possuem as mesmas funções biológicas (Filipe, 1969).

A fração glicídica das mucinas neutras é composta principalmente por glicogênio, com alta concentração molecular de frutose, galactose e n-acetilglucosamina, e recebem essa denominação por possuírem pequena quantidade de ácido siálico (menos de 1mol/%) e n-acetilgalactosamina na composição. A fração proteica das mucinas neutras é formada principalmente pelos aminoácidos serina, aspartato e alanina (Gold *et al.*, 1981). É o subtipo mais encontrado no interior das células caliciformes do trato gastrointestinal e representam, aproximadamente, 80% do conteúdo total de mucinas encontradas no tubo digestivo.

De maneira diferente, as mucinas ácidas possuem na sua fração glicídica grande quantidade de ácido siálico (mais que 10mols/%). A porção glicídica é composta principalmente por glucosamina, galactosamina e frutose. Quando se analisa a fração proteica das mucinas ácidas, prolina, treonina e glicina são os aminoácidos mais presentes (Gold *et al.*, 1981). Dividem-se em dois subgrupos representados pelas sulfomucinas e sialomucinas segundo a predominância de radicais sulfatados ou de ácido siálico, respectivamente, na sua porção glicídica.

Há quatro décadas pesquisas vêm avaliando a expressão de mucinas ácidas e neutras na mucosa do intestino grosso. Esses estudos já demonstraram que no epitélio normal existe predomínio das mucinas ácidas, principalmente sulfomucinas (Filipe,

1969). Ao longo de toda superfície epitelial do cólon ambos os subtipos de mucinas ácidas estão presentes, mas dependendo da região considerada existe predomínio de um ou outro subtipo.

Estudos em seres humanos avaliando por técnicas histoquímicas a presença da proteína transcrita demonstraram que o conteúdo e o padrão de distribuição das mucinas na mucosa do trato gastrointestinal se fazem de maneira distinta quando se consideram os diferentes segmentos do tubo digestivo (Sheahan e Jervis, 1976). No epitélio normal as mucinas neutras habitualmente expressam-se com maior intensidade nos segmentos craniais do trato digestivo (estômago e duodeno), enquanto as ácidas apresentam maior intensidade de expressão a partir da flexura duodeno-jejunal (Lev e Spicer, 1964; Goldman e Ming, 1968; Filipe, 1969; Sheahan, 1976). Acredita-se que os diferentes padrões existentes possam estar relacionados às diferentes origens embriológicas dos segmentos que formam o tubo digestivo (Gervaz *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2008).

O esôfago, estômago e duodeno originam-se, embriologicamente, a partir do intestino anterior. O jejuno, íleo, ceco, cólon ascendente e os dois terços proximais do cólon transversal originam-se do intestino médio. O terço final do cólon transversal, descendente, sigmóide e os dois terços proximais do reto são formados a partir do intestino posterior (Distler e Holt, 1997; Gervaz *et al.*, 2001). Nos segmentos proximais as criptas cólicas são maiores, mais profundas, provavelmente adaptadas à maior função absorptiva dessa região, enquanto no cólon distal as criptas são menos profundas e com maior quantidade de células caliciformes, relacionadas aos processos de lubrificação para facilitar a progressão das fezes formadas (Gervaz *et al.*, 2001).

Recentemente, com o advento das técnicas de “microarray”, verificou-se que o perfil de expressão de mais de 1000 genes que controlam o ciclo celular das células da mucosa do cólon são diferentes nos cólons proximal e distal (Glebov *et al.*, 2003). A expressão de alguns deles pode ser até três vezes mais intensa dependendo do segmento considerado. Estes achados talvez expliquem as mudanças nos padrões de expressão das mucinas quando se comparam os diferentes segmentos do cólon.

Muitas vezes, em uma mesma célula caliciforme, pode ser encontrado os dois subtipos de mucinas ácidas. As sialomucinas localizam-se no domínio basal da célula entre o núcleo e o complexo de Golgi, enquanto as sulfomucinas ocupam, principalmente, o domínio apical próximo à membrana celular voltada para a luz intestinal. Moderadas quantidades de mucinas neutras são encontradas na superfície epitelial, localizadas principalmente nas porções superiores das criptas. Este padrão de distribuição das mucinas predomina no cólon esquerdo e reto. (Greco *et al.*, 1967; Goldman e Ming, 1968; Filipe, 1969).

O padrão de expressão das mucinas no epitélio cólico de ratos é semelhante ao encontrado em seres humanos (Sakata e von-Engelhardt, 1981). Estudo experimental demonstrou que o conteúdo de mucinas neutras decresce enquanto o conteúdo de mucinas ácidas aumenta quando se progride do ceco em direção ao cólon distal. Em relação às mucinas ácidas constatou-se que as sulfomucinas estavam presentes apenas no cólon distal enquanto as sialomucinas, apesar de serem encontradas em todo o cólon, aumentavam em quantidade à medida que se progride do ceco para o cólon distal (Sakata e von-Engelhardt, 1981). Outros autores verificaram que no cólon esquerdo, de forma semelhante ao que ocorre no homem, as sulfomucinas ocupam os

dois terços superiores das criptas intestinais, enquanto as sialomucinas os dois terços inferiores (Keli *et al.*, 1997).

A intensidade de expressão, o tipo e o padrão de distribuição de mucinas ao longo das criptas modificam-se em diversas doenças que acometem o cólon (Filipe, 1969; Mimura *et al.*, 1999; Uchida *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2006). Estudos mostraram diferentes padrões de expressão na mucosa cólica de doentes portadores de RCUI, adenomas, na mucosa cólica adjacente a tumores do cólon (mucosa de transição) e, principalmente, no CCR (Filipe, 1969; Filipe e Dawson, 1970; Filipe, 1971; Ono e Katsuyama, 1985; Trauner *et al.*, 1994; Tamai *et al.*, 1998; Tsuiji *et al.*, 1998; Uchida *et al.*, 2001).

A expressão de mucinas na mucosa cólica inflamada por diferentes condições clínicas, também pode modificar-se (Filipe, 1969; Filipe, 1972; Filipe, 1975). Nas colites inespecíficas a produção total de mucinas ácidas encontra-se reduzida e, nas áreas onde o processo inflamatório é mais intenso, as mucinas podem não ser identificadas. A expressão de mucinas ao longo das criptas é irregular, apresentando tanto mucinas neutras quanto ácidas com predomínio das sulfomucinas (Filipe, 1969). Na RCUI o principal subtipo de mucina encontrada no epitélio inflamado é a sialomucina, entretanto é possível encontrar pequena expressão tecidual de sulfomucinas, principalmente na porção mais profunda das criptas intestinais. Na RCUI a expressão de mucinas neutras diminui acentuadamente, e em alguns casos está ausente (Filipe, 1969).

Modificação na secreção de mucinas parece ser um dos elementos mais importantes no espectro histológico da CE, servindo ainda como base para discussão com relação aos aspectos etiopatogênicos envolvidos na CE (Keli *et al.*, 1997). Poucos

estudos avaliaram a expressão de mucinas ácidas e neutras comparando segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal com CE (Keli *et al.*, 1997; Nonose *et al.*, 2009; Martinez, Bartocci *et al.*, 2010). Os autores verificaram que a exclusão do trânsito fecal levou a importante diminuição do conteúdo de mucinas neutras e ácidas neste segmento em relação ao cólon com trânsito, com relativo aumento do conteúdo após período de exclusão do trânsito intestinal.

A despeito do conhecido caráter inflamatório da CE e das alterações na expressão de mucinas que este processo inflamatório induz no cólon, a expressão de mucinas induzidas por infusão de substâncias no cólon excluído não foi adequadamente estudada.

2.5-Análise de Imagem Assistida por Computador

O uso de sistemas de análise de imagem assistida por computador, também conhecida como morfometria computadorizada ou análise estereológica, permite a mensuração das mais variadas estruturas, sendo possível determinar de forma objetiva parâmetros histológicos, bem como quantificar a expressão tecidual de diversas proteínas presentes, coradas por técnicas histoquímicas ou imunoistoquímicas (Martinez *et al.*, 2002; Priolli *et al.*, 2003; Priolli *et al.*, 2007).

Nos estudos experimentais, a análise de imagem assistida por computador apresenta como vantagens em relação aos métodos convencionais a possibilidade de mensurar objetivamente e de modo rápido diferentes aspectos macroscópicos e microscópicos. A quantificação de elementos estruturais é parte fundamental nos estudos anatomopatológicos e a possibilidade de utilizar uma unidade métrica para a

comparação entre diferentes medidas permite análise estatística mais fidedigna (Martinez *et al.*, 2002).

A morfometria computadorizada já foi empregada para mensurar a espessura das diferentes camadas que compõe a parede cólica, quantificar o edema na parede intestinal e a quantidade de colágeno tecidual (Kissmeyer-Nielsen *et al.*, 1994; Biondo-Simões *et al.*, 2000; Lopes, 2002; Priolli *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2008; Martinez, Bartocci *et al.*, 2010; Martinez, Nonose *et al.*, 2010). A quantificação de mucinas neutras e ácidas com métodos de análise de imagem já foi realizada anteriormente em outros modelos experimentais (Filipe, 1975; Rubio e Rivera, 1991; Rubio e Huang, 1992; Phillips e Wilson, 1993).

Nenhum estudo quantificou, com morfometria computadorizada, a expressão de mucinas neutras e ácidas em modelos experimentais de CE, submetidos a intervenção com SCF, o que torna a proposta do presente estudo inédita.

2.6 - Sucralfato (SCF)

O SCF é um sal de alumínio de um dissacarídeo sulfatado (sacarose octasulfatado) polianiônico (McGraw e Caldwell, 1981; Nagashima, 1981a; Maggi *et al.*, 2000; Henson, 2010) com fórmula bioquímica $C_{12}H_{54}Al_{16}O_{75}S_8$, nomenclatura segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry): alumínio;3,4,5-trisulfooxi-2-(sulfooximetil)-6-[3,4,5-trisulfooxi-2(sulfooximetil)oxolan-2-il] oxi-oxano;icosahidrato. Tem massa molar 2086,74 g/mol (Sweetman *et al.*, 2009). A molécula de SCF contém 19-20% de alumínio (McCarthy, 1991), principalmente na forma de hidróxido de alumínio, utilizado em outras formulações como antiácido (Nagashima e Yoshida, 1979). Porém, apesar desse efeito, não pode ser considerado como agente antiácido

por causar pouca alteração no pH gástrico (Bighley e Giesing, 1981). O SCF é insolúvel em água ou álcool, mas se torna parcialmente solúvel em soluções ácidas ou básicas (Nagashima, 1981b), mantendo-se em suspensão em pH 6,5.

A melhor formulação disponível comercialmente é em gel, permitindo bom contato com a mucosa, uma vez que age por contato direto com o tecido lesado, sem sofrer precipitação do princípio ativo, comum na suspensão (Hanstein e Bauer, 1986; Caramella *et al.*, 1988; Hardy *et al.*, 1993; Vaira *et al.*, 1993; Caramella *et al.*, 1995; Conte *et al.*, 1995).

Segundo o Food and Drug Administration (FDA), o SCF é classificado como categoria B para o uso durante a gestação, uma vez que estudos em camundongos e coelhos, utilizando doses até 50 vezes superiores às administradas ao homem, não demonstraram riscos ao feto, porém não há estudos em humanos.

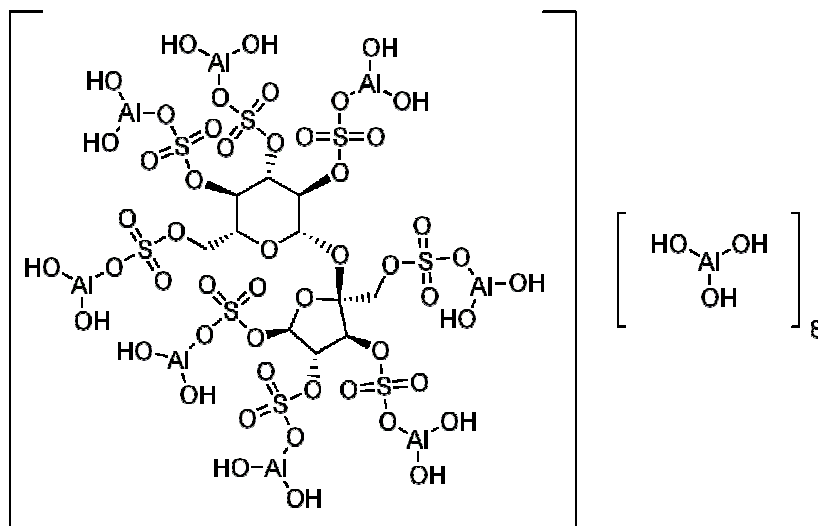


Figura 1- Fórmula estrutural completa do SCF.

Foi desenvolvido a partir de anticoagulantes polissacarídeos sulfatados, após a observação de que ao contrário destes, os dissacarídeos sulfatados não apresentam a atividade anticoagulante, mas tinha a capacidade de se ligar a proteínas do epitélio do trato gastrointestinal, sendo a atividade antiulcerosa péptica dependente apenas do grau de sulfatação (McCarthy, 1991; Rodrigues *et al.*, 2011; Tovar *et al.*, 2012; Alvarenga *et al.*, 2014). Inicialmente foi estudado e desenvolvido como droga antiulcerosa gastroduodenal de efeito não sistêmico, sendo um agente citoprotetor tópico com alta afinidade pela mucosa gastrointestinal (Nagashima, 1981a; Nagashima, 1981b; Tarnawski *et al.*, 1986; Rees, 1991; Jensen e Jensen, 1992).

Após sua administração, ocorre a dissociação do alumínio ao SCF, sendo o alumínio logo absorvido, com eliminação renal (Nagashima e Yoshida, 1979; Nagashima, 1981b; Haram *et al.*, 1987; Pai *et al.*, 1987; Robertson *et al.*, 1989; Santarelli *et al.*, 2003). Já o SCF, na forma de sucrose sulfatada, não é absorvido pelo trato gastrointestinal, tornando-se altamente condensado e com consistência viscosa, com capacidade de aderir tanto à mucosa normal quanto à lesada, formando um complexo com o muco extracelular e agindo como barreira protetora na superfície mucosa (Nagashima & Yoshida, 1979; Nagashima, 1981a; Nagashima, 1981b; Bighley e Giesing, 1981; Nakazawa *et al.*, 1981; Giesing *et al.*, 1981; Steiner *et al.*, 1982; Tarnawski *et al.*, 1986; Ishimori, 1995).

Tal aderência parece dever-se à ligação iônica das moléculas carregadas negativamente da droga às proteínas carregadas positivamente do muco ou mucosa lesada (Nagashima & Yoshida, 1979; Konturek *et al.*, 1987). Apesar das glicoproteínas do muco apresentarem carga negativa, elas contêm elementos como debris celulares,

fibrina e outros componentes plasmáticos que as tornam eletricamente positivas, servindo de ligação ao SCF (Ishimori, 1995). Assim, a ligação da droga é maior quanto mais inflamação e lesão existir no tecido (Nakazawa *et al.*, 1981; Nagashima, 1981a; Nagashima, 1981b; Samloff, 1983).

Apresenta capacidade de prevenção de lesões gástricas agudas induzidas por vários agentes ulcerogênicos em animais experimentais (Shimizu *et al.*, 1968; Harrington e Code, 1980; Harrington *et al.*, 1981; Tesler e Lim, 1981; Okabe *et al.*, 1983; Ligumskv *et al.*, 1984; Hollander *et al.*, 1985; Nagashima *et al.*, 1988), com índice de cura de doença ulcerosa péptica comparável aos bloqueadores de receptor H2 e inibidores da bomba de prótons (Harrington *et al.*, 1981; Tesler e Lim, 1981; Okabe *et al.*, 1983; Caldwell, 1985; Wu *et al.*, 1985). É possível que apresente também efeito em longo prazo, uma vez que permite baixo índice de recidiva ulcerosa, apoiado por diversos ensaios clínicos (Myake *et al.*, 1980; McHardy, 1981; Hollander, 1981; Marks *et al.*, 1981; Classen *et al.*, 1983; Glise *et al.*, 1985; Hallerback *et al.*, 1985; Carling *et al.*, 1985; Lam *et al.*, 1987; Hui *et al.*, 1989; Lam, 1989; Lam, 1991; Hui *et al.*, 1992; Santarelli *et al.*, 2003).

O mecanismo de ação do SCF ainda não encontra-se totalmente elucidado. No início acreditava-se ter maior efeito tópico que sistêmico, mas parece ser multifatorial, sendo alguns mecanismos já conhecidos (Okabe *et al.*, 1983). O complexo formado pelo sucralfato-muco extracelular gera uma barreira a outras substâncias como o ácido clorídrico, sais biliares, e reduz a atividade da pepsina (Caspary, 1980; Marks *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1980; Bruugsgard *et al.*, 1981; Harrington *et al.*, 1981; Nakazawa *et al.*, 1981; McHardy, 1981; Nagashima, 1981a; Martin *et al.*, 1982; Graham *et al.*,

1984; Elsborg *et al.*, 1984; Samloff e O'Dell, 1985; Slomiany, Hurty *et al.*, 1985; Tarnawski *et al.*, 1986; Jensen e Jensen, 1992; Volkin *et al.*, 1993; Copeman *et al.*, 1994; Ishimori, 1995; Pletz *et al.*, 2003). Além disso, o SCF exerce função citoprotetora ao aumentar a produção de muco por estimular a produção de mucinas, diminuir a degradação do muco pelo ácido, aumentar a secreção de bicarbonato, aumentar a síntese de prostaglandina, diminuir a difusão ácida e acelerar a renovação das células epiteliais (Nakazawa *et al.*, 1981; Guslandi *et al.*, 1983; Slomiany, Takagi *et al.*, 1985; Guslandi, 1985; Konturek *et al.*, 1986; Tarnawski *et al.*, 1986; Shea-Donohue *et al.*, 1986; Crampton *et al.*, 1987; Crampton *et al.*, 1988; Nagashima *et al.*, 1988; Slomiany *et al.*, 1989; Copeman *et al.*, 1994; Banerjee *et al.*, 1996). Tais efeitos ocorrem principalmente em meios ácidos, mas já tendo sido comprovado sua ação em pH próximos ao 7 (Nagashima, 1981a; Graham *et al.*, 1984; Danesh *et al.*, 1988). O SCF também apresenta atividade antioxidante, sendo capaz de reduzir a formação de RLO produzidos por neutrófilos presentes no tecido inflamado (Laudanno *et al.*, 1990; Wada *et al.*, 1997).

Acreditava-se que o SCF apresentava propriedades citoprotetoras semelhantes às prostaglandinas (Okabe *et al.*, 1983), até que se identificou sua relação. O SCF demonstrou ser capaz, em lesões induzidas por álcool em camundongos, de elevar de forma dose dependente a produção e liberação de prostaglandina E2 (Hollander *et al.*, 1984; Konturek *et al.*, 1987), com potente ação sobre receptores EP3, e conseqüente aumento da secreção de muco (Scheiman *et al.*, 1992; Devlin, 1997), reduzindo microsangramento mucoso (Konturek *et al.*, 1986). Este estímulo à produção de prostaglandina foi confirmado ao identificar-se que o efeito protetor do SCF era

bloqueado pela administração previa de indometacina, um potente inibidor da ciclooxigenase (prostaglandina H2 sintase) (Hollander *et al.*, 1985).

Outro mecanismo pelo qual o SCF acelera o processo de cicatrização epitelial é a capacidade que a droga possui de aumentar o fluxo sanguíneo na mucosa gastrointestinal de forma dose dependente (Shea-Donohue *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1989).

O SCF apresenta mínima absorção gastrointestinal, com biodisponibilidade de 3-5%, tendo essa pequena parcela absorvida metabolismo hepático, com relato na literatura de apenas um caso de hepatotoxicidade (Odeh e Oliven, 2001).

Apesar de ter absorção muito baixa e efeito sistêmico praticamente nulo, a associação do SCF a outras drogas é causa de grandes alterações na biodisponibilidade de diversas classes farmacológicas, como anticonvulsivantes, anticoagulantes, antibióticos e hormônios (Lacz, Drees *et al.*, 1982; Mungall *et al.*, 1983; Lode, 1988; Grasela *et al.*, 1989; Gugler e Allgayer, 1990; Cabarga *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 1992; Lubowski *et al.*, 1992; Sherman *et al.*, 1994; Ramon *et al.*, 1994). O mecanismo dessa interação medicamentosa deve-se principalmente a quelação de ânions das drogas por íons positivos (cátions) do alumínio presente no SCF, formando complexos não absorvíveis e diminuindo sua biodisponibilidade a até 10% do usual (Brouwers *et al.*, 1989; Nix *et al.*, 1989; Parpia *et al.*, 1989; Polk *et al.*, 1989; Yuk *et al.*, 1989; Garrelts *et al.*, 1990; Lewin e Smith, 1990; Stein, 1991; Zix *et al.*, 1997). Porém, se a administração da maioria das drogas preceder o SCF em pelo menos 2 horas, não há interferência significativa (Lehto e Kari, 1994). Por outro lado, o SCF mostrou-se seguro para administração concomitante a diversos anti-inflamatórios esteroidais e não

esteroidais (Lacz, Groschang *et al.*, 1982; Lacz, Drees *et al.*, 1982; Kamali *et al.*, 1985; Lau *et al.*, 1985; McCarthy, 1991).

O efeito colateral mais frequente relacionado ao uso de SCF cronicamente é a constipação, presente em 3-4% dos pacientes. Outros efeitos menos frequentes incluem náusea, prurido, sonolência e cefaléia. Possível efeito colateral creditado ao SCF é o de retardar o esvaziamento gástrico (Petersen *et al.*, 1989). Há relatos na literatura de bezoar secundário ao uso de SCF, com depósito do material em sondas enterais ou no estômago de idosos ou de recém-nascidos, na maioria das vezes internados em unidades de terapia intensiva (Guy e Ollagnier, 1999). Da mesma forma, pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos parecem ter maior predisposição à deposição de fosfato de alumínio na mucosa gástrica quando do uso crônico de antiácidos ou SCF (Greenson *et al.*, 1993). A maior parte dos efeitos adversos relacionados ao uso de SCF deve-se à absorção do sal de alumínio, que tem sua concentração aumentada em até dez vezes, podendo induzir lesões em longo prazo em pacientes com insuficiência renal crônica (McCarthy, 1991).

A partir do uso inicial e bons resultados apresentados no tratamento de lesões gastroduodenais, baseado em seus mecanismos de ação, diversos estudos clínicos avaliaram o uso de SCF em outras lesões epiteliais gastrointestinais, a grande maioria desses com resultados promissores. Em mucosites secundárias a radioquimioterapia do trato digestivo, o uso do SCF demonstrou bons resultados (Allison *et al.*, 1995).

A capacidade do SCF em promover barreira protetora e cicatrização epitelial estimulou seu estudo na colite actínica, demonstrando resultados promissores (Kochhar *et al.*, 1990; Kochhar *et al.*, 1991; Kochhar *et al.*, 1999; Gul *et al.*, 2002; Denton *et al.*,

2002b). Uma vez que se liga mais intensamente a epitélio lesado, tem apresentado resposta proporcional a lesão epitelial prévia ao tratamento, com estudos mostrando melhores resultados nas lesões mais extensas (O'Brien *et al.*, 1997; Martenson *et al.*, 2000; Kneebone *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 2002; Kneebone *et al.*, 2004).

Com o mesmo objetivo, estudos demonstraram bons resultados clínicos, endoscópicos e histológicos no tratamento da colite actínica não restrita ao reto, agindo após administração tópica ao estimular a cicatrização e formação de uma barreira protetora nas superfícies mucosas lesadas (Denton *et al.*, 2002a), com melhora clínica e endoscópica após o uso do SCF em relação a anti-inflamatórios (Kochhar *et al.*, 1999).

Da mesma forma, SCF via retal em diferentes posologias mostrou-se mais eficiente no tratamento da colite actínica que sulfasalazina associada a prednisolona, com melhora clínica de 94% x 54%, e endoscópica de 71% x 47%, respectivamente, após seguimento de 4 semanas (Kochhar *et al.*, 1999; Sanguineti *et al.*, 2003; Phan *et al.*, 2009). Tais resultados estimularam o uso de SCF em outras DII que cursam com formação de úlceras epiteliais (Wright *et al.*, 1999; Matsuu-Matsuyama *et al.*, 2006; Dehghani *et al.*, 2012; Mendenhall *et al.*, 2013).

Sendo a CE processo inflamatório, com formação de úlceras, com eventos de sangramento, com diagnóstico algumas vezes indistinguível de outras DII, o uso de SCF poderia também apresentar bons resultados em seu tratamento. Porém, até a presente data, do melhor do nosso conhecimento, os efeitos do SCF na proteção epitelial só foram avaliados em um único estudo (Pereira *et al.*, 2013). Os efeitos da

aplicação de enemas contendo SCF na produção das mucinas neutras e ácidas ainda não foram avaliados em doentes ou modelos experimentais de CE.

3. OBJETIVOS

1. Verificar em modelo experimental de CE, os efeitos da aplicação diária de clisteres com SCF nas alterações histológicas na mucosa cólica exclusiva de trânsito intestinal;
2. Verificar em modelo experimental de CE, os efeitos da aplicação diária de clisteres com SCF na infiltração neutrofílica tecidual na mucosa cólica exclusiva de trânsito intestinal;
3. Verificar em modelo experimental de CE, os efeitos da aplicação diária de clisteres com SCF no conteúdo de mucinas neutras e ácidas na mucosa cólica exclusiva de trânsito intestinal.

4. MATERIAL E MÉTODO

A realização deste estudo obedeceu à Lei Federal 11.794 de 08/10/2008 (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 (projeto 22.11/07) (Anexo 1).

4.1 - Animais de experimentação

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos, pesando entre 300 e 350g provenientes do Biotério Central da Universidade São Francisco.

Durante o período de vigilância epidemiológica (sete dias) todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais, permanecendo em ambiente climatizado, com controle de temperatura, luminosidade e ruídos. Foram pesados no dia anterior ao procedimento cirúrgico, para o qual estavam em jejum, exceto água, por 12h.

As gaiolas foram identificadas com o número, grupo e subgrupo experimental a que pertenciam e esses mesmos dados foram tatuados com tinta da China, na cauda de cada animal. Os ratos foram alimentados sempre com a mesma ração, própria para roedores, e pesados semanalmente.

4.2 -Anestesia

Os animais foram submetidos a anestesia geral pela administração intraperitoneal de 0,1mL/100g de solução 1:1 (v/v) de cloridrato de xilazina 20mg/mL (Anasedan[®])¹ + cloridrato de quetamina 50mg/mL (Dopalen[®])¹.

4.3 - Técnica cirúrgica

Sob anestesia, foram restringidos os quatro membros à mesa cirúrgica por tiras elásticas, em decúbito dorsal horizontal, realizando-se tricotomia abdominal e anti-sepsia com polivinilpirrolidona-iodo. A laparotomia foi realizada por incisão longitudinal mediana com três centímetros de extensão. A secção do cólon foi realizada dois centímetros a jusante do ceco. Após a ligadura dos vasos da arcada marginal, seccionou-se o cólon direito no ponto escolhido, exteriorizando-se o segmento proximal como colostomia terminal na fossa ilíaca direita, fixando-se a colostomia à pele com pontos separados de fio absorvível monofilamentar 5-0 nos quatro pontos cardinais, e entre eles. Concluída a fixação da colostomia proximal, o segmento caudal do cólon direito foi cateterizado com sonda de polivinil 12 F, fixada por ligadura frouxa, e irrigado com 40 mL de solução fisiológica 0,9% (SF) a 37°C, até que o efluente drenado pelo ânus não mais apresentasse resíduos fecais. Terminada a irrigação, o cateter foi removido e o cólon distal exteriorizado como uma fístula mucosa distal no hipocôndrio direito. O estoma distal foi fixado com a mesma técnica utilizada no proximal. A síntese da parede abdominal foi realizada em dois planos de sutura: peritônio e aponeurose com pontos contínuos de fio inabsorvível monofilamentar (nylon) 4-0 e a pele com pontos separados com o mesmo fio.

¹ Agribrands do Brasil Ltda. Brasil

4.4 - Pós-operatório

Concluída a operação, os animais foram mantidos por 10 minutos sob lâmpada aquecida, e após recuperação anestésica, alojados em gaiolas individuais, sendo liberados para ingestão de água e ração padronizada (Nuvilab CR1[®])². Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais até a data do sacrifício, permanecendo nas mesmas condições ambientais do período de vigilância epidemiológica.

Os animais toleraram bem o procedimento cirúrgico e anestésico, não ocorrendo óbitos durante a intervenção assim como no pós-operatório imediato. No grupo experimento, ocorreu óbito tardio de um animal, sendo substituído para a conclusão do estudo.

4.5 - Grupos experimentais

A Figura 1 mostra o algoritmo de formação dos grupos experimentais. Os 36 animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais com 12 ratos cada. O primeiro grupo recebeu enemas retais diários contendo solução fisiológica a 0,9% (grupo controle). O segundo e o terceiro (grupos experimentais) receberam diariamente enemas contendo SCF suspensão da concentração de 200mg/ml (EMS do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), sendo infundido volume necessário para atingir dose de 1,0 g/kg/dia (subgrupo SCF1) e 2,0 g/kg/dia (subgrupo SCF2). Em cada um dos grupos, seis animais foram sacrificados após duas semanas e os outros seis após quatro semanas de intervenção.

² Nuvital Nutrientes SA, São Paulo, Brasil

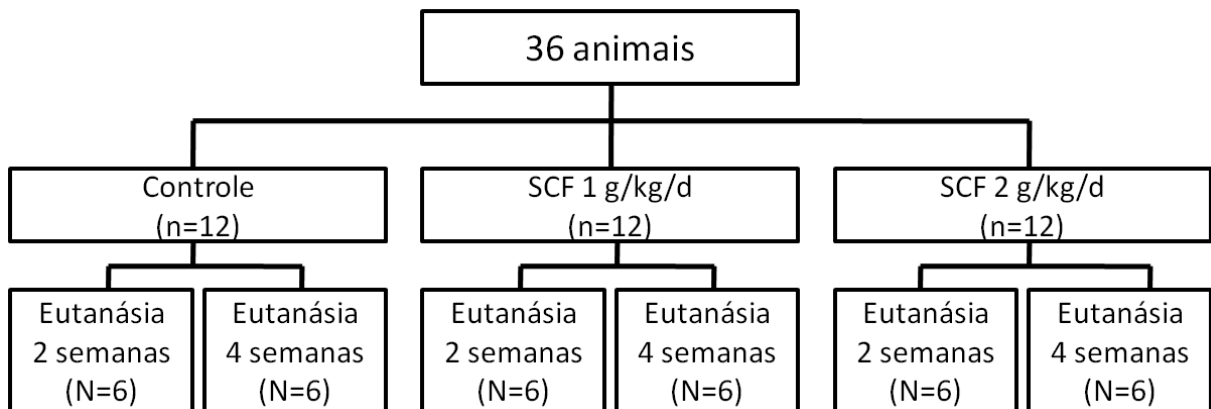


Figura 2- Subdivisão dos grupos experimentais

4.6 - Coleta das amostras

Duas ou quatro semanas após a intervenção com as substâncias propostas, os animais pertencentes a cada grupo foram anestesiados com a mesma técnica descrita anteriormente. A cavidade abdominal foi reaberta, removendo-se todo o cólon submetido à irrigação com as soluções de intervenção nas concentrações propostas. O espécime extirpado foi aberto longitudinalmente pela borda antimesentérica, lavado com SF a 37°C e dividido longitudinalmente em dois fragmentos com quatro centímetros de comprimento. Os fragmentos longitudinais foram sempre retirados de uma distância padronizada e localizada dois centímetros acima da placa de Peyer. Os dois fragmentos foram fixados com alfinetes em fragmento de cortiça com a superfície mucosa voltada para cima, e encaminhados para estudo histológico e histoquímico.

4.7 - Confeção dos blocos de parafina e lâminas

Os fragmentos removidos foram submersos em solução tamponada de formaldeído a 10% (Sigma, St. Louis, MO, USA) por 24 horas. Após o período de fixação, os espécimes foram desidratados em cinco banhos de álcool em concentrações crescentes durando uma hora cada banho. Em seguida, foram

submetidos a três banhos sucessivos de xilol durando uma hora cada. Terminada esta etapa foram submetidos a três banhos de parafina durando uma hora cada banho à temperatura constante de 60°C. Terminada a impregnação pela parafina os espécimes foram incluídos em blocos de parafina. De cada bloco dois cortes histológicos com 5 µm de espessura foram realizados para montagem de lâminas.

Para a confecção das lâminas, independente da técnica de coloração, os cortes foram desparafinados em dois banhos sucessivos de xilol, durando dez minutos cada banho, seguidos de alcoolização em três banhos sucessivos de álcool absoluto por três minutos e hidratação com água destilada por 3 minutos.

Todas as lâminas foram confeccionadas por um mesmo técnico e analisadas com microscópio óptico comum (Nikon Eclipse DS-50³) com magnificação final de 200x, por patologista experiente em doenças colorretais que desconhecia os objetivos do estudo.

4.8 - Técnicas de Coloração

As lâminas obtidas dos animais do grupo controle e experimento foram submetidas a três técnicas de coloração: Hematoxilina-Eosina (HE), Alcian Blue (AB) e Periódico Ácido de Schiff (PAS). A técnica da HE teve por objetivo avaliar as alterações histológicas que permitam o diagnóstico de CE, enquanto as técnicas do PAS e AB tiveram o objetivo de identificar a expressão tecidual das mucinas neutras e ácidas, respectivamente. Todas as lâminas possuíam uma das extremidades fosca onde anotou-se o número do animal, o grupo experimental a que pertencia e a técnica de coloração adotada.

³ Nikon Inc., Osaka, Japan.

4.8.1 - Hematoxilina-Eosina (HE)

Na técnica da HE, após preparo conforme descrito acima, as lâminas foram expostas à hematoxilina de Harris filtrada em temperatura ambiente por um minuto, seguido de lavagem contínua e cuidadosa com água corrente e, posteriormente água destilada por três minutos. Em seguida, foram expostas ao corante eosina por dois minutos a temperatura ambiente. Transcorrido esse período, foram inicialmente lavadas em água corrente e posteriormente em água destilada por mais dois minutos em temperatura ambiente. Terminada a lavagem, foram desidratadas em três banhos sucessivos de álcool absoluto, e diafanizadas em xilol, seguida de montagem com resina e lamínulas.

4.8.2 - Alcian Blue (AB)

Os cortes histológicos foram preparados com a mesma técnica descrita anteriormente, para serem expostas ao corante azul de Alcian (AB) por 30 minutos a temperatura ambiente. Terminado esta etapa os fragmentos dispostos sobre as lâminas foram expostos ao ácido acético a 3% em uma única passagem a temperatura ambiente. Após a descoloração pelo ácido acético as lâminas foram lavadas contínua e cuidadosamente com água corrente por cinco minutos a temperatura ambiente e desidratada em três banhos sucessivos de álcool absoluto. Terminada a desidratação foram diafanizadas em três banhos de xilol. As lâminas já coradas foram secas por três minutos e terminado esse tempo, montadas com resina e lamínula.

4.8.3 - Periódico Ácido de Schiff (PAS)

Os cortes histológicos foram preparados com a mesma técnica descrita anteriormente, para serem expostas ao ácido periódico por um período de 60 minutos em temperatura ambiente. Terminada a coloração realizou-se a lavagem contínua e cuidadosa inicialmente com água corrente e posteriormente com água destilada por três minutos à temperatura ambiente. Terminada a lavagem foram expostas ao reativo de Schiff por período de 60 minutos em temperatura ambiente e, novamente lavada em água corrente e destilada por cinco minutos. Terminada a lavagem, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por dois minutos à temperatura ambiente. Após a contra-coloração foram novamente lavadas em água corrente e água destilada por três minutos e desidratadas, em três banhos sucessivos de álcool absoluto, durando três minutos cada banho, e diafanizadas em três banhos de xilol. Após diafanização foram montadas com resina e lamínulas.

4.9 - Análise histológica

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Eclipse DS-50i, Nikon Inc., Osaka, Japan), por patologista experiente em DII, que desconhecia a qual grupo do estudo o material pertencia. Foram realizadas fotografias utilizando sistema digital de videocaptura (DS-Fi-50; Nikon Inc, Osaka, Japan) previamente acoplado ao microscópio. Para o diagnóstico de CE foram considerados os seguintes parâmetros histológicos: perda de superfície epitelial (ulcerações epiteliais), abscessos em criptas cólicas, intensidade do infiltrado inflamatório e presença de fibrose epitelial, atribuindo de zero a três cruces (0 = ausente; + = leve; ++ = moderada e +++ = grave) para cada variável, que quando somadas formaram o escore de graduação inflamatória para a

presença de colite. A leitura das lâminas foi realizada com magnificação final de 200x e sempre feita em local onde existissem pelo menos três glândulas cólicas íntegras e contíguas. Adotou-se como resultado final para o escore inflamatório de cada animal, a média obtida após a leitura de três campos distintos. As lâminas que não permitiram preencher tal critério foram descartadas da análise estatística.

4.10 - Quantificação do conteúdo de mucinas neutras e ácidas por Análise de Imagem Assistida por Computador

Para quantificação do conteúdo tecidual de mucinas utilizou-se o sistema de análise de imagens NIS-Elements[®] (Nikon Inc., Japan), versão 3.0, que utiliza a imagem capturada por câmera previamente acoplada ao microscópio óptico. O programa através de histogramas de cor no sistema RGB (red, green, blue) determinava a intensidade da coloração escolhida (azul claro na identificação das mucinas ácidas quando se coram as lâminas pelo AB e magenta na identificação das mucinas neutras quando se coram as lâminas pelo PAS) em número de pixels por cada campo selecionado, transformando o conteúdo final de mucinas neutras e ácidas encontradas em valores percentuais por campo (%/campo). Da mesma forma a leitura foi feita em campo focal que apresentasse três glândulas íntegras e contíguas. O valor final considerado para o conteúdo de mucina neutra e ácida em cada animal foi à média obtida após a leitura de três campos histológicos.

4.11 - Técnica imunoistoquímica para Mieloperoxidase (MPO)

Para realização da técnica imunoistoquímica para pesquisa da enzima MPO nos blocos previamente confeccionados, foram realizados cortes histológicos, com 5µm de espessura em todas as amostras colhidas dos animais do grupo experimento

(segmentos sem o trânsito fecal) nos três grupos experimentais propostos. Os cortes foram dispostos em lâminas com margens foscas previamente identificadas com o grupo experimental, subgrupo e o número do animal. As lâminas foram desparafinadas, reidratadas em álcool em concentrações decrescentes (absoluto, 95%, 80% e 50%) e lavadas em água destilada. Depois da lavagem, as lâminas foram submersas em tampão fosfato (PBS) (0,05 M, pH 7,2) por 10 minutos e secas com papel filtro. Realizou-se bloqueio da atividade de peroxidases endógenas com H₂O₂ a 3% em câmara umidificada, à temperatura ambiente por 10 minutos, seguida por outra lavagem com PBS por mais 10 minutos. Realizou-se a recuperação antigênica em recipientes especiais contendo citrato de sódio 10 mM (pH 6,0) em um banho de água a 95°C por 45 minutos. A seguir, as lâminas foram deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos e, novamente, lavadas em PBS por cinco minutos. Para a avaliação da expressão tecidual da MPO utilizou-se anticorpo primário monoclonal anti-MPO⁴ que reconhece a proteína murina diluído à 1:50 em albumina bovina (1%). As lâminas foram cobertas com 100 µL das soluções contendo os anticorpos primários e mantidas em refrigeração a 4°C por 24 horas. Concluída esta etapa foram então lavadas com PBS, incubadas com anticorpo secundário e submetidas ao complexo de coloração estreptavidina-biotinaperoxidase por 45 minutos, preparado com uma diluição de 1:100 em PBS. As lâminas foram desenvolvidas usando preparação recém preparada contendo tetrahidrocloreto diaminobenzidina (DAB, 10 mg em 10 ml de PBS com 3 ml H₂O₂), que foi gotejada sobre as lâminas e incubada por três minutos. Finda a contra coloração, foram desidratadas por imersão em soluções crescentes de etanol (50%, 80%, 95% e 100%) e xileno. Finalmente, as lâminas foram montadas, rotuladas e

⁴ Dako Agilent Technologies, New York (NY) USA

mantidas em posição horizontal por 24 horas. A imunocoloração foi considerada positiva quando se detectava coloração acastanhada difusamente presente, com pontos de intensidade variável e distribuição homogênea nos neutrófilos. Como recomenda o fabricante, o controle negativo para a imunocoloração foi realizado sem a adição do anticorpo primário e o positivo em espécime de apêndice vermiforme com apendicite aguda. A semelhança do que foi realizado para a quantificação das mucinas neutras e ácidas, o conteúdo tecidual de MPO foi mensurado por morfometria computadorizada.

4.12 - Análise estatística

O conteúdo tecidual de mucinas neutras e ácidas foi descrito segundo o valor médio encontrado com o respectivo desvio padrão. A comparação entre os grupos foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney e a variância pelo teste ANOVA. Em ambos os testes adotou-se nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), utilizando-se o programa Biostat[®] versão 5.0. Os valores significantes à 5% foram marcados com um asterisco (*) enquanto os valores com significância de 1% com dois (**).

5. RESULTADOS

A Figura 3A mostra segmento obtido do cólon irrigado com SF 0,9% por quatro semanas, enquanto a Figura 3B o cólon irrigado com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia pelo mesmo período de tempo. Verifica-se que nos animais do grupo controle existe nítida perda epitelial, desarranjo na arquitetura e no alinhamento das glândulas cólicas, enquanto nos animais submetidos à intervenção com SCF 2,0 g/kg/dia, a superfície epitelial encontra-se preservada, as criptas intestinais apresentam-se alinhadas, com padrão de distribuição normal e preservação da população de células caliciformes. É possível observar uma fina camada de SCF recobrimdo a superfície epitelial da mucosa cólica traduzida histologicamente por um aumento na intensidade de coloração sobre a porção luminal das células epiteliais.

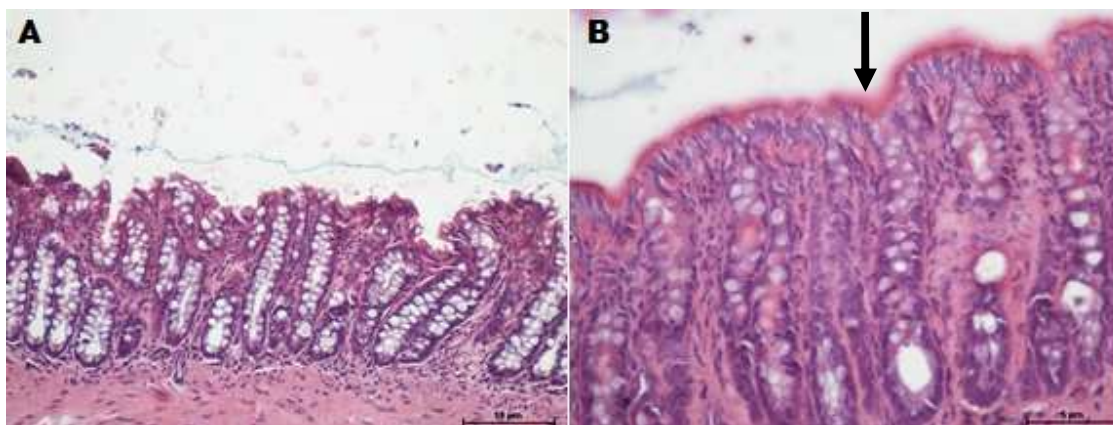


Figura 3- A: Mucosa do cólon desprovido de trânsito após irrigação com SF 0,9% por quatro semanas (HE-100x). **B:** Mucosa do cólon desprovido de trânsito após irrigação com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia por quatro semanas. Camada de SCF recobrimdo a superfície mucosa (seta preta) (HE-200x).

A Figura 4 mostra os escores inflamatórios encontrados nos segmentos desprovidos de trânsito fecal após a intervenção com SF 0,9%, SCF 1,0 g/kg/dia e 2,0 g/kg/dia, por duas e quatro semanas. Os resultados mostram que a intervenção com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia no cólon desprovido de trânsito reduz o escore inflamatório após quatro semanas de irrigação quando comparado aos animais do grupo controle ($p = 0,03$).

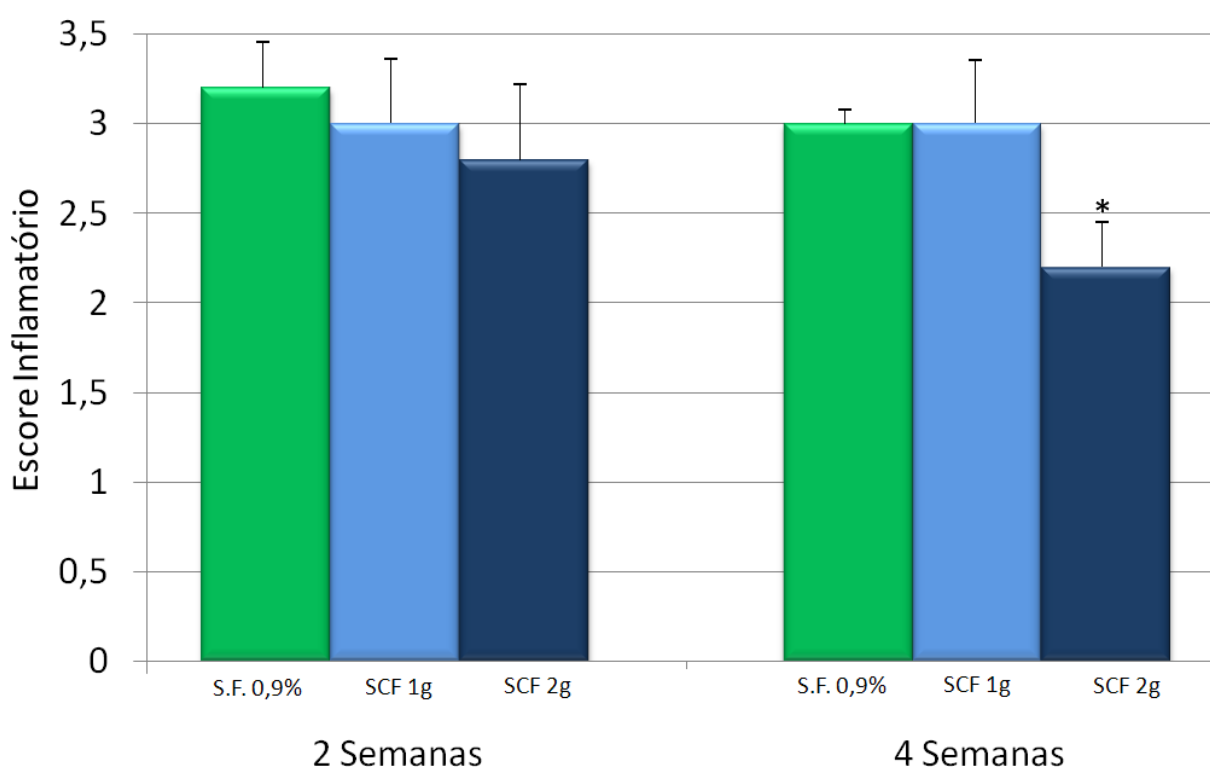


Figura 4 – Escore inflamatório no cólon sem trânsito dos animais dos grupos controle (SF 0,9%), SCF1 (SCF 1,0 g/kg/dia) e SCF2 (2,0 g/kg/dia) por duas e quatro semanas.

* = $p < 0,05$ (SCF2 x Controle). Teste de Mann-Whitney.

A Figura 5 mostra o conteúdo tecidual de MPO encontrados nos segmentos desprovidos de trânsito fecal após a intervenção com SF 0,9%, SCF 1,0 g/kg/dia e 2,0

g/kg/dia, por duas e quatro semanas. Os resultados mostram que a intervenção com SCF por duas e quatro semanas independente da concentração utilizada, reduz os níveis de infiltração neutrofílica quando comparado aos animais do grupo controle (p = 0,001).

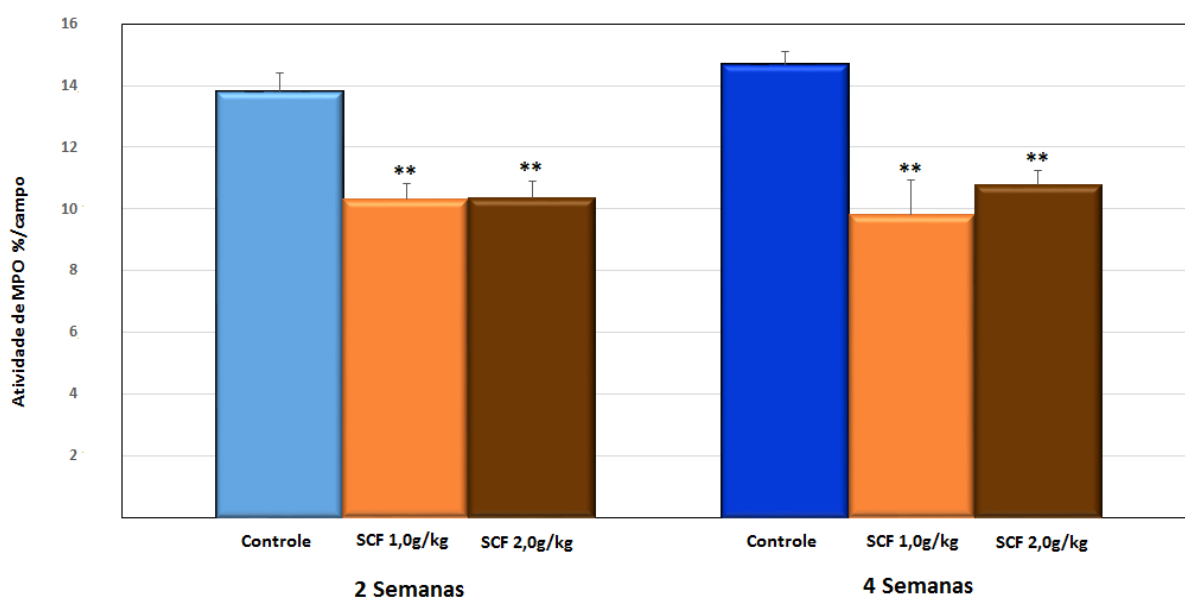


Figura 5 – Conteúdo de MPO no cólon sem trânsito dos animais dos grupos controle (SF 0,9%), SCF1 (SCF 1,0 g/kg/dia) e SCF2 (2,0 g/kg/dia) por duas e quatro semanas.

** = p<0,001 (SCF2 x Controle). Teste de Mann-Whitney.

A Figura 6A mostra a expressão tecidual de mucinas ácidas no cólon irrigado com SF 0,9% por quatro semanas, enquanto a Figura 6B mostra o cólon irrigado com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia pelo mesmo período de tempo. Verifica-se que nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9% existe redução no conteúdo de

mucinas nas células caliciformes, desarranjo na arquitetura e alinhamento das glândulas cólicas. Nos animais submetidos à intervenção com SCF 2,0 g/kg/dia a superfície epitelial encontra-se preservada e as criptas intestinais apresentam-se alinhadas, com padrão de distribuição normal e preservação no conteúdo de mucinas ácidas presentes nas células caliciformes.

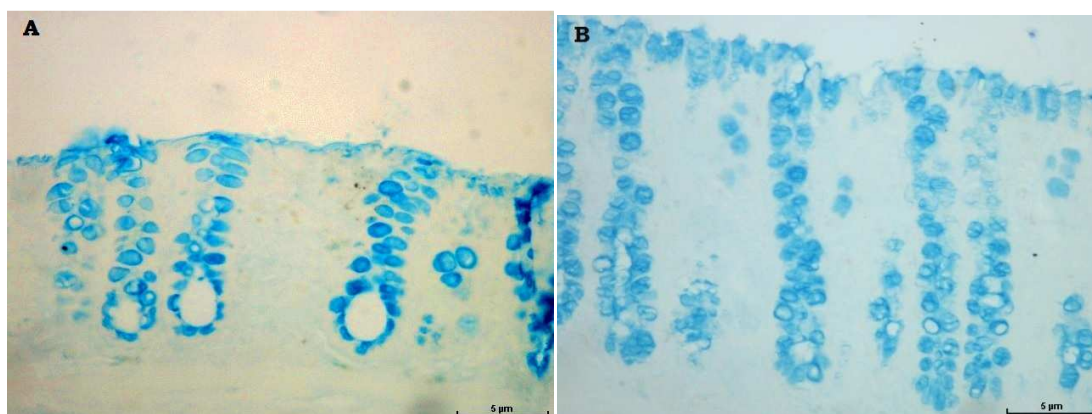


Figura 6- A: Expressão tecidual de mucinas ácidas no cólon desprovido de trânsito após irrigação com SF 0,9% por quatro semanas (AB-100x). **B:** Expressão tecidual de mucinas ácidas no cólon desprovido de trânsito após intervenção com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia por quatro semanas (AB-200x).

A Figura 7 mostra o conteúdo de mucinas ácidas encontrados nos segmentos desprovidos de trânsito fecal após a intervenção com SF 0,9%, SCF 1,0 g/kg/dia e 2,0 g/kg/dia, por duas e quatro semanas. Os resultados mostram que a intervenção com SCF, na concentração de 1,0 g/kg/dia e 2,0 g/kg/dia no cólon desprovido de trânsito, permitiu conteúdo significativamente maior de mucinas ácidas após duas e quatro semanas de irrigação quando comparado aos animais do grupo controle. O maior

conteúdo das mucinas ácidas encontrado é diretamente proporcional à dose de SCF administrada ($p < 0,01$).

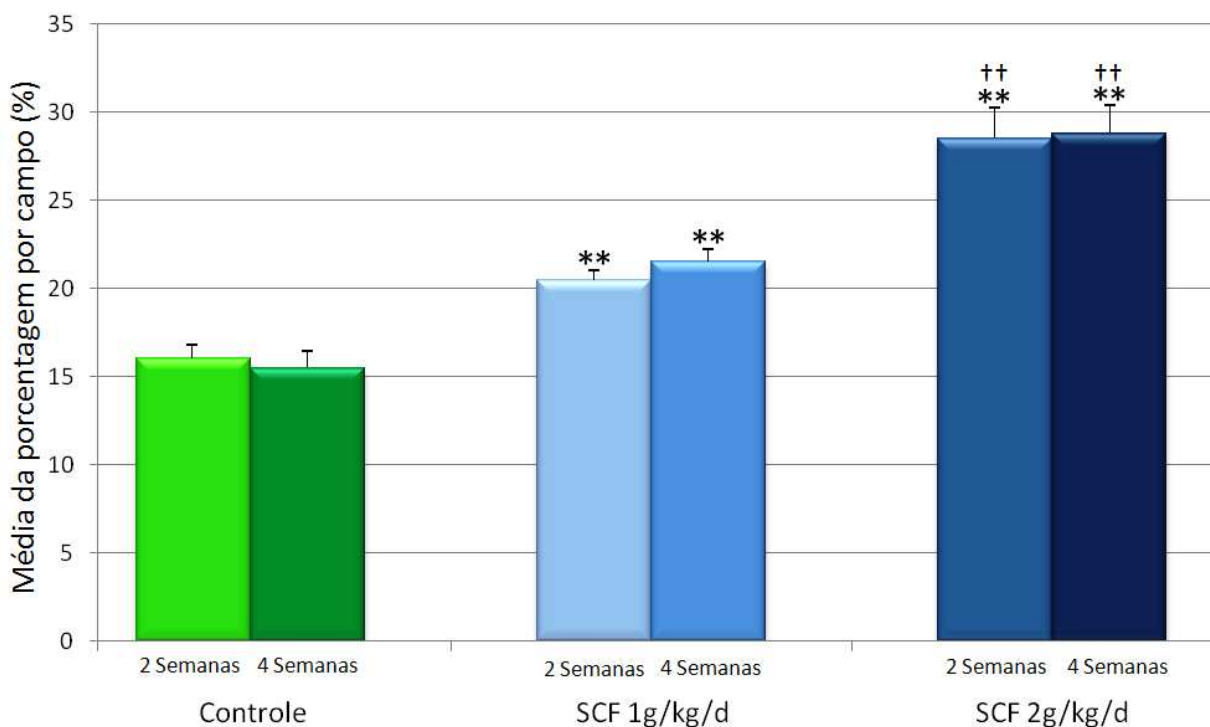


Figura 7 – Conteúdo tecidual de mucinas ácidas nos animais dos grupos controle, SCF1 e SCF2 submetidos a intervenção diária com SCF por duas e quatro semanas. ** = $p < 0,01$ (SCF1 × Controle; SCF2 × Controle); †† = $p < 0,01$ (SCF1 × SCF2).

A Figura 8A mostra a expressão tecidual de mucinas neutras no cólon irrigado com SF 0,9% por quatro semanas, enquanto a Figura 8B mostra o cólon irrigado com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia pelo mesmo período de tempo. Verifica-se que nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9% existe redução global no conteúdo de mucinas, mais intenso nas células caliciformes, além de desarranjo no alinhamento das glândulas cólicas. Nos animais submetidos à intervenção com SCF 2,0 g/kg/dia a

superfície epitelial encontra-se preservada, as criptas intestinais apresentam-se alinhadas, com padrão de distribuição normal e preservação no conteúdo de mucinas neutras.

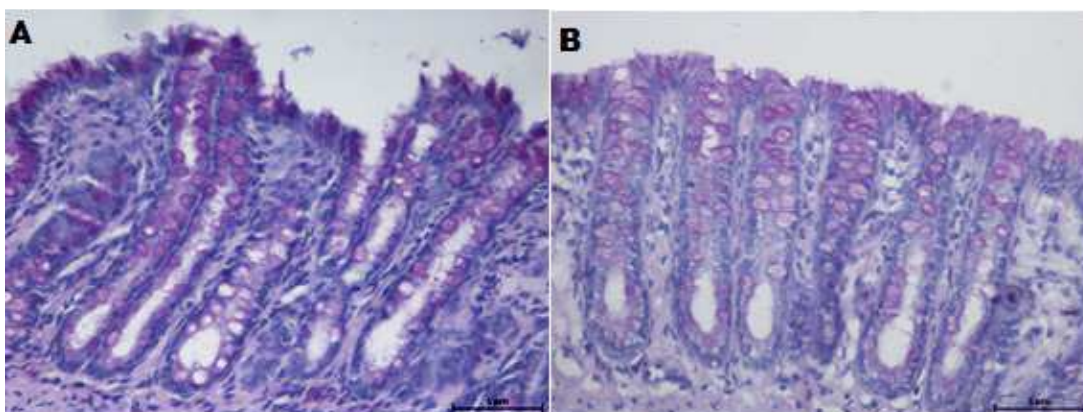


Figura 8- A: Expressão tecidual de mucinas neutras no cólon desprovido de trânsito após irrigação com SF 0,9% por quatro semanas (PAS-200x). **B:** Expressão tecidual de mucinas neutras no cólon desprovido de trânsito após intervenção com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia por quatro semanas (PAS-200x).

A Figura 9 mostra o conteúdo de mucinas neutras encontrados nos segmentos desprovidos de trânsito fecal após a intervenção com SF 0,9%, SCF 1,0 g/kg/dia e 2,0 g/kg/dia, por duas e quatro semanas. Os resultados mostram que a intervenção com SCF, na concentração de 1,0 g/kg/dia e 2,0 g/kg/dia no cólon desprovido de trânsito, permitiu conteúdo significativamente maior de mucinas ácidas após duas e quatro semanas de irrigação quando comparado aos animais do grupo controle ($p < 0,01$).

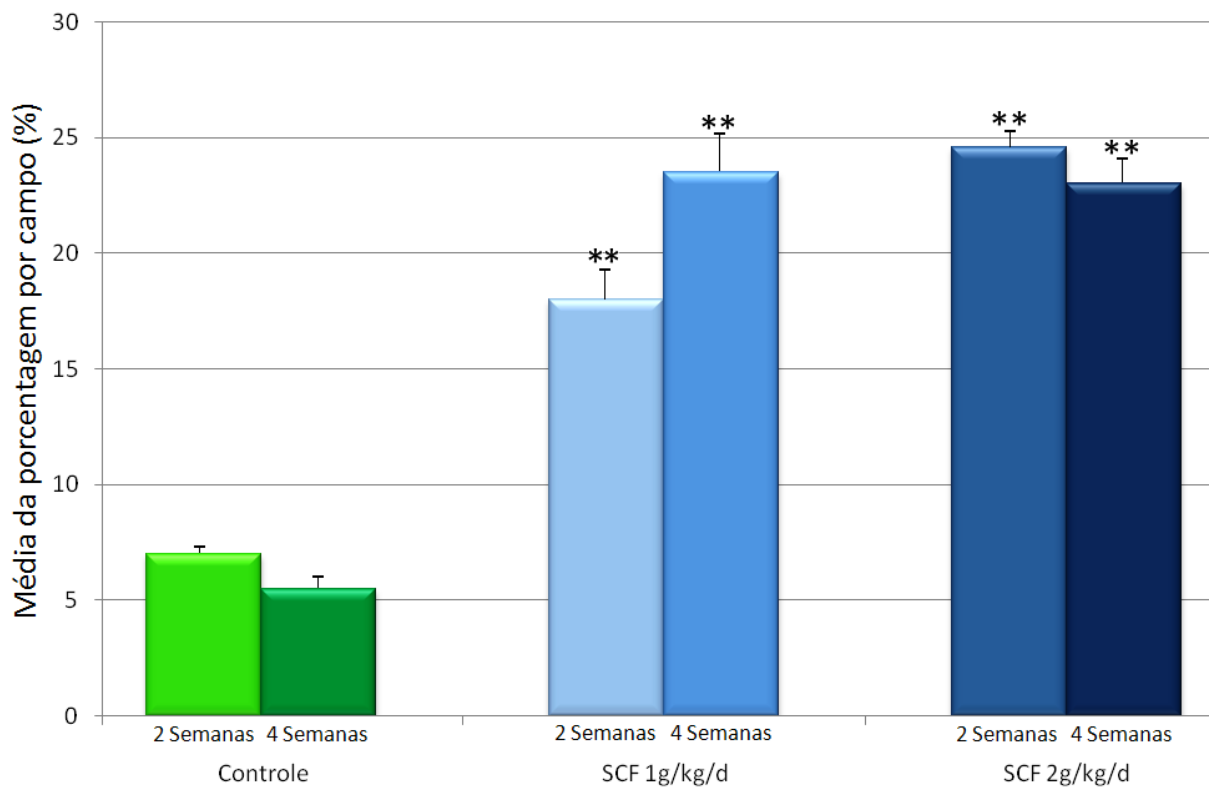


Figura 9 – Conteúdo tecidual de mucinas neutras nos animais dos grupos controle, SCF1 e SCF2 submetidos a intervenção diária com SCF por duas e quatro semanas. ** = $p < 0,01$ (SCF1 × Controle; SCF2 × Controle).

A Tabela 1 mostra a variação no conteúdo de mucinas neutras e ácidas segundo a concentração de SCF utilizada e ao tempo de uso do SCF, em relação ao grupo controle. O conteúdo das mucinas neutras e ácidas nos grupos experimentais mostrou-se superior ao grupo controle, nas concentrações de 1,0 g/kg/d e 2,0 g/kg/d de SCF, e em ambos os períodos de intervenção avaliados ($p < 0,01$).

Tabela 1 – Variação do conteúdo de mucinas neutras e ácidas nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9%, SCF1 e SCF2 após duas e quatro semanas.

Conteúdo tecidual (%/campo)						
(Média ± Desvio Padrão)						
	SF 0,9%		SCF 1,0 g/kg/d		SCF 2,0 g/kg/d	
	Duas semanas	Quatro semanas	Duas semanas	Quatro semanas	Duas semanas	Quatro semanas
Neutras	6,67±1,61	5,54±1,59	21,44±2,93**	23,42±6,61**	24,44±4,59**	21,76±4,22**
Ácidas	15,91±4,32	15,53±3,61	20,36±2,91**	21,33±3,76**	28,99±6,65**	29,06±7,00**

Teste ANOVA. SF 0,9% = solução salina. SCF1 = SCF 1,0 g/kg/dia; SCF2 = SCF 2,0 g/kg/dia; ** significativo ($p < 0.01$) – SCF1 e SCF2 x SF 0,9%

5. DISCUSSÃO

É inquestionável a importância da mucosa na função de barreira no cólon, tendo o muco papel primordial, como primeira linha na prevenção de lesões epiteliais (Corfield *et al.*, 2000; Pravda, 2005; Gaudier e Hoebler, 2006; Gaudier *et al.*, 2009). O muco é composto predominantemente pela glicoproteína mucina, sendo produzido e secretado pelas células caliciformes nas criptas intestinais (Finnie *et al.*, 1995; Deplancke e Gaskins, 2001; Pravda, 2005; Swidsinski *et al.*, 2007; Gaudier *et al.*, 2009). Por ser sua produção dependente de adequado fornecimento de substrato energético pela luz intestinal, condições que alterem o trânsito intestinal podem promover mudanças na produção e composição das mucinas (Augenlicht *et al.*, 2003; Willemsen *et al.*, 2003; Gaudier *et al.*, 2004; Gaudier *et al.*, 2009), enquanto que a infusão de soluções ricas em AGCC é capaz de reverter, ao menos parcialmente, essas alterações (Roediger, 1980; Roediger e Rae, 1982; Agarwal e Schimmel, 1989; Frankel *et al.*, 1994; Velasquez *et al.*, 1997; Nassri *et al.*, 2008).

Contudo, as bases fisiopatológicas para o desenvolvimento da CE ainda não se encontram totalmente esclarecidas, sendo os AGCC apenas um dos fatores envolvidos nesse processo (Wong *et al.*, 2006; Gaudier *et al.*, 2009), uma vez que os mecanismos moleculares que ocasionam a lesão epitelial ainda não foram totalmente elucidados (Martinez, Nonose *et al.*, 2010). Recentemente tem-se dado importância crescente ao papel desempenhado pelos RLO nos mecanismos envolvidos na lesão da mucosa exclusiva de trânsito intestinal (Martinez, Nonose *et al.*, 2010).

Com o objetivo de identificar opções terapêuticas para a CE, alguns estudos experimentais avaliaram a administração tópica de substâncias com efeito antioxidante

em relação às alterações encontradas na CE. O uso de enemas com 5-ASA (*ácido 5-aminossalicílico*), um potente antioxidante, foi capaz de reduzir os níveis de estresse oxidativo tecidual e melhorar o processo inflamatório na mucosa exclusiva de trânsito fecal (Caltabiano *et al.*, 2011).

Considerando os bons resultados apresentados, o custo e os efeitos colaterais em longo prazo inerentes ao 5-ASA, outras drogas logo foram estudadas como opções terapêuticas mais baratas. Recentemente, estudo avaliou a eficácia da n-acetilcisteína em modelo de CE. A substância já é utilizada no tratamento de outras doenças inflamatórias e tem como mecanismo de ação a capacidade de melhorar o processo inflamatório tecidual por remover RLO formados pelas células epiteliais exclusas de trânsito (Almeida *et al.*, 2012). O estudo mostrou que a melhora do processo inflamatório estava diretamente relacionada à diminuição dos níveis de estresse oxidativo (Almeida *et al.*, 2012).

Da mesma forma, mostrou-se experimentalmente que a intervenção do cólon excluso com clisteres contendo extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (erva mate), substância com reconhecido efeito antioxidante, foi seguida de importante redução nos níveis de dano oxidativo tecidual após irrigação diária por duas ou quatro semanas (Cunha *et al.*, 2011).

O SCF foi desenvolvido inicialmente para o tratamento de lesões inflamatórias gastroduodenais, como um agente citoprotetor tópico com alta afinidade pela mucosa gastrointestinal, principalmente em epitélios lesados, formando um complexo com o muco extracelular, agindo como barreira protetora na superfície mucosa (Nagashima, 1981a; Nakazawa *et al.*, 1981; Jensen e Jensen, 1992). Apresenta mecanismo de ação multifatorial, alguns dos quais já elucidados (Okabe *et al.*, 1983). A formação de uma

barreira mecânica sobre a mucosa do trato digestivo foi inicialmente proposto como seu principal mecanismo de ação. Posteriormente constatou-se que o SCF apresenta outros mecanismos de ação, atuando como substância citoprotetora por aumentar a produção de muco, diminuir sua degradação, aumentar a secreção de bicarbonato, incrementar a síntese de prostaglandina, diminuir a difusão ácida, aumentar o fluxo sanguíneo mucoso, acelerar a renovação das células epiteliais e, mais recentemente, pelo seu destacado efeito antioxidante (Nakazawa *et al.*, 1981; Guslandi *et al.*, 1983; Guslandi, 1985; Slomiany, Takagi *et al.*, 1985; Konturek *et al.*, 1986; Shea-Donohue *et al.*, 1986; Tarnawski *et al.*, 1986; Crampton *et al.*, 1987; Crampton *et al.*, 1988; Nagashima *et al.*, 1988; Slomiany *et al.*, 1989; Copeman *et al.*, 1994; Banerjee *et al.*, 1996; Wada *et al.*, 1997). Esse último mecanismo de ação torna interessante a avaliação dos efeitos do SCF na CE, enfermidade recentemente relacionada a maior produção de RLO pelas células epiteliais com modificações no metabolismo energético consequente à carência do suprimento adequado de AGCC, ocasionado pela derivação do trânsito intestinal (Pravda, 2005, Martinez, Ribeiro *et al.*, 2010)

A utilização do SCF apresenta outras vantagens adicionais. A substância tem mínima absorção gastrointestinal, exerce seu efeito topicamente o que favorece seu uso como clister (Odeh e Oliven, 2001). Além disso, o SCF apresenta efeitos colaterais infrequentes, com incidência menor que 5% quando administrado por via oral, sendo os mais comuns: constipação, náusea, prurido, sonolência e cefaléia (Marks, 1991). Existem poucos casos relatados na literatura da formação de bezoares secundário ao uso crônico de SCF administrado por via oral (Guy e Ollagnier, 1999). Assim sendo, é possível que a aplicação da droga por via retal possa favorecer a formação de concreções no segmento de cólon excluído de trânsito fecal, de forma semelhante à

relatada após o uso de sulfato de bário em exames contrastados (Hariri *et al.*, 1983). Apesar dessa possibilidade teórica, não existem relatos de formação de bezoares retais após a administração do SCF.

Recentemente, estudo experimental avaliou a aplicação de enemas contendo SCF no cólon excluso em um modelo experimental de CE. Os autores demonstraram que a aplicação de enemas com SCF diminuía a perda epitelial mucosa cólica com menor formação de úlceras, além de reduzir o infiltrado inflamatório encontrado na mucosa (Pereira *et al.*, 2013). Os autores avaliaram o infiltrado inflamatório apenas por parâmetros histológicos, que são sujeitos a subjetividade de interpretação. Com o intuito de assegurar maior confiabilidade quanto ao grau de inflamação da mucosa cólica desprovida de trânsito, no presente estudo resolvemos analisar o grau de inflamação da parede cólica associando ao estudo histopatológico tradicional a pesquisa do infiltrado neutrofílico pela dosagem tecidual da enzima MPO. A MPO é uma enzima presente quase que exclusivamente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, sendo o marcador mais utilizado para avaliar a presença de infiltrado neutrofílico tecidual. A dosagem tecidual da MPO pode ser feita com várias técnicas, sendo as mais utilizadas a detecção tecidual por métodos bioquímicos, técnica imunoenzimática e, mais recentemente por estudo imunoistoquímico (Bradley *et al.*, 1982). No presente estudo optamos por avaliar o conteúdo tecidual da enzima MPO por imunoistoquímica, por estarmos familiarizados com o método. A quantificação tecidual de MPO foi feita por meio de morfometria computadorizada pelos mesmos motivos.

Estudos recentes mostraram que o cólon excluso de trânsito fecal apresenta importante redução do conteúdo de mucinas neutras e, particularmente, das mucinas ácidas (Nonose, 2009; Nonose *et al.*, 2009). Quando se considera que a camada de

muco que recobre o epitélio cólico, constituída essencialmente de mucinas, representa a primeira linha de defesa epitelial, depreende-se que qualquer redução do conteúdo tecidual de mucinas torna o epitélio intestinal mais vulnerável à agressão de antígenos e bactérias existentes no lúmen intestinal (Nonose *et al.*, 2009). Por outro lado, o uso de qualquer substância que preserve ou estimule a produção de mucinas pelo cólon excluso pode ser importante na manutenção da integridade dessa barreira epitelial morfofuncional. Apesar de já ter sido demonstrado que o SCF além de exercer um efeito mecânico de proteção ao epitélio intestinal, é um importante indutor da produção de muco pela mucosa gastrointestinal, do melhor do nosso conhecimento, os efeitos do SCF na produção de mucinas na mucosa exclusa do trânsito fecal ainda não foram estudados. Assim sendo, julgamos oportuno estudar os efeitos do SCF no conteúdo de mucinas neutras e ácidas num modelo experimental de CE. Essa avaliação torna-se interessante quando consideramos que dentre as principais vantagens do SCF destaca-se seu baixo custo, fácil administração, e pequenos efeitos colaterais quando comparado a outras substâncias (Marks *et al.*, 1980; Kuwayama, 1991).

Com o objetivo de sermos precisos na determinação do conteúdo tecidual dos subtipos de mucinas no cólon excluso optamos por quantificá-las utilizando um sistema de análise de imagem assistida por computador. Desse modo pudemos avaliar numericamente o conteúdo tecidual das mucinas neutras e ácidas no cólon excluso permitindo comparar objetivamente os efeitos do SCF na produção desses subtipos de mucinas na mucosa cólica. Com o objetivo de verificar se os efeitos do SCF eram dependentes da concentração utilizada, elaboramos dois grupos experimentais utilizando concentrações distintas (1,0 g/kg/dia e 2,0 g/kg/dia). Preocupados em avaliar a influência do tempo de aplicação da substância no conteúdo de mucinas, aplicamos a

substância por períodos de tempo diferentes (duas e quatro semanas). Desse modo pudemos avaliar se os efeitos do SCF eram dose-dependentes ou tempo-dependentes.

Os resultados encontrados mostraram que a aplicação diária de clisteres com SCF nos segmentos excluídos de trânsito fecal preservava a barreira mucosa do epitélio cólico e melhorava do infiltrado inflamatório. Quando analisamos os resultados histológicos em relação ao infiltrado inflamatório constatamos que o único grupo que atingiu significância estatística em relação ao controle foi aquele em que utilizamos maiores concentração de SCF por maior período de tempo (quatro semanas). Uma possível justificativa para esse achado seria o fato de que o intervalo de tempo de duas semanas possa ser insuficiente para o SCF restabelecer a integridade mucosa, dificultando a infiltração bacteriana. Entretanto, os resultados encontrados sugerem que a substância seja eficaz, uma vez que estudos anteriores demonstraram que o processo inflamatório agrava-se com o tempo de exclusão fecal, bem como a redução da camada de muco no epitélio desprovido de trânsito é mais evidente (Nonose, 2009; Nonose *et al.*, 2009; Martinez, Nonose *et al.*, 2010). No presente estudo foi justamente neste período onde a aplicação de enemas com SCF apresentou os melhores resultados. Novas pesquisas utilizando doses ainda maiores de SCF e períodos de intervenção mais prolongados podem ser úteis na confirmação do efeito dose-tempo dependência, para que se possa recomendar seu uso contínuo no tratamento da CE.

Deve-se ressaltar que é ainda necessário avaliar se essa aplicação mais prolongada do SCF e com concentração mais elevada poderia aumentar a formação de bezoares ou desencadear outros efeitos colaterais, o que limitaria a sua utilização. No entanto, estudos que acompanharam doentes em uso crônico de SCF - até um ano - administrado por via oral, não identificaram efeitos colaterais importantes em pacientes

com função renal normal (Blum *et al.*, 1990). Neste estudo, quando analisamos os 24 animais submetidos a intervenção com diferentes concentrações de SCF, durante a abertura do cólon excluso para o estudo histológico, nenhum deles apresentava formação de bezoares. Em todos os animais era possível verificar macroscopicamente uma fina camada esbranquiçada recobrimdo toda a mucosa cólica exclusa de trânsito. Esses achados sugerem que o uso do SCF possa ser seguro também em seres humanos, embora ainda sejam desconhecidos os riscos em longo prazo em doentes com CE.

Os resultados encontrados com as análises mostraram que a melhora histológica após a aplicação do SCF parece ser dose-dependente e tempo-dependente uma vez que encontramos melhora da inflamação tecidual avaliada pelo estudo histológico nos animais submetidos a intervenção com concentrações mais elevadas e por maior período de tempo.

Quando analisamos a presença de infiltrado neutrofílico pela dosagem do conteúdo tecidual de MPO verificamos que os animais submetidos a intervenção com SCF já apresentavam menor infiltrado neutrofílico após duas semanas de intervenção, mostrando que apesar de não existir melhora histológica a ação da substância já ocorria após duas semanas. É possível que a camada de SCF formada sobre a superfície mucosa possa proteger mecanicamente o epitélio dificultando a migração de antígenos e bactérias existentes na luz intestinal para o interior da parede cólica, diminuindo com isso a infiltração neutrofílica. Da mesma forma não é possível afastar a possibilidade de que o SCF possa ter efeitos bactericidas reduzindo a população bacteriana presente na luz do cólon excluso e fazendo com que a menor translocação bacteriana possa estar relacionada ao menor infiltrado inflamatório neutrofílico

encontrado. Entretanto, essa possibilidade deve ser ainda confirmada por estudos adicionais que avaliem a população microbiota da luz cólica comparando animais que sofreram ou não a intervenção com SCF. Apesar de todas essas ponderações os resultados encontrados no presente estudo sugerem que o menor infiltrado neutrofílico após a aplicação do SCF não tem relação com a concentração utilizada nem com o tempo de intervenção, mostrando a eficácia da substância no controle da infiltração neutrofílica tecidual.

Com o intuito de avaliar a ação do SCF no conteúdo tecidual de mucinas neutras identificadas pela coloração do PAS, verificamos que havia maior conteúdo tecidual de mucinas neutras nos animais submetidos a irrigação com SCF, independente da dose empregada ou do período de intervenção utilizado. Esses achados sugerem que o SCF apresenta papel importante na manutenção do conteúdo tecidual das mucinas neutras nas glândulas da mucosa cólica exclusiva de trânsito fecal. O mecanismo exato pelo qual o SCF aumenta a produção de mucinas neutras ainda necessita estudos complementares. Entretanto, acreditar que o SCF interfira no conteúdo de mucinas neutras apenas pela ação mecânica sobre a mucosa cólica aderindo a sua superfície e impedindo a migração dos patógenos da luz do cólon não justificaria todas as alterações encontradas neste e em outros estudos (Martinez *et al.*, 2008; Nonose *et al.*, 2009). Apesar do inadequado suprimento de AGCC secundário à derivação intestinal poder ser responsabilizada por uma menor expressão de genes relacionados a produção de muco, é necessário lembrar que o segmento exclusivo de trânsito apresenta menor número de bactérias, substâncias tóxicas e agentes oxidantes, fatores potencialmente relacionados a menor produção do muco pela agressão das células do epitélio cólico e sua conseqüente apoptose. Deve ainda ser lembrada que o SCF

aumenta a produção de bicarbonato, prostaglandinas e, principalmente do fluxo sanguíneo mucoso, o que favorece a renovação epitelial e conseqüentemente, maior produção de mucinas (Wada *et al.*, 1997). Outro importante mecanismo de ação do SCF que merece ainda ser lembrado é sua notável atividade antioxidante, reduzindo a formação de RLO produzidos pelas células exclusas de trânsito. É possível o SCF possa agir como um antioxidante removendo os RLO produzidos pelas células epiteliais com modificações de seu metabolismo energético pela ausência do suprimento dos AGCC. Some-se a isso o fato de que reduzindo a infiltração de neutrófilos nos tecidos o SCF possa diminuir a produção de RLO por essas células. Estudos sugerem que possivelmente a ação antioxidante do SCF possa agir em sinergia com outros mecanismos, potencializando o efeito anti-inflamatório, dificultando a perpetuação do processo inflamatório induzido pelos RLO (Millar *et al.*, 1996).

Quando utilizamos a técnica histoquímica do AB, específica para coloração das mucinas ácidas, verificamos que a intervenção com SCF resultou na preservação do conteúdo de mucinas ácidas presentes nas glândulas cólicas diferentemente do encontrado no grupo submetido à intervenção com SF 0,9%. Constatamos que a expressão das mucinas ácidas era diretamente proporcional à concentração utilizada. A irrigação com 2,0 g/kg/d estava relacionada à presença de maior conteúdo de mucinas ácidas em relação ao grupo controle, bem como aos animais submetidos a intervenção com concentração de 1,0 g/kg/d. Esses achados mostram que o efeito da aplicação diária de enemas com SCF no conteúdo tecidual de mucinas ácidas é dose-dependente. Todavia, cabe destacar que mesmo utilizando menores concentrações de SCF observamos importante diferença no conteúdo das mucinas ácidas em relação ao grupo controle, o que mostra a eficácia da droga mesmo quando utilizada em menor

concentração. O uso de SCF por um período mais prolongado não aumentou o conteúdo de mucinas ácidas, sugerindo que o efeito da droga na produção das mucinas ácidas, justamente o subtipo mais reduzido nos modelos de CE, ocorre já nas primeiras duas semanas de uso. É possível que esse achado esteja relacionado à desnutrição das células epiteliais do cólon, decorrente do menor suprimento de AGCC, o que poderia induzir uma menor expressão dos genes relacionados a transcrição deste subtipo de mucina. Estudos avaliando a expressão dos genes relacionados à transcrição das mucinas são necessários para confirmar essa possibilidade.

Cabe lembrar que optamos pelo uso de SF 0,9% como substância de intervenção no grupo controle pois os poucos estudos disponíveis na literatura que avaliaram os efeitos de diferentes substâncias em modelos de CE utilizaram o SF 0,9% como controle (Margarido *et al.*, 2003; Nasrri *et al.*, 2008; Caltabiano 2010; Caltabiano *et al.* 2010; Marques *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013). Pode-se especular que a intervenção com SF 0,9% possa alterar a superfície mucosa cólica, talvez por eliminar de forma mecânica parte da camada de muco que recobre o epitélio intestinal. Por apresentar menor viscosidade quando comparado ao SCF é possível que diminuição do tempo de contato com mucosa cólica nos animais do grupo controle, possa ocasionar a eliminação mais rápida da substância de intervenção, não permitindo o mesmo tempo de retenção quando comparado aos animais submetidos a aplicação do SCF. Contudo, da mesma forma que fizemos no presente estudo, outros autores que avaliaram o uso do SCF em mucosites, também utilizaram o SF 0,9% como substância de intervenção no grupo controle, sem que exista qualquer referência a um possível comprometimento metodológico (Hollander *et al.*, 1984; Zahari,

1989; Gianotti *et al.*, 1993; Henningsohn *et al.*, 1997; Akman, *et al.*, 2000; Arancibia e Montera, 2009). Reforça a opção pelo uso do SF 0,9% como substância de intervenção para o grupo controle resultados encontrados por outros autores que utilizaram substâncias com maior viscosidade, como a carboximetilcelulose e, mesmo assim, os resultados da intervenção com SCF ainda foram superiores (Madalosso, 2011). Dessa forma, não acreditamos que o emprego de uma substância com maior viscosidade mesmo que permanecesse no cólon por maior período de tempo pudesse modificar os resultados por nós encontrados.

Ainda com relação ao uso de SF 0,9% no grupo controle, outra preocupação seria a possibilidade de que a solução pudesse induzir ou interferir no estresse oxidativo tecidual. Todavia, estudo anterior que comparou os níveis teciduais de malondialdeído, um biomarcador utilizado para avaliação da intensidade de estresse oxidativo tecidual, comparando segmentos de colon exclusivos e não exclusivos do trânsito fecal irrigados com SF 0,9% por duas e quatro semanas, não encontrou diferenças no conteúdo tecidual entre os grupos, mostrando que a intervenção com SF 0,9% por si só não é capaz de aumentar os níveis dano oxidativo na mucosa exclusiva (Cunha *et al.*, 2011). Não utilizamos a carboximetilcelulose como substância de intervenção no grupo controle pelo fato de não existirem estudos na literatura assegurando que a substância não aumente a produção de RLO. Cabe lembrar que em estudo anterior realizado pelo nosso grupo onde estudamos o infiltrado inflamatório tecidual e o conteúdo de mucinas neutras e ácidas no cólon exclusivo de trânsito que não sofreu qualquer tipo de intervenção, encontramos valores de mucinas neutras e ácidas semelhantes aos dos animais submetidos a intervenção com SF 0,9%. Assim sendo, é possível inferir que a

intervenção com SF 0,9% não piora a lesão tecidual induzida pela exclusão fecal nem modifica, significativamente, o conteúdo de mucinas neutras e ácidas. Talvez, em outra oportunidade possamos idealizar um estudo onde a intervenção nos animais do grupo controle utilize o glicerol, que é o próprio veículo de solubilização do SCF comercial. Assim, talvez seja possível utilizar uma solução com viscosidade semelhante à do SCF (Helman *et al.*, 2008; Madalosso, 2011).

Como podemos inferir, diversas são as hipóteses para os mecanismos de ação do SCF no conteúdo de mucinas em modelos de CE. Para analisar os mecanismos moleculares de ação e potenciais benefícios, estudos complementares ainda se mostram necessários, o que possibilita o desenvolvimento de uma linha de pesquisa interessante, inédita, e o que é mais importante, com aplicação clínica imediata. Os resultados encontrados sugerem que a aplicação de enemas com SCF seja uma alternativa terapêutica eficaz, de baixo custo e com poucos efeitos colaterais para o tratamento de um contingente não desprezível de enfermos que já sofrem as adversidades infligidas pelo uso de um estoma muitas vezes definitivo.

7. CONCLUSÃO

A aplicação diária por quatro semanas de enemas contendo SCF na dose de 2,0 g/kg/d reduz as alterações inflamatórias histológicas na mucosa cólica exclusiva de trânsito intestinal de modelo experimental de CE.

A aplicação diária de enemas contendo SCF reduz a infiltração neutrofílica independente da concentração e do tempo de intervenção utilizado.

A aplicação diária de enemas contendo SCF em ambas as concentrações e períodos estudados impede o decréscimo do conteúdo tecidual de mucinas neutras e ácidas na mucosa cólica exclusiva de trânsito intestinal de modelo experimental de CE.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, V.P; Schimmel, E.M. Diversion colitis: a nutritional deficiency syndrome? **Nutr Rev**, 47(9):257-261, 1989.

Akgun, E; Çaliskan, C; Celik, H.A; Ozutemiz, A.O; Tuncyurek, M; Aydin, H.H. Effects of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress in acetic acid-induced experimental colitis in rats. **J Int Med Res** 33(2):196-206, 2005.

Akman, M; Akbal, H; Emir, H; Ozturk, R; Erdogan, E; Yeker, D. The effects of sucralfate and selective intestinal decontamination on bacterial translocation. **Pediatr Surg Int**, 16(1-2):91-93, 2000.

Allen, D.C; Connolly, N.S; Biggart, J.D. Mucin profiles in ulcerative colitis with dysplasia and carcinoma. **Histopathology**, 13(4):413-424, 1988.

Allison, R.R; Vongtama, V; Vaughan, J; Shin, K.H. Symptomatic acute mucositis can be minimised or prophylaxed by the combination of sucralfate and fluconazole. **Cancer Invest**, 13(1):16-22, 1995.

Almalouf, P; Shehab, T.M; Daniel, A.M; Robinson, E.A; Barnett, J.L. Therapeutic hydrogen peroxide enema causing severe acute colitis. **Int J Colorectal Dis**, 23(11):1139-1140, 2008.

Almeida, M.G; Pereira, J.A; Silva, C.M.G; Cunha, F.L; Marques, L.H.S; Lameiro, T.M.M; Martinez, C.A.R. Evaluation of topical n-acetylcysteine in diversion colitis. **Journal of Coloproctology**, 32: 223-231, 2012.

Alvarenga, V; Pacheco, R.G; Esposito, C.C; Buongusto, F; Castelo-Branco, M.T.L; Madi, K; Belmiro, C.R; Pavao, M.S.G; Souza, H.S.P; Schanaider, A. Ascidian (chordate-tunicate) and mammalian heparin enemas attenuate experimental diversion colitis. **Surgery**, 155(2):217-227, 2014.

Andreyev, J. Gastrointestinal symptoms after pelvic radiotherapy: a new understanding to improve management of symptomatic patients. **Lancet Oncol**, 8: 1007-1017, 2007.

Arancibia, W; Montera, E. Estudio comparativo de la cicatrización en piel de conejo entre sucralfato y tartrato de ketanserina / Comparative study of wound healing in rabbit skin between sucralfate and ketanserina tartrate. **Rev chil dermatol**, 25(2):114-119, 2009.

Augenlicht, L; Shi, L; Mariadason, J; Labois, C; Velcich, A. Repression of MUC2 gene expression by butyrate, a physiological regulator of intestinal cell maturation. **Oncogene**, 22(32):4983-4992, 2003.

Banerjee, S; El-Omar, E; Mowat, A; Ardill, J. E; Park, R. H; Watson, W; Beattie, A. D; McColl, K. E. Sucralfate suppresses Helicobacter pylori infection and reduces gastric acid secretion by 50% in patients with duodenal ulcer. **Gastroenterology**, 110:717-724, 1996.

Barreto, N.P.F; Morais, D.C.R; Tavares, G.A; Bispo, D.J.S. Trauma colorretal: estudo retrospectivo, **Revista Brasileira de Coloproctologia**, 3:170-174, 2002.

Bartman, A.E; Sanderson, S.J; Ewing, S.L; Niehans, G.A; Wiehr, C.L; Evans, M.K; Ho, S.B. Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps. **Int J Cancer**. 18;80(2):210-218, 1999.

Bighley, L; Giesing, D. Mechanism of action studies of sucralfate. In: **Duodenal ulcer, gastric ulcer: sucralfate, a new therapeutic concept**, ed. Caspary, 1981, p. 3-12. Baltimore, Maryland: Urban and Schwarzenberg.

Biondo-Simões, M.L.P; Grecca, F.H; Ioshi, S; Abicalaffe, M.D; Colnaghi, M.C; Mattos e Silva, E; Yamasaki, E.S; Smaniotto, G. Colite do cólon exclusivo: modelo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, 15(3):7-11, 2000.

Blum, A.L; Bethge, H; Bode, J.C; Domschke, W; Feurle, G. Sucralfate in the treatment and prevention of gastric ulcer: multicentre double blind placebo controlled study. **Gut**, 31:825-830, 1990.

Bobek, L.A; Tsai, H; Biesbrock, A.R; Levine, M.J. Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). **J Biol Chem**, 268:20563-20569, 1993.

Bondy, S.C; LeBel, C.P. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. **Free Radic Biol Med**, 14(6):633-642, 1993.

Bradley, P.P; Priebat, D.A; Christensen, R.D; Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, 78(3):206-209, 1982.

Brouwers, J.R.B; Kam, H.J.V.D; Sijtsma, J; Koks, C.H.W. Important drug interaction of oral ciprofloxacin with sucralfate and magnesium citrate solution. **Pharm Weekbl**, 11:13, 1989.

Brownlee, I.A; Knight, J; Dettmar, P.W; Pearson, J.P. Action of reactive oxygen species on colonic mucus secretions. **Free Radic Biol Med**, 43(5):800-808, 2007.

Bruugsgard, A; Elsborg, L; Reinecke, V. Bile acid-binding properties of sucralfate. In: **Duodenal ulcer, gastric ulcer: sucralfate, a new therapeutic concept**, ed. Caspary, 1981, p. 28-31. Baltimore, Maryland: Urban and Schwarzenberg.

Cabarga, M.M; Navarro, A.S; Gandarillas, C.I.C; Dominguez-Gil, A. Effects of two cations on gastrointestinal absorption of ofloxacin. **Antimicrob Agents Chemother**, 35:2102-2105, 1991.

Cadenas, E; Davies, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic Biol Med**, 29(3-4):222-230, 2000.

Caldwell, J.R. Sucralfate in the relief of gastrointestinal symptoms associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **South Med J**, 78(8):938-940, 1985.

Caltabiano, C. **Avaliação dos efeitos do ácido 5-aminosalicílico contra o dano oxidativo ao DNA na colite de exclusão**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2010.

Caltabiano, C; Máximo, F.R; Spadari, A.P; Miranda, D.D.C; Serra, M.M; Ribeiro, M.L; Martinez C.A.R. 5-aminosalicylic acid (5-ASA) can reduce levels of oxidative DNA damage in cells of colonic mucosa with and without fecal stream. **Dig Dis Sci**, 56:1037-1046, 2011.

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

Campbell, N.R.C; Kara, M; Hasinoff, B.B; Haddara, W.M; McKay, D.W. Norfloxacin interaction with antacids and minerals. **Br J Clin Pharmacol**, 33:115-116, 1992.

Caramella, C; Colombo, P; Conte, U; Zagnoli, G. Pharmaceutical compositions in the form of stable sucralfate suspensions free of suspending agents. **EP Patent 286 978**; 1988.

Caramella, C; Conte, U; Colombo, P. Stable sucralfate suspensions free of suspending agents. **Acta Toxicol Ther**, XVI:33-39, 1995.

Carling, L; Glise, H; Hallerback, B. Short term treatment of acute prepyloric ulcer (PPU) - a comparison of Sucralfate and Cimetidine. **Gastroenterology**, 88(5): 1343-1347, 1985.

Carvalho, V.R.J. **Avaliação do conteúdo e padrão de expressão da proteína claudina na mucosa cólica com e sem trânsito intestinal: estudo experimental em ratos**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2013.

Caspary, W.F. Effect of sucralfate on in vitro binding of bile acids and bile acid-induced changes of transmural potential differences in healthy subjects. **Hepato gastroenterology**, 27: suppl: 381, 1980.

Castro, M.A; Ferreira, U; Martins, M.H; Stoppiglia, R.M; Netto Júnior, N.R. Histological and histochemical changes of the intestinal mucosa at the urothelial-enteric anastomotic site. **Int Braz J Urol**, 32(2):222-227, 2006.

Chen, B.W; Hiu, W.M; Lam, S.K; Cho, C.H; Luk, C.T. Effect of sucralfate on gastric mucosal blood flow in rats. **Gut**, 30:1544-1551, 1989.

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

Chen, Y; Zhao, Y.H; Kalaslavadi, T.B. Genome-wide search and identification of a novel gel-forming mucin MUC19 in glandular tissue. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 30: 155-165, 2004.

Christl, S.U; Eisner, H.D; 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**, 41(12): 2477-2481, 1996.

Classen, M; Bethge, H; Brunner, G. Effect of sucralfate on peptic ulcer recurrence: a controlled double-blind multicenter study. **Scand J Gastroenterol**, 18: suppl 83: 61-68, 1983.

Conte, U; Colombo, P; Zagnoli, G; Contos, S; De Bernardi, M; Caramella, C. The cytoprotective action of sucralfate in two different pharmaceutical forms (gel and powder). **Acta Toxicol Ther**, XVI:40-58, 1995.

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

Copeman, M; Matuz, J; Leonard, A.J; Pearson, J.P; Dettmar, P.W; Allen, A. The gastroduodenal mucus barrier and its role in protection against luminal pepsins: the effect of 16,16 dimethyl prostaglandin E2, carbopol-polyacrylate, sucralfate and bismuth subsalicylate. **J Gastroenterol Hepatol**, 9(1):S55-S59, 1994.

Corfield, A.P; Myerscough, N; Longman, R; Sylvester, P; Arul, S; Pignatelli, M. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. **Gut**, 47(4):589-594, 2000.

Crampton, J.R; Gibbons, L.C; Rees, W.D. Effects of sucralfate on gastroduodenal bicarbonate secretion and prostaglandin E2 metabolism. **Am J Med**, 83:14-18, 1987.

Crampton, J.R; Gibbons, L.C; Rees, W.D. Stimulation of amphibian gastroduodenal bicarbonate secretion by sucralfate and aluminium: role of local prostaglandin metabolism. **Gut**, 29:903-908, 1988.

Cunha, F.L; Silva, C.M.G; Almeida, M.G; Lameiro, T.M.M; Marques, L.H.S; Margarido, N.F; Martinez, C.A.R. Reduction in oxidative stress levels in the colonic mucosa without fecal stream after the application of enemas containing aqueous *Ilex paraguariensis* extract. **Acta Cir Bras**, 26:289-296, 2011.

Danesh, B.J.Z; Duncan, A; Russel, R.I; Mitchell, G. Effect of intragastric pH on mucosal protective action of sucralfate. **Gut**, 29, 1379-1385, 1988.

David, G.G; Al-Sarira, A.A; Willmott, S; Cade, D; Corless, D.J; Slavim, J.P. Use of Hartmann's procedure in England. **Colorectal Dis**, 11(3):308-312, 2009.

Dehghani, S.M; Malekpour, A; Haghghat, M. Solitary rectal ulcer syndrome in children: a literature review. **World J Gastroenterol**, 18:6541-6545, 2012.

Dekker, J; Rossen, J.W; Büller, H.A; Einerhand, A.W. The MUC family: an obituary. **Trends Biochem Sci**, 27(3):126-131, 2002.

Denton, A.S; Andreyev, H.J.N; Forbes, A; Maher, E.J. Systematic review for non-surgical interventions for the management of late radiation proctitis. **Br J Cancer**, 87: 134-143, 2002.

Denton, A.S; Andreyev, H.J.N; Forbes, A; Maher, E.J. Nonsurgical interventions for late radiation proctitis in patients who have received radical radiotherapy to the pelvis. **Cochrane Database Syst Rev**, 1: CD003455, 2002.

Deplancke, B; Gaskins, H.R. Microbial modulation of innate defense: goblet-cells and the intestinal mucus layer. **Am J Clin Nutr**, 73:1131S-41S, 2001.

Devlin, T. **Textbook of Biochemistry with clinical correlations**. Ed Wiley-Liss, 4th, 1997.

Distler, P; Holt, P.R. Are right and left-sided colon neoplasms distinct tumors? **Dig Dis**, 15:302-311, 1997.

Dorr, W. Pathogenesis of normal tissue side effects, In: Joiner, M. and Van der Kogel, A. **Basic Clinical Radiobiology**, 4th, Hodder Arnold: London, pp. 183-190. 2009.

Drut, R; Drut, R.M. Hyperplasia of lymphoglandular complexes in colon segments in Hirschsprung's disease: a form of diversion colitis. **Pediatr Pathol**, 122(4): 575-581, 1992.

Edwards, C.M; George, B; Warren, B. Diversion colitis - new light through old windows. **Histopathology**, 34(1):11-15, 1999.

Elsborg, L; Boysen, K; Bruusgaard, A; Reinicke, V. Sukralfat versus placebo ved ulcus duodeni. **Dan Med Bull**, 19: 1440-1442, 1984.

Farrell, R.F; Peppercorn, M.A. Ulcerative colitis. **Lancet**, 359(9303):331-340, 2002.

Ferguson, C.M; Siegel, R.J. A prospective evaluation of diversion colitis. **AmSurg**, 51(1):46-49, 1991.

Ferreira, C.C. **Avaliação do padrão de expressão e conteúdo tecidual da proteína ocludina na mucosa cólica de ratos com e sem trânsito intestinal**. Bragança Paulista, 60p. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco. 2013.

Filipe, M.I. Value of histochemical reactions for muco substances in the diagnosis of certain pathological conditions of the colon and rectum. **Gut**, 10(7):577-586, 1969.

Filipe, M.I.; Dawson, I. The diagnostic value of muco substances in rectal biopsies from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. **Gut**, 11(3): 229-234, 1970.

Filipe, M.I. 35 sulphur uptake in the mucosa adjacent to carcinoma of the large intestine. **Histochem J**, 3(1):27-35, 1971.

Filipe, M.I. The value of a study of the mucosubstances in rectal biopsies from patients with carcinoma of the rectum and lower sigmoid in the diagnosis of premalignant mucosa. **J Clin Pathol**, 25(2):123-128, 1972.

Filipe, M.I. Mucous secretion in rat colonic mucosa during carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. A morphological and histochemical study. **Br J Cancer**, 32(1):60-77, 1975.

Filipe, M.I. Mucins in the human gastrointestinal epithelium: a review. **Invest Cell Pathol**, 2(3)195-216, 1979.

Fillmann, H; Kretzmann, N.A; San-Miguel, B; Llesuy, S; Marroni, N; GonzálezGallego, J. 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**, 236(3):217-26, 2007.

Finnie, I.A; Dwarakanath, A.S; Taylor, B.A; Rhodes, J.M. Colonic mucins synthesis is increased by sodium butyrate. **Gut**, 36:93-99, 1995.

Fiorino, C; Rancati, T; Valdagni, R. Predictive models of toxicity in external radiotherapy. **Cancer**, 115: 31353140, 2009.

Fiorino, C; Rancati, T; Valdagni, R. Dose-volume effects for normal tissues in external radiotherapy: Pelvis. **Radiother Oncol**, 93: 153167, 2009.

Frankel, W; Lew, J; Su, B; Bain, A; Klurfeld, D; Einhorn, E; MacDermott, R.P; Rombeau, J. Butyrate increases colonocyte protein synthesis in ulcerative colitis. **J Surg Res**, 57(1):210-214, 1994.

Garrelts, J.C; Godley, P.J; Peterie, J. D; Gerlach, E. H; Yakshe, C. C. Sucralfate significantly reduces ciprofloxacin concentrations in serum. **Antimicrob Agents Chemother**, 34:931-933, 1990.

Gaudier, E; Forestier, L; Gouyer, V; Huet, G; Julien, R; Hoebler, C. Butyrate regulation of glycosylation-related gene expression: evidence for galectin-1 upregulation in human intestinal epithelial goblet cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 325:1044-1051, 2004.

- Gaudier, E; Jarry, A; Blottière, H.M; de Coppet, P; Buisine, M.P; Aubert, J.P; Laboisse, C; Cherbut, C; Hoebler, C. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 287(6):1168-1174, 2004.
- Gaudier, E; Hoebler, C. Physiological role of mucins in the colonic barrier integrity. **Gastroenterol Clin Biol**, 30(8):965-974, 2006.
- Gaudier, E; Rival, M; Buisine, M.P; Robineau, I; Hoebler, C. Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. **Physiol Res**, 58(1):111-119, 2009.
- Gendler, S.J; Spicer, A.P. Epithelial mucin genes. **Annu Rev Physiol**, 57:607-634, 1995.
- Geraghty, J.M; Talbot, I.C. Diversion colitis: histological features in the colon and rectum after defunctioning colostomy. **Gut**, 32(9):1020-1023, 1991.
- Geraghty, J.M; Charles, A.K. Aphthoid ulceration in diversion colitis. **Histopathology**, 24(4):395-397, 1994.
- Gervaz, P; Bouzourene, H; Cerottini, J.P; Chaubert, P; Benhattar, J; Secic, M. Dukes B colorectal cancer: distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location. **Dis Colon Rectum**, 44:364-372, 2001.
- Gianotti, L; Alexander, J.W; Fukushima, R; Pyles, T. Reduction of bacterial translocation with oral fibroblast growth factor and sucralfate. **Am J Surg**, 165(1):195-200, 1993.
- Giardiello, F.M; Lazenby, A.J; Bayless, T.M. The new colitis. Collagenous, lymphocytic, and diversion colitis. **Gastroenterol Clin North Am**, 24(3):717-729, 1995.
- Giesing, D.H; Bighley, L.D; Iles, R.L. Effect of food and antacid on binding of sucralfate to normal and ulcerated gastric and duodenal mucosa in rats. **J Clin Gastroenterol**, 3: suppl 2: 111-116, 1981.
- Glebov, O.K; Rodriguez, L.M; Nakahara, K; Jenkins, J; Cliatt, J; Humbyrd, C.J. Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 12:755-762, 2003.
- Glise, H; Carling, L; Hallerback, B; Kagevi, J; Svedberg, L.E; Wahlby, L. Short term treatment of acute duodenal ulcer - a comparison of sucralfate and cimetidine. **Gastroenterology**, 88: 1396, 1985.
- Glotzer, D.J; Glick, M.E; Goldman, H. Proctitis and colitis following diversion of fecal stream. **Gastroenterology**, 80(3):438-441, 1981.

Gold, D.V; Shochat, D; Miller, F. Protease digestion of colonic mucin. Evidence for the existence of two immunochemically distinct mucins. **J Biol Chem**, 256(12):6354-6358, 1981.

Goldman, H; Ming, S.C. Mucins in normal and neoplastic gastrointestinal epithelium. Histochemical distribution. **Arch Pathol**, 85:580-586, 1968.

Graham, D.Y; Sackman, J.W; Giesing, D.H; Runser, D.J. In vitro adsorption of bile salts and aspirin to sucralfate. **Dig Dis Sci**, 29: 402-406, 1984.

Grasela, T.H; Schentag, J.J; Sedman, A.J; Wilton, J.H; Thomas, D.J; Schultz, R.W; Lebsack, M.E; Kinkel, A.W. Inhibition of enoxacin absorption by antacids or ranitidine. **Antimicrob Agents Chemother**, 33:615-617, 1989.

Gratchev, A; Böhm, C; Riede, E; Foss, H.D; Hummel, M; Mann, B; Backert, S; Buhr, H.J; Stein, H; Riecken, E.O; Hanski, C. Regulation of mucin MUC2 gene expression during colon carcinogenesis. **Ann N Y Acad Sci**, 17(859):180-183, 1998.

Greco, V; Lauro, G; Fabbrini, A; Torsoli, A. Histochemistry of the colonic epithelial mucins in normal subjects and in patients with ulcerative colitis. A qualitative and histophotometric investigation. **Gut**, 8 (5):491-496, 1967.

Greenson, J.K; Trinidad, S.B; Pfeil, S.A; Brainard, J.A; McBride, P.T; Colijn, H.O; Tesi, R.J; Lucas, J.G. Gastric mucosal calcinosis. Calcified aluminum phosphate deposits secondary to aluminum-containing antacids or sucralfate therapy in organ transplant patients. **Am J Surg Pathol**, 17(1):45-50, 1993.

Gugler, R; Allgayer, H. Effects of antacids on the clinical pharmacokinetics of drugs. An update. **Clin Pharmacokinet**, 18:210-219, 1990.

Gul, Y; Prasannan, S; Jabar, F; Shaker, A; Moissinac, K. Pharmacotherapy for chronic hemorrhagic radiation proctitis. **World J Surg**, 26: 1499-1502, 2002.

Gum, J.R; Hicks, J.W; Swallow, D.M; Lagace, R.L; Byrd, J.C; Lamport, D.T.A; Siddiki, B; Kim, Y.S. Molecular cloning of cDNAs derived from a novel human intestinal mucin gene. **Biochem Biophys Res Commun**, 171:407-415, 1990.

Gum, J.R; Hicks, J.W; Toribara, N.W. Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA, **J Biol Chem**, 269:2440-2446, 1994.

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

Guslandi, M; Ballarin, E; Cambielli, M; Tittobello, A. Stimulation of mucus output: A further mode of action of sucralfate. **Gastroenterology**, 84:1177, 1983.

- Guslandi, M. Sucralfate and gastric bicarbonate. **Pharmacology**, 31: 298-300, 1985.
- Gutteridge, J.M; Halliwell, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann N Y Acad Sci**, 899:136-47, 2000.
- Guy, C; Ollagnier, M. Sucralfate and bezoars: data from the system of pharmacologic vigilance and review of the literature. **Therapie**, 54(1):55-58, 1999.
- Haas, P.A; Haas, G.P. A critical evaluation of the Hartmann's procedure. **Am Surg**, 54(6):380-385, 1988.
- Haas, P.A; Fox, T.A; Szilagy, E.J. Endoscopic examination of the colon and rectum distal to a colostomy. **Am J Gastroenterol**, 85(7):850-854. 1990.
- Habib, N.A; Dawson, P.N; Krausz, T; Blount, M.A; Kersten, D; Wood,C.B. A study of histochemical changes in mucus from patients with ulcerative colitis, Crohn's disease and diverticular disease of the colon. **Dis Colon Rectum**, 29:15-17, 1986.
- Habr-Gama, A; Teixeira, M.G; Vieira, M.J.F; Miléu, L.F; Laurino-Neto, R; Pinotti, H.W. Operação de Hartmann e suas conseqüências. **Rev bras Coloproctol**, 17(1): 5-10, 1997.
- Hallerback, B; Anker-Hansen, O; Carling, L. Short term treatment of gastric ulcer - a comparison of sucralfate and cimetidine. **Gastroenterology**, 88:1411, 1985.
- Halliwell, B; Gutteridge, J.M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys**, 246(2):501-514, 1986.
- Halliwell, B; Gutteridge, J.M. The antioxidants of human extracellular fluids. **Arch Biochem Biophys**, 280(1):1-8, 1990.
- Halliwell, B; Gutteridge, J.M. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. **J Neurochem**, 69(3):1330-1331, 1997.
- Hanstein, U; Bauer, L. Sucralfate suspension. WO Patent 86/01406; 1986. <http://www.patentbuddy.com/Patent/8601406>.
- Haram, E.M; Weberg, R; Berstad, A. Urinary excretion of aluminum after ingestion of sucralfate and an aluminum-containing antacid in man. **Scand J Gastroenterol**, 22:615-618, 1987.
- Hardy, J.G; Hooper, G; Ravelli, G.P; Steed, K.P; Wilding, I.R. A comparison of the gastric retention of a sucralfate gel and a sucralfate suspension. **Eur JPharmBiopharm**, 39:70-74, 1993.
- Hariri, J; Bichel, P; Dyreborg, U. Barytoma of the rectum. **Acta Radiol Diagn**, 24(6):473-475, 1983.

Harrington, S.J; Code, C.F. Protective effects of sucralfate on gastric mucosal barrier. **Gastroenterology**, 78: 1179, 1980.

Harrington, S.J; Schlegel, J.F; Code, C.F. The protective effect of sucralfate on the gastric mucosa of rats. **J Clin Gastroenterol**, 3: suppl 2: 129-134, 1981.

Helman, L; Martins, J.L; Fagundes, D.J; Esteves, E; Lima, C.P; Costa, A.S. Experimental antegrade enema. Effects on water, electrolyte and acid-base balances with different solutions. **Acta Cir Bras**, 22(5):372-377, 2008.

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

Henningsohn, L; Ingelman-Sundberg, H; Kinn, A.C; Trygg, G. Effect of sucralfate on induced chemical cystitis in rabbits. **Br J Urol**, 79(6):861-864, 1997.

Henson, C. Chronic radiation proctitis: issues surrounding delayed bowel dysfunction post-pelvic radiotherapy and an update on medical treatment. **Ther Adv Gastroenterol**, 3(6) 359-365, 2010.

Higuchi,T; Orita, T; Nakanishi, S. Molecular cloning, genomic structure and expression analysis of MUC20, a novel mucin protein, up-regulated in injured kidney. **J Biol Chem**, 279: 1968-1979, 2004.

Hollander, D. Efficacy of sucralfate for duodenal ulcers: a multicenter, double-blind trial. **J Clin Gastroenterol**, 3: suppl 2: 153-157, 1981.

Hollander, D; Tarnawski, A; Gergely, H; Zipser, R.D. Sucralfate protection of the gastric mucosa against ethanol-induced injury: a prostaglandin-mediated process? **Scand J Gastroenterol**, 19 suppl 10(1): 97-102, 1984.

Hollander, D; Tarnawski, A; Krause, W.J; Gcergeoly, H. Protective effect of sucralfate against alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. Macroscopic, histologic, ultrastructural, and functional time sequence analysis. **Gastroenterology**, 88: 366-374, 1985.

Hui, W.M; Lam, S.K; Ho, I; Branicki, F.J; Lai, C.L; Lok, A.S; Fok, J. Effect of sucralfate and cimetidine on duodenal ulcer-associated antral gastritis and *Campylobacter pylori*. **Am J Med**, 86:60-65, 1989.

Hui, W.M; Lam, S.K; Lok, A.S; Lai, C.L. Maintenance therapy for duodenal ulcer: a randomized controlled comparison of seven forms of treatment. **Am J Med**, 92:265-274, 1992.

Ishimori, A. History of the development of sucralfate. In: Hollander, D; Tytgat, J.N.J. **Sucralfate, from Basic Science to the Bedside**. New York: Plenum Medical Book Company, 1995:35-45.

Jensen, S. L; Jensen, P.F. Role of sucralfate in peptic disease. **Dig Dis Sci**, 10:153-161, 1992.

Jorgensen, J.R; Clausen, M.R; Mortensen, P.B. Oxidation of short and medium chain C2-C8 fatty acids in Sprague-Dawley rat colonocytes. **Gut**, 40(3):400-405, 1997.

Junqueira, L.C; Carneiro, J. **Histologia Básica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 11 ed., cap.15, p.283-316, 2008.

Kamali, F; Fry, J.R; Smart, H.L; Bell, G.D. A double-blind placebo controlled study to examine effects of sucralfate on paracetamol absorption. **Br J Clin Pharmac**, 19:113-114, 1985.

Keli, E; Bouchoucha, M; Devroede, G; Carnot, F; Ohrant, T; Cugnenc, P.H. Diversion-related experimental colitis in rats. **Dis Colon Rectum**, 40:222-228, 1997.

Khan, J; Liboshi, Y; Cui, L; Wasa, M; Sando, K; Takagi, Y; Okada, A. Alanylglutamine-supplemented parenteral nutrition increases luminal mucus gel and decreases permeability in the rat small intestine. **J Parenter Enteral Nutr**, 23(1):24-31, 1999.

Kiely, E.M; Ajayi, N.A; Wheeler, R.A; Malone, M. Diversion procto-colitis: response to treatment with short-chain fatty acids. **J Pediatr Surg**, 36(10):1514-1517, 2001.

Kissmeyer-Nielsen, P; Christensen, H; Laurberg, S. Diverting colostomy induces mucosal and muscular atrophy in rat distal colon. **Gut**, 35(9):1275-1281, 1994.

Kneebone, A; Mameghan, H; Bolin, T. The effect of oral sucralfate on the acute proctitis associated with prostate radiotherapy: a double-blind, randomized trial. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 51:628-635, 2001.

Kneebone, A; Mameghan, H; Bolin, T; Berry, M; Turner, S; Kearsley, J. Effect of oral sucralfate on late rectal injury associated with radiotherapy for prostate cancer: a double-blind, randomized trial. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 60:1088-1097, 2004.

Kochhar, R; Mehta, S.K; Aggarwal, R; Dhar, A; Patel, F. Sucralfate enema in ulcerative rectosigmoid lesions. **Dis Colon Rectum**, 33:49-51, 1990.

Kochhar, R; Patel, F; Dhar, A. Radiation-induced proctosigmoiditis. Prospective, randomized, double-blind controlled trial of oral sulfasalazine plus rectal steroids versus rectal sucralfate. **Dig Dis Sci**, 36:103-107, 1991.

Kochhar, R; Sriram, P.V; Sharma, S.C; Goel, R.C; Patel, F. Natural history of late radiation proctosigmoiditis treated with topical sucralfate suspension. **Dig Dis Sci**, 44:973-978, 1999.

Komorowski, R.A. Histologic spectrum of diversion colitis. **Am J Sur Pathol**, 14(6):548-554, 1990.

Konturek, S.J; Kwiecien, N; Obtulowicz, W; Kopp, B; Oleksy, J. Double blind controlled study on the effect of sucralfate on gastric prostaglandin formation and microbleeding in normal and aspirin treated man. **Gut**, 27:1450-1456, 1986.

Konturek, S.J; Radecki, T; Piastucki, I; Brzozowski, T; Drozdowicz, D. Gastrocytoprotection by colloidal bismuth subcitrate (De-nol) and sucralfate. Role of endogenous prostaglandins. **Gut**, 28: 201-205, 1987.

Kuwayama, H; Matsuo, Y; Eastwood, G.L. Effects of sucralfate, lansoprazole, and cimetidine on the delayed healing by hydrocortisone sodium phosphate of chronic gastric ulcers in the rat. **Am J Med**, 8;91(2A):15-19, 1991.

Lacz, J. P; Drees, D; Browne, R. K. The effect of sucralfate on the absorption of cimetidine and other drugs in dogs. **Am J Gastroenterol**, 77:689, 1982.

Lacz, J. P; Groschang, A. G; Giesing, D. H; Browne, R. K. The effect of sucralfate on drug absorption in dogs. **Gastroenterology**, 82:1108, 1982.

Lam, S. K; Hui, W. M; Lau, W. Y; Branicki, F. J; Lai, C. L; Lok, A. S; Ng, M. M; Fok, P. J; Poon, G. P. Sucralfate versus cimetidine in duodenal ulcer-factors affecting healing and relapse. **Scand J Gastroenterol**, Suppl. 140:61, 1987.

Lam, S. K. Implications of sucralfate-induced ulcer healing and relapse. **Am J Med**, 86:122-126, 1989.

Lam, S. K. Treatment of duodenal ulcer with sucralfate. **Scand J Gastroenterol**, Suppl.185:22-28, 1991.

Lau, A; Chang, C. W; Schesinger, P. Evaluation of a potential drug interaction between sucralfate and aspirin. **Drug Intell clin Pharm**, 19, 457, 1985.

Laudanno, O.M; Bedini, O.A; Cesolari, J.A; San Miguel, P. Evidence of anti-oxidant role of sucralfate in gastric mucosal protection. **Ital J Gastroenterol**, 22:19-21, 1990.

Lechner, G.L; Frank, W; Jantsch, H; Pichler, W; Hall, D.A; Waneck, R; Wunderlich, M. Lymphoid follicular hyperplasia in excluded colonic segments: a radiologic sign of diversion colitis. **Radiology**, 176(1):135-136, 1990.

Lehto, P; Kari, T. Effect of Sucralfate on Absorption of Norfloxacin and Ofloxacin. **Antimicrob Agents Chemoth**, 38: 248-251, 1994.

Leiper, K; Morris, A.I. Treatment of Radiation Proctitis. **Clin Oncol**, 19: 724-729, 2007.

Leppi, T.J; Spicer, S.S. The histochemistry of mucins in certain primate salivary glands. **Am J Anat**, 118(3):833-859, 1966.

Lev, R; Spicer, S.S. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low ph. **J Histochem Cytochem**, 12:309, 1964.

Lewin, C.S; Smith, J.T. 4-quinolones and multivalent ions. **J Antimicrob Chemother**, 26:149, 1990.

Ligumsky, M; Karmeli, F; Rachmilewitz, D. Sucralfate stimulation of gastric PG E synthesis-possible mechanism to explain its effective cytoprotective properties. **Gastroenterology**, 86: 1164, 1984.

Lode, H. Drug interactions with quinolones. **Rev Infect Dis**, 10(1):S132-S136, 1988.

Lopes, P.F. Alterações estruturais na mucosa do cólon derivado. Estudo estereológico experimental em ratos. **Rev bras Coloproct**, 22(3):164-169, 2002.

Lu, E.S; Lin, T; Harms, B.L; Gaumnitz, E.A; Singaram. C. A severe case of diversion colitis with large ulcerations. **Am J Gastroenterol** 90(9):1508-1510, 1995.

Lubowski, T. J., Nightingale, C.H; Sweeney, K; Quintiliani, R. Effect of sucralfate on pharmacokinetics of fleroxacin in healthy volunteers. **Antimicrob Agents Chemother**, 36:2758-2760, 1992.

Lusk, L.B; Reichen, J; Levine, J.S. Aphthous ulceration in diversion colitis. Clinical implications. **Gastroenterology**, 87(5):1171-1173, 1984.

Ma, C.K; Gottlieb, C; Haas, P.A. Diversion colitis: a clinicopathologic study of 21 cases. **Hum Pathol**, 21(4):429-436, 1990.

Madalosso, R.C. **Avaliação da toxicidade aguda e da atividade gastroprotetora de extratos de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz e Pav. em roedores.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

Maggi, L; Catellani, P.L; Fisicaro, E; Santi, P; Zani, F; Massimo, G; Colombo, P. Effect of Drying Methods on Retention of Moist Sucralfate Gel Properties. **AAPS PharmSciTech**, 1 (3) article 26, 2000.

Margarido, N.F; Nassri, C.G.G; Nassri, A.B; Rotta, C.M; Soares, L.A. Método de limpeza mecânica anterógrada intra-operatória de colo excluído. Estudo experimental em ratos. **Rev Col Bras Cir**, 30:42, 2003.

Marks, I.N; Wright, J.P; Denyer, M; Garish, J.A.M; Lucke, W. Comparison of sucralfate and cimetidine in the short-term treatment of chronic peptic ulcers. **S Afr Med J**, 57:567-573, 1980.

Marks, I.N; Lucke, W; Wright, J.P; Gridwaak, A.H. Ulcer healing and relapse rates after initial treatment with cimetidine or sucralfate. **J Clin Gastroenterol**, 3,(2):163-165, 1981.

Marks, I.N. Sucralfate-safety and side effects. **Scand J Gastroenterol**, 26(185):36-42, 1991.

Marques, L.H.S; Silva C.M.G; Lameiro, T.M.M; Almeida, M.G; Cunha, F.L; Pereira, J.A; Martinez C.A.R. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica em células da mucosacólica após aplicação de enemas com peróxido de hidrogênio: estudo experimental em ratos. **Rev bras Coloproctol**, 30:272-280, 2010.

Martenson, J.A; Bollinger, J.W; Sloan, J.A. Sucralfate in the prevention of treatment-induced diarrhea in patients receiving pelvic radiation therapy: a North Central Cancer Treatment Group phase III double-blind placebo-controlled trial. **J Clin Oncol**, 18:1239-1245, 2000.

Martin, F; Farley, A; Gagnon, M; Benseman, D. Comparison of the healing capacities of sucralfate and cimetidine in the short-term treatment of duodenal ulcer: A double blind randomized trial. **Gastroenterology**, 82(3):401-405, 1982.

Martinez, C.A.R; Waisberg, J; Palma, R.T; Silva, F.Z; Cimerman, G; Goffi, F.S. Morphometric study of gastric mucosa in dogs submitted to proximal gastric vagotomy, splenectomy or proximal gastric vagotomy associated with splenectomy. **Acta Cir Bras**, 17(5):289-298, 2002.

Martinez, C.A.R; Nonose, R; Margarido, N.F; Spadari, A.P.P; Pereira, J.A; Priolli, D.G; Máximo, F.R. Quantificação da expressão de mucinas na mucosa cólica de segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos. **Rev bras Coloproct**, 28(1):47-48, 2008.

Martinez, C.A.R; Bartocci, P.C.M; Carmo, C.V; Pereira, J.A; Miranda, D.D.C; Ribeiro, M.L. The effects of oxidative DNA damage and mutations in the p53 protein on cells of the colonic mucosa with and without the fecal stream: an experimental study in rats. **Scand J Gastroenterol**, 45:714-724, 2010.

Martinez, C.A.R; Nonose, R; Spadari, A.P.P; Máximo, F.R; Priolli, D.G; Pereira, J.A; Margarido, N.F. Quantification by computerized morphometry of tissue levels of sulfomucins and sialomucins in diversion colitis in rats. **Acta Cir Bras**, 25: 231-240, 2010.

Martinez, C.A.R; Ribeiro, M.L; Gambero, A; Miranda, D.D.C; Pereira, J.A; Nadal, S.R. The importance of oxygen free radicals in the etiopathogenesis of diversion colitis in rats. **Acta Cir Bras**, 25:387-395, 2010.

Matsuu-Matsuyama, M; Shichijo, K; Okaichi, K; Ishii, K; Wen, C.Y; Fukuda, E; Nakayama, T; Nakashima, M; Okumura, Y; Sekine, I. Sucralfate protects intestinal epithelial cells from radiation-induced apoptosis in rats. **J Radiat Res**, 47:1-8, 2006.

McCarthy, D.M. Sucralfate. **N Engl J Med**, 325:1017-1025, 1991.

McCord, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **Am J Med**, 108(8):652-659, 2000.

McGraw, B. F; Caldwell, E. G. Sucralfate. **Drug Intell Clin Pharm**, 15(7-8):578-580, 1981.

McHardy, G.G. A multicenter, double-blind trial of sucralfate and placebo in duodenal ulcer. **J Clin Gastroenterol**, 3(2): 147-152, 1981.

Mello, R.O; Silva, C.M.G; Fonte, F.P; Silva, D.L.F; Pereira, J.A; Margarido, N.F; Martinez, C.A.R. Evaluation of the number of goblet cells in the crypts of the colonic mucosa with and without fecal transit. **Rev Col Bras Cir**, 39(2):139-145, 2012.

Mendenhall, W.M; McKibben, B.T; Hoppe, B.S; Nichols, R.C; Henderson, R.H; Mendenhall, N.P. Management of radiation proctitis. **Am J ClinOncol**, 2013.

Millar, A.D; Rampton, D.S; Chander, C.L; Claxson, A.W; Blades, S; Coumbe, A. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. **Gut**, 39(3):407-15, 1996.

Mimura, T; Kuramoto, S; Yamasaki, K; Kaminishi, M. Familial adenomatous polyposis: a case report and histologic mucin study. **J Clin Gastroenterol**, 28(4):372-376, 1999.

Møller P. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 98(4):336-345, 2006.

Mortensen, P.B; Clausen, M.R. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. **Scand J Gastroenterol Suppl**, 216:132-148, 1996.

Mungall, D; Talbert, R. L; Phillips, C; Jaffe, D; Ludden, T. M. Sucralfate and warfarin. **Ann Intern Med**, 98, 557, 1983.

Murray, F; O'Brien, M.J; Birkett, D.H; Kennedy, S.M; La Mont, J.T. Diversion colitis: pathologic findings in a resected sigmoid colon and rectum. **Gastroenterology**, 93(6):1404-1408, 1987.

Miyake, T; Ariyoshi, J; Suzaki, T; Oishi, M; Sakai, M; Veda, S. Endoscopic evaluation of the effect of sucralfate therapy and other clinical parameters of the recurrence rate of gastric ulcer. **Dig Dis Sci**, 25:1-7, 1980.

Nagashima, R; Yoshida, N. Sucralfate, a basic aluminum salt of sucrose sulfate. Behaviour in gastroduodenal pH. **Arzneimittelforschung**, 29:1668-1676, 1979.

Nagashima, R. Mechanisms of action of sucralfate. **J Clin Gastroenterol**, 3:117-127, 1981.

Nagashima, R. Development and characteristics of sucralfate. **J Clin Gastroenterol**, 3(2):103-110, 1981.

Nagashima, R; Hoshino, E; Hinohara, Y; Sakai, K; Iaa, S; Nakano, H. Effect of sucralfate on ethanol-induced gastric mucosal damage in the rat. **Scand J Gastroenterol**, 18(83):17-20, 1988.

Nakazawa, S; Nagashima, R; Samloff, I.M. Selective binding of sucralfate to gastric ulcer in man. **Dig Dis Sci**, 26:297-300, 1981.

Nassri, C.G.G; Margarido, N.F; Nassri, A.B; Rotta, C.M; Soares, L.A. Modelo experimental de colite por exclusão. XXIV Fórum de Pesquisa do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. Rio de Janeiro, Brasil, 2003.

Nassri, C.G.G; Nassri, A.B; Favero, E; Rotta, C.M; Martinez, C.A.R; Margarido, N.F. Influência da irrigação de soluções nutricionais no colo excluído de trânsito intestinal: estudo experimental em ratos. **Rev bras Coloproctol**, 28:306-314, 2008.

Neut, C; Colombel, J.F; Guillemot, F; Cortot, A; Gower, P; Quandalle, P; Ribet, M; Romond, C; Paris, J.C. Impaired bacterial flora in human excluded colon. **Gut**, 30(8):1094-1098, 1989.

Neut, C; Guillemot, F; Gower-Rousseau, C; Biron, N; Cortot, A; Colombel, J.F. Treatment of diversion colitis with short-chain fatty acids. Bacteriological study. **Gastroenterol Clin Biol**, 19(11):871-875, 1995.

Neut, C; Guillemot, F; Colombel, J.F. Nitrate-reducing bacteria in diversion colitis: a clue to inflammation? **Dig Dis Sci**, 42(12):2577-2580, 1997.

Nix, D. E; Watson, W.A; Handy, L; Frost, R.W; Rescott, D.L; Goldstein, H.R. The effect of sucralfate pretreatment on the pharmacokinetics of ciprofloxacin. **Pharmacotherapy**, 9:377-380, 1989.

Nobels, F; Colemont, L; Van Moer, E. A case of diversion rectitis. **Acta Clin Bel**, 44(3):202-204, 1989.

Nonose, R; Spadari, A.P.P; Priolli, D.G; Máximo, F.R; Pereira, J.A; Martinez, C.A.R. Tissue quantification of neutral and acid mucins in the mucosa of the colon with and without fecal stream in rats. **Acta Cir Bras**, 24: 267-275, 2009.

Nonose, R. **Avaliação do padrão de expressão e do conteúdo de mucinas na mucosa cólica em modelo experimental de colite de exclusão: estudo em ratos.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2009.

O'Brien, P.C; Franklin, C.I; Dear, K.B. A phase III double-blind randomised study of rectal sucralfate suspension in the prevention of acute radiation proctitis. **Radiother Oncol**, 45:117-123, 1997.

O'Brien, P.C; Franklin, C.I; Poulsen, M.G. Acute symptoms, not rectally administered sucralfate, predict for late radiation proctitis: longer term follow-up of a phase III trial–

Trans-Tasman Radiation Oncology Group. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 54:442-449, 2002.

Odeh, M; Oliven, A. Hepatotoxicity related to sucralfate. **Hepatol Res**, 20(2):255-258, 2001.

Ogata, S; Uehara, H; Chen, A; Itzkowitz, S.H. Mucin gene expression in colonic tissues and cell lines. **Cancer Res**, 52(21):5971-5978, 1992.

Okabe, S; Takeuchi, K; Kulimi, H; Kanno, M; Kawashimat, M. Effects of an antiulcer drug. Sucralfate a basic alluminium salt of sulfated disaccharide on experimental gastric lesions and gastric secretion in rats. **Dig Dis Sci**, 28:1034-1042, 1983.

Oliveira-Neto, J.P; Aguilar-Nascimento, J.E. Intraluminal irrigations with fibers improve mucosal inflammation and atrophy in diversion colitis. **Nutrition**, 20(2): 197-199, 2004.

Ona, F.V; Boger, J.N. Rectal bleeding due to diversion colitis. **Am J Gastroenterol**, 80(1):40-41, 1985.

Ono, K; Katsuyama, T. Mucosubstance histochemistry of the normal mucosa and epithelial neoplasms of the large intestine. **Acta Pathol Jpn**, 35(2): 281-297, 1985.

Pacheco, R.G; Esposito, C.C; Müller, L.C; Castelo-Branco, M.T; Quintella, L.P; Chagas, V.L; Souza, H.S; Schanaider, A. Use of butyrate or glutamine in enema solution reduces inflammation and fibrosis in experimental diversioncolitis. **World J Gastroenterol**, 18:4278-4287, 2012.

Pai, S; Melethil, S; Cuddy, P; Hall, T. Elevation of serum aluminum in humans on a two-day sucralfate regimen. **J Clin Pharmacol**, 27:213-215, 1987.

Parpia, S. H; Nix, D.E; Hejmanowski, L.G; Goldstein, H.R; Wilton, J.H; Schentag, J.J. Sucralfate reduces the gastrointestinal absorption of norfloxacin. **Antimicrob Agents Chemother**, 33:99-102, 1989.

Pereira, J.A; Rodrigues, M.R; Sato, D.T; Silveira Júnior, P.P; Dias, A.M; Martinez, C.A.R. Evaluation of sucralfate enema in experimental diversion colitis. **J Coloproct**, 33(4):182-190, 2013.

Petersen, J.M; Caride, V.J; Prokop, E.K; Troncale, F.J; McCallum, R.W. Sucralfate delays gastric emptying of liquids and solids in duodenal ulcer patients. **Int J Rad Appl Instrum B**, 16(4):389-395, 1989.

Phan, J; Swanson, D.A; Levy, L.B; Kudchadker, R.J; Bruno, T.L; Frank, S.J. Late rectal complications after prostate brachytherapy for localized prostate cancer. **Cancer**, 115(9):1827-1839, 2009.

Phillips, T.E; Wilson, J. Morphometric analysis of mucous granule depletion and replenishment in rat colon. **Dig Dis Sci**, 38(12): 2299-2304, 1993.

Pigny, P; Guyonnet-Duperat, V; Hill, A.S. Human mucin genes assigned to 11p15.5: Identification and organisation of a cluster of genes. **Genomics**, 38: 340-352, 1996.

Pinto Jr, F.E.L; Oliveira, A.J.F; Medeiros, K.F; Ramos, A.M.O; Ramos, C.C.O; Medeiros, A.C. Repercussões histopatológicas da colostomia no coto colônico distal desfuncionalizado: estudo experimental em ratos/ Histopathological consequences of colostomy in the defunctional intestinal segment: an experimental study in rats. **Rev Col Bras Cir**, 26(6):327-333, 1999.

Pinto Jr, F.E.L; Brandt, C.T; Medeiros, A.C; Oliveira, A.J.F. Bacterial translocation in rats nonfunctioning diverted distal colon. **Acta Cirurgica Brasileira**, 22:195-201, 2007.

Pletz, M.W; Preechachatchaval, V; Bulitta, J; Allewelt, M; Burkhardt, O; Lode, H. ABT-773: Pharmacokinetics and Interactions with Ranitidine and Sucralfate. **Antimicrob Agents Chemother**, 47(3):1129-1131, 2003.

Polk, R.E; Healy, D.P; Sahai, J; Drowal, L; Racht, E. Effect of ferrous sulfate and multivitamins with zinc on absorption of ciprofloxacin in normal volunteers. **Antimicrob Agents Chemother**, 33: 1841-1844, 1989.

Porchet, N; Buisine, M.P; Desseyn, J.L; Moniaux, N; Nollet, S; Degand, P; Pigny, P; Van Seuningen, I; Laine, A; Aubert, JP. MUC genes: a superfamily of genes? Towards a functional classification of human apomucins. **J Soc Biol**, 193(1): 85-99, 1999.

Pravda, J. Radical induction theory of ulcerative colitis. **World J Gastroenterol**, 11:2371-2384, 2005.

Priolli, D.G; Margarido, N.F; Martinez, C.A.R; Rotta, C.M; Stephani, S.M. Edema quantification by computerized morphometry as an evaluation parameter for the resistance of colon anastomoses. **Acta Cir Bras**, 18(5):398-406, 2003.

Priolli, D.G; Cardinali, I.A; Piovesan, H; Margarido, N.F; Martinez, C.A.R. Proposta para estadiamento do câncer colorretal baseada em critérios morfofuncionais. Correlação com níveis séricos do antígeno carcinoembrionário. **Rev bras Coloproct**, 27(4):374-383, 2007.

Ramon, J; Dautrey, S; Farinoti, R; Carbon, C; Rubinstein, E. Intestinal elimination of ciprofloxacin in rabbits. **Antimicrob Agents Chemother**, 38:757-760, 1994.

Rees, W.D. Mechanisms of gastroduodenal protection by sucralfate. **Am J Med**, 91(2A):58S-63S, 1991.

Reis, L.D.O; Lombardi, O.A; Reis, A.D.O; Cardoso, E.H; Cardoso-Filho, C.A.M. Cirurgia de Hartmann - Análise de 41 casos em Hospital de referência do norte do Paraná. **Rev bras Coloproct**, 21(1):19-22, 2001.

Reis, S.B; Oliveira, C.C; Acedo, S.C; Miranda, D.D; Ribeiro, M.L; Pedrazzoli, J. Jr. Attenuation of colitis injury in rats using *Garcinia cambogia* extract. **Phytother Res.** 23(3):324-329, 2008.

Ribeiro, M.L; Priolli, D.G; Miranda, D.D; Arçari, D.P; Pedrazzoli, J.Jr; Martinez, C.A.R. Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. **Clin Colorectal Cancer**, 7(4):267-72, 2008.

Robertson, J. A; Salusky, I.B; Goodman, W.G; Norris, K.C; Coburn, J.W. Sucralfate, intestinal aluminum absorption, and aluminium toxicity in a patient on dialysis. **Ann Intern Med**, 111:179-181, 1989.

Rodrigues, J.A.G; Queiroz, I.N.L; Bessa, E.F; Coura, C.O; Amorim, R.C.N; Benevides, N.M.B. Anticoagulant activity of sulfated polysaccharides fractions from an aqueous extract obtained from the red seaweed *Halymenia floresia* (Clemente) C. Agardh. **Acta Scientiarum Technology Maringá**, v. 33, n. 4, p. 371-378, 2011.

Roe, A.M; Warren, B.F; Brodribb, A.J; Brown, C. Diversion colitis and involution of the defunctioned anorectum. **Gut**, 34(3):382-385, 1993.

Roediger, W.E. Anaerobic bacteria, the colon and colitis. **Aust N Z J Surg**, 50(1): 73-75, 1980.

Roediger, W.E. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. **Gastroenterology**, 83(2):424-429, 1982.

Roediger, W.E; Rae, D.A. Trophic effect of short chain fatty acids on mucosal handling of ions by the defunctioned colon. **Br J Surg**, 69(1):23-25, 1982.

Roediger, W.E; Nance, S. Metabolic induction of experimental ulcerative colitis by inhibition of fatty acid oxidation. **Br J Exp Pathol**, 67(6):773-782, 1986.

Roediger, W.E. The starved colon - diminished mucosal nutrition, diminished absorption, and colitis. **Dis Colon Rectum**, 33(10):858-862, 1990.

Rubio, C.A; Rivera, F. Quantification of acid mucins in the descending colon of rats having simultaneously growing colonic tumors. **APMIS**, 99(11):993-996, 1991.

Rubio, C.A; Huang, C.B. Quantification of the sulphomucin-producing cell population of the colonic mucosa during protracted stress in rats. **In Vivo**, 6(1):81-84, 1992.

Sakata, T; von-Engelhardt, W. Luminal mucin in the large intestine of mice, rats and guinea pigs. **Cell Tissue Res**, 219(3):629-635, 1981.

Samloff, I.M. Inhibition of peptic aggression by sucralfate. The view from the ulcer crater. **Scand J Gastroenterol**, 18(83):7-11, 1983.

- Samloff, I.M; O'Dell, C. Inhibition of peptic activity by sucralfate. **Am J Med**, 79(2):15-18, 1985.
- Sanguineti, G; Franzone, P. Marcenaro, M; Foppiano, F; Vitale, V. Sucralfate versus mesalazine versus hydrocortisone in the prevention of acute radiation proctitis during conformal radiotherapy for prostate carcinoma: a randomized study. **Strahlentherapie und Onkologie**, 179(7):464-470, 2003.
- Santarelli, L; Gabrielli, M; Candelli, M; Cremonini, F; Nista, E. C; Cammarota, G; Gasbarrini, G; Gasbarrini, A. Post-cholecystectomy alkaline reactive gastritis: a randomized trial comparing sucralfate versus rabeprazole or no treatment. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, 15:975-979, 2003.
- Scheiman, J.M; Kraus, E.R; Yoshimura, K; Boland, C.R. Effect of sucralfate on components of mucosal barrier produced by cultured canine epithelial cells in vitro. **Dig Dis Sci**, 37:1853-1859, 1992.
- Scheppach, W; Christl, S.U; Bartran, H.P; Richter, F; Kasper, H. Effects of shortchain fatty acids on the inflamed colonic mucosa. **Scand J Gastroenterol**, 222:53-57, 1997.
- Scheppach, W; Weiler, F. The butyrate story: old wine in new bottles? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 7(5):563-567, 2004.
- Shea-Donohue, T; Steel, L; Montcalm, E; Dubois, A. Gastric protection by sucralfate. Role of mucus and prostaglandins. **Gastroenterology**, 91: 660-666, 1986.
- Sheahan, D.G; Jervis, H.R. Comparative histochemistry of gastrointestinal mucosubstances. **Am J Anat**, 146(2):103-131, 1976.
- Sheehan, J.F; Brynjolfsson, G. Ulcerative colitis following hydrogen peroxide enema. Case report and experimental production with transient emphysema of colonic wall and gas embolism. **Lab Invest**, 9:150-68, 1960.
- Sheridan, A.M; Fitzpatrick, S; Wang, C; Wheeler, D.C; Lieberthal, W. Lipid peroxidation contributes to hydrogen peroxide induced cytotoxicity in renal epithelial cells. **Kidney Int**, 49(1):88-93, 1996.
- Sherman, S.I; Tielens, E.T; Ladenson, P.W. Sucralfate causes malabsorption of L-Thyroxine. **Am J Med**, 96(6): 531-535, 1994.
- Shimizu, M; Ishii, A; Imai, T. Experimental studies on antiulcerous activity of basic sucrose sulfate ICG-A6J: I. Assessment of CG-A6J for antiulcerous, antacid, and anti-pepsin activities in pylorus-ligated rats and effect of CG-A6J on blood coagulability in rabbit. **Kiso-to-Rinsho (Clin Rep)**, 2: 374-384, 1968.
- Slomiany, B.L; Hurty, V.L.N; Laszewicz, W; Piasek, A; Slomiany, A. Effect of sucralfate on the viscosity and retardation of hydrogen ion diffusion by gastric mucus. **Gastroenterology**, 88: 1591, 1985.

Slomiany, B.L; Takagi, A; Laszewicz, W; Slomiany, A. In vitro inhibition of peptic degradation of gastric mucus by sucralfate [Abstract]. **Gastroenterology**, 88: 1590, 1985.

Slomiany, B.L; Piotrowski, J; Okazaki, K; Grzelinska, E; Slomiany, A. Nature of the enhancement of the protective qualities of gastric mucus by sucralfate. **Digestion**, 44:222-231, 1989.

Slomiany, B.L; Murty, V.L; Piotrowski, E; Morita, M; Piotrowski, J; Slomiany, A. Activation of arachidonoyl phospholipase A2 in prostaglandin-mediated action of sucralfate. **Gen Pharmacol**, 25:261-266, 1994.

Soergel, K.H. Colonic fermentation: metabolic and clinical implications. **Clin Investig**, 72(10):742-748, 1994.

Sousa, M.V; Priolli, D.G; Portes, A.V; Cardinalli, I.A; Pereira, J.A; Martinez, C.A.R. Evaluation by computerized morphometry of histopathological alterations of the colon wall in segments with and without intestinal transit in rats. **Acta Cir Bras**, 23:417-424, 2008.

Spicer, S.S; Leppi, T.J; Stoward, P.J. Suggestions for a histochemical terminology of carbohydrate-rich tissue components. **J Histochem Cytochem**, 13(7):599-603, 1965.

Stein, G.E. Drug interaction with fluoroquinolones. **Am J Med**, 6A: 81-86, 1991.

Steiner, K; Buhring, K.K; Faro, H.P; Garbe, A; Nowak, H. Sucralfate: pharmacokinetics, metabolism and selective binding to experimental gastric and duodenal ulcers in animals. **Drug Res**, 32: 512-518, 1982.

Swallow, D; Gendler, S; Griffiths, B; Kearney, A; Povey, S; Sheer, D; Palmer, R; Taylor-Papadimitriou, J. The hypervariable gene locus PUM, which codes for the tumor-associated epithelial mucins, is located on chromosome 1 within the region 1q21-24. **Ann Hum Genet**, 51:289-294, 1987.

Sweetman, S.C. **Martindale-The complete drug reference**. 36th, Pharmaceutical Press, 2009.

Swidsinski, A; Loening-Baucke, V; Theissig, F; Engelhardt, H; Bengmark, S; Koch, S; Lochs, H; Dorffel, Y. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. **Gut**, 56(3):343-350, 2007.

Syed, H.A; Malone, P.S; Hitchcock, R.J. Diversion colitis in children with colovaginoplasty. **BJU Int**, 87(9):857-860, 2001.

Tamai, O; Miyazato, H; Shiraishi, M; Kusano, T; Muto Y. Morphologic and mucin histochemical analysis of transitional zones in advanced ulcerated colorectal carcinomas: potential prognostic indicators. **J Surg Oncol**, 67(2):85-89, 1998.

Tarnawski, A; Hollander, D; Krause, W.J; Zipser, R.D; Stachura, J; Gergely, H. Does sucralfate affect the normal gastric mucosa? Histologic, ultrastructural, and functional assessment in the rat. **Gastroenterology**, 90:893-905, 1986.

Tesler, M.A; Lim, E.S. Protection of gastric mucosa by sucralfate from aspirin-induced erosions. **J Clin Gastroenterol**, 3(2):175-179, 1981.

Toolenaar, T.A; Freundt, I; Huikeshoven, F.J; Drogendijk, A.C; Jeekel, H; ChadhaAjwani, S. The occurrence of diversion colitis in patients with a sigmoidneovagina. **Hum Pathol**, 24(8):846-849, 1993.

Tovar, A.M.F; Capillé, N.V.M; Santos, G.R.C; Vairo, B.C; Oliveira, S.N.M.C.G; Fonseca, R.J.C; Mourao, P.A.S. Heparin from bovine intestinal mucosa: Glycans with multiple sulfation patterns and anticoagulant effects. **Thrombosis and Haemostasis**, 903-915, 2012.

Trauner, M; Grygar, S; Stauber, R.E; Brodatsch-Hausler, E; Klimpfinger, M. Carcinoembryonic antigen, cytokeratin expression and mucin composition in hyperplastic and neoplastic polyps of the colorectum. **Z Gastroenterol**, 32(11): 626-631, 1994.

Tsuiji, H; Hayashi, M; Wynn, D.M; Irimura, T. Expression of mucin-associated sulfo-Lea carbohydrate epitopes on human colon carcinoma cells. **Jpn J Cancer Res**, 89(12):1267-1275, 1998.

Tytgat, K.M; Bovelander, F.J; Opdam, F.J; Einerhand, A.W; Buller, H.A; Dekker, J. Biosynthesis of rat MUC2 in colon and its analogy with human MUC2. **Biochem J**, 309:221-229, 1995.

Tytgat, K.M; Opdam, F.J; Dekker, J. MUC2 is the prominent colonic mucin expressed in ulcerative colitis. **Gut**, 38(4):554-563, 1996.

Uchida, K; Kado, S; Ando, M; Nagata, Y; Takagi, A; Onoue, M. A mucinous histochemical study on malignancy of aberrant crypt foci (ACF) in rat colon. **J Vet Med Sci**, 63(2):145-149, 2001.

Vaira, P; Corbelli, G; Brunetti, G. Gastric retention of sucralfate gel and suspension in upper gastrointestinal diseases. **Aliment Pharmacol Ther**, 7:531-535, 1993.

Van-Klinken, B.J; Dekker, J; Buller, H.A; Einerhand, A.W. Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion. **Am J Physiol**, 269:613-627, 1995.

Vasina, V; Broccoli, M; Ursino, M.G; Bellot, S.F; Soleti, A; Paolini, M. Effects of the non-peptidyl low molecular weight radical scavenger IAC in DNBS-induced colitis in rats. **Eur J Pharmacol**, 614(1-3):137-145, 2009.

Velazquez, O.C; Lederer, H.M; Rombeau, J.L. Butyrate and colonocyte. Production, absorption, metabolism and therapeutic implications. **Adv Exp Med Biol**, 427:123-134, 1997.

Villanacci, V; Talbot, I.C; Rossi, E; Bassotti, G. Ischaemia: a pathogenetic clue in diversion colitis? **Colorectal Dis**, 9(7):601-605, 2007.

Volkin, D.B; Verticelli, A.M; Marfia, K.E; Burke, C.J; Mach, H; Middaugh, C.R. Sucralfate and soluble sucrose octasulfate bind and stabilize acidic fibroblast growth factor. **BiochimBiophys Acta**,1203:18-26, 1993.

Wada, K; Kamisaki, Y; Kitano, M; Kishimoto, Y; Nakamoto, K; Itoh, T. Effects of sucralfate on acute gastric mucosal injury and gastric ulcer induced by ischemia-reperfusion in rats. **Pharmacology**, 54:57-63, 1997.

Whelan, R.L; Abramson, D; Kim, D.S; Hashmi, H.F. Diversion colitis. A prospective study. **Surg Endosc**, 8(1):19-24, 1994.

Willemsen, L.E; Koetsier, M.A; van Deventer, S.J; van Tol, E.A. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E1 and E2 production by intestinal myofibroblasts. **Gut**, 52(10):1442-1447, 2003.

Williams, S.J; Munster, D.J; Quin, R.J; Gotley, D.C; McGuckin, M.A. The MUC3 gene encodes a transmembrane mucin and is alternatively spliced. **Biochem Biophys Res Commun**, 261(1):83-89, 1999.

Wong, J.M; Souza, R; Kendall, C.W. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **J Clin Gastroenterol**, 40:235-243, 2006.

Wreschner, D.H; Hareuveni, M; Tsarfaty, I; Smorodinsky, N; Horev, J; Zaretsky, J; Kotkes, P; Weiss, M; Lathe, R; Dion, A. Human epithelial tumor antigen cDNA sequences. Differential splicing may generate multiple protein forms. **Eur J Biochem**, 189(3):463-473, 1990.

Wright, J.P; Winter, T.A; Candy, S; Marks, I.S. Sucralfate and methylprednisolone enemas in active ulcerative colitis: a prospective, single-blind study. **Dig Dis Sci**, 44:1899-1901, 1999.

Wu, W.C; Semble E.L; Castell, D.O. Sucralfate therapy of nonsteroidal anti-inflammatory drug induced gastritis. **Gastroenterology**, 88: 1636, 1985.

Yeong, M.L; Bethwaite, P.B; Prasad, J; Isbister, W.H. Lymphoid follicular hyperplasia - a distinctive feature of diversion colitis. **Histopathology**, 19(1): 55-61, 1991.

Yoshida, N; Terao, N; Nagashima, R. Sucralfate, a basic aluminum salt of sucrose sulfate. IV. Interaction with enzyme pepsin. **Arzneim-Forsch**, 30:79-80. 1980.

Yuk, J. H; Nightingale, C.N; Quintiliani, R. Ciprofloxacin levels when receiving sucralfate. **JAMA**, 262(7):901, (Letter), 1989.

Zahari, I; Avidor, I; Marcus, H; Rosenbach, Y; Waisman, Y. Effect of sucralfate on experimental colitis in the rat. **Dis Colon Rectum**, 32(2): 95-98, 1989.

Zix, J.A; Geerdes-Fenge, H.F; Rau, M. Pharmacokinetics of sparfloxacin and interaction with cisapride and sucralfate. **Antimicrob Agents Chemother**, 41: 1668-1672, 1997.

9. ANEXOS

ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética

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 Prioli; 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

ANEXO 2 – Conteúdo de mucinas ácidas nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9%, SCF1 e SCF2 após duas e quatro semanas.

Grupo	Controle		SCF 1g/kg/d		SCF 2g/kg/d		
	Semanas	Duas	Quatro	Duas	Quatro	Duas	Quatro
		12,41	17,92	17,12	19,11	36,63	33,86
		13,90	14,92	23,90	21,92	35,45	27,47
		13,00	18,89	17,55	16,82	35,39	22,44
		17,70	17,40	23,50	19,74	36,23	29,50
		11,15	17,73	23,03	17,67	36,40	47,00
		10,96	17,47	21,84	25,68	36,25	33,30
		12,66	9,67	20,52	19,25	34,33	34,67
		10,41	16,64	24,00	20,54	23,43	21,47
		15,64	20,22	14,00	24,18	27,41	19,00
		15,11	10,51	20,00	23,80	32,35	21,11
		19,90	11,25	18,83	26,40	22,25	31,88
		24,90	18,22	19,95	18,92	20,45	31,11
		17,51	11,17	24,28	28,14	35,08	21,39
		23,19		23,69	20,76	30,73	29,56
		21,25		17,13	20,91	41,56	22,09
		16,69		20,47	13,87	31,99	29,35
		16,24		19,81	25,01	25,86	33,00
		19,93		17,13		27,88	34,99
		23,70		22,75		23,49	
		18,22		20,93		17,24	
		14,24		17,30		30,90	
		14,12				20,65	
		9,49				24,27	
		11,98				23,17	
		13,60				24,22	
						20,23	

Valores da quantificação das mucinas ácidas pela técnica do AB (%/campo), comparando animais dos grupos controle, SCF 1g/kg/d e SCF 2g/kg/d após duas ou quatro semanas de aplicação de enemas.

ANEXO 3 – Conteúdo de mucinas neutras nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9%, SCF1 e SCF2 após duas e quatro semanas.

Grupo	Controle		SCF 1g/kg/d		SCF 2g/kg/d		
	Semanas	Duas	Quatro	Duas	Quatro	Duas	Quatro
		6,84	6,08	21,67	13,19	18,77	21,99
		3,74	8,13	22,50	18,57	33,30	14,57
		6,14	4,23	18,44	19,94	27,89	22,11
		8,48	7,91	19,18	13,72	26,72	19,63
		6,30	4,07	20,17	21,38	19,93	27,24
		6,87	5,66	24,15	33,71	18,54	16,64
		8,01	3,35	23,35	21,42	21,52	19,18
		7,90	4,45	22,87	27,48	27,42	25,50
		6,01	4,41	21,89	24,51	22,35	22,81
		8,29	4,98	25,81	23,77	29,17	24,65
		9,52	7,68	24,13	22,31	25,75	28,57
		3,31		21,58	31,45	28,91	18,49
		6,65		14,28	33,10	19,96	17,65
		6,30		23,25		21,95	25,64
		5,76		18,35			
		6,66					

Valores da quantificação das mucinas ácidas pela técnica do PAS (%/campo), comparando animais dos grupos controle, SCF 1g/kg/d e SCF 2g/kg/d após duas ou quatro semanas de aplicação de enemas.