



Universidade São Francisco
Avenida Francisco de Assis, 218
CEP 12916-900 - BRAGANÇA PAULISTA-SP



MESTRADO

Ciências da Saúde

BRAGANÇA PAULISTA
2010

AValiação DOS EFEITOS DO ÁCIDO 5-AMINOSALICÍLICO CONTRA O DANO OXIDATIVO AO DNA NA COLITE DE EXCLUSÃO.
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

USF
2010

CAROLINE CALTABIANO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO 5-AMINOSALICÍLICO CONTRA O DANO
OXIDATIVO AO DNA NA COLITE DE EXCLUSÃO.
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

**BRAGANÇA PAULISTA
2010**

CAROLINE CALTABIANO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO 5-AMINOSALICÍLICO CONTRA O DANO
OXIDATIVO AO DNA NA COLITE DE EXCLUSÃO.
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco (USF) 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

2010

WI 522
C166a

Caltabiano, Caroline.

Avaliação dos efeitos do ácido 5-aminosalicílico contra o dano oxidativo ao DNA na colite de exclusão: estudo experimental em ratos / Caroline Caltabiano. -- Bragança Paulista, 2010.
97 p.

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

Orientação de: Carlos Augusto Real Martinez.

1. Colite. 2. Mesalamina. 3. Ácidos graxos voláteis.
4. Ratos. I. Martinez, Carlos Augusto Real. II. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Presidente: Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

Membros titulares:

1. Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

2. Prof. Dr. René Crepaldi Filho

3. Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro

Membros suplentes:

1. Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho

2. Prof. Dr. Nelson Fontana Margarido

Resultado: _____

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

Data: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmão, ORAZIO, GRACI MARY E WAGNER pelo apoio, amor, amizade e por estarem sempre ao meu lado. Muito obrigado.

Ao meu marido VANDERLEI, pela felicidade que traz à minha vida, grande amigo, companheiro, sempre me apoiando e ajudando em tudo que preciso. Te amo!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ**, pela amizade e incentivo profissional, me ensinando e orientando desde o início da minha carreira em tudo que precisei.

Ao Professor **JOSE EDUARDO CHRISTOFOLETTI DE FREITAS** por mostrar a beleza da medicina durante a minha formação e pelo apoio e amizade em diferentes momentos.

A Professora Doutora **DENISE GONÇALVES PRIOLLI** por mostrar sempre entusiasmo nas pesquisas, aulas e, principalmente, na vida.

Ao Professor **CALED JAOUDAD KADRI** grande amigo sempre alegre e otimista. Com ele muito aprendi sobre as relações médico-paciente e interpessoais.

Ao Professor Doutor **MARCELO LIMA RIBEIRO**, pelo inestimável auxílio na quantificação dos níveis danos ao DNA, realizado no **LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR** da **UNIDADE DE FARMACOLOGIA E GASTROENTEROLOGIA (UNIFAG)** da Universidade São Francisco;

A Professora Doutora **MÁRCIA MILENA PIVATTO SERRA** pela dedicação na análise estatística dos resultados encontrados em nosso estudo;

Aos acadêmicos, **FELIPE RODRIGUES MÁXIMO, ANA PAULA PIMENTEL SPADARI** e **DANIEL DUARTE DA CONCEIÇÃO MIRANDA** pelo auxílio em todas as etapas experimentais envolvidas neste estudo;

Ao Sr. **FABIANO SALLOVICKZ** pela colaboração no **LABORATÓRIO DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO**;

Aos funcionários do **BIOTÉRIO CENTRAL DA UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO** pelo primoroso cuidado com os animais de experimentação.

A **FUNDAÇÃO DE AMPARO E PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP)** pelo suporte financeiro concedido ao presente estudo.

Aos professores e funcionários do **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO, BRAGANÇA PAULISTA**, pela oportunidade da concretização deste sonho.

A **UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO**, por proporcionar meu crescimento profissional.

RESUMO

Estudos recentes demonstraram a relação entre estresse oxidativo e a etiopatogenia da colite de exclusão. Já se demonstrou que o ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) é eficaz no tratamento de diferentes formas de colite, entretanto, nenhum estudo avaliou sua eficácia contra o estresse oxidativo ao DNA em modelos experimentais de colite de exclusão. É possível que a atividade antioxidante do 5-ASA possa ser o mecanismo responsável pelo seu efeito terapêutico. **OBJETIVO:** Avaliar os efeitos do ácido 5-ASA contra o dano oxidativo do DNA em modelo experimental de colite de exclusão. **MÉTODOS:** Vinte e seis ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos com 13 animais segundo o sacrifício ter sido realizado duas ou quatro semanas após a derivação fecal do cólon esquerdo. Todos os animais foram submetidos à colostomia proximal no cólon descendente e fístula mucosa no remanescente cólico distal. Cada grupo foi dividido em dois subgrupos segundo a intervenção no cólon sem trânsito ter sido realizada com solução fisiológica a 0,9% (subgrupo controle; n=4) ou ácido 5-ASA (subgrupo experimento; n= 9). O diagnóstico de colite foi feito pelo estudo histopatológico. Os níveis de dano oxidativo ao DNA foram determinados pela técnica do ensaio em cometa, analisando 100 células obtidas dos segmentos com e sem trânsito, antes e após desafio com H₂O₂. Para o estudo estatístico foram utilizados os testes t pareado, ANOVA e pós teste Newman-Keuls, estabelecendo-se nível de significância de 5% (p<0,05). **RESULTADOS:** Os níveis de dano oxidativo ao DNA nos animais submetidos à intervenção com solução fisiológica, nos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal após duas e quatro semanas de irrigação foram de 2,59±0,54, 3,28±0,62 e 2,99±0,17, 3,20±0,27, respectivamente. Os níveis de dano oxidativo nos animais submetidos à intervenção com ácido 5-ASA, nos cólons providos e desprovidos de trânsito após duas e quatro semanas de irrigação foram de 1,80±0,05, 2,07±0,15 e 2,06±0,13, 2,45±0,17, respectivamente. Os níveis de dano ao DNA em segmentos desprovidos de trânsito fecal nos animais irrigados com ácido 5-ASA, após duas e quatro semanas foram menores quando comparados aos animais irrigados com solução fisiológica (p=0,005 e p=0,005, respectivamente). Após o desafio com H₂O₂ os níveis de dano ao DNA no cólon desprovido de trânsito fecal permaneceram menores nos animais irrigados com ácido 5-ASA por duas e quatro semanas quando comparados aos irrigados com solução fisiológica (p=0,01 e p=0,005, respectivamente). **CONCLUSÃO:** A aplicação de enemas com ácido 5-ASA reduz os níveis de dano oxidativo ao DNA no cólon desprovido de trânsito fecal, após duas e quatro semanas de irrigação, mesmo após desafio com H₂O₂, sugerindo que a substância apresenta efeitos protetores contra o dano oxidativo do DNA.

PALAVRAS CHAVES: Colite. Mesalamina. 5-aminosalicilato. Ácidos graxos voláteis. Ratos.

ABSTRACT

Recent studies has been demonstrated the relationship between oxidative stress and the etiopathogenesis of diversion colitis. It has been shown that 5-aminosalicylic acid (5-ASA) is effective in treating different forms of colitis, however, no studies have evaluated its effectiveness against oxidative DNA damage in experimental models of diversion colitis. It is possible that the antioxidant activity of 5-ASA may be the mechanism responsible for its therapeutic effect. **OBJECTIVE:** To evaluate the effects of 5-ASA against oxidative DNA damage in an experimental model of diversion colitis. **METHODS:** Twenty-six male Wistar rats were divided into two groups with 13 animals in accordance with the sacrifice was performed two to four weeks after the fecal derivation of the left colon. All animals underwent proximal colostomy in the descending colon and colonic mucosa fistula in the remaining distal. Each group was divided into two subgroups according to the intervention in the colon without transit have been performed with 0.9% saline solution (control subgroup, n = 4) or acid 5-ASA (experimental subgroup, n = 9). The diagnosis of colitis was made by histological examination. The levels of oxidative DNA damage were determined by the comet assay, and were analyzed 100 cells obtained from segments with and without fecal stream before and after challenge with H₂O₂. For the statistical analysis were used the paired t test, ANOVA and Newman-Keuls pos test, adopting a significance level of 5% (p <0.05). **RESULTS:** The levels of oxidative DNA damage in animals subjected to intervention with saline solution, in the colon with and without fecal stream, after two and four weeks of irrigation were 2.59±0.54, 3.28±0.62 and 2.99±0.17, 3.20±0.27, respectively. The levels of oxidative DNA damage in animals subjected to intervention with 5-ASA in the colon with and without fecal stream, after two and four weeks of irrigation were 1.80±0.05, 2.07±0.15 and 2,06±0.13, 2.45±0.17, respectively. The levels of oxidative DNA damage in segments devoid of fecal stream in the animals irrigated with acid 5-ASA, after two and four weeks were lower when compared to animals irrigated with saline solution (p=0.005 and p=0.005, respectively). Following challenge with H₂O₂ the levels of oxidative DNA damage in the colon devoid of fecal stream remained lower in the animals irrigated with 5-ASA for two and four weeks when compared with animals irrigated with saline solution (p=0.01 and p=0.005, respectively). **CONCLUSION:** The use of enemas with 5-ASA acid reduces the levels of oxidative DNA damage in the colon devoid of fecal stream, after two and four weeks of irrigation, even after challenge with H₂O₂, suggesting that the 5-ASA present protective effects against oxidative DNA damage.

KEY WORDS: Colitis. Mesalazine. 5-aminosalicylic. Short-chain fatty acid. Rats.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
c	Criptas cólica
CAT	Catalase
CE	Colite de exclusão
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DII	Doença inflamatória intestinal
DP	Desvio padrão
DSS	Sulfato Sódico Dextran
EDTA	Etileno diamino tetracético
EtBr	Brometo de etídio
F	French
FDA	Diacetato de fluoresceína
GPX	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSH-rd	Glutaciona redutase
HE	Hematoxilina-eosina
HO ₂ [•]	Hidroperoxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

IC	Intervalo de confiança
iNOS	Óxido nítrico sintase
μl	Microlitros
M	Molar
mA	Miliampér
mc	Muco
mM	Milimolar
MM	Muscular da mucosa
<i>MUC-2</i>	Gene <i>MUC-2</i>
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Óxido de sódio
NF-κβ	Fator nuclear kappa-beta
O ₂ ^{•-}	Superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlet
OH ⁻	Hidroxila
PGE-2	Prostaglandina E-2
PBS	Tampão fosfato
RCUI	Retocolite ulcerativa inespecífica
RLO	Radicais livres de oxigênio
sm	Submucosa
SOD	Superóxido dismutase

SPF	<i>Specific free parasitis</i>
TM	<i>Tail moment</i>
TNBS	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
UNIFAG	Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia
V	Volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto da irrigação do segmento cólico excluído de trânsito fecal com a solução de intervenção.....	28
Figura 2 - Foto da placa de Peyer como reparo anatômico.....	32
Figura 3 – Foto da ligadura da artéria marginal.....	32
Figura 4 – Foto da limpeza mecânica anterógrada do cólon excluído de trânsito fecal.....	33
Figura 5 – Foto do aspecto final da parede abdominal após confecção dos estomas.....	33
Figura 6 -Fotomicrografia de segmento provido de trânsito fecal de animal submetido à derivação intestinal por quatro semanas (HE – 100x). c=criptas; MM= muscular da mucosa; sm = submucosa; mp= muscular própria.....	37
Figura 7 - Fotomicrografia segmento desprovido de trânsito fecal de animal submetido à derivação intestinal por quatro semanas (HE – 100x). mc = muco; c=criptas; MM= muscular da mucosa; sm = submucosa; mp= muscular própria.....	37
Figura 8 - Foto mostrando a avaliação dos níveis de estresse oxidativo (<i>Tail Moment</i>), pelo ensaio do cometa. A – Célula normal; B – Célula com dano oxidativo moderado; C – Célula com dano oxidativo intenso.....	40
Figura 9 - Fotomicrografia do segmento provido de trânsito após duas semanas de derivação fecal e irrigação com solução fisiológica 0,9%. (HE-200x).....	43
Figura 10 – Fotomicrografia das alterações histológicas encontradas no segmento provido de trânsito após quatro semanas de derivação fecal e irrigação com solução fisiológica a 0,9%. (HE-200x).....	44
Figura 11 – Fotomicrografia alterações histológicas encontradas no segmento desprovido de trânsito após duas semanas de derivação fecal e irrigação com	44

solução fisiológica 0,9%. (HE-200x).....	
Figura 12 - A – Fotomicrografia do segmento provido de trânsito após duas semanas de derivação fecal e irrigação com ácido 5-ASA. B – Fotomicrografia do segmento provido de trânsito após quatro semanas de derivação fecal e irrigação com ácido 5-ASA. (HE-200x).....	45
Figura 13 - Fotomicrografia do segmento desprovido de trânsito após duas semanas de derivação fecal e irrigação com ácido 5-ASA (HE-200x).....	45
Figura 14 - Fotomicrografia do segmento desprovido de trânsito após quatro semanas de derivação fecal e irrigação com ácido 5-ASA. (HE-200x).....	46
Figura 15 - Gráfico - Valor médio, com o respectivo desvio padrão, dos níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear nos cólons irrigados com solução fisiológica ou ácido 5-ASA por duas semanas comparando segmentos com e sem trânsito fecal. Teste pareado;significante.....	47
Figura 16 - Gráfico - valor médio, com o respectivo desvio padrão, dos níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear nos cólons irrigados com solução fisiológica ou ácido 5-ASA, por quatro semanas comparando segmentos com e sem trânsito fecal. Teste t pareado; * = significativa.....	48
Figura 17 - Gráfico - variação dos níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear nos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal nos animais submetidos à intervenção por duas ou quatro semanas com solução fisiológica a 0,9% e ácido 5-ASA. Teste de ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls; * = significativa.....	49
Figura 18 - Gráfico - variação dos níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear nos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal comparando animais submetidos à intervenção por duas quatro semanas irrigados com solução fisiológica a 0,9% ou ácido 5-ASA. Teste de ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls; * = significativa.....	50
Figura 19 – Gráfico - valores médios, com o respectivo desvio padrão, dos níveis de dano oxidativo ao DNA nos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal, após desafio com H ₂ O ₂ , comparando animais submetidos à intervenção com	52

solução fisiológica e ácido 5-ASA por duas semanas. Teste t pareado; * =
significante

Figura 20 – Gráfico - valores médios, com o respectivo desvio padrão, dos níveis de dano oxidativo ao DNA nos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal, após desafio com H₂O₂, comparando animais submetidos à intervenção com solução fisiológica e ácido 5-ASA por quatro semanas. Teste t pareado; * =
significante.....

53

Figura 21 – Gráfico - variação dos níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear nos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal nos animais submetidos à intervenção por quatro semanas com solução fisiológica a 0,9% e ácido 5-ASA, desafiados com H₂O₂. Teste de ANOVA, pós teste de Newman-Keuls; * =
significante.....

54

Figura 22 – Gráfico - variação dos níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear nos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal comparando animais submetidos à intervenção por duas quatro semanas irrigados com solução fisiológica a 0,9% ou ácido 5-ASA, após desafio com H₂O₂. Teste de ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls; * =
significante.....

55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Colite de exclusão.....	01
1.2. Radicais livres.....	11
1.3. Sistemas de defesas antioxidantes.....	14
1.4. Colite experimental e estresse oxidativo.....	15
1.5. Ácido 5- aminosalicílico.....	19
2. OBJETIVOS	25
3. METODO	27
3.1. Animal de experimentação.....	27
3.2. Grupos experimentais.....	27
3.2.1. Subgrupo controle (duas semanas).....	28
3.2.2. Subgrupo controle (quatro semanas).....	28
3.2.3. Subgrupo experimento (duas semanas).....	29
3.2.4. Subgrupo experimento (quatro semanas).....	29
3.3. Período pré operatório.....	29
3.4. Técnica anestésica.....	30
3.5. Técnica cirúrgica.....	30
3.6. Pós operatório.....	34
3.6.1. Imediato.....	34
3.6.2. Tardio.....	34
3.7. Sacrifício dos animais.....	34
3.8. Técnica histológica.....	35
3.9. Confeção dos blocos de parafina e laminas.....	36
3.10. Eletroforese em gel de célula isolada (ensaio do cometa).....	38
3.11. Método estatístico.....	40
4. RESULTADOS	43
4.1. Diagnostico histológico de colite.....	43
4.2. Níveis de dano oxidativo após duas semanas de irrigação.....	46
4.3. Níveis de dano oxidativo após quatro semanas de irrigação.....	47
4.4. Níveis de dano oxidativo após desafio com H ₂ O ₂ (duas semanas).....	51
4.5. Níveis de dano oxidativo após desafio com H ₂ O ₂ (quatro semanas).....	52
5. DISCUSSÃO	57
5.1. Quanto ao método.....	57
5.1.1. Aspectos éticos da pesquisa.....	57

5.1.2. Animal de experimentação.....	57
5.1.3. Fase pré-operatória.....	59
5.1.4. Anestesia.....	61
5.1.5. Técnica operatória.....	62
5.1.6. Preparo mecânico do cólon exclusivo.....	63
5.1.7. O reparo anatômico para secção do cólon.....	64
5.1.8. Grupos experimentais.....	66
5.1.9. Técnicas histológicas.....	68
5.1.10. Ensaio em cometa.....	69
5.2. Quanto aos resultados.....	72
6. CONCLUSÕES.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
FONTES CONSULTADAS.....	99
ANEXO.....	101
APÊNDICE.....	103

1. INTRODUÇÃO

1.1. Colite de Exclusão

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

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

realização de estomas para derivação intestinal (Habr-Gama et al.,1997; Curi et al., 2002).

A CE é diagnosticada em 91% dos pacientes submetidos ao exame endoscópico sistemático do intestino excluído de trânsito, após três meses da confecção do estoma, sendo de intensidade leve em 52%, moderada em 44% e acentuada em 4% deles (Haas et al., 1990; Whelan et al., 1994). Estudos sugeriram que a incidência seja ainda maior, ao demonstrarem que o trânsito intestinal somente é restabelecido em 57% dos portadores de colostomia temporária, condenando os demais a conviver pelo resto de suas vidas com a enfermidade (Haas e Haas, 1988; Habr-Gama et al., 1997). Nos doentes cujo trânsito intestinal é restabelecido, o período médio para que isso ocorra varia de seis a oito meses, podendo chegar até 60 meses, tempo mais do que suficiente para instalação da doença (Habr-Gama et al., 1997; Curi et al., 2002).

O quadro clínico é variável, estando diretamente relacionado à extensão do cólon excluído de trânsito e ao tempo decorrido desde a confecção do estoma (Glotzer et al., 1981). Nos casos iniciais, quando o comprometimento da mucosa é menor, pode ser assintomática (Lu et al., 1995). Nos doentes sintomáticos, as queixas mais comuns incluem dor abdominal, eliminação de sangue e muco pelo segmento excluído e, nos casos mais graves, pode haver a formação de fissuras e fístulas perianais (Ona e Boger, 1985; Habr-Gama et al., 1997). Esses mesmos sintomas são referidos por aqueles cujo cólon foi interposto para reconstituição do trato urogenital (Syed et al., 2001; Desrayaud et al., 2003; Abbasakoor et al., 2004).

O diagnóstico é feito pelo exame endoscópico e pelo estudo histopatológico da mucosa exclusa. A colonoscopia encontra-se alterada em 100% dos submetidos à derivação intestinal por mais de 36 meses (Lechner et al., 1990; Ferguson e Siegel, 1991). A mucosa mostra-se hiperemiada, congesta, edemaciada, friável, com nítido apagamento dos vasos sangüíneos da submucosa e sangramento fácil ao contato do aparelho (Haas et al., 1990; Lechner et al., 1990). Nos casos graves encontram-se úlceras aftóides indistinguíveis daquelas encontradas na retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI), tornando difícil o diagnóstico diferencial (Lusk et al., 1984; Geraghty e Charles, 1994). O enema baritado do segmento excluso, com a técnica do duplo contraste, é sugestivo quando demonstra pequenas irregularidades nodulares na superfície mucosa, características da hiperplasia linfóide folicular, alteração histológica encontrada em mais de 80% dos doentes (Lechner et al., 1990). Estudos manométricos demonstraram redução significativa da capacidade retal de retenção de volume sem haver, contudo, alteração do reflexo evacuatório ou da continência fecal (Roe et al., 1993).

O estudo histopatológico demonstra aspectos variados (Geraghty e Talbot, 1991). A exclusão do trânsito fecal provoca atrofia das criptas intestinais, bem como modificações na espessura das demais camadas da parede cólica acompanhadas ou não de depleção das células caliciformes e mucinas (Geraghty e Talbot, 1991; Biondo-Simões et al., 2000; Lopes-Paulo, 2002; Sousa et al., 2008; Nonose et al., 2009). Displasias nas criptas podem ser observadas, principalmente, nos doentes submetidos a períodos mais longos de exclusão intestinal (Keli et al., 1997). Na lâmina basal encontra-se infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, linfócitos, macrófagos,

plasmócitos e eosinófilos (Roediger e Nance, 1986; Ma et al., 1990; Geraghty e Talbot, 1991). É possível identificar abscessos na base das criptas e áreas de hiperplasia linfóide nodular, considerada a alteração histológica mais característica da doença (Murray et al., 1987; Komorowski, 1990; Yeong et al., 1991; Drut e Drut, 1992). Nessas áreas existe predomínio dos linfócitos B, em relação aos do tipo T, sugerindo que a resposta inflamatória da mucosa seja mais do tipo humoral, pela estimulação antigênica persistente, do que celular, pela infiltração bacteriana (Grant et al., 1997; Chetty et al., 2009). Excepcionalmente, podem aparecer microcarcinóides nessas áreas, sobretudo naqueles com maior tempo de exclusão. Entretanto, o aparecimento das neoplasias de origem epitelial em portadores de estomias por moléstias não relacionadas às DII, e que desenvolveram CE, é possibilidade rara (Griffiths e Dixon, 1992).

A redução na população das células caliciformes e a modificação no padrão de expressão das mucinas nas células epiteliais da mucosa são alterações descritas, constituindo-se em achados úteis para o diagnóstico da CE (Haque et al., 1993; Keli et al., 1997, Martinez et al., 2008; Martinez et al., 2009; Nonose et al., 2009). A mensuração da quantidade tecidual das mucinas no epitélio cólico demonstrou depleção tanto das mucinas neutras quanto das ácidas (Keli et al., 1997; Martinez et al., 2008; Martinez et al., 2009; Nonose et al., 2009). Quando se estudou, isoladamente, os subtipos de mucinas ácidas (sialomucinas e sulfomucinas), comparando segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal encontrou-se redução significativa na quantidade dos dois subtipos de mucinas, ao longo das criptas cólicas, havendo predomínio das sulfomucinas e tendência ao desaparecimento das sialomucinas (Keli et al., 1997; Martinez et al., 2009). Essas alterações são opostas ao que ocorre na RCUI e

no carcinoma colorretal e refletem as peculiaridades da modificação na síntese das proteínas observada na CE, (Filipe, 1969; Swidsinski et al., 2007) tornando o padrão de expressão tecidual dos subtipos de mucinas ácidas potencial marcador histoquímico para o diagnóstico histológico de CE.

As bases fisiopatológicas para o desenvolvimento CE ainda não se encontram totalmente esclarecidas. Já se propôs que tenha origem isquêmica, ou se deva a mudanças na quantidade e nas características da flora do cólon excluso, com redução da população bacteriana e predomínio das bactérias redutoras de nitrato (Neut et al., 1989; Neut et al., 1997; Villanacci et al., 2007). Entretanto, a maioria dos autores propõe que a doença decorra da deficiência de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) na luz intestinal, provocada pela derivação do trânsito fecal (Roediger e Truelove, 1979; Roediger e Rae, 1982; Harig et al., 1989; Neut et al., 1995; Christl et al., 1996; Mortensen e Clausen, 1996; Scheppach et al., 1997; Velazquez et al., 1997; Cook e Sellin, 1998; Kiely et al., 2001; Oliveira-Neto e Aguilar-Nascimento, 2004; Scheppach e Weiler, 2004; Wong et al., 2006). Essa possibilidade torna-se mais evidente quando se demonstrou que a reconstituição do trânsito fecal e a irrigação dos segmentos excluídos de trânsito, com soluções nutricionais, ricas em AGCC, ou glutamina regridem as alterações clínicas e histopatológicas da colite experimental e da CE (Scheppach, 1998; Kaya et al., 1999; Wong et al., 2006; Filmann, 2007; Nassri et al., 2008; Szczepkowski et al., 2008).

Os AGCC, representados pelo butirato, acetato e propionato, são formados a partir da fermentação das fibras vegetais dietéticas e dos carboidratos pelas bactérias anaeróbicas existentes na luz intestinal (*Clostridium sp*, *Eubacterium sp* e

Fusobacterium sp), e respondem por 90% de todo o substrato utilizado pelas células da mucosa cólica para a obtenção de energia (Roediger, 1982; Soergel, 1994; Jørgensen et al., 1997; Velazquez et al., 1997). Depois de formados, são rapidamente absorvidos para que as células desse epitélio, através de reações oxidativas, obtenham a energia necessária para seu funcionamento normal (Roediger, 1982; Velazquez et al., 1997; Sousa et al., 2008).

A presença dos AGCC na luz intestinal regula a expressão dos diversos genes relacionados à síntese das diferentes proteínas envolvidas na produção de muco, na aderência entre as células epiteliais, na sinalização e, principalmente, na homeostase do binômio proliferação-apoptose celular (Butzner et al., 1996; Scheppach e Weiler, 2004). Estudo analisando simultaneamente a expressão de 19.400 genes, nas células epiteliais da mucosa cólica, demonstrou que os AGCC são capazes de regular a expressão de 221, sendo o butirato o mais importante, pois é responsável pela manutenção da homeostase do tecido cólico, já que regula a expressão de genes associados à proliferação, diferenciação e apoptose celular (Daly e Shirazi-Beechey, 2006). Os AGCC aumentam a síntese das mucinas pelo epitélio cólico, por estimular a expressão dos genes que transcrevem a fração protéica das mucinas (Shimotoyodome et al., 2000). Eles elevam em cerca de 20 vezes a expressão do *MUC-2*, o principal gene relacionado à produção das mucinas pelo epitélio cólico. (Finnie et al., 1995; Shimotoyodome et al., 2000; Ohata et al., 2005; Gaudier et al., 2009). Estudos recentes demonstraram que camundongos silenciados (*knockout-mice*) para o gene *MUC-2* desenvolveram quadros graves de colite, reafirmando a importância dos AGCC na adequada produção de mucinas (Van der Sluis et al., 2006). A deficiência do butirato na

luz intestinal altera a permeabilidade das firmes junções intercelulares, por modificar a expressão intercelular da β -catenina, principal proteína responsável pela adesão celular, facilitando a penetração de bactérias e antígenos existentes na luz intestinal na camada submucosa estéril (Ohata et al., 2005; Turecková, 2006). A ausência dos AGCC na luz intestinal promove a liberação das enzimas citolíticas pelos lisossomos, destruindo as proteínas que compõem a membrana basal e a matriz extracelular (Hayman et al., 1982). A deficiência dos AGCC aumenta a formação de radicais livres de oxigênio (RLO) pelas células da mucosa cólica e pelos neutrófilos nos portadores de RCUI (Liu et al., 2001; Roediger e Babidge, 2000; Pravda, 2005). Os resultados de todos esses estudos sugeriram, em última análise, que a ausência dos AGCC pode determinar quebra da função da barreira epitelial exercida pela mucosa cólica, favorecendo o surgimento de diferentes formas de colite (Pravda, 2005).

Dentre todos os substratos existentes na luz intestinal, capazes de serem utilizadas pelos colonócitos como combustível energético, verificou-se que o butirato é o mais usado seguido pelo propionato, acetato, cetonas, aminoácidos e glicose (Roediger e Rae, 1982; Scheppach e Weiler, 2004). Há três décadas, demonstrou-se que células isoladas da mucosa cólica são capazes de aumentar intensamente seu metabolismo energético (oxidativo) quando o butirato é acrescentado ao meio, confirmando ser o combustível energético mais processado por essas células (Roediger e Truelove, 1979; Guillemot et al., 1991; Velazquez et al., 1997; Nieto et al., 2002). Quando é o único AGCC disponível, o butirato aumenta significativamente a taxa celular de consumo de O_2 , confirmando sua importância como fonte de energia (Roediger e Truelove, 1979; Roediger, 1982; Roediger, 1990; Velazquez et al., 1997). Recentes estudos

demonstraram os efeitos protetores dos AGCC contra o dano tecidual provocado pelos RLO, por reduzirem os níveis de O₂ tecidual (Liu et al., 2001; Rosignoli et al., 2001). Reforçam essas evidências, os resultados de estudos experimentais demonstrando que a administração intrarretal de grandes quantidades de glutamina e em altas concentrações, provavelmente por seu efeito antioxidante, é capaz de reduzir a formação de RLO (Matés et al., 2002; Fillmann, 2007; Fillmann et al., 2007).

Apesar da deficiência dos AGCC ser responsabilizada pela inflamação que caracteriza a CE, os mecanismos moleculares que determinam a agressão epitelial ainda não foram totalmente esclarecidos (Scheppach e Weiler, 2004; Martinez, 2009). Várias teorias relacionando a etiopatogenia da CE a diferentes causas foram propostas, entretanto, nenhuma delas apresentava bases experimentais concretas para esclarecer a alteração celular que determina a agressão inicial ao epitélio mucoso, nem eram capazes de explicar todos os aspectos histopatológicos e bioquímicos encontrados (Farrell e Peppercorn, 2002; Hendrickson et al., 2002; Pravda, 2005; Martinez, 2009). A infiltração inflamatória epitelial que ocorre nos doentes com CE é evento secundário mediado pelas diferentes células inflamatórias presentes no organismo, contudo, havia dúvidas quanto aos motivos pelos quais ocorria a quebra da barreira epitelial e a conseqüente infiltração neutrofilica (Pravda, 2005; Martinez, 2009). Nenhuma teoria explicava, satisfatoriamente, o mecanismo inicial da quebra da barreira epitelial que permitiria a migração das bactérias para o interior da submucosa estéril, desencadeando a resposta inflamatória.

Diante dessas evidências, foi proposta a Teoria por Indução de Radicais (*Radical Induction Theory*) para explicar os fenômenos iniciais que precedem e desencadeiam a

infiltração inflamatória da mucosa nos portadores de colite (Pravda, 2005). A teoria propôs que a agressão inicial à mucosa intestinal se deve à formação dos RLO pela célula epitelial com alterações no seu metabolismo energético oxidativo. Como são moléculas tóxicas para as células, a produção exagerada dos RLO determinaria quebra das diferentes linhas de defesa que compõem a barreira mucosa. A quebra da barreira epitelial permite a migração das bactérias do interior da luz intestinal para a intimidade estéril da submucosa. (Riedle e Kerjaschki, 1997; Pravda, 2005). Na tentativa de combater essa infiltração bacteriana, leucócitos migrariam para o interior da parede intestinal, dando origem ao processo inflamatório característico da doença (Millar et al., 1996; Sheridan et al., 1996; Pravda, 2005).

Os RLO são constantemente formados durante o metabolismo energético das células vivas, contudo, sua produção excessiva é nociva às células (Halliwell e Gutteridge, 1986; Bondy e Le Bel, 1993; Halliwell e Gutteridge, 1997; Cadenas e Davies, 2000; Gutteridge e Halliwell, 2000, McCord, 2000; Møller, 2005; Møller, 2006). As células possuem defesas antioxidantes naturais, enzimáticas e não-enzimáticas, que atuam contra essa toxicidade mantendo o equilíbrio entre a produção e a neutralização (Neut et al., 1995; Mortensen e Clausen, 1996; Sheridan et al., 1996; McCord, 2000). Todavia, em certas condições, quer pela diminuição do sistema antioxidante do organismo, quer pelo aumento exagerado na produção dos RLO, ocorre desequilíbrio, determinando o aparecimento do fenômeno conhecido como estresse oxidativo (Mortensen e Clausen, 1996; Scheppach et al., 1997; Chen e Schopfer, 1999; Gutteridge e Halliwell, 2000).

A possibilidade de que os RLO danifiquem o epitélio mucoso cólico já é conhecida há vários anos, quando se demonstrou que a instilação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um potente formador de RLO, no interior do cólon era seguida por intenso quadro de colite (Sheeham e Brynjolfsson, 1960; Chen e Schopfer, 1999; Thibaud et al., 2001; Cammarota et al., 2007; Almalouf et al., 2008). A colite induzida pelo H_2O_2 apresenta aspectos clínicos, macroscópicos e microscópicos semelhantes aos encontrados na RCUI (Sheeham e Brynjolfsson, 1960; Almalouf et al., 2008). Relatos na literatura também descreveram casos graves de colite, alguns até mesmo fatais, após a instilação de H_2O_2 na luz do cólon com os mais diferentes objetivos. (Sheeham e Brynjolfsson, 1960; Meyer et al., 1981; Schwartz et al., 1995; Gan e Price, 2003; Lapeyre, 2005; Cammarota et al., 2007). Soma-se a isso, o fato de que nos últimos anos, vem se demonstrando de maneira inequívoca que substâncias antioxidantes são utilizadas com sucesso no tratamento da colite quimicamente induzida, RCUI e CE. (Roediger e Millard, 1995; Zingarelli et al., 1999; Nosál'ova et al., 2000; Cetinkaya et al., 2005; Pravda, 2005; Jiang et al., 2006; Damiani et al., 2007; Fillmann, 2007; Reis et al., 2008; Hanai e Sugimoto, 2009).

A CE, à semelhança da RCUI, apresenta como uma das alterações histológicas mais comuns a infiltração de neutrófilos na mucosa e submucosa, principalmente nos casos mais graves (Keli et al., 1997). Já se demonstrou que um dos mecanismos principais de ação dos neutrófilos contra bactérias é a capacidade de produzirem altos níveis dos RLO que são poderosos agentes bactericidas (Yamada e Grisham, 1981; Vasina et al., 2009). Entretanto, a produção aumentada dos RLO pelos neutrófilos

também é capaz de determinar as lesões teciduais encontradas na colite (Fillmann, 2007).

Recentemente demonstrou-se que na CE, a semelhança do que ocorre nos portadores de RCUI, a mucosa cólica desprovida de trânsito fecal é capaz de formar altos níveis de RLO quando desprovida de seu suprimento habitual de AGCC (Martinez et al., 2008; Martinez, 2009). Demonstrou-se ainda, que o aumento da produção de RLO encontra-se relacionada ao tempo de exclusão do trânsito fecal e, que esses maiores níveis de RLO relacionam-se às alterações histológicas e bioquímicas que caracterizam a CE (Martinez et al., 2008; Martinez, 2009). Assim sendo, pela primeira vez na literatura, foi possível demonstrar que dentre os possíveis mecanismos moleculares desencadeadores da CE, a maior capacidade de produção de RLO pelas próprias células da mucosa cólica desprovidas do seu substrato energético habitual apresenta papel de destaque. Esse estudo, além de explicar os mecanismos moleculares desencadeantes da CE, levantou a possibilidade de que substâncias com atividade antioxidante poderiam ser eficazes no tratamento e, principalmente, na prevenção da enfermidade. Todavia, até a presente data, a eficácia de substâncias com propriedades antioxidantes ainda não foi avaliada em modelos experimentais de CE.

1.2 - Radicais Livres de Oxigênio

A partir da década de noventa pesquisas vêm sendo realizadas para esclarecer a importância dos radicais livres em diversas enfermidades, tais como a aterosclerose, câncer e diferentes formas de doenças inflamatórias, entre as quais as DII, que acometem o homem (Halliwell e Gutteridge, 1990; Grishan et al., 1991; Ferreira e Matsubara, 1992; Halliwell e Gutteridge, 1997; Gutteridge e Halliwell, 2000). Por seu

caráter multidisciplinar, estes estudos atraem à atenção de pesquisadores de várias áreas da saúde. Todavia, esses artigos causam desinteresse no leitor não especializado porque envolvem aspectos bioquímicos de difícil compreensão. (Ferreira e Matsubara, 1992). Para o leitor pouco acostumado ao assunto é difícil até mesmo compreender a definição de um radical livre.

De maneira simples, o termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula com alta capacidade reativa, que contenha número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (Halliwell e Gutteridge, 1990). Este desemparelhamento eletrônico pode ocorrer pela perda ou aquisição de um elétron. As reações de redução implicam no ganho de elétrons enquanto as reações de oxidação, em perda. Como exemplo, no metabolismo celular normal durante a fosforilação oxidativa no interior das mitocôndrias, quando ocorre redução do O_2 molecular, existe ganho de um elétron, formando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), considerado um verdadeiro RLO por possuir número ímpar de elétrons na sua última camada atômica.

Ao compreender-se a formação do radical $O_2^{\cdot-}$, constata-se que os RLO são formados durante as reações metabólicas que ocorrem nas células em um cenário de reações óxido-redução, ou seja, cedendo o elétron solitário e oxidando-se, ou recebendo outro e, conseqüentemente, reduzindo-se. O termo RLO é empregado pelo fato da maioria dos radicais livres serem derivados do metabolismo do O_2 , contudo, é possível a formação de outros radicais livres, pelos mesmos mecanismos acima descritos, a partir da molécula do óxido nítrico (Ferreira e Matsubara, 1992)

Os RLO são encontrados em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo energético celular o O_2 sofre redução gradual e

progressiva. Esta redução é tetravalente (aquisição seqüencial de quatro elétrons), resultando na formação de água (H_2O) e energia (Ferreira e Matsubara, 1992). Durante esse processo são formados produtos intermediários reativos, tais como os radicais $O_2^{\cdot-}$ hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), hidroxila (OH^{\cdot}) e H_2O_2 . Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a alta reatividade dos produtos intermediários formados é neutralizada pela aquisição progressiva de quatro elétrons formando a H_2O .

Nos organismos aeróbios, o O_2 é reduzido à H_2O na fase final da respiração mitocondrial, conhecida como fosforilação oxidativa. A molécula de O_2 mantém-se unida ao complexo citocromo-oxidase na cadeia respiratória até que ocorra sua redução total em H_2O . Durante esse processo, por receber apenas um elétron de cada vez, ocorre redução parcial formando como produto intermediário inicial o ânion $O_2^{\cdot-}$. Com a adição de um átomo de hidrogênio ao ânion $O_2^{\cdot-}$, este se reduz ao segundo produto intermediário, representado pelo H_2O_2 . Posteriormente, se um terceiro elétron for acrescentado, ocorrerá à formação do terceiro RLO, representado pela OH^{\cdot} . Desse modo, a possibilidade de formação de RLO se deve ao fato do O_2 se reduzir à água de forma tetravalente, permitindo a geração de moléculas ou íons reativos durante o seu processo de redução. (Tannickal e Fanburg, 2000).

O ânion $O_2^{\cdot-}$, primeiro RLO formado no processo de transformação do O_2 em H_2O , para que não danifique a célula, é normalmente removido por dismutação, que consiste na reação entre dois ânions de $O_2^{\cdot-}$ catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O produto formado pela dismutação do ânion $O_2^{\cdot-}$, pela enzima SOD, é o H_2O_2 . Os sistemas enzimáticos intrínsecos das células, comumente encontrados nos peroxissomos, são capazes de formar e degradar o H_2O_2 , substância muito tóxica

para a célula. Dentre os sistemas enzimáticos mais comuns que atuam como neutralizantes do H_2O_2 encontram-se a catalase (CAT), β -oxidase dos AGCC e glutaciona peroxidase (GPX). O H_2O_2 , apesar de não ser considerado um RLO propriamente dito, pode reagir com outro ânion $O_2^{\bullet-}$ ou com o íon ferro pelas reações de Fenton e Haber-Weiss, formando o radical OH^{\bullet} (Halliwell e Gutteridge, 1997; Tannickal e Fanburg, 2000). Este radical é extremamente tóxico para a célula, sendo considerado o mais danoso de todos os RLO, podendo danificar membranas, organelas, DNA e demais constituintes naturais (Ribeiro et al., 2007; Bajka et al., 2008; Ribeiro et al., 2008).

Despreende-se do exposto que a formação de RLO ocorre, normalmente, durante os processos de oxidação de substratos alimentares, dentre os quais se destaca a respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa. Alterações no suprimento de substrato energético, tal como ocorre na interrupção do fornecimento de AGCC provocada pela derivação do trânsito intestinal, podem interferir nos mecanismos de redução do O_2 a H_2O na cadeia respiratória mitocondrial, aumentando a produção de RLO.

1.3- Sistemas de defesa antioxidantes

É essencial para a célula manter sua homeostase o perfeito equilíbrio entre produção de RLO e neutralização pelos sistemas de defesa antioxidante. Como já descrito as substâncias com potencial oxidante são constantemente geradas como consequência direta do metabolismo energético celular. Para proteger-se a célula possui sistemas de defesa antioxidante definidos como qualquer substância que,

quando presente em baixas concentrações, comparadas àquelas de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou impede a oxidação daquele substrato (Fillmann, 2007). A função destas substâncias é manter os níveis de RLO em baixas concentrações, e para isso podem atuar em duas linhas de defesa. Uma delas, preventiva, atua como detoxificadora do agente oxidante antes que ele cause lesão celular. Esta linha de defesa é constituída pelos sistemas enzimáticos da SOD, CAT, glutathiona reduzida (GSH), GPX e vitamina E (α -tocoferol). A outra linha de defesa tem a função de combater os RLO depois de formados, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-rd) e GPX. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana celular, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (Ferreira e Matsubara, 1992).

1.4 - Colite experimental e estresse oxidativo

Com o objetivo de tentar reproduzir experimentalmente as diferentes etapas evolutivas da colite, foram criados vários modelos experimentais, todavia nenhum deles considerava as etapas iniciais da agressão ao epitélio cólico (Hoffmann et al., 2003). Nenhum modelo experimental atualmente utilizado é perfeito e as tentativas de se criar no animal um modelo humano de colite que utilize a infusão retal de agentes químicos tóxicos, tais como o ácido acético, ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) ou sulfato sódico de dextram (DSS), são limitados na sua capacidade de reproduzir fielmente as alterações celulares que precedem a infiltração inflamatória da mucosa cólica propriamente dita (Farrel e Peppercorn, 2002). Nestes modelos, o dano à barreira mucosa é induzido, artificialmente, por agressão química ao epitélio cólico (Nonose et al., 2009).

A colite surge no homem a partir de alterações intrínsecas do epitélio e não, como proposto, pela infusão retal de agentes lesivos. Assim sendo, os modelos experimentais de colite (quimicamente induzida), atualmente empregados, representam apenas em parte o que ocorre na colite. Contudo, nestes modelos fica clara a importância da integridade da barreira epitelial da mucosa na proteção das camadas internas da parede cólica, impedindo a penetração de antígenos bacterianos e a consequente resposta imune à invasão bacteriana tecidual. Os mecanismos celulares envolvidos na manutenção da integridade da barreira mucosa epitelial do cólon normalmente encontram-se precocemente comprometidos no desenvolvimento da colite (Pravda, 2005). Portanto, a violação desta importante função deve ser considerada como uma etapa inicial e necessária que precede a série de eventos que determinam a penetração antigênica, bacteriana e toda a resposta inflamatória subsequente.

Há vários anos verificou-se que doentes com colite apresentam alterações significativas na lâmina própria (Schmehl et al., 2000). Encontraram-se áreas de lesão epitelial na mucosa cólica em locais, onde a membrana basal ainda apresentava-se intacta. Também se identificou segmentos cólicos, onde a membrana basal encontrava-se totalmente destruída, sem que existisse, ao mesmo tempo, infiltração inflamatória (Schmehl et al., 2000). Estas evidências sugeriam que as próprias células epiteliais da mucosa cólica possam estar envolvidas no processo de agressão à membrana basal. Assim sendo, atualmente vem sendo proposto que o processo inicial para o desencadeamento da RCUI ocorre na interface entre as células epiteliais e a membrana basal por formação exagerada de RLO (Kruidenier e Verspaget, 2002; Pravda, 2005; Rezaie et al., 2007). Todavia, os modelos experimentais de colite quimicamente

induzida não possibilitam identificar a molécula responsável pelo início do processo inflamatório por que não levam em conta a possibilidade da produção dessas moléculas decorrerem de alterações do metabolismo energético da própria célula epitelial.

Em 1960 foi possível reproduzir em ratos quadros agudos e crônicos de colite pela infusão intrarretal de soluções de H₂O₂ a 3% (Sheenan et al., 1960). Cabe destacar que esse foi o primeiro modelo experimental que reproduziu as alterações histológicas encontradas em doentes com colite. O exame microscópico *post-mortem* dos animais demonstrou ulcerações da mucosa cólica e infiltração neutrofilica próxima a segmentos com mucosa normal. Nos ratos sobreviventes as ulcerações cicatrizaram em tempo médio de 10 semanas, com exceção de algumas úlceras localizadas nas porções mais caudais do reto. Estes três achados: áreas de inflamação mucosa convivendo com áreas normais, inflamação localizada principalmente no cólon esquerdo e caráter persistente, também são características encontradas em doentes com diferentes formas de colite. Essas evidências mostram que mesmo pequenas concentrações de H₂O₂, quando em contato com a mucosa cólica, produzem quadro clínico e histológico praticamente indistinguível daquele que ocorre em doentes com CE.

Estas mesmas alterações podem, também, ser encontradas em seres humanos. Uma série de casos relacionando a instilação de H₂O₂ intrarretal ao aparecimento de inflamações da mucosa do cólon e reto, semelhantes as que ocorrem na RCUI e na CE, tem sido descritos (Sheehan e Brynjolfsson, 1960; Bilotta e Waye, 1989). Por muitas décadas, os enemas com H₂O₂ foram rotineiramente empregados para a eliminação das fezes impactadas no reto. Contudo, a partir de 1930, surgiram referências ao desenvolvimento de formas graves de colite, até mesmo fatais, subseqüentes ao uso do

H₂O₂ com esse objetivo. Mesmo pequenas quantidades da substância, como as utilizadas para a limpeza dos colonoscópios, podem causar colite no homem (Bilotta e Waye, 1989).

Restava dúvida quanto à capacidade das células normais da mucosa cólica produzir RLO. Tais dúvidas foram dirimidas no início da década de 70, quando se demonstrou que os colonócitos produzem, constantemente, H₂O₂ como produto do metabolismo celular aeróbico (Chance et al., 1979). Verificou-se que em condições normais 90% do H₂O₂ é formado como radical tóxico pela cadeia respiratória mitocondrial de transporte de elétrons (Eaton e Qian, 2002). Ao se constatar que aplicação da H₂O₂ ocasiona dano às células da mucosa cólica e sabendo-se que as células epiteliais da mucosa cólica são capazes de produzir H₂O₂ e que a mucosa cólica é relativamente deficiente nos sistemas antioxidantes, é razoável especular que o estresse oxidativo resultante possa causar agressão inflamatória provocando o aparecimento da colite (Pravda, 2005; Fillmann, 200).

Quando se supõe que o H₂O₂ originário do metabolismo respiratório celular pode ser responsável pela quebra da barreira epitelial cólica, o estresse oxidativo poderia representar a manifestação mais precoce da agressão tecidual em portadores de CE. Para que esta possibilidade pudesse ser confirmada seria necessário demonstrar, experimentalmente, que células da mucosa cólica desprovidas de AGCC seriam capazes de produzir maiores níveis de RLO que, ocasionando estresse oxidativo tecidual, levariam ao desenvolvimento de CE. Esta possibilidade foi recentemente confirmada por estudo experimental que demonstrou importante estresse oxidativo em células da

mucosa cólica desprovida do suprimento de AGCC (Martinez et al., 2008; Martinez, 2009).

A importância do estresse oxidativo no desencadeamento das colites fica mais evidente com os resultados de estudos demonstrando que o emprego de substâncias antioxidantes, como a n-acetilcisteína, deferoxamina, quercitrina, rofecoxibe, curcumina são capazes de diminuir, em animais experimentação, a agressão oxidativa na colite quimicamente induzida por DSS (Blau et al., 2000; Nosál'ová et al., 2000; Camuesco et al., 2004; Cetinkaya et al., 2005; Dryden et al., 2005; Martin et al., 2005; Jiang et al., 2006; Damiani et al., 2007; Aoy et al., 2008). Da mesma forma, estudos vêm demonstrando que o emprego do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), freqüentemente utilizado no tratamento da RCUI, também se mostrou eficaz tanto no tratamento da colite quimicamente induzida, quanto no da CE (Triantafillidis et al., 1991; Tripodi et al., 1992; Song et al., 2006; Moshkovska e Mayberry, 2007; Ancha et al., 2008; Szczepkowski et al., 2008; Ancha et al., 2009; Arafa et al., 2009; Hayashi et al., 2009).

Entretanto, a avaliação da eficácia do ácido 5-ASA na proteção contra o estresse oxidativo em modelos experimentais de CE ainda não foi estudada. A utilização de uma substância com importante atividade antioxidante em um modelo experimental de CE permitiria confirmar o papel exercido pelos RLO como moléculas responsáveis pelo dano epitelial à mucosa cólica na CE (Pravda, 2005).

1.5 - Ácido 5-aminosalicílico (5-ASA)

A molécula da sulfasalazina foi desenvolvida em 1940 com objetivo de propor novas terapias para artrite infecciosa (Moshkovska e Mayberry, 2007). Naquela época acreditava-se que o componente sulfapirimidínico da molécula atuaria como agente

antiinfecioso, enquanto o radical salicílico teria ação, predominantemente, antiinflamatória (Moshkovska e Mayberry, 2007). Contudo, seu modesto efeito terapêutico no combate a artrite infecciosa contrastava-se com os excelentes resultados quando utilizada em doentes, onde a artrite era de origem puramente inflamatória. Verificou-se que na artrite dos doentes com RCU, a utilização da sulfasalazina encontrava-se não só associada à significativa melhora dos sintomas clínicos articulares, mas, principalmente, a remissão do quadro infamatório intestinal (Moshkovska e Mayberry, 2007). Além de induzir à remissão da doença aguda o emprego da sulfasalazina em doentes com RCU também mostrava benefícios na manutenção sustentada da resposta clínica e histológica.

Apesar da sulfasalazina apresentar potenciais efeitos terapêuticos, seu uso contínuo apresentava duas importantes limitações. Quando utilizada nos enfermos com doença ativa, apenas 50% dos tratados por via oral apresentavam remissão dos sintomas e, em mais de 30% deles, as recaídas eram freqüentes (Riley, 1998). Em segundo lugar, devido aos efeitos adversos, que ocorriam em mais de um terço dos doentes, em muitos casos havia necessidade da interrupção da medicação (Riley, 1998). Dentre os efeitos colaterais mais freqüentemente descritos destacavam-se as reações anafiláticas, com graus variados de gravidade, a anemia por interferência no metabolismo do ácido fólico e a intolerância gástrica.

Com o objetivo de diminuir os efeitos colaterais e aumentar a eficácia terapêutica antiinflamatória, pesquisas avaliaram separadamente a ação terapêutica dos dois componentes da molécula de sulfasalazina. Verificou-se que o radical sulfapiridina era a fração responsável pela maioria dos efeitos adversos (Azad Khan et al., 1977; Riley, 1998). Constatou-se que o radical 5-ASA era a fração da molécula responsável pela

ação antiinflamatória da substância, que incluíam a inibição da síntese de prostaglandinas, redução do metabolismo do ácido araquidônico e efeito inibitório na quimiotaxia dos leucócitos (Riley, 1998). Nessa mesma época, já se chamava a atenção para um potencial efeito antioxidante do ácido 5-ASA. Essas suspeitas foram confirmadas posteriormente quando se demonstrou, em portadores de RCUI, que a aplicação de enemas que continham apenas o ácido 5-ASA na sua composição, apresentava resultados melhores quando comparados aos da aplicação da sulfasalazina, e como grande vantagem, sem os deletérios efeitos colaterais (Campieri et al., 1991).

A ação antiinflamatória do 5-ASA ocorre, diretamente, sobre a mucosa inflamada, bloqueando as vias da cicloxigenase e lipoxigenase reduzindo, com isso, a formação de RLO (Dalledri et al., 1990; Kenji et al., 2003). O ácido 5-ASA é um potente redutor dos níveis teciduais de hipoclorito prevenindo a oxidação da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase nas células do epitélio cólico (Kenji, 2003). Apesar de menor efeito, também atua na redução de cloraminas e do radical livre $O_2^{\cdot-}$. Todas essas propriedades sugerem que o ácido 5-ASA possua importante ação antioxidante para as células da mucosa cólica, constantemente expostas ao estresse oxidativo (McKenzie et al., 1999).

Um dos fatores mais importantes e que deve ser levado em conta na potência antioxidante do ácido 5-ASA é a sua forma de administração. Trabalhos demonstraram que o uso tópico através da aplicação de enemas, espumas ou supositórios apresentava melhor eficácia terapêutica quando comparada a administração por via oral (Campieri et al., 1991). A aplicação de enemas com ácido 5-ASA diretamente sobre a região inflamada permite atingir concentrações teciduais adequadas, mesmo quando

se utilizam pequenos volumes, tornando assim, essa via de administração opção interessante. Quando administrada por via oral, a droga distribui-se por todo organismo, não atingindo a mesma concentração tecidual no cólon quando comparada a administração sob a forma de enemas (Campieri et al., 1991; Haagen-Nielsen e Bondesen, 1983; Batta et al., 1998). A maior eficácia da aplicação tópica apresenta vantagens tanto para os portadores de RCUI, quanto para os doentes com CE, onde o processo inflamatório acomete com maior frequência o reto e cólon sigmóide distal.

Estudo experimental avaliando os efeitos do tratamento da colite quimicamente induzida em ratos com enemas contendo ácido 5-ASA verificou que animais que receberam 5-ASA na dose de 100mg/kg apresentavam melhora macroscópica e microscópica do processo inflamatório. Os animais tratados com a droga diminuía significativamente os níveis de atividade tecidual da enzima mieloperoxidase (MPO), marcador bioquímico da infiltração neutrofílica tecidual, e do fator nuclear kapa-beta (NF- κ), importante marcador bioquímico de atividade inflamatória. (Song et al., 2006).

Estudo realizado em modelo experimental de colite quimicamente induzida por DSS constatou que animais tratados pela administração oral do ácido 5-ASA melhoravam significativamente os níveis teciduais de MPO, número de leucócitos no sangue e a intensidade da agressão inflamatória tecidual quando comparados com os que não receberam a substância (Hayashi et al., 2009). Mostrou ainda, que a administração oral da substância melhorava a expressão de proteínas de adesão celular, sugerindo que a recuperação da mucosa cólica, após o tratamento com o ácido 5-ASA, também poderia estar associada à prevenção da quebra dos mecanismos de adesão celular (Hayashi et al., 2009).

Inúmeras substâncias apresentam propriedades antioxidantes, e a eficácia terapêutica de algumas delas já foi avaliada em modelos experimentais de colite quimicamente induzida (Fillmann et al., 2007; Ancha et al., 2008; Guijarro et al., 2008; Reis et al., 2008; Arafa et al., 2009). Porém, a ação antioxidante de cada uma delas em modelos experimentais de CE ainda não foi estudada. Apesar de já ter sido demonstrado, de forma empírica que a administração de enemas com ácido 5-ASA melhora os sintomas clínicos e endoscópicos de doentes com CE, em nenhuma oportunidade avaliou-se, experimentalmente, o potencial antioxidante da substância. O melhor conhecimento da ação antioxidante do ácido 5-ASA permitiria a proposição de novas estratégias terapêuticas para o tratamento e prevenção da CE (Martinez, 2009).

Essa possibilidade assume grande importância ao se constatar que o trânsito intestinal somente é restabelecido em 57% dos portadores de colostomia temporária, condenando os demais a conviver pelo resto de suas vidas com a CE (Haas e Haas, 1988; Habr-Gama et al., 1997). Nos doentes cujo trânsito intestinal é restabelecido, o período médio para que isso ocorra varia de seis a oito meses, podendo chegar até 60 meses, tempo mais do que suficiente para instalação da doença (Habr-Gama et al., 1997; Curi et al., 2002). Dessa forma a possibilidade de se avaliar a eficácia de uma nova proposta terapêutica é válida.

A avaliação dos efeitos terapêuticos do ácido 5-ASA em modelos experimentais de CE poderia auxiliar na identificação do melhor momento para o início do tratamento. Possibilitaria avaliar a eficácia da via intrarretal de administração da substância nos doentes com CE, e o que é mais importante, avaliar se o ácido 5-ASA confere proteção ao dano oxidativo do DNA de células da mucosa cólica, fenômeno já demonstrado

como precursor do câncer colorretal nos portadores de RCUI. Entretanto, até o momento não existem estudos que respondam com segurança todos estes questionamentos, fazendo com que a ação do ácido 5-ASA na CE seja avaliada apenas pela resposta clínica. A possibilidade de se encontrar novas substâncias, naturais ou sintéticas, que apresentem como vantagens boa eficácia, grande disponibilidade e baixo custo, poderia contribuir para minimizar o sofrimento daqueles que já vivem as dificuldades do convívio diário com um estoma.

2. OBJETIVOS

Verificar se a aplicação intrarretal diária de enemas contendo ácido 5-aminosalicílico reduz os níveis de dano oxidativo ao DNA de células da mucosa cólica provida e desprovida de trânsito fecal.

Verificar se a aplicação intrarretal diária de enemas contendo ácido 5-aminosalicílico reduz os níveis de dano oxidativo ao DNA de células da mucosa cólica provida e desprovida de trânsito fecal submetidas ao desafio *ex vivo* com peróxido de hidrogênio.

3. 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 (apêndice).

3.1 - Animal de experimentação:

Foram utilizados 26 ratos Wistar SPF machos, com peso variando entre 250 e 350 g, com média de idade de quatro meses, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.2 - Grupos experimentais:

Constituímos, aleatoriamente, dois grupos experimentais de 13 animais, divididos segundo o sacrifício a ser realizado em duas ou quatro semanas. Submetemos todos os animais à derivação do trânsito intestinal por meio da confecção de colostomia proximal terminal no cólon descendente e fístula mucosa no segmento distal. Dividimos cada grupo experimental em dois subgrupos denominados experimento e controle. Realizamos nos quatro animais pertencentes ao subgrupo controle a irrigação do segmento distal do reto através da instilação de enemas com solução fisiológica 0,9% e nos nove animais do subgrupo experimento com enemas contendo ácido 5-ASA. A irrigação das substâncias de intervenção foi sempre realizada pelo ânus dos animais (Figura 1).

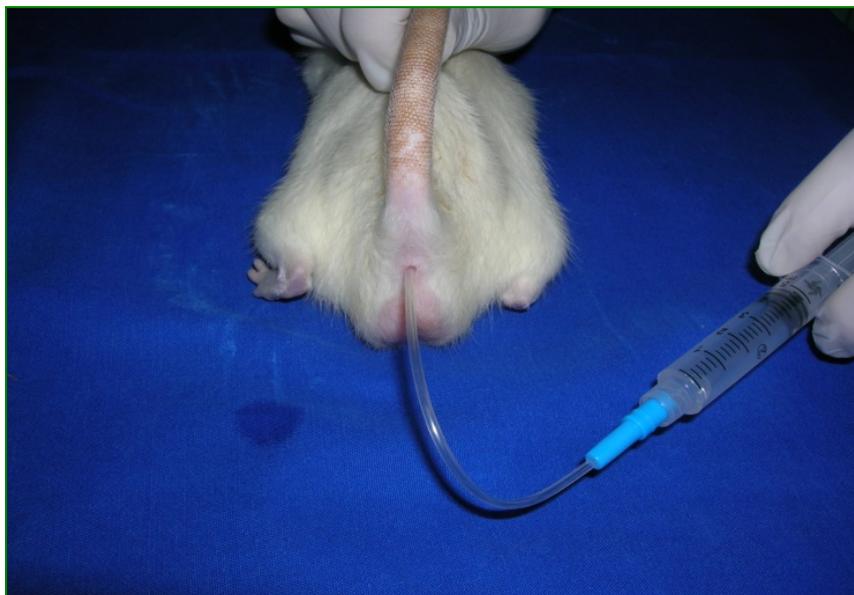


Figura 1 – Técnica de irrigação do segmento cólico excluído de trânsito fecal com a solução de intervenção.

3.2.1 - Subgrupo controle (duas semanas)

Composto de quatro animais submetidos à derivação do cólon distal e irrigados, diariamente, pelo ânus, com 10 mL de soro fisiológico a 0,9% e sacrificados duas semanas após o procedimento cirúrgico.

3.2.2 - Subgrupo controle (quatro semanas)

Formado por quatro animais submetidos à derivação do cólon distal e irrigados, diariamente, pelo ânus, com 10 mL de soro fisiológico a 0,9% e sacrificados quatro semanas após o procedimento cirúrgico.

3.2.3 - Subgrupo experimento (duas semanas)

Composto de nove animais submetidos à derivação do cólon distal e irrigados, diariamente, pelo ânus com 1,2 mL de enema de *ácido 5-aminosalicílico*¹ na concentração de 100mg/kg e sacrificados após duas semanas do procedimento cirúrgico.

3.2.4 - Subgrupo experimento (quatro semanas)

Formado com nove animais submetidos à derivação do cólon distal e irrigados, diariamente, pelo ânus com 1,2 mL de enema de *ácido 5-aminosalicílico*¹ na concentração de 100mg/kg e sacrificados após quatro semanas do procedimento cirúrgico.

3.3 - Período pré-operatório

Durante o período de vigilância epidemiológica (sete dias) mantivemos os animais em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, com controle de temperatura, luminosidade, umidade e ruídos. Todos permaneceram em jejum durante 12h, exceto para água, antes da intervenção cirúrgica. Identificamos cada gaiola com o número do animal, o grupo e o subgrupo experimental a que pertencia. Esses mesmos dados foram tatuados com tinta da China (tinta nanquim) na cauda de cada animal.

¹ 5-ASA®, Pentasa, Ferring Pharmaceuticals Ltd., Berkshir, UK

3.4 – Técnica anestésica

No dia da intervenção, após serem convenientemente identificados, os ratos foram pesados e anestesiados com o emprego de cloridrato de xilazina 2%² + cloridrato de quetamina³ na dose de 0,1mL/100g, administradas por via intramuscular na pata traseira esquerda.

3.5 - Técnica cirúrgica

Depois de anestesiados e fixos à mesa cirúrgica, em decúbito dorsal horizontal, realizamos tricotomia da região abdominal, da pelve até as rebordas costais, com aparelho elétrico de depilação. Utilizamos a polivinilpirolidona-iodo para anti-sepsia da área depilada, posteriormente, recoberta por campo cirúrgico fenestrado estéril. Abrimos a cavidade abdominal por meio de incisão longitudinal mediana com três centímetros de extensão. Terminada essa etapa, identificamos a placa de Peyer, estrutura linfóide situada na face anterior do cólon na transição entre o reto e o sigmóide (Figura 2). Com o auxílio de paquímetro, medimos a distância entre a placa de Peyer e o local escolhido para a secção do cólon esquerdo, situado a quatro centímetros acima da extremidade superior da placa. Após ligadura da arcada cólica marginal (Figura 3), seccionamos o cólon no ponto escolhido e exteriorizamos o segmento proximal como colostomia terminal, através de incisão circular com três milímetros de diâmetro, realizada na região do hipocôndrio esquerdo. Fixamos a

² Dopaser™ Agribrands do Brasil Ltda. Brasil

³ Dopalen™ Agribrands do Brasil Ltda. Brasil

colostomia à pele com pontos separados de fio absorvível monofilamentar 4-0 (Monocryl[®])⁴ nos quatro pontos cardinais, e depois entre eles, amarrando com três nós.

Terminada a confecção da colostomia proximal, cateterizamos o segmento caudal do intestino grosso com sonda de polivinil medindo 12F de diâmetro interno, e o irrigamos com 40 ml de solução fisiológica 0,9% aquecida a 37°C (Figura 4), até que o efluente drenado pelo ânus não apresentasse material fecal. Concluída a irrigação, removemos o cateter e exteriorizamos o cólon distal como colostomia (fístula mucosa distal) na face lateral inferior esquerda da parede abdominal (Figura 5). Fixamos a colostomia distal com a mesma técnica utilizada na colostomia proximal. Realizamos a síntese da parede abdominal em dois planos de sutura: peritônio e aponeurose com pontos contínuos de fio de ácido poliglicólico 4-0 (Vicryl[®])⁵ e a pele com pontos separados de nylon 4-0 (Mononylon[®])⁵

A partir do primeiro pós-operatório os animais do subgrupo controle foram irrigados diariamente com 3 ml de soro fisiológico à 0,9% por duas ou quatro semanas. Já os animais do subgrupo experimento foram irrigados, também diariamente, com o ácido 5-ASA pelo mesmo período.

⁴ Ethicon, Inc. Somerville, NJ, USA.

⁵ Ethicon, Inc. Somerville, NJ, USA

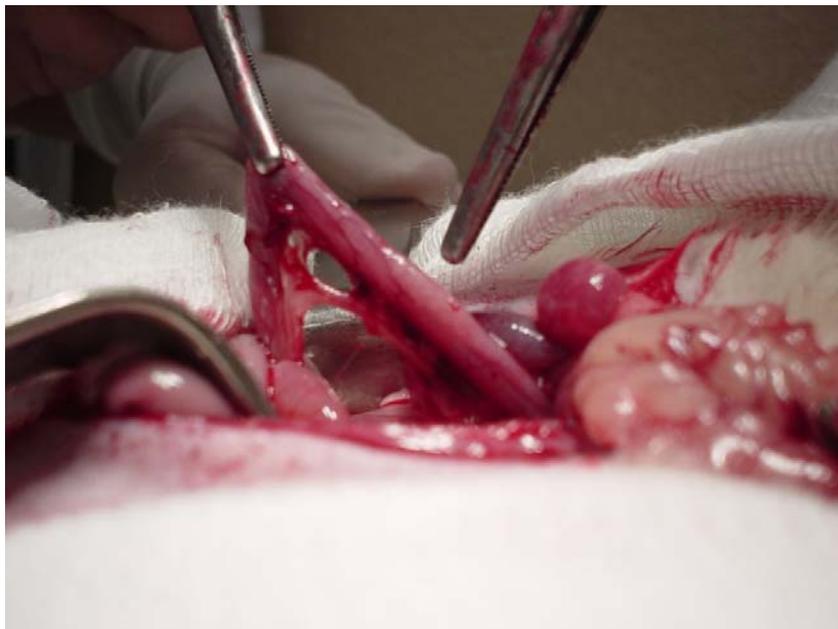


Figura 2 – Identificação da placa de Peyer (seta) como reparo anatómico.

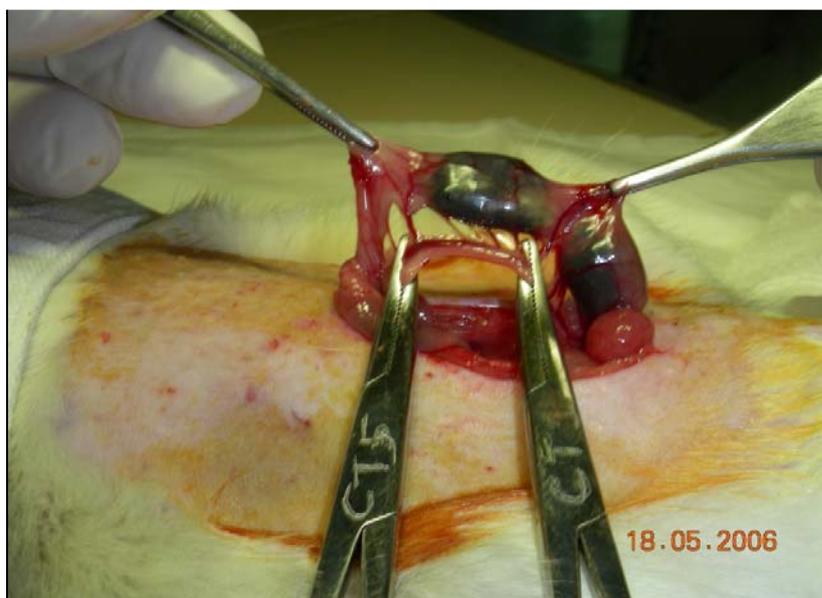


Figura 3 – Ligadura da artéria marginal na altura da secção do cólon.



Figura 4 – Limpeza mecânica anterógrada do cólon excluído de trânsito fecal.



Figura 5 – Aspecto final da parede abdominal após confecção dos estomas.

3.6 - Pós-operatório

3.6.1 - Imediato:

Após o término da operação os animais foram mantidos por 10 min sob lâmpada aquecida, e após recuperação anestésica alojados em gaiolas individuais, sendo liberados para ingestão de água e ração padronizada⁶ (Nuvilab CR1™ Nuvital Nutrientes AS, Brasil) após acordarem completamente.

3.6.2 - Tardio

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais até a data do sacrifício. Permaneceram no biotério da Universidade São Francisco em ambiente climatizado e com controle de luminosidade. Foram avaliados e irrigados diariamente pelo ânus com soro fisiológico ou 5-ASA, dependendo do grupo experimental a que pertenciam, e pesados, semanalmente, por um único bioterista em uma mesma balança. Não houve necessidade de sedar os animais para realização da irrigação cólica. Registramos o peso semanal, assim como as características macroscópicas das fezes eliminadas pelos estomas em planilhas apropriadas. Durante o pós-operatório os animais receberam água e ração padronizada à vontade.

3.7 - Sacrifício dos animais

Na véspera do dia programado para a coleta do material, os animais foram novamente pesados e mantidos em jejum por 12h, exceto para água. Para a remoção dos fragmentos cólicos a serem estudados, anestesiámos os animais com a mesma

⁶ Nuvilab CR1™ Nuvital Nutrientes AS, Brasil

técnica anteriormente descrita e realizamos incisão xifopúbica. Após liberação das aderências removemos o cólon provido, incluindo a colostomia, e todo o segmento caudal do cólon desprovido de trânsito fecal, incluindo o ânus. Os animais anestesiados foram sacrificados com dose inalatória letal de éter etílico.

Depois de removidos, abrimos longitudinalmente os segmentos do cólon pela borda anti-mesocólica, e os lavamos com soro fisiológico a 0,9% aquecido a 37°C para remoção dos resíduos fecais ou muco. Retiramos fragmentos, medindo cada um deles 10 mm de extensão, interessando toda a parede intestinal. Eram quatro do cólon provido e quatro do desprovido de trânsito intestinal. Os fragmentos do segmento provido de trânsito foram colhidos a um centímetro da fixação do estoma no peritônio parietal, desprezando a região da colostomia. Colhemos, nos grupos experimento, os fragmentos dos segmentos sem trânsito, 10 mm a partir da fixação do estoma ao peritônio parietal e 5 mm acima do ânus, desprezando o canal anal. Isolamos nos fragmentos destinados à mensuração dos níveis de estresse oxidativo a mucosa das demais camadas da parede, por micro-dissecação, realizada com o auxílio de lupa entomológica e os acondicionamos em frasco com solução tampão de congelamento, própria para o ensaio do cometa e, após identificação, refrigeramos a -80°C .

3.8 - Técnica histológica

Todos os fragmentos cólicos retirados durante o sacrifício foram seccionados no sentido longitudinal pelas bordas anti-mesocólica e mesocólica. Os fragmentos seccionados longitudinalmente foram lavados com solução fisiológica a 0,9% e dispostos e presos sob superfície plana de cortiça com a superfície mucosa voltada

para cima e submersos em solução de formaldeído a 10%, tamponado, para estudo histopatológico.

3.9 - Confeção dos blocos de parafina e lâminas

Dispusemos para a realização do estudo histopatológico e fixamos com alfinetes fragmentos com 20 mm de extensão, retirados dos cólons com e sem trânsito, em superfície plana de cortiça com a face mucosa voltada para cima. Após identificação o material foi acondicionado em frascos contendo solução de 20 ml de solução de formaldeído tamponado a 10%. Colocamos os espécimes nos frascos com os fragmentos de cólon totalmente imersos na solução onde permaneciam por 72 h. Depois deste período foram retirados e lavados em água corrente e água destilada para, em seguida, serem desidratados em sucessivas concentrações crescentes de álcool e clarificados em xilol. Após essa etapa o material foi incluído em parafina. Cada bloco foi submetido a dois cortes longitudinais, com 5 μ de espessura, para confecção das lâminas destinadas ao estudo histológico. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e montadas em lamínulas com resina. Todas as lâminas foram confeccionadas por um mesmo técnico e analisadas em microscópio óptico comum (Nikon Eclipse DS-50) com magnificação final de imagem de 200 vezes.

Para o diagnóstico da doença considerou-se a presença de atrofia das criptas cólicas, ulcerações epiteliais, infiltrado inflamatório, edema da camada mucosa e submucosa, congestão vascular e hiperplasia linfóide nodular quando presente. O diagnóstico de colite foi firmado por patologista experiente em afecções colorretais, que desconhecia os objetivos do estudo, bem com a origem do material. .

As Figuras 6 e 7 mostram a parede cólica em segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal em animais submetidos a derivação intestinal por duas e quatro semanas.

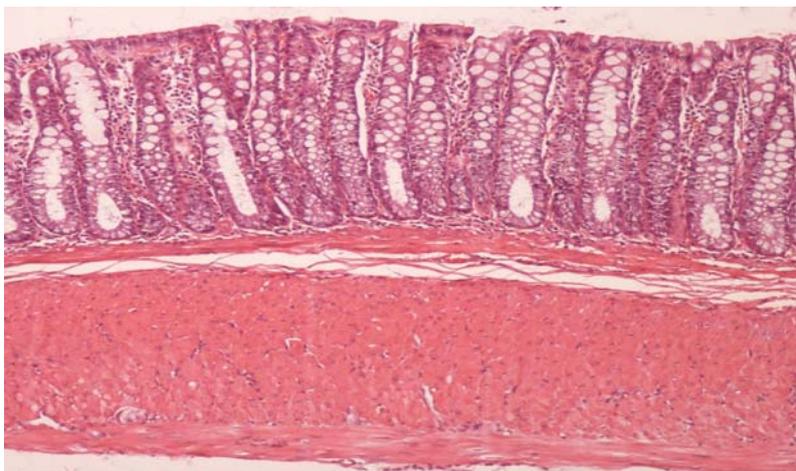


Figura 6 – Fotomicrografia da parede cólica no segmento provido de trânsito fecal de animal submetido à derivação intestinal por 4 semanas (HE – 100x). c=criptas; MM= muscular da mucosa; sm = submucosa; mp= muscular própria.

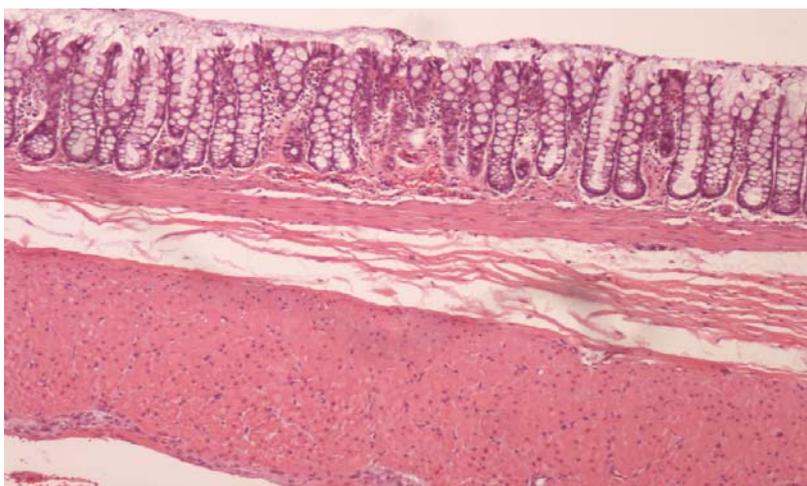


Figura 7 – Fotomicrografia da parede cólica no segmento desprovido de trânsito fecal de animal submetido à derivação intestinal por 4 semanas (HE – 100x). mc = muco; c=criptas; MM= muscular da mucosa; sm = submucosa; mp= muscular própria.

3.10 - Eletroforese em gel de célula isolada (ensaio cometa)

O ensaio do cometa foi realizado na Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia da Universidade São Francisco, Bragança Paulista (UNIFAG).

Realizamos a quantificação dos níveis de estresse oxidativo pela eletroforese em gel de células isoladas (ensaio do cometa) segundo padronização técnica proposta por Pool-Zobel et al. (1994). Resumidamente, utilizamos para a detecção dos níveis de estresse oxidativo amostras provenientes dos animais do grupo controle e experimento da região cólica provida e desprovida de trânsito intestinal. Todas as amostras foram colhidas e analisadas em triplicata. Os espécimes foram incubados em 3 mL de solução tampão de Hank's⁷ contendo 5,5 mg de proteinase K⁸ e 3 mg de colagenase¹⁰ por 45 min a 37°C para a o isolamento das células da mucosa cólica. Alíquotas foram retiradas e a viabilidade celular avaliada.

Realizamos o ensaio do cometa apenas nas amostras que apresentassem viabilidade celular maior que 75%. Avaliamos a viabilidade celular usando o método do diacetato de fluoresceína (FDA) / brometo de etídio (EtBr)⁹. Resumidamente, a solução de coloração celular foi preparada imediatamente antes da sua utilização e continha 30 ml de FDA em acetona (5mg/mL), 200 ml de EtBr em tampão fosfato (PBS; 200 mg/ml e 4,8 mL de PBS¹⁰). A suspensão contendo células isoladas foi então misturada com 25 mL da solução corante, colocada sobre lâmina e recoberta com lamínula. As lâminas foram lidas no microscópio de imunofluorescência. O núcleo das células viáveis

⁷ Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

⁸ Sigma Chemical, CO, St. Louis, MO, USA

⁹ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

¹⁰ Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

corava-se em verde, e em vermelho o das células inviáveis. Após análise das lâminas, selecionamos amostras dos tecidos que apresentassem mais de 75% das células viáveis.

A versão alcalina do ensaio do cometa foi realizada de acordo com protocolo publicado por Miranda et al. (2008). Em resumo, 15 μ L da suspensão celular previamente obtida foram misturados à agarose *low melting point* 0.5%⁹, postos sobre uma lâmina e cobertos com lamínula. Essas foram imersas em solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% SDS, pH 10 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) e permaneceram a 4°C por 12 horas. Subseqüentemente, foram expostas a um tampão alcalino (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH=13,4) por 40 min. a 4°C. A eletroforese foi realizada nesse tampão, no interior da geladeira a 4°C, por 30 min a 25V e 300 mA. Adicionalmente, o dano oxidativo também foi induzido “*ex vivo*” pelo desafio das células isoladas a 100 μ M de H₂O₂, em gelo, por 30 minutos antes da incorporação em agarose. Depois disso, as lâminas foram colocadas em tubos com PBS (pH 7,4) antes da lise alcalina, e incubadas por 1 hora à 37°C. Após a incubação foram lavadas em PBS frio, submetidas à lise alcalina, realizando a desnaturação e eletroforese com a mesma técnica acima descrita. Após a corrida da eletroforese, as lâminas foram neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5), coradas com *Sybr Safe*¹⁰, e analisadas ao microscópio de fluorescência. Todo material foi processado e analisado simultaneamente por um mesmo profissional, para evitar variações da técnica empregada. Duzentas células foram aleatoriamente selecionadas (100 de cada segmento intestinal, provido e desprovido de trânsito) e analisadas usando o programa

Komet 5.5¹¹. Com o auxílio do programa, foi obtido o valor da extensão da cauda do cometa (*Tail moment*) sendo seus valores médios determinados. Segundo o manual do fabricante, o *Tail moment* (*TM*) é definido como o produto entre os fragmentos de DNA da cauda e a distância média da migração da cauda do cometa, e reflete a extensão das rupturas das hélices de DNA (estresse oxidativo), podendo ser quantificado por métodos de intensificação de imagem e análise computacional (Ribeiro et al., 2008) (Figura 8). Para cada animal, utilizou-se a média dos valores obtidos com a leitura de 100 células de cada segmento cólico realizada pelo mesmo biomédico, que desconhecia a origem do material e os objetivos do estudo.

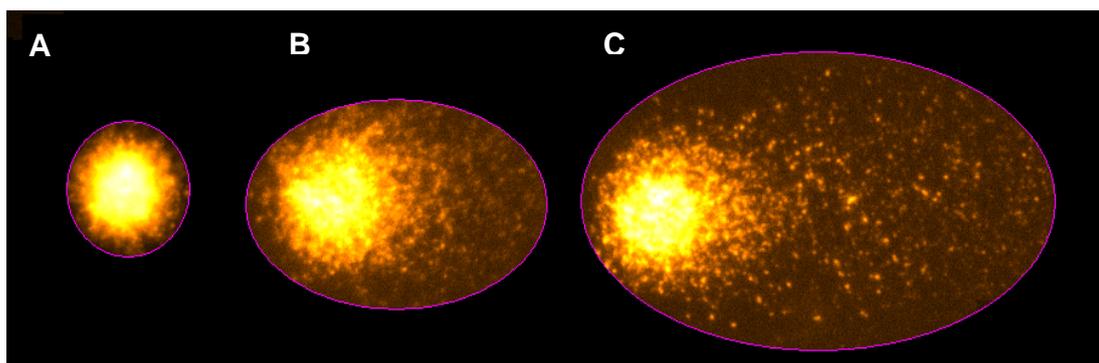


Figura 8 – Avaliação dos níveis de estresse oxidativo (*Tail Moment*), pelo ensaio do cometa. **A** – Célula normal; **B** – Célula com dano oxidativo moderado; **C** – Célula com dano oxidativo intenso.

3.11 - Método estatístico

Os resultados obtidos foram descritos adotando-se sempre os valores médios encontrados com o respectivo desvio padrão. Utilizamos os testes t de Student pareado para comparar os resultados encontrados nos cólons com e sem trânsito fecal para

¹¹ Kinetic Imaging, NY,USA

cada solução de intervenção utilizada, independente do período de irrigação adotado (duas ou quatro semanas) no mesmo animal. Adotamos o teste de ANOVA e Newman Keuls para avaliar a variação nos níveis de dano oxidativo ao DNA comparando, em um mesmo segmento cólico (com ou sem trânsito fecal) as diferentes soluções de irrigação, em cada grupo experimental constituído (duas ou quatro semanas). Empregamos o teste de Friedman para verificar a variação dos níveis de dano oxidativo ao DNA após duas e quatro semanas analisando de maneira pareada as soluções de intervenção e os segmentos cólicos analisados.

Para todos os testes adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$) com os respectivos intervalos de confiança a 95%. Todos os dados obtidos foram analisados pelo programa estatístico SPSS¹² for Windows (versão 13.0).

¹² SPSS Inc., Chicago, USA

4. RESULTADOS

4.1 - Diagnóstico de colite

As figuras 9,10,11,12,13 e 14 mostram as alterações histopatológicas encontradas nos segmentos providos e desprovidos de trânsito, que permitiram o diagnóstico de CE, em todos os animais, independente do grupo ou subgrupo experimental a que pertenciam. Verificou-se que os segmentos excluídos de trânsito fecal dos animais submetidos à intervenção com ácido 5-ASA apresentavam menor inflamação tecidual quando comparado aos animais irrigados com solução fisiológica, independente do tempo de irrigação considerado.

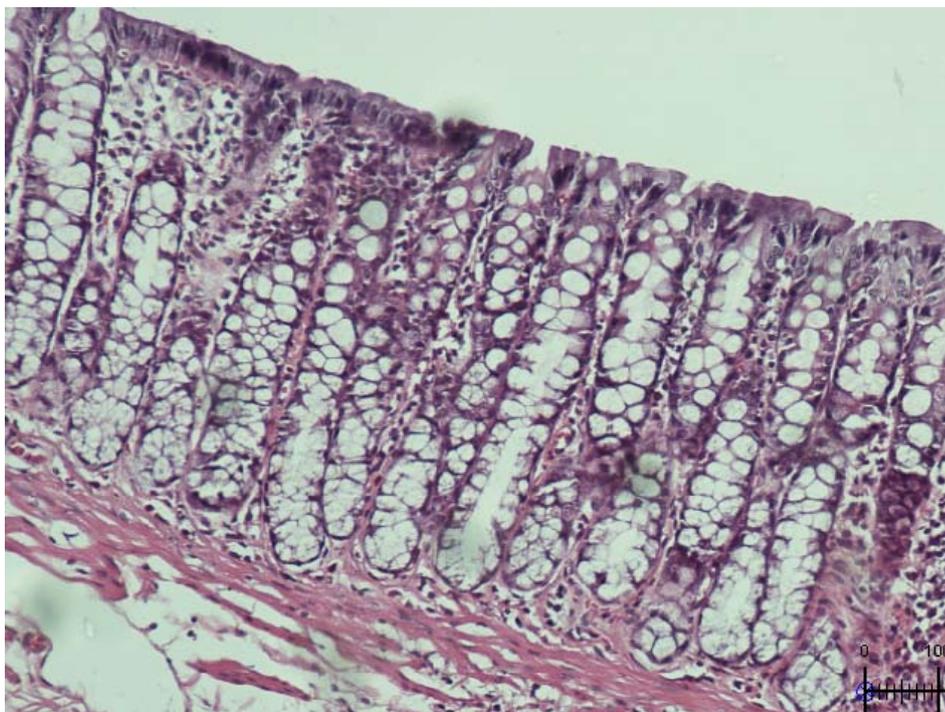


Figura 9 – Fotomicrografia do segmento provido de trânsito após duas semanas de derivação fecal e irrigação com solução fisiológica 0,9%. (HE-200x)

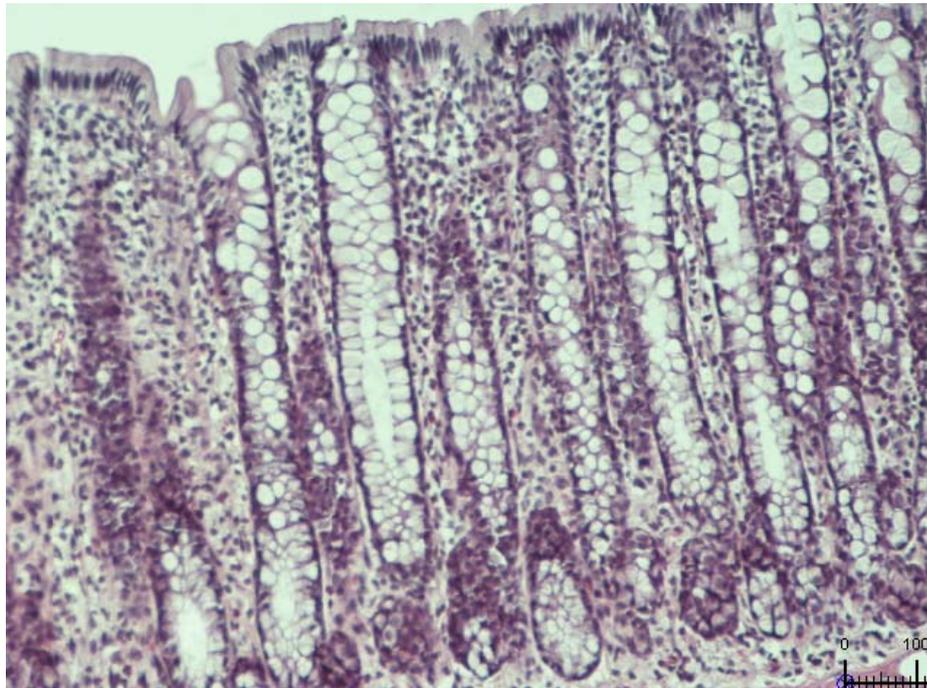


Figura 10 – Fotomicrografia das alterações histológicas encontradas no segmento provido de trânsito após quatro semanas de derivação fecal e irrigação com solução fisiológica a 0,9%. (HE-200x)

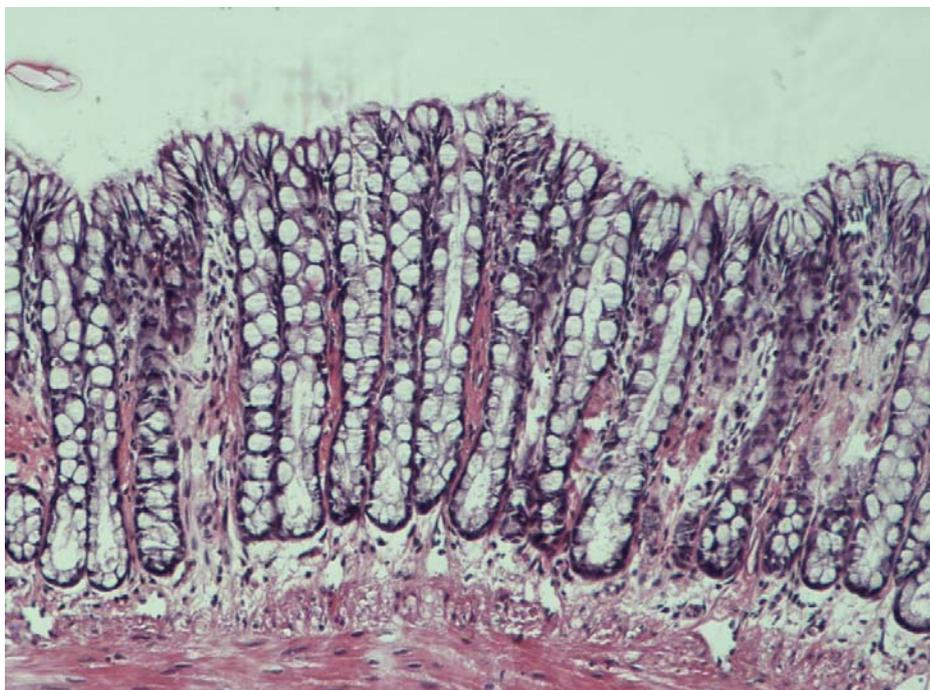


Figura 11 – Fotomicrografia das alterações histológicas encontradas no segmento desprovido de trânsito após duas semanas de derivação fecal e irrigação com solução fisiológica 0,9%. (HE-200x)

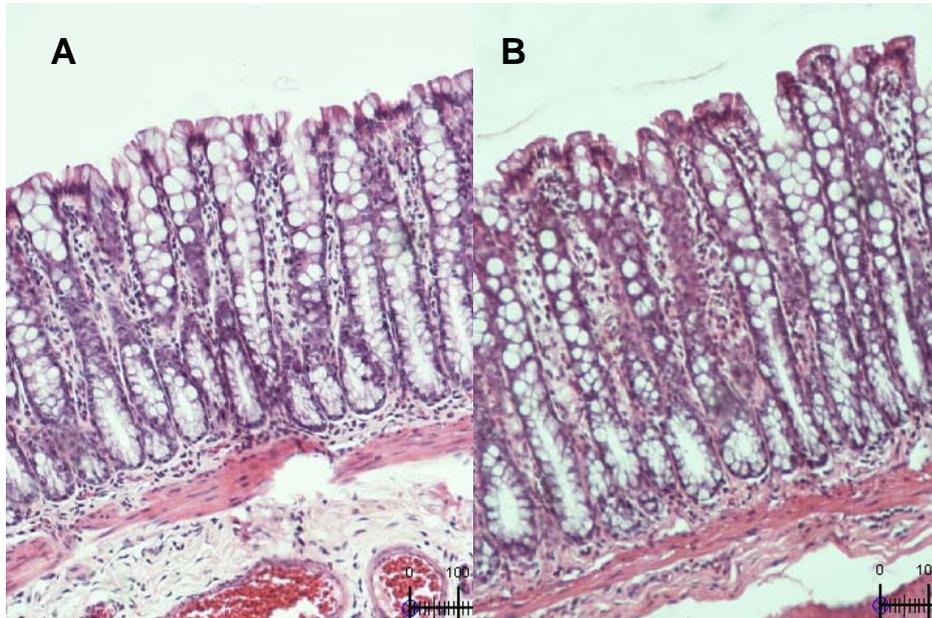


Figura 12 – A – Fotomicrografia do segmento provido de trânsito após duas semanas de derivação fecal e irrigação com ácido 5-ASA. **B** – Fotomicrografia do segmento provido de trânsito após quatro semanas de derivação fecal e irrigação com ácido 5-ASA. (HE-200x)

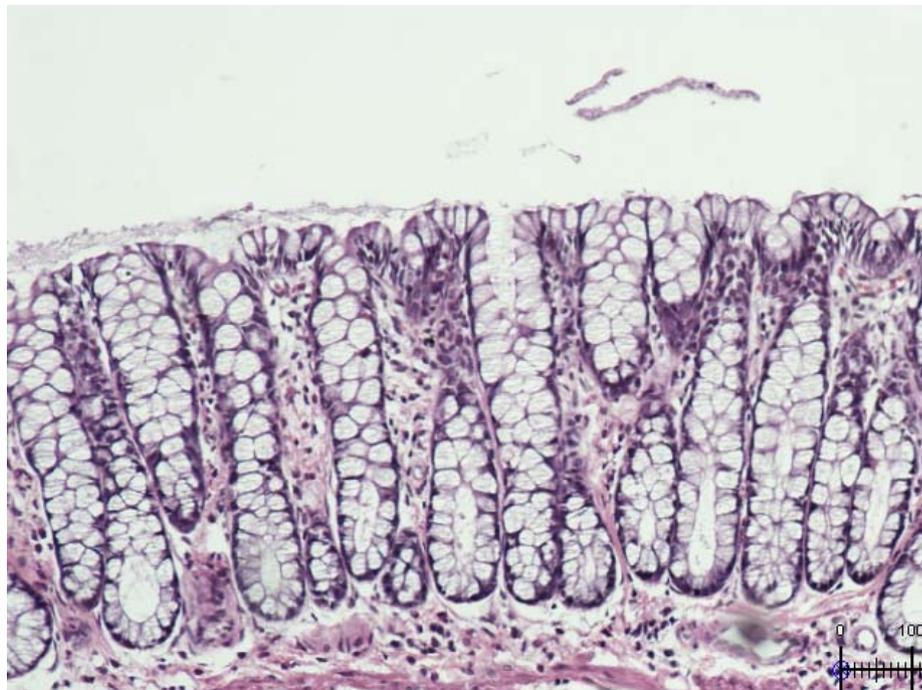


Figura 13 – Fotomicrografia do segmento desprovido de trânsito após duas semanas de derivação fecal e irrigação com ácido 5-ASA (HE-200x)

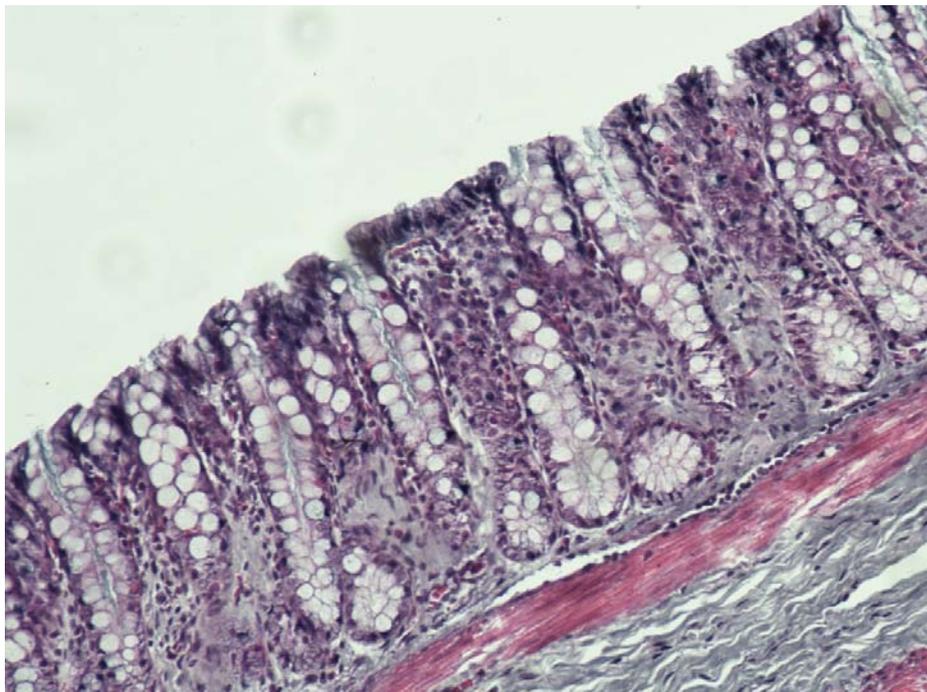


Figura 14 – Fotomicrografia do segmento desprovido de trânsito após quatro semanas de derivação fecal e irrigação com ácido 5-ASA. (HE-200x)

4.2 – Níveis de dano oxidativo após duas semanas de irrigação

A figura 15 mostra os níveis de dano oxidativo de DNA nos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal nos animais sacrificados após duas semanas. Nos animais irrigados com solução fisiológica a 0,9% encontramos níveis de dano oxidativo ao DNA no cólon com trânsito fecal, em média, com o respectivo desvio padrão, de $2,590 \pm 0,54$ enquanto, nos irrigados com 5-ASA de $1,807 \pm 0,05$ (Anexo). No cólon sem trânsito fecal os níveis de dano nos animais irrigados com solução fisiológica foram de $3,280 \pm 0,62$ enquanto nos irrigados com ácido 5-ASA de $2,074 \pm 0,15$ (Anexo). Verificamos que nos animais irrigados com solução fisiológica os níveis de dano oxidativo ao DNA nos segmentos sem trânsito fecal foram significativamente maiores quando comparados aos

dos segmentos com trânsito preservado ($p = 0,02$; I.C.: 95%: -1.831 a -0,1969; teste t pareado). Nos animais irrigados com ácido 5-ASA os níveis de dano oxidativo ao DNA nos segmentos excluídos de trânsito, também foram maiores quando comparados aos dos segmentos com trânsito preservado ($p=0,0001$; I.C.: 95%: -0,3517 a -0,1839; teste t pareado).

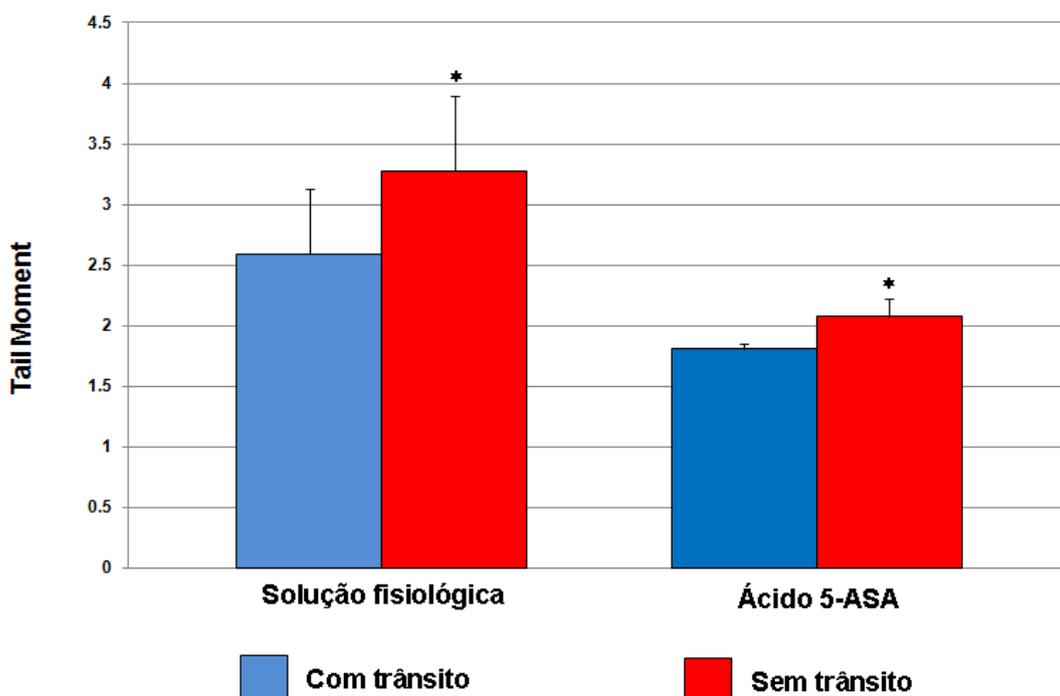


Figura 15 - Valor médio, com o respectivo desvio padrão, dos níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear nos cólons irrigados com solução fisiológica ou ácido 5-ASA por duas semanas comparando segmentos com e sem trânsito fecal. Teste t pareado; * = significante.

4.3 – Níveis de dano oxidativo após quatro semanas de irrigação

A figura 16 mostra os níveis de dano oxidativo de DNA nos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal nos animais sacrificados após quatro semanas. Nos animais irrigados com solução fisiológica a 0,9%, encontramos níveis de dano oxidativo

ao DNA no cólon com trânsito fecal, em média, com o respectivo desvio padrão, de $2.590 \pm 0,54$ enquanto, nos irrigados com 5-ASA de $2,066 \pm 0,13$ (Anexo). No cólon sem trânsito fecal os níveis de dano nos animais irrigados com solução fisiológica foram de $3,20 \pm 0,27$ enquanto nos irrigados com ácido 5-ASA de $2,453 \pm 0,17$ (Anexo). Verificamos que nos animais irrigados com solução fisiológica os níveis de dano oxidativo ao DNA nos segmentos com trânsito fecal foram semelhantes aos dos segmentos sem trânsito ($p=0,14$; teste t pareado). De modo diferente, nos animais irrigados com ácido 5-ASA os níveis de dano oxidativo ao DNA nos segmentos excluídos de trânsito foram maiores quando comparados aos dos segmentos com trânsito preservado ($p=0,001$; teste t pareado).

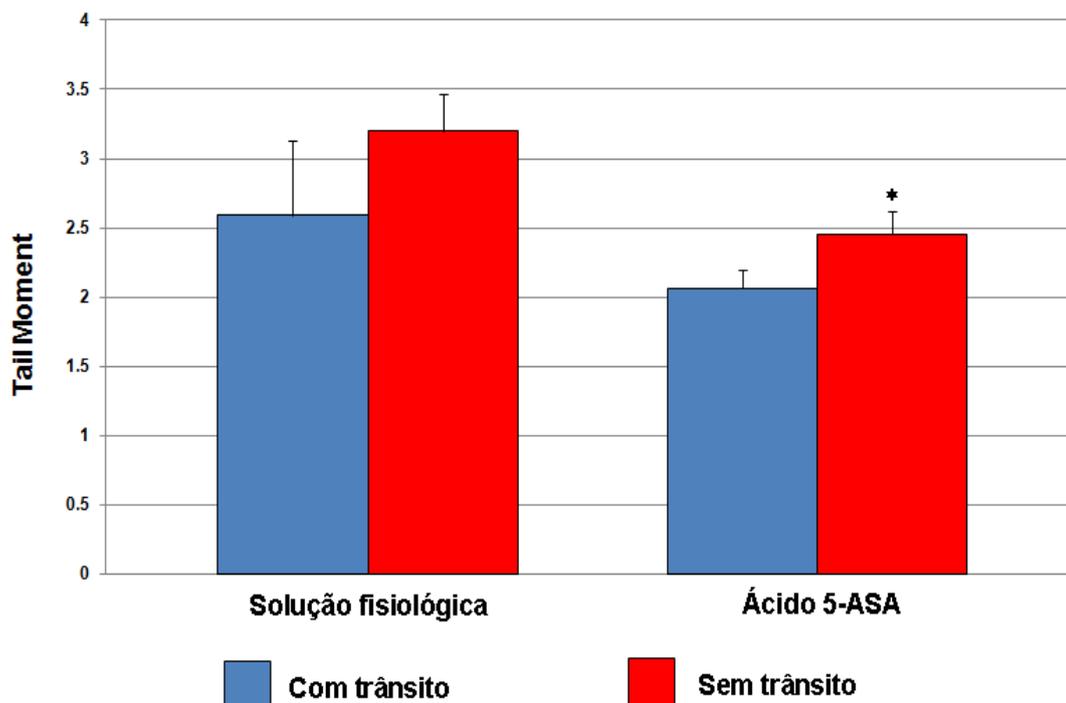


Figura 16 - Valor médio, com o respectivo desvio padrão, dos níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear nos cólons irrigados com solução fisiológica ou ácido 5-ASA, por quatro semanas comparando segmentos com e sem trânsito fecal. Teste t pareado; * = significativo.

A figura 17 mostra a variação dos níveis de dano ao DNA nos cólons providos e desprovidos de trânsito, após uso das soluções de intervenção por duas ou quatro semanas. Ao analisarmos a variação dos níveis de dano ao DNA, nos segmentos com e sem trânsito fecal, verificamos que nos animais irrigados com 5-ASA, os níveis de dano foram menores sempre, independente do tempo de irrigação, quando comparados aos animais irrigados com solução fisiológica ($p < 0,01$; ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls).

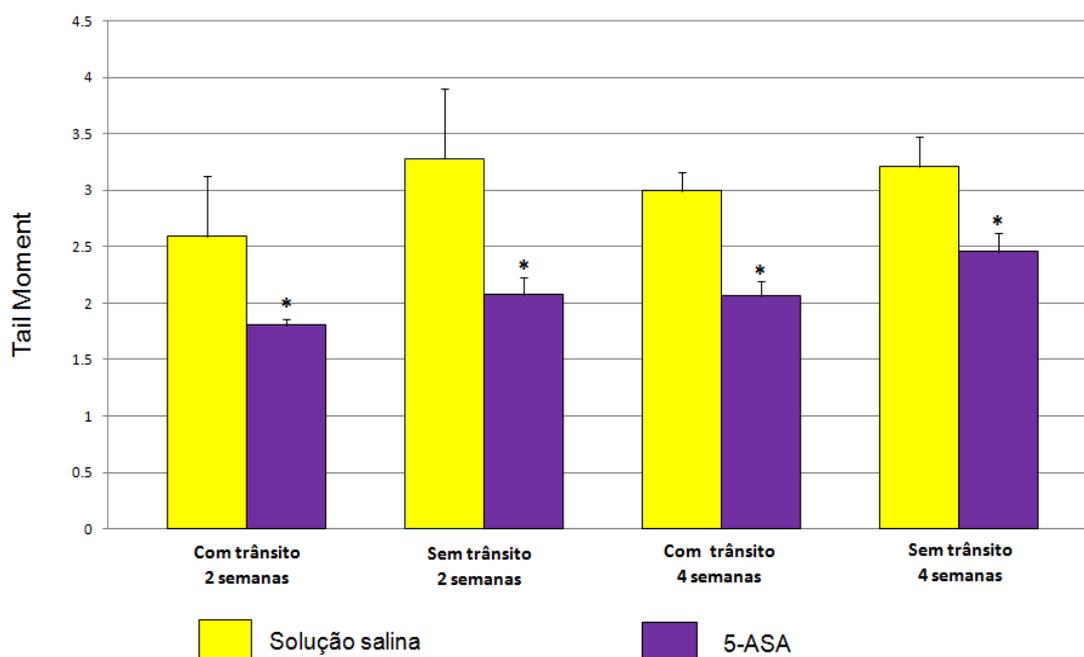


Figura 17 - Variação dos níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear nos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal nos animais submetidos à intervenção por duas ou quatro semanas com solução fisiológica a 0,9% e ácido 5-ASA. Teste de ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls; * = significativo.

A figura 18 mostra a variação dos níveis de dano ao DNA nos segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal comparando os diferentes tempos de irrigação (duas e quatro semanas) irrigados com solução fisiológica ou ácido 5-ASA. Verificamos que os níveis de danos nos segmentos com e sem trânsito fecal nos animais irrigados com solução fisiológica não apresentavam variação, mantendo-se elevados durante o experimento. Os níveis de dano ao DNA nos segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal dos animais irrigados com ácido 5-ASA apesar de aumentarem com o progredir do experimento mantinham-se menores que os níveis dos animais irrigados com solução fisiológica.

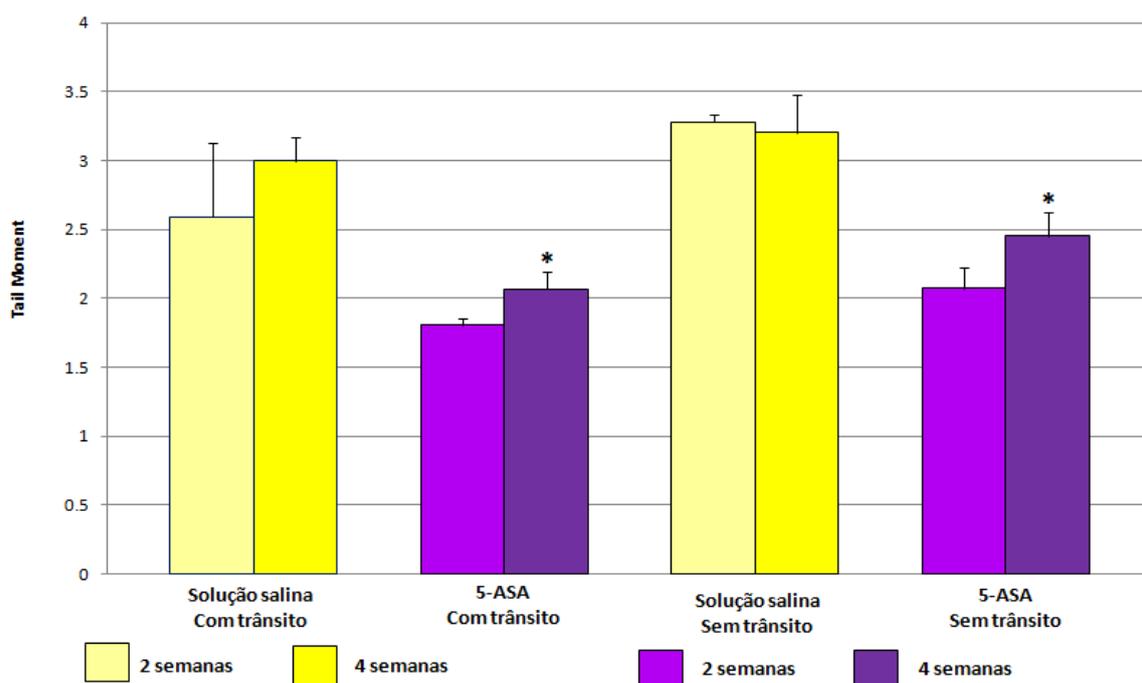


Figura 18 - Variação dos níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear nos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal comparando animais submetidos à intervenção por duas e quatro semanas, irrigados com solução fisiológica a 0,9% ou ácido 5-ASA. Teste de ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls; * = significativo.

4.4 - Níveis de dano oxidativo após desafio com H₂O₂ (duas semanas)

A figura 19 mostra os níveis de dano oxidativo de DNA em células da mucosa cólica após o desafio com H₂O₂ nos animais submetidos à irrigação por duas semanas. Verificamos que nos animais submetidos à intervenção com solução fisiológica a 0,9% os níveis de dano oxidativo ao DNA no cólon com trânsito preservado foram, em média, com o respectivo desvio padrão, de $2.910 \pm 0,36$, enquanto nos submetidos à intervenção com ácido 5-ASA de $1,896 \pm 0,07$. Ao mensurarmos os níveis de dano oxidativo no cólon sem trânsito fecal verificamos que os níveis nos animais irrigados com solução fisiológica foram de $3,555 \pm 0,43$ enquanto nos animais irrigados com ácido 5-ASA de $2,441 \pm 0,35$.

Constatamos que nos animais irrigados com solução fisiológica os níveis de dano oxidativo ao DNA nos segmentos sem trânsito fecal, após desafio com H₂O₂ foram significativamente mais elevados quando comparados aos dos segmentos onde o trânsito fecal encontrava-se preservado ($p=0,005$; I.C.: 95%: $-1,0028$ a $-0,2872$; teste t pareado). De modo semelhante verificamos que nos animais irrigados com ácido 5-ASA os níveis de dano oxidativo ao DNA nos segmentos excluídos de trânsito, também foram maiores quando comparados aos segmentos com trânsito preservado ($p=0,0007$; I.C.: 95%: $-0,7802$ a $-0,3109$; teste t pareado).

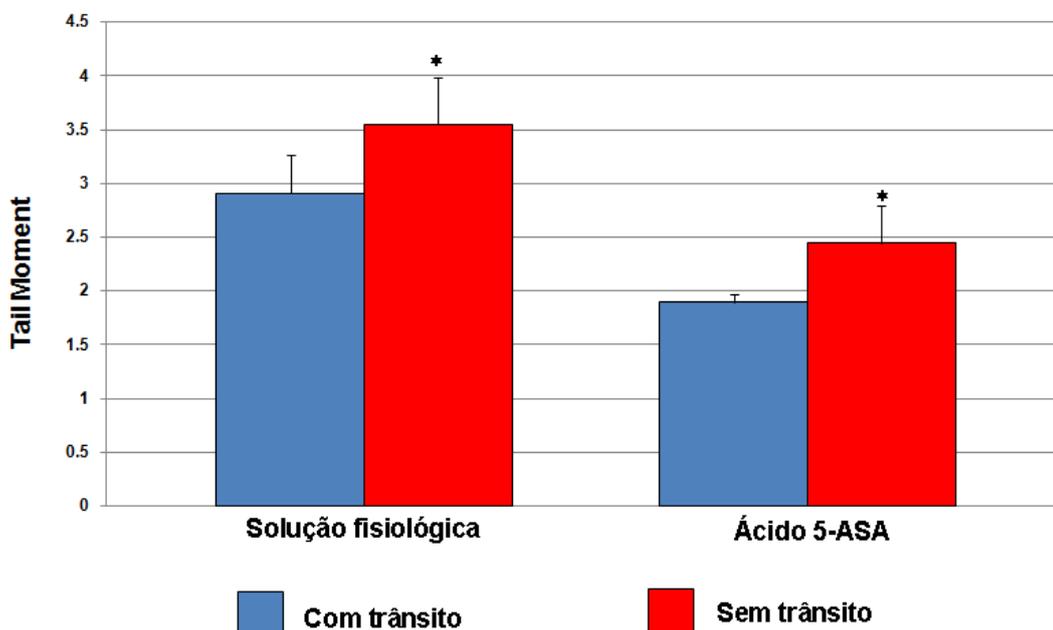


Figura 19 - Valores médios, com o respectivo desvio padrão, dos níveis de dano oxidativo ao DNA nos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal, após desafio com H_2O_2 , comparando animais submetidos à intervenção com solução fisiológica e ácido 5-ASA por duas semanas. Teste t pareado; * = significativo

4.5 - Níveis de dano oxidativo após desafio com H_2O_2 (quatro semanas)

A figura 20 mostra os níveis de dano oxidativo de DNA em células da mucosa cólica após o desafio com H_2O_2 nos animais submetidos à irrigação por quatro semanas. Constatamos que os níveis de dano ao DNA nos segmentos com trânsito fecal dos animais irrigados com solução fisiológica a 0,9%, foram de $4,158 \pm 0,12$, enquanto nos submetidos a intervenção com ácido 5-ASA de $2,581 \pm 0,34$. Verificamos que os níveis de dano ao DNA no cólon sem trânsito fecal dos animais irrigados com solução fisiológica foram de $4,520 \pm 0,34$, enquanto nos irrigados com ácido 5-ASA de $3,254 \pm 0,41$.

Constatamos que nos animais irrigados com solução fisiológica os níveis de dano oxidativo ao DNA nos segmentos com trânsito, após o desafio, foram semelhantes quando comparados aos dos segmentos sem trânsito fecal ($p = 0,14$; I.C.: 95%: -0,9551 a 0,2201; teste t pareado). De modo diferente, verificamos que nos animais irrigados com ácido 5-ASA os níveis de dano oxidativo ao DNA nos segmentos excluídos de trânsito, após o desafio foram mais elevados quando comparados aos dos segmentos com trânsito preservado ($p=0,001$; I.C.: 95%: -0,9935 a -0,3532; teste t pareado) (Anexo).

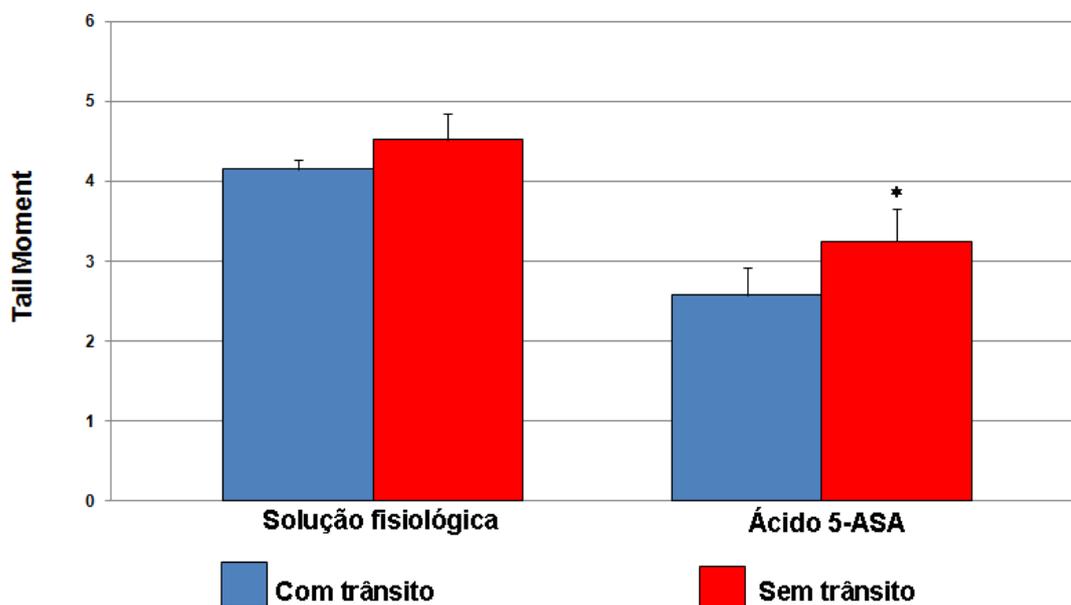


Figura 20 - Valores médios, com o respectivo desvio padrão, dos níveis de dano oxidativo ao DNA nos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal, após desafio com H_2O_2 , comparando animais submetidos à intervenção com solução fisiológica e ácido 5-ASA por quatro semanas. Teste t pareado; * = significante

A figura 21 mostra a variação dos níveis de dano ao DNA nos cólons providos e desprovidos de trânsito após uso das soluções de intervenção por duas ou quatro semanas, nos animais submetidos ao desafio com H₂O₂. Ao analisarmos a variação dos níveis de dano ao DNA, nos segmentos com e sem trânsito fecal, verificamos que nos animais irrigados com 5-ASA, os níveis de dano foram menores independente do tempo de irrigação (p<0,01; ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls). (Anexo).

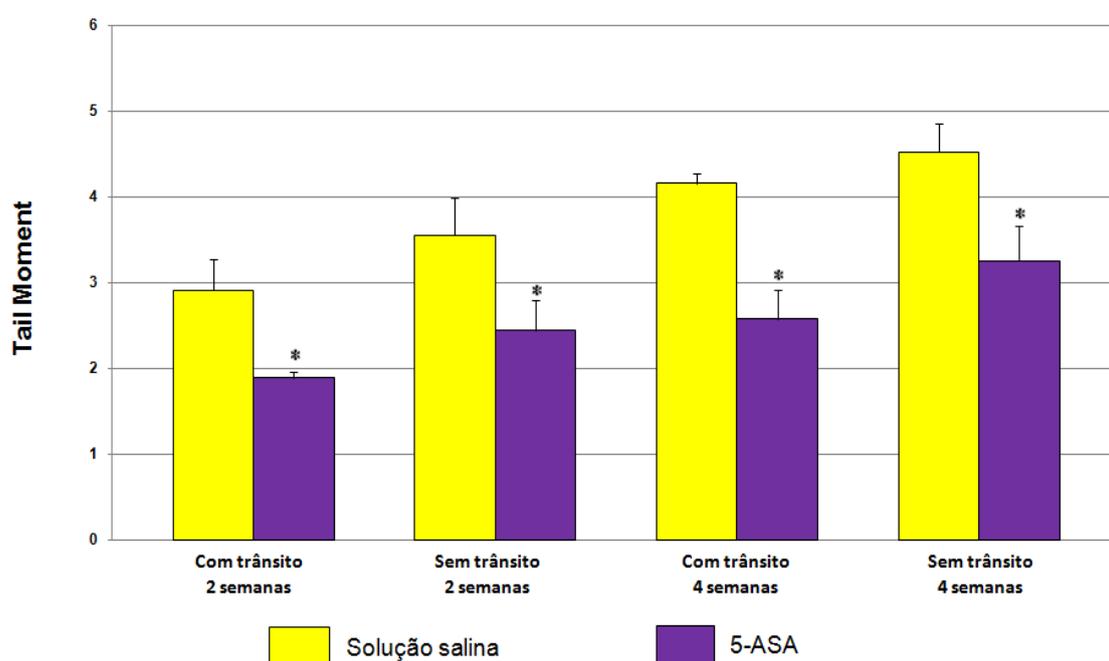


Figura 21 - Variação dos níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear nos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal nos animais submetidos à intervenção por quatro semanas com solução fisiológica a 0,9% e ácido 5-ASA, desafiados com H₂O₂. Teste de ANOVA, pós teste de Newman-Keuls; * = significativo.

A figura 22 mostra a variação dos níveis de dano ao DNA nos segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal comparando os diferentes tempos de irrigação (duas e quatro semanas) em animais com solução fisiológica ou ácido 5-ASA, após desafio com

H₂O₂. Encontramos aumento nos níveis de dano oxidativo do DNA após intervenção com solução fisiológica ou ácido 5-ASA, independente do período de irrigação considerado. Todavia, os níveis de dano ao DNA nos segmentos providos de trânsito fecal e irrigados com ácido 5-ASA no segmento excluído variavam menos quando comparados aos dos animais irrigados com solução fisiológica.

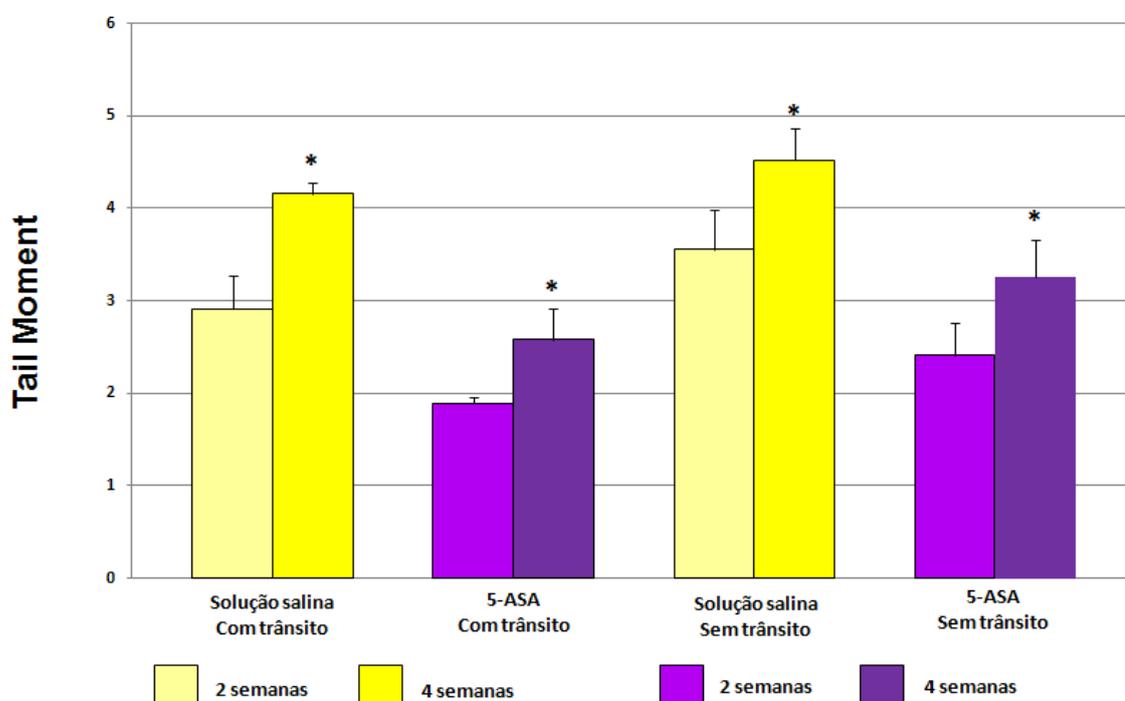


GRÁFICO 22 - Variação dos níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear nos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal comparando animais submetidos à intervenção por duas e quatro semanas, irrigados com solução fisiológica a 0,9% ou ácido 5-ASA, após desafio com H₂O₂. Teste de ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls; * = significativo.

5. DISCUSSÃO

5.1 - Quanto ao método

5.1.1 - Aspectos éticos da pesquisa

A utilização de animais de experimentação têm sido de grande importância para a ciência. Isso é percebido não apenas pelos avanços no conhecimento dos processos vitais, mas também para a evolução nos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças (Sousa et al., 2008). Entretanto, é de responsabilidade do pesquisador o manuseio destes animais, garantindo-lhes não apenas um tratamento livre de dor, mas também bem estar durante o experimento. Da mesma forma, o número de animais empregados deve ser o menor possível evitando-se o emprego de grandes grupos experimentais. Ao final da pesquisa o sacrifício destes animais deve respeitar a metodologia recomendada para cada espécie pela legislação atual.

Respeitando estes princípios obedecemos às orientações da Lei Federal 11.794 de 08/102008, tendo cuidado de elaborar grupos experimentais com o menor número de animais possível e com especial atenção para que os mesmos fossem manuseados e sacrificados segundo as recomendações do COBEA.

5.1.2 – Animal de experimentação

Os ratos são os animais mais frequentemente utilizados em modelos experimentais de colite (Filmann, 2007; Martinez et al., 2008; Reis, 2008; Sousa et al., 2008; Hayashi et al., 2009; Martinez, 2009; Nonose et al., 2009). Os poucos estudos que avaliaram a CE em modelos experimentais também adotaram o rato como animal

de experimentação (Keli et al., 1997; Biondo-Simões et al., 2000; Lopes-Paulo, 2002; Margarido et al., 2003; Pinto Júnior et al., 2007; Sousa et al., 2008; Nasrri et al., 2008; Martinez et al., 2008; Nonose et al., 2008; Martinez, 2009). Embora a maioria dos autores proponha que o desenvolvimento da CE no animal apresente paralelismo com o que ocorre no homem, outros acreditam que os ratos não representam um bom animal de experimentação para o estudo da CE, pois a frequência com que desenvolvem as lesões histológicas nos segmentos sem trânsito é discreta e não relacionada ao tempo de exclusão (Biondo-Simões et al., 2000). É possível que esse conflito de opiniões esteja diretamente relacionado a diferentes aspectos técnicos nos modelos experimentais empregados.

Utilizamos ratos albinos (*Rattus Norvegicus Berkenhout*), SPF (*Specific Pathogen Free*), da linhagem Wistar, fornecidos por um único biotério que é centro de referência nacional para criação de animais de experimentação. Tais cuidados foram tomados para assegurarmos melhor qualidade e uniformidade na amostra estudada. Utilizamos apenas animais SPF com o objetivo de evitar que parasitoses intestinais pudessem determinar o aparecimento de colite infecciosa. Essa mesma precaução já havia sido adotada anteriormente em modelos experimentais de CE (Sousa et al., 2008; Martinez et al., 2008; Nonose et al., 2008; Martinez, 2009)

Assim como outros selecionamos apenas animais pertencentes ao gênero masculino com o objetivo minimizar os efeitos das mudanças fisiológicas que ocorrem durante o ciclo hormonal das fêmeas que poderiam interferir nos resultados (Sousa et al., 2008; Martinez, 2009; Nonose et al., 2009). O emprego de um único gênero também possibilitou eliminar quaisquer variações significantes com relação ao reparo anatômico adotado na padronização do local no cólon esquerdo aonde seria confeccionada a

colostomia. Estudos vêm demonstrando que existem variações na localização da placa de Peyer em relação à reflexão peritoneal ao compararem-se animais pertencentes a diferentes gêneros (Priolli et al., 2009).

Pesquisas recentes mostraram que o modelo experimental de CE no rato determina modificações histológicas comparáveis com as encontradas nos seres humanos (Lopes-Paulo, 2002; Margarido et al., 2003; Oliveira-Neto e Aguiar-Nascimento, 2004; Sousa et al., 2008; Nasri et al., 2008; Martinez, 2009). Os resultados encontrados no presente estudo confirmaram que o rato é animal de experimentação adequado, pois desenvolveu alterações no segmento excluído de trânsito que permitiram o diagnóstico histopatológico de CE em todos os animais do grupo experimento, independente do tempo de exclusão proposto.

5.1.3 – Fase pré-operatória

Durante todo o período do experimento mantivemos os animais em gaiolas individuais até a data do sacrifício, mantendo-os em ambiente com temperatura variando entre 20°C e 30°C, umidade relativa do ar entre 40% e 60% e exposição à luminosidade por 12 horas/dia. A manutenção em ambientes climatizados e o manuseio cuidadoso são medidas importantes uma vez que estudos já demonstraram que o estresse físico pode provocar dano oxidativo ao DNA celular, o que poderia interferir nos resultados do presente estudo (König et al., 2001; Mayr et al., 2002).

Optamos por iniciar o jejum 12 horas antes do procedimento, exceto a oferta de água, com intuito de reduzir o conteúdo fecal no interior do cólon. Com este cuidado tínhamos com objetivo facilitar a manipulação intestinal e diminuir o volume de solução

fisiológica quando realizamos a limpeza mecânica intra-operatória para eliminação de eventuais resíduos fecais ainda presentes no cólon a ser excluído de trânsito.

O acondicionamento em gaiolas individuais permitiu acompanhamento pré e pós-operatório, com identificação do número do animal e o grupo experimental a que pertenciam, assim como as anotações em ficha individualizada tornaram possível o controle adequado das características das evacuações, consumo de ração, aspectos relacionados à ferida cirúrgica, estoma e evolução ponderal. O isolamento também evitou que um animal agredisse o estoma do outro, fato que observamos durante a elaboração de grupo piloto para padronização das etapas experimentais desenvolvidas no presente estudo.

Revisando a literatura recente a maioria dos autores não faz menção aos cuidados dispensados no preparo pré-operatório (Keli et al., 1997; Biondo-Simões et al., 2000; Lopes-Paulo, 2002; Pinto Júnior et al., 2007). Um estudo relata que os animais foram isolados uma semana antes do procedimento cirúrgico em gaiolas individuais, porém não adotou o regime de jejum pré-operatório empregado em nossa pesquisa (Keli et al., 1997). De modo semelhante ao anteriormente proposto isolamos os animais nos dias que antecederam a intervenção cirúrgica em um período de vigilância epidemiológica (Keli et al., 1997; Sousa et al., 2008; Nonose et al., 2009). Acreditamos que o jejum, iniciado 12 horas antes do procedimento cirúrgico, evita a privação prolongada de substrato fecal no cólon provido de trânsito, que poderia interferir nos resultados histológicos e bioquímicos caso adotássemos período mais prolongado. Cabe lembrar que um dia de vida nos ratos Wistar corresponde à maior período aproximado de 360 dias no homem (de Araújo, 2007).

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

5.1.4 – Anestesia

Optamos por utilizar como agente anestésico solução de xilazina a 2% associada ao cloridrato de quetamina na dose de 0,1ml/100g, administradas por via intramuscular. Em estudo semelhante foi utilizado o éter inalatório como agente anestésico, porém, os autores descrevem complicações pulmonares que levaram à morte de um animal durante o procedimento cirúrgico (Keli et al., 1997).

Outros autores, apesar de utilizarem anestesia inalatória com éter etílico, não encontraram complicações, mas também não expressam quaisquer benefícios relacionados ao veículo anestésico empregado (Biondo-Simões et al., 2000). Um autor empregou a anestesia geral intraperitoneal com tiobarbiturato de sódio na dose de 50 mg/kg de peso, sem relato de complicação relacionada à droga (Lopes-Paulo, 2002). A via de administração adotada e as drogas empregadas no presente estudo foram bem toleradas por todos os animais, sendo a recuperação anestésica pós-operatória rápida e sem óbitos. Evitamos a administração intraperitoneal pelo receio de que as drogas

anestésicas pudessem ocasionar inflamação da parede cólica interferindo na síntese de proteínas. Este tipo de padronização anestésica já tinha sido utilizado em modelos de colite de exclusão que avaliaram, experimentalmente os níveis de dano oxidativo tecidual e que não referiram interferência do método anestésico nos resultados (Martinez et al., 2008; Martinez, 2009)

5.1.5 – Técnica operatória

Realizamos a abertura da cavidade através de incisão mediana infra-umbilical longitudinal de três centímetros de extensão para a identificação do cólon distal e reto. A extensão e a localização mediana da incisão na parede abdominal permitiram, com facilidade, a localização do cólon esquerdo, a identificação da placa de Peyer - o reparo anatômico adotado para a secção do cólon - bem como a confecção dos estomas proximal e distal distante da incisão cirúrgica. A extensão da incisão também foi suficiente para permitir a colocação do paquímetro para a medida do ponto exato onde foi realizada a secção do cólon esquerdo. A padronização do local da colostomia possibilitou que o estoma fosse sempre realizado no mesmo local em todos os animais. Dessa forma tivemos segurança de que os espécimes removidos para o estudo cometa foram sempre retirados do mesmo local. Confeccionamos a colostomia proximal e a fístula mucosa distal no hipocôndrio esquerdo e fossa ilíaca esquerda, respectivamente, para evitar que o animal pudesse alcançar o estoma com a boca o que poderia gerar complicações pós-operatórias. Quando padronizávamos a técnica operatória nos animais do grupo piloto verificamos que um deles roeu o estoma proximal realizado, a princípio, no abdômen inferior.

Optamos pela confecção de dois estomas terminais separados com o objetivo de evitar a migração de material fecal da colostomia proximal para fistula mucosa distal, o que poderia manter o fornecimento de nutrição ao cólon desfuncionalizado. Modelos experimentais que realizaram a colostomia em alça não podem assegurar a completa exclusão fecal (Keli et al., 1997). Acreditamos que a opção técnica que adotamos no presente estudo mostrou-se válida, à medida que não encontramos em nenhum animal resíduos fecais no segmento excluído de trânsito quando da coleta dos espécimes para análise histológica. Outros autores preferem utilizar a exclusão do cólon distal com a operação de Hartmann, todavia, esta técnica dificulta a localização e remoção do cólon excluído, aumentando a possibilidade de que o cólon não seja retirado em um único segmento dificultando a obtenção de material suficiente para o estudo histológico (Biondo-Simões et al., 2000).

A técnica empregada para fixação cutânea da colostomia e da fistula mucosa assegurou boa cicatrização das bordas do estoma à pele e não observamos, em nenhum animal, necrose ou deiscência da fixação da colostomia.

5.1.6 – Preparo mecânico do cólon excluído

Acreditamos que a limpeza mecânica do cólon excluído, em modelos experimentais propostos para CE, é etapa fundamental e imprescindível para assegurar a completa eliminação de todo conteúdo fecal residual no segmento cólico a ser excluído.

A limpeza mecânica do segmento excluído de trânsito em modelos experimentais de CE já havia sido recomendada anteriormente (Margarido et al., 2003) e vem sendo utilizada rotineiramente nos estudos mais recentes (Nasrri et al., 2008; Sousa et al.,

2008; Martinez et al., 2008; Nonose et al., 2008; Martinez, 2009). Todavia, poucas pesquisas realizadas com modelos experimentais de CE mencionam que tal cuidado tenha sido tomado (Pinto Júnior et al., 2007; Nassri et al., 2008; Sousa et al., 2008; Martinez, 2009; Nonose et al., 2009). No presente estudo, assim que a colostomia proximal foi terminada, o segmento distal foi irrigado com soro fisiológico 0,9%, até que o efluente drenado pelo ânus do animal não mais apresentasse saída de material fecal. Com o preparo mecânico intra-operatório asseguramos a inexistência de resíduos fecais no cólon desprovido de trânsito. Cabe destacar que, em todos os animais de ambos os grupos, quando realizamos a limpeza mecânica do cólon distal houve saída de fezes pelo ânus.

A maior parte dos modelos experimentais para o estudo de CE adotados não faz menção à limpeza mecânica do cólon distal antes da confecção da colostomia em alça, fístula mucosa distal ou fechamento do coto retal (Biondo-Simões et al., 2000, Keli et al., 1997, Lopes-Paulo, 2002). É importante ressaltar que a presença de fezes no segmento intestinal excluído altera os resultados encontrados, pois mantém o substrato rico em AGCC que continua servindo de combustível energético para a porção excluída do cólon, minimizando as alterações histológicas. Sendo assim, os estudos que não realizaram a limpeza mecânica prévia no segmento excluído de trânsito, e que não encontraram as alterações histológicas compatíveis com desenvolvimento da CE, provavelmente não levaram em conta essa possibilidade.

5.1.7 – O reparo anatômico para a secção do cólon

Para determinar o ponto de secção cólica para confecção dos estomas, adotamos a placa de Peyer como reparo anatômico. Outros estudos utilizaram a

reflexão peritoneal como reparo anatômico ou confeccionaram a colostomia em local determinado pela introdução de cateter graduado por via anal marcando a distância para confeccionar a colostomia (Biondo-Simões et al., 2000; Lopes-Paulo, 2002; Kissmeyer-Nielsen et al., 1994). A adoção da reflexão peritoneal com reparo anatômico faz com que no momento da remoção do segmento excluído de trânsito a placa de Peyer possa estar incluída no espécime.

A placa de Peyer é estrutura linfóide singular, localizada na transição retossigmoideana no rato. Foi descrita entre nós, pela primeira vez em 1947, como estrutura linfóide na porção terminal do cólon de ratos (Junqueira, 1947). Encontra-se anteriormente ao epidídimo, em machos, ou ao útero, em fêmeas. Pela facilidade de sua localização, já que aparece sempre como área de conformação ovalada, esbranquiçada, ligeiramente espessada, facilmente identificada na parede anterior do cólon, contralateral à linha de inserção do mesentério e mais cranial à reflexão peritoneal, permite que a medida das distâncias intracavitárias seja mais facilmente obtida quando comparada à mesma medida aferida adotando outro reparo anatômico (Nonose et al., 2009; Priolli et al., 2009). Acreditamos que a adoção da placa de Peyer como reparo anatômico, em detrimento à reflexão peritoneal, reduziu a extensão da incisão cirúrgica e o tempo necessário para as medidas intracavitárias. Sua identificação foi feita em todos os animais com facilidade e o auxílio do paquímetro foi útil para uniformizar o ponto exato para secção do cólon esquerdo. .

A introdução de cateter via anal, para determinar o ponto de secção do cólon apresenta como desvantagem o fato de que pode provocar traumatismos à mucosa reto-cólica levando ao aparecimento de soluções de continuidade na mucosa com

conseqüente processo inflamatório mucoso que pode interferir, posteriormente, na interpretação das alterações histológicas.

Entretanto, é importante salientar que a placa de Peyer é estrutura linfóide que substitui parte do epitélio mucoso cólico. Para o estudo dos níveis de estresse oxidativo sempre tivemos o cuidado de coletar os fragmentos fora da região cólica que continha a placa. Com isso acreditamos que os níveis dano oxidativo ao DNA nuclear foram mensurados sempre em células epiteliais obtidas da mucosa cólica, e não sobre uma estrutura linfóide capaz de alterar os resultados encontrados.

5.1.8 – Grupos experimentais

Revisando os poucos estudos experimentais em modelos de CE verificamos variação entre os autores com relação ao tempo ideal para promover a exclusão intestinal (Biondo-Simões et al., 2000; Keli et al., 1997; Lopes-Paulo, 2002; Pinto Júnior et al., 2007, Sousa et al., 2008). Esta falta de uniformidade dificulta a comparação dos resultados histológicos encontrados nos diferentes estudos. Entretanto, estudos experimentais já demonstraram que as alterações histológicas que caracterizam a CE podem ser encontradas após duas semanas da derivação fecal. Optamos por excluir o trânsito fecal por duas e quatro semanas para reduzir o tempo do experimento, evitando dessa forma a realização de procedimento invasivo por longos períodos. Da mesma forma, reduzimos o inconveniente de manter os animais colostomizados por maior tempo. Mesmo assim, com esta padronização encontramos alterações histológicas nos segmentos desprovidos de trânsito compatíveis com a CE em todos os animais, independente do tempo de exclusão.

Optamos por constituir dois grupos experimentais com duas e quatro semanas de exclusão fecal com o objetivo de verificar a eficácia antioxidante das soluções de intervenção utilizadas com o progredir do tempo de exclusão. Estudos anteriores demonstraram que os níveis de dano oxidativo ao DNA de células obtidas da mucosa cólica excluída de trânsito aumentam com o decorrer do tempo de exclusão (Martinez et al., 2008; Martinez, 2009). Optamos por constituir subgrupo experimental irrigado com apenas com solução fisiológica a 0,9%, com o objetivo de estabelecer um parâmetro de comparação com o grupo submetido à intervenção com o ácido 5-ASA. Este cuidado se deve ao fato de que a solução fisiológica, habitualmente, é o veículo onde o princípio ativo é dissolvido nas preparações comerciais. Dessa forma poderíamos avaliar a influência da solução fisiológica a 0,9% nos níveis de dano oxidativo. Não idealizamos um grupo experimental de animais não submetidos à intervenção, por termos verificado no grupo piloto para padronização técnica de nosso estudo, que os níveis de dano oxidativo em ambos os segmentos cólicos eram semelhantes aos dos animais irrigados com solução fisiológica. Além do mais, acreditamos que a cateterização retal diária, sem a infusão de qualquer substância não representa uma situação clínica observada.

A padronização do local de coleta dos espécimes para o estudo histológico e bioquímico é determinante para comparação entre diferentes grupos e animais de experimentação. Quando não se define o local da coleta, retirando-se material de diferentes regiões do cólon pelas variações existentes, não é possível estabelecer comparação adequada. Para minimizar esse viés de coleta, padronizamos não só o local onde o cólon seria seccionado como também de onde seria retirado o fragmento destinado às avaliações histológicas e níveis de dano de DNA. Dessa forma, encaminhamos para as duas avaliações os fragmentos obtidos sempre da mesma

região, independente do animal ou do grupo experimental estudado. Poucos estudos experimentais descrevem tal cuidado (Kissmeyer-Nielsen et al., 1994; Sousa et al., 2008; Martinez, 2009; Nonose et al., 2009).

5.1.9 - Técnicas histológicas

As técnicas histológicas e de coloração utilizadas no presente estudo foram realizadas pelo mesmo técnico e em bateria única. Acreditamos que a realização das colorações por uma mesma pessoa e em uma mesma série permitiu maior uniformidade entre os grupos e evitando interferências relacionadas ao meio ambiente (luz, temperatura, umidade).

Para o diagnóstico histopatológico de CE, todos os espécimes foram corados pela HE. Optamos pela coloração pela HE pelo seu uso rotineiro, uma vez que é a técnica de coloração habitualmente usada para o diagnóstico de colite em modelos experimentais, bem como em seres humanos. A técnica da HE permitiu a confecção de lâminas com boa qualidade de coloração que possibilitou o diagnóstico de CE em todos os segmentos exclusivos de trânsito independente do tempo considerado. Em nenhum momento o patologista que analisou as lâminas foi informado sobre a origem do material, bem como demais aspectos relacionados ao estudo. Assim, acreditamos ter tornado a interpretação mais fidedigna.

As alterações histológicas encontradas (redução da espessura das criptas cólicas, presença de ulcerações epiteliais, infiltrado inflamatório, congestão vascular da camada submucosa e áreas com hiperplasia nodular focal) foram encontradas em todos os segmentos exclusivos de trânsito, permitindo confirmar os resultados de estudos anteriores demonstrando que o modelo experimental adotado foi capaz de

desencadear o aparecimento de colite (Sousa et al., 2008; Martinez, 2009; Nonose et al., 2009). Não nos preocupamos em avaliar a resposta histológica comparando animais irrigados com solução fisiológica ou ácido 5-ASA, pois não era objetivo do presente estudo. Porém, em estudo recentemente concluído utilizando o mesmo grupo de animais, que avaliou a resposta terapêutica utilizando escala histológica de graduação inflamatória, e análise de imagem, assistida por computador, encontramos melhora significativa do grau de inflamação na mucosa dos segmentos desprovidos de trânsito fecal, irrigados com ácido 5-ASA (Máximo et al., 2010).

5.1.10 - Ensaio em cometa

Um dos principais mecanismos de destruição tecidual nas colites é decorrente da excessiva síntese e liberação dos RLO pelos neutrófilos e pelas células da mucosa cólica com alterações metabólicas (McCord, 2000; Liu et al., 2001; Nieto et al., 2002; Damiani et al., 2007; Fillmann, 2007; Fillmann et al., 2007). Embora a formação desses radicais seja essencial para a defesa do hospedeiro no combate a infecção bacteriana, sua contínua superprodução, durante o processo inflamatório, pode causar extensa destruição tecidual pelo estresse oxidativo (Liu et al., 2001; Pravda, 2005; Møller, 2006; Damiani et al., 2007; Roessner et al., 2008; Martinez, 2009).

A mensuração dos níveis de estresse oxidativo até poucos anos envolvia técnicas bioquímicas sofisticadas que necessitavam considerável quantidade de tecido para a sua correta quantificação. Dessa forma, em virtude dos limites relacionados com a obtenção de material suficiente para análise, não era possível aplicar essas técnicas em pequenas quantidades de tecidos, como aqueles obtidos durante procedimentos endoscópicos (Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2008). Por esta razão, poucos estudos

que quantificaram os níveis de dano oxidativo DNA em portadores de colite, comparando os tecidos normais e inflamados (Longatti et al., 2010). O desenvolvimento de uma técnica que possibilitasse a avaliação dos níveis de estresse oxidativo em pequenas quantidades de tecido foi conquistado quando em 1984 demonstrou-se pela primeira vez a possibilidade de se determinar os níveis de dano oxidativo ao DNA de uma única célula por meio da técnica de microeletroforese em gel de célula isolada (Ostling e Johanson, 1984). Com o advento da técnica da microeletroforese em gel de célula única, também conhecida como ensaio em cometa, tornou-se possível quantificar os níveis de danos oxidativos ao DNA em pequenos fragmentos de tecido, possibilitando o estudo comparativo entre células normais, em diversos estágios do processo inflamatório e, até mesmo, no tecido neoplásico (Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2008). A técnica permite a identificação de quebras simples e duplas nas fitas do DNA oxidadas por RLO, e vem sendo utilizada na quantificação dos níveis de estresse oxidativo em diferentes enfermidades (Pool-Zobel, 1994; Ladeira et al., 2005; Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; Martinez, 2009).

O princípio técnico baseia-se na constatação de que os RLO determinam quebras nas fitas do DNA nuclear (Ribeiro et al., 2008). Para a realização do ensaio os fragmentos de tecidos a serem estudados são, inicialmente, submetidos a ação de colagenase específica para tecido cólico que tem a função de isolar as células epiteliais em uma suspensão líquida. A suspensão é então cuidadosamente centrifugada e as células isoladas são submetidas à lise alcalina, que tem como objetivo destruir a membrana citoplasmática, citosol, organelas citoplasmáticas e a primeira camada da carioteca, preservando a segunda camada da carioteca íntegra mantendo, em seu

interior, o DNA nuclear. Estes núcleos, contendo apenas a segunda camada da carioteca e o DNA, são submetidos à eletroforese em gel a -4°C , com o objetivo de inativar as proteínas de reparo existente no interior do núcleo celular impedindo que corrijam as fitas do DNA fragmentadas pelo estresse oxidativo. A seguir os núcleos são neutralizados, corados com corante fluorescente e analisados, individualmente, em microscópio de imunofluorescência. Os fragmentos de DNA oxidados por apresentarem menor peso molecular migram, durante a eletroforese, de modo diferente do restante do DNA íntegro existente no interior da membrana intacta. A migração dos fragmentos de DNA oxidados e corados forma imagens semelhantes à cauda de um cometa, daí o nome da técnica. Quanto maior for a intensidade de estresse oxidativo, maior será a migração de fragmentos do DNA e, conseqüentemente, maior a cauda do cometa.

No presente estudo, para o cálculo dos níveis de estresse oxidativo, utilizamos o programa de análise de imagem Komet 5.0. Mensuramos, em 100 células obtidas da mucosa cólica provida e desprovidas de trânsito fecal, a distância média da migração da cauda do cometa em relação ao seu corpo, o que refletia a extensão das rupturas das hélices de DNA, traduzindo os níveis de dano (estresse oxidativo). O programa estabelece unidades arbitrárias, denominadas de *Tail Moment* (momento de cauda), a essa medida que representa os níveis de dano oxidativo em cada célula. Adotou-se como valor final para cada tecido analisado a média dos valores encontrados na leitura de 100 células.

O ensaio do cometa já havia sido anteriormente utilizado para a quantificação dos níveis de estresse oxidativo em modelos experimentais de colite quimicamente induzida e CE (Abrahamse et al., 1999; Reis et al., 2008; Martinez et al., 2008; Martinez, 2009). A

técnica também vem sendo utilizada para estudar os efeitos genotóxicos dos RLO nos mecanismos envolvidos na carcinogênese colorretal (Rosignoli et al., 2001; Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2008). Contudo, o ensaio cometa só tinha sido empregado duas vezes pelo nosso grupo para quantificar os níveis de estresse oxidativo em modelos experimentais de CE (Martinez, et al., 2008; Martinez, 2009).

Com o objetivo de avaliar os efeitos do ácido 5-ASA na proteção contra o dano oxidativo ao DNA induzido *in vitro* por RLO, realizamos pelo desafio das células com H₂O₂. Esta etapa tinha como objetivo verificar se o ácido 5-ASA apresenta efeitos residuais preventivos contra o dano provocado pela maior exposição aos RLO. Outros estudos também avaliaram os efeitos protetores *ex vivo* contra o estresse oxidativo utilizando a mesma metodologia descrita (Miranda et al., 2008).

Os resultados encontrados mostraram que o ensaio do cometa revelou-se metodologia útil, fidedigna, e de baixo custo para avaliação dos níveis de dano ao DNA de células isoladas da mucosa cólica. Atualmente estamos utilizando o ensaio do cometa para avaliação comparativa dos efeitos de diferentes agentes antioxidantes nos modelos experimentais de CE proposto no presente estudo.

5.2 - Quanto aos resultados

Já se encontra bem determinado que os RLO O₂^{-•}, OH⁻, H₂O₂ e o ácido hipocloroso são produzidos em excesso pela mucosa cólica inflamada em enfermos com DII (Ferreira e Matsubara, 1997). A produção exagerada de RLO, associada à menor capacidade antioxidante das células epiteliais, torna a mucosa cólica, particularmente, vulnerável ao estresse oxidativo (Babbs, 1992; Simmonds et al., 1993; Sedghi et al., 1993; Grisham, 1994; Fillmann, 2007). As principais fontes produtoras de

RLO na mucosa cólica cronicamente inflamada são: os neutrófilos e macrófagos ativados, os episódios de isquemia de reperfusão que acompanham as crises de exacerbação da doença e as modificações no metabolismo energético das células epiteliais. (Repine et al., 1979, Pravda, 2005).

A teoria de indução da RCUI por RLO já aventava a possibilidade de que deficiências no fornecimento de AGCC à mucosa cólica poderiam aumentar a produção de RLO pelas próprias células epiteliais desprovidas do seu substrato energético (Pravda, 2005). Essa possibilidade ficou ainda mais evidente quando estudos demonstraram que o emprego de substâncias que inibiam a β -oxidação dos AGCC era capaz de provocar inflamação na mucosa cólica (Agarwal e Schimmel, 1989; Roediger, 1990). Contudo, a maioria dos modelos experimentais de colite não permitia verificar se modificações do metabolismo energético das células epiteliais da mucosa cólica eram capazes, isoladamente, de aumentar a produção de RLO desencadeando o surgimento da colite (Sousa et al., 2008; Nonose et al., 2009). Nos modelos de colite utilizados a quebra da barreira epitelial da mucosa cólica, que possibilita a infiltração neutrofílica, é provocada pela instilação de substâncias químicas tóxicas na luz do cólon ou administradas por via oral. Assim sendo, não permitiam confirmar se a deficiência isolada do suprimento de AGCC poderia aumentar a produção de RLO pela mucosa cólica desprovida de trânsito fecal (Sheehan e Brynjolfsson, 1960; Pravda, 2005).

Com o objetivo de verificar se as células epiteliais do cólon, submetidas à privação do fornecimento regular de AGCC, eram capazes de aumentar a produção de RLO, recente estudo avaliou a importância do estresse oxidativo na etiopatogênia da CE (Martinez, 2009). Os resultados encontrados mostraram que células da mucosa cólica, desprovidas do suprimento normal de AGCC, sofrem modificações no seu

metabolismo energético aumentando, significativamente, a produção de RLO e que o dano oxidativo tecidual resultante encontrava-se relacionado às alterações histológicas e bioquímicas encontradas na CE (Martinez, 2009). O estudo mostrou ainda, que a maior capacidade de produção de RLO pelas células da mucosa desprovida de AGCC aumentava com o decorrer do tempo de exclusão fecal. Dessa forma, pela primeira vez, confirmou-se experimentalmente, que o estresse oxidativo tecidual, ocasionado pela maior produção de RLO, pode ser um dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento da CE (Martinez, 2009).

Essa possibilidade já havia sido anteriormente suspeitada, quando resultados de ensaios clínicos demonstraram que substâncias com atividade antioxidante, tais como a sulfassalazina e o ácido 5-ASA eram capazes de reduzir a produção dos RLO O_2^{\bullet} e OH^- pelos neutrófilos ativados (Hiller e Wilson, 1983; Myiachi et al., 1987; Naito et al., 2007). Era de se esperar então que as substâncias apresentassem efeito terapêutico na CE devolvendo o equilíbrio a mucosa cólica alterada no seu metabolismo oxidativo. Estudos experimentais também demonstraram que a associação do ácido 5-ASA a outras substâncias com atividade antioxidante apresentava melhores respostas clínicas e histológicas quando comparada a seu uso isolado, sugerindo que a redução dos níveis de RLO é proporcional à intensidade do efeito antioxidante oferecido (Simmonds et al., 1992; Millar et al., 1996; Simmonds et al., 1999; Ancha et al., 2008; Guijarro et al., 2008; Ancha et al., 2009).

Há várias décadas os derivados aminosalicilatos são os fármacos mais utilizados para o tratamento da colite ulcerativa leve e moderada, em especial a sulfassalazina. Inicialmente acreditava-se que a melhora do quadro era devido ao

efeito antimicrobiano da mesma, mas hoje se sabe que existe uma atividade farmacológica múltipla (inibição da síntese de prostaglandinas, inibição de enzimas proteolíticas e imunossupressão); é utilizada na dose de 2 a 4 g por dia. Possui como efeitos colaterais: “rash” cutâneo, depressão da medula óssea, náuseas, cefaléia, hemólise em pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, anorexia, deficiência de ácido fólico, hepatite, pancreatite, pneumonite, eosinofilia, alveolite fibrosante, colite e anormalidades nos espermatozóides, podendo levar à infertilidade masculina. Esses efeitos podem ser dose-dependentes ou devido à reação idiossincrásica. A clivagem da sulfassalazina por ação das bactérias da flora intestinal forma os radicais sulfapiridina e mesalazina. A fração ativa mais importante da sulfassalazina é o ácido 5-aminosalicílico (5-ASA).

Dos derivados aminosalicílicos, a princípio, a sulfassalazina foi a droga mais empregada para o tratamento das diferentes formas de colite sendo utilizada na RCUI, colite de crohn, colite actínica, colite bacteriana e CE. Todavia, devido as inúmeras reações adversas causadas, sobretudo, pelo radical sulfapiridímico, a droga foi progressivamente substituída pelo ácido 5-ASA, também conhecido como mesalazina ou mesalamina, a fração da molécula com atividade antioxidante (Miyashi et al., 1987; Rilley et al., 1988; Riley, 1998). Os menores efeitos adversos e a maior eficácia terapêutica fizeram com que o ácido 5-ASA rapidamente substituísse a sulfassalazina no tratamento dos portadores de RCUI e outras enfermidades. Assim sendo, a administração oral do ácido 5-ASA tornou-se a opção medicamentosa mais utilizada nos doentes que apresentavam formas leves ou moderada da doença, principalmente localizadas nas porções proximais do cólon (Bresci et al., 2007). Desde sua introdução

na prática clínica o ácido 5-ASA tem-se mostrado efetivo no tratamento das crises de agudização e na manutenção da remissão da doença, prevenindo recaídas e mostrando boa tolerância quando administrado por longos períodos (Bresci et al., 2007).

O mecanismo de ação do ácido 5-ASA ainda não está totalmente esclarecido. A droga inibe a migração de leucócitos polimorfonucleares e a lipoxigenase das células com as concentrações alcançadas no intestino grosso durante o tratamento. A produção dos leucotrienos pró-inflamatórios pelos macrófagos da parede intestinal é também inibida. Além disso, o ácido 5-ASA inibe, em condições experimentais, a cicloxigenase, e desta forma a liberação da tromboxano B2 e da prostaglandina E2, mas o significado clínico deste efeito não é claro. A droga inibe a formação do fator de agregação plaquetário (PAF), tendo ainda atividade antioxidante, o que diminui a formação de produtos contendo oxigênio reativo, favorecendo a captação de radicais livres. O ácido 5-ASA reduz a produção de citocinas, diminui a atividade da forma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS) e a via de ativação do NFκβ que são importantes mecanismos responsáveis pela iniciação e progressão do processo inflamatório e capazes de aumentar a produção de RLO (Bantel et al., 2000; Hollenbach et al., 2005). Já se demonstrou que o ácido 5-ASA inibe a formação de RLO pelos polimorfonucleares, reduz a formação do peróxido nitrito, importante radical livre de nitrogênio, determinando decréscimo ou completa inibição do dano oxidativo ao DNA, fenômeno envolvido na etiopatogenia da RCU, CE e até do câncer colorretal (McKenzie et al., 1999; Miyashi et al., 1997; Pravda, 2005; Ikeda et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; Ancha et al., 2009; Martinez, 2009).

Estudos avaliando os benefícios terapêuticos do ácido 5-ASA, em modelos experimentais de colite quimicamente induzida, demonstraram que a substância, assim como no homem, apresentava bons resultados terapêuticos. (Pearson et al., 1996; Siddiqui et al., 2006; Aslan et al., 2007; Ancha et al., 2008; Guijarro et al., 2008). Todavia, por ser um radical instável e rapidamente absorvido nas porções iniciais do intestino delgado, apenas uma pequena quantidade do ácido 5-ASA atinge as concentrações ideais nas porções terminais do íleo e, principalmente, no cólon. Esta menor biodisponibilidade reduz sua eficácia terapêutica, principalmente nos doentes com retite ou colite distal (Naganuma et al., 2001). Estudo comparando a concentração tecidual do 5-ASA, o princípio ativo da molécula da sulfassalazina, mostrou que a administração retal de sulfassalazina era associada à maior concentração tecidual do princípio ativo na mucosa cólica quando comparada à administração oral do próprio ácido 5-ASA (Naganuma et al., 2001). Esses achados sugerem que a molécula da sulfassalazina, por sofrer degradação nas porções mais caudais do intestino delgado faz com que o ácido 5-ASA seja liberado próximo ao íleo terminal. Essas suspeitas foram confirmadas quando estudos de metanálise demonstraram maior eficácia terapêutica do ácido 5-ASA quando utilizado por enemas quando comparado à administração oral (Lakatos e Lakatos, 2008). Este aspecto torna-se particularmente relevante ao considerarmos que a maioria dos enfermos com RCUI e CE apresenta maior comprometimento das porções finais do intestino grosso (Lakatos e Lakatos, 2008). Cabe lembrar ainda que, embora 30% do ácido 5-ASA possam ser absorvidos pela mucosa intestinal, a administração da substância por via retal, quando comparada à administração oral, resultou em menor exposição sistêmica com redução da sua toxicidade.

Nos doentes submetidos à exclusão do trânsito fecal, como acontece nas operações de derivação intestinal, é provável que a biodisponibilidade da droga, quando administrada por via oral seja ainda menor. Este fato torna-se mais relevante ao considerar-se que o reto é o segmento intestinal mais freqüentemente excluído de trânsito, em virtude da maior prevalência de estomas confeccionados por doenças localizadas no cólon distal e reto. Acrescente-se ainda que a cirurgia de Hartmann para o tratamento em caráter de urgência, da diverticulite, do câncer obstrutivo do cólon sigmóide e dos traumatismos anorretocólicos e perineais é o procedimento mais utilizado nessas enfermidades. (Habr-Gama et al., 1997).

Não obstante os crescentes esforços para se encontrar mecanismos capazes de fazer como que a liberação do ácido 5-ASA, administrado por via oral ocorra nas porções terminais do cólon, estudos sugerem que nas colites com grande comprometimento distal a substância apresenta melhor eficácia terapêutica quando administrada por via retal (Naganuma et al., 2001). Estudos comparando a aplicação diária intrarretal do ácido 5-ASA sob a forma de espuma ou enemas mostraram que as remissões clínicas e histológicas foram mais evidentes quando o ácido 5-ASA era administrado diluído em veículo aquoso, sob a forma de enemas (Cortot et al., 2008). Essa foi a principal razão para termos escolhido a realização da intervenção através de enemas contendo o ácido 5-ASA dissolvido em veículo aquoso ou solução fisiológica. Acreditamos que com a administração por enemas estaríamos infundindo o principio ativo diretamente sobre o colo excluso, permitindo avaliar melhor seu efeito antioxidante na forma ideal de administração. Aplicamos os enemas com o ácido 5-ASA a partir do dia seguinte à derivação intestinal, com o objetivo de avaliar sua eficácia não só na redução, mas na prevenção dos danos oxidativos ao DNA tecidual.

Apesar do ácido 5-ASA vir sendo utilizado de forma empírica, poucos estudos clínicos avaliaram os efeitos terapêuticos da substância em doentes com CE (Lai et al., 1997; Triantafillidis et al., 1991). Da mesma forma, até a presente data nenhum estudo, do melhor do nosso conhecimento, avaliou os efeitos antioxidantes do ácido 5-ASA em modelos experimentais de CE. Quando se considera que o estresse oxidativo encontra-se relacionado aos mecanismos moleculares que levam ao aparecimento da CE, e que o ácido 5-ASA apresenta atividade antioxidante, torna-se relevante a avaliação da eficácia da substância no tratamento da doença.

Os resultados encontrados no presente estudo parecem confirmar a importância do regular fornecimento de AGCC para a manutenção da homeostase do metabolismo oxidativo das células do epitélio cólico. Verificamos que apesar dos níveis de dano ao DNA reduzirem nos animais submetidos à intervenção com ácido 5-ASA, sempre foram mais elevados nos segmentos excluídos, demonstrando a importância da deficiência do suprimento de AGCC no desenvolvimento da CE. Encontramos redução significativa dos níveis de dano ao DNA nos segmentos providos de trânsito fecal após duas semanas de irrigação com o ácido 5-ASA em relação aos animais irrigados com solução fisiológica. Estes resultados confirmam que a aplicação de enemas com ácido 5-ASA no segmento excluído de trânsito apresenta efeitos sistêmicos, provavelmente pela absorção da droga pela mucosa colorretal.

Constatamos que após duas semanas de aplicação diária de enemas com ácido 5-ASA no cólon excluído de trânsito, os níveis de dano ao DNA tanto nos segmentos providos quanto nos desprovidos de trânsito foram menores quando comparados aos irrigados com solução fisiológica (Figura15). Verificamos que o cólon sem trânsito não obstante apresentar maior nível de dano ao DNA quando comparado ao cólon com

trânsito, os níveis reduzem nos animais irrigados com o ácido 5-ASA. Estes resultados confirmam os efeitos antioxidantes tópicos do ácido 5-ASA.

Nos animais irrigados por quatro semanas com solução fisiológica verificamos que os níveis de dano oxidativo ao DNA nos segmentos com trânsito foram semelhantes aos dos segmentos sem trânsito, mostrando que a irrigação com solução fisiológica não reduz os níveis de dano quer por efeito local quer por efeito sistêmico (Figura 16). De modo diferente, nos animais irrigados com ácido 5-ASA, apesar dos níveis de dano oxidativo ao DNA no cólon excuso serem maiores aos do cólon com trânsito preservado, em ambos os segmentos foram menores quando comparados aos irrigados com solução fisiológica. Esses resultados confirmam que o ácido 5-ASA mantém efeito antioxidante local e sistêmico após a aplicação por quatro semanas nos ratos, o que no homem, corresponderia a, aproximadamente, 28 anos. Entretanto, os efeitos sistêmicos parecem não serem tão evidentes quando comparados aos animais irrigados por duas semanas. É possível que esses resultados estejam relacionados à redução na capacidade de absorção da droga pela mucosa cólica excusa em virtude da redução na superfície de absorção ocasionada pela atrofia das criptas intestinais (Keli et al., 1997; Pinto Jr et al., 1999; Biondo-Simões et al., 2000; Lopes Paulo, 2002; Sousa et al., 2008).

Quando analisamos a variação dos níveis de dano ao DNA nos cólons com e sem trânsito fecal nos animais irrigados por duas ou quatro semanas, comparando as duas soluções de intervenção, verificamos que, a intervenção com ácido 5-ASA reduz, significativamente, a variação dos níveis de dano ao DNA, independente do tempo de irrigação (Figura 17). Encontramos redução nos cólons com e sem trânsito mostrando que o ácido 5-ASA apresenta atividade antioxidante tanto local quanto sistêmica.

Quando avaliamos os níveis de dano nos segmentos cólicos com e sem trânsito, irrigados com solução fisiológica ou ácido 5-ASA, comparando os dois períodos de irrigação, verificamos que os níveis de dano, apesar de aumentarem com progredir do tempo, sempre foram menores após quatro semanas nos animais irrigados com ácido 5-ASA (Figura 18). Estes resultados mostram que os efeitos antioxidantes do ácido 5-ASA são capazes de manter os níveis de dano ao DNA em níveis significativamente menores quando comparados à solução fisiológica com o decorrer do tempo.

Com o objetivo de avaliarmos os efeitos protetores do ácido 5-ASA contra o dano oxidativo DNA induzido pela superexposição a RLO, realizamos o desafio das células da mucosa cólica com o H_2O_2 nos animais derivados por duas e quatro semanas (Figura 19 e Figura 20). Verificamos que nos segmentos cólicos com e sem trânsito, a intervenção com o ácido 5-ASA diminuía os níveis de dano mesmo após o desafio, demonstrando que os efeitos protetores residuais contra o dano do DNA, apesar de serem mais evidentes no local da aplicação, também ocorrem de modo sistêmico (Figura 19). Quando realizamos o desafio das células isoladas da mucosa cólica com o H_2O_2 nos animais derivados por quatro semanas, com o objetivo de avaliarmos os efeitos do ácido 5-ASA contra o dano induzido, encontramos resultados semelhantes, confirmando os efeitos protetores, mesmo com o desafio, após longos períodos de aplicação (Figura 20).

Ao analisarmos a variação dos níveis de dano ao DNA nos segmentos com e sem trânsito fecal, após desafio com H_2O_2 , verificamos que nos animais irrigados com ácido 5-ASA os níveis de dano variavam menos, em ambos os segmentos cólicos, quando comparados aos irrigados com solução fisiológica, independente do tempo de irrigação (Figura 21).

Quando avaliamos os níveis de dano nos segmentos cólicos com e sem trânsito, irrigados com solução fisiológica ou ácido 5-ASA, comparando os dois períodos de irrigação após desafio com H₂O₂, encontramos aumento nos níveis de dano ao DNA após intervenção com solução fisiológica ou ácido 5-ASA, independente do período de irrigação considerado (Figura 22). Todavia, os níveis de dano ao DNA em ambos os segmentos irrigados com ácido 5-ASA aumentavam menos quando comparados aos irrigados com solução fisiológica. Estes resultados sugerem que o ácido 5-ASA apresente efeito antioxidante residual mantendo proteção às células epiteliais da mucosa cólica por quatro semanas, mesmo após desafio com H₂O₂.

Os resultados encontrados no presente estudo confirmam achados anteriores demonstrando que o estresse oxidativo provocado por RLO, formados pelas células deficientes no suprimento de AGCC, encontram-se relacionados a etiopatogenia da CE (Martinez, 2009). Reforçam as propriedades antioxidantes e os benefícios tanto tópicos quanto sistêmicos da aplicação intrarretal de enemas com ácido 5-ASA no tratamento da CE. Finalmente, demonstram que o uso do ácido 5-ASA através de enemas é uma alternativa válida para o tratamento e prevenção da CE. Estudos em seres humanos e com maior número de doentes, ainda devem ser realizados como objetivo de verificar se os resultados encontrados no modelo experimental proposto podem ser extrapolados para o homem.

6. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados, nas condições experimentais do modelo de colite de exclusão adotado no presente estudo, permitem concluir que:

1. As células epiteliais da mucosa cólica desprovida de trânsito fecal mantêm maiores níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear, quando comparadas às obtidas da mucosa cólica com trânsito preservado, independente do uso de enemas com 5-ASA;
2. A irrigação do cólon excluído de trânsito fecal com ácido 5-ASA por duas semanas reduz, significativamente, os níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear de células epiteliais isoladas da mucosa cólica provida e desprovida de trânsito fecal;
3. A irrigação do cólon excluído de trânsito fecal com ácido 5-ASA por quatro semanas reduz, significativamente, os níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear de células epiteliais isoladas da mucosa cólica desprovida de trânsito fecal;
4. Após a exposição ao H_2O_2 células obtidas de animais submetidos à irrigação diária com ácido 5-ASA apresentam menores níveis de dano oxidativo ao DNA independente de serem provenientes de segmentos com ou sem trânsito fecal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasakoor F, Mahon C, Boulos PB. Diversion colitis in sigmoid neovagina. *Colorectal Dis.* 2004;6(4):290-1.
- Abrahamse SL, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis.* 1999;20(4):629-34.
- Agarwal VP, Schimmel EM. Diversion colitis: a nutritional deficiency syndrome? *Nutr Rev.* 1989;47(9):257-61.
- Almalouf P, Shehab TM, Daniel AM, Robinson EA, Barnett JL. Therapeutic hydrogen peroxide enema causing severe acute colitis. *Int J Colorectal Dis.* 2008;23(11):1139-40.
- Ancha HR, Kurella RR, McKimmey CC, Lightfoot S, Harty RF. Luminal antioxidants enhance the effects of mesalamine in the treatment of chemically induced colitis in rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008;233(10):1301-8.
- Ancha HR, Kurella RR, McKimmey CC, Lightfoot S, Harty RF. Effects of N-acetylcysteine plus mesalamine on prostaglandin synthesis and nitric oxide generation in TNBS-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci.* 2009;54(4):758-66.
- Aoi Y, Terashima S, Ogura M, Nishio H, Kato S, Takeuchi K. Roles of nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of dextran sulfate sodium-induced rat colitis. *Physiol Pharmacol.* 2008;59(2):315-36.
- Arafa HM, Hemeida RA, El-Bahrawy AI, Hamada FM. Prophylactic role of curcumin in dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis murine model. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(6):1311-7.
- Aslan A, Temiz M, Atik E, Polat G, Sahinler N, Besirov E, Aban N, Parsak CK. Effectiveness of mesalamine and propolis in experimental colitis. *Adv Ther.* 2007;24(5):1085-97.
- Azad Khan AK, Piris J, Truelove SC. An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. *Lancet.* 1977;2(8044):892-5.
- Babbs CF. Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free Rad Biol Med* 1992;13:169-82.
- Bajka BH, Clarke JM, Cobiac L, Topping DL. Butyrylated starch protects colonocyte DNA against dietary protein-induced damage in rats. *Carcinogenesis.* 2008;29(11): 2169-74.
- Bantel H, Berg C, Vieth M, Stolte M, Kruis W, Schulze-Osthoff K. Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF-kappaB in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2000;95: 3452-7
- Batta AK, Tint GS, Xu G, Shefer S, Salen G. Synthesis and intestinal metabolism of ursodeoxycholic acid conjugate with an antiinflammatory agent, 5-aminosalicylic acid. *J Lipid Res.* 1998;39(8):1641-6.

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

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

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

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

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

Bresci G, Parisi G, Gambardella L, Banti S, Bertoni M, Rindi G, Capria A. Evaluation of clinical patterns in ulcerative colitis: a long-term follow-up. *Int J Clin Pharmacol Res.* 1997;17(1):17-22.

Butzner JD, Parmar R, Bell CJ, Dalal V. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. *Gut.* 1996;38(4):568-73.

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

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

Campieri M, Gionchetti P, Belluzzi A, Brignola C, Tampieri M, Iannone P, Miglioli M, Barbara L. Optimum dosage of 5-aminosalicylic acid as rectal enemas in patients with active ulcerative colitis. *Gut.* 1991;32:929-81.

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

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

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979;59(3):527-605.

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

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

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

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

Cortot A, Maetz D, Degoutte E, Delette O, Meunier P, Tan G, Cazals JB, Dewit O, Hebuterne X, Beorchia S, Grunberg B, Leprince E, D'Haens G, Forestier S, Idier I, Lémann M. Mesalamine foam enema versus mesalamine liquid enema in active left-sided ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2008;103(12):3106-14.

Curi A, Mascarenhas JCS, Moreira Junior H, Almeida AC, Moreira JPT, Azevedo IF, Louza LR, Moreira H. Morbimortalidade associada à reconstrução do trânsito intestinal - Análise de 67 casos. *Rev bras Coloproct.* 2002;22(2):88-97.

Dallegri F, Ottonello I, Ballestrero A, Bogliolo F, Ferrando F, Patrone F. Cytoprotection against neutrophil derived hypochlorous acid: a potential mechanism for the therapeutic action of 5-aminosalicylic acid in ulcerative colitis. *Gut.* 1990;31:184-6.

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

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

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

Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am L Physiol.* 1989; 257(4 Pt 1): L163-73.

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

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

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

Eaton JW, Qian M. Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(9):833-40.

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

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

- Farrell RF, Peppercorn MA. Ulcerative colitis. *Lancet*. 2002; 359(9303):331-40.
- Ferguson CM, Siegel RJ. A prospective evaluation of diversion colitis. *Am Surg*. 1991;57(1):46-9.
- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras*. 1992; 43(1):61-8.
- Filipe MI. Value of histochemical reactions for mucosubstances in the diagnosis of certain pathological conditions of the colon and rectum. *Gut*. 1969;10(7):577-86
- Fillmann HS. O efeito protetor da glutamina na colite experimental induzida por ácido acético. Tese (Doutorado). Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.
- Fillmann H, Kretzmann NA, San-Miguel B, Llesuy S, Marroni N, González-Gallego J, Tuñón MJ. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicology*. 2007;236(3):217-26.
- Finnie IA, Dwarakanath AD, Taylor BA, Rhodes JM. Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut*. 1995;36(1):93-9.
- Fridovich I. Superoxide dismutase. *Annu Rev Biochem*. 1975;44:147-59
- Frisbie JH, Ahmed N, Hirano I, Klein MA, Soybel DI. Diversion colitis in patients with myelopathy: clinical, endoscopic, and histopathological findings. *J Spinal Cord Med*. 2000;23(2):142-9.
- Gan SI, Price LM. Waiting-list induced proctitis: the hydrogen peroxide enema. *Can J Gastroenterol*. 2003;17(12):727-9.
- Gaudier E, Rival M, Buisine MP, Robineau I, Hoebler C. Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. *Physiol Res*. 2009;58(1):111-9.
- Geraghty JM, Charles AK. Aphthoid ulceration in diversion colitis. *Histopathology*. 1994;24(4):395-7.
- Geraghty JM, Talbot IC. Diversion colitis: histological features in the colon and rectum after defunctioning colostomy. *Gut*. 1991;32(9):1020-3.
- Glei M, Hovhannisyann G, Pool-Zobel BL. Use of comet-fish in the study of DNA damage and repair: review. *Mutat Res*. 2009;681(1):33-43.
- Glutzer DJ, Glick ME, Goldman H. Proctitis and colitis following diversion of fecal stream. *Gastroenterology*. 1981;80(3):438-41.
- Grant NJ, Van Kruiningen HJ, Haque S, West AB. Mucosal inflammation in pediatric diversion colitis: a quantitative analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1997;25(3):273-80.
- Griffiths AP, Dixon MF. Microcarcinoids and diversion colitis in a colon defunctioned for 18 years. Report of a case. *Dis Colon Rectum*. 1992;35(7):685-8.

- Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet*. 1994;344: 859-61.
- Grisham MB, MacDermott RP, Deitch EA. Oxidant defense mechanisms in the human colon. *Inflammation*. 1990;14:669-80.
- Grisham MB, Volkmer C, Tso P, Yamada T. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. *Gastroenterology*. 1991;101(2):540-7.
- Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, Hossain S, Matula S, Kornbluth A, Bodian C, Ullman T. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology*. 2007;133(4):1099-105.
- Guijarro LG, Mate J, Gisbert JP, Perez-Calle JL, Marin-Jimenez I, Arriaza E, Olleros T, Delgado M, Castillejo MS, Prieto-Merino D, Gonzalez Lara, V, Pena AS. N-acetyl-L-cysteine combined with mesalamine in the treatment of ulcerative colitis: randomized, placebo-controlled pilot study. *World J Gastroenterol*. 2008;14(18):2851-7.
- Guillemot F, Colombel JF, Neut C, Verplanck N, Lecomte M, Romond C, Paris JC, Cortot A. Treatment of diversion colitis by short-chain fatty acids. Prospective and double-blind study. *Dis Colon Rectum*. 1991;34(10):861-4.
- Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;899:136-47.
- Haagen Nielsen O, Bondesen S. Kinetics of 5-aminosalicylic acid after jejunal instillation in man. *Br J Clin Pharmacol*. 1983;16(6):738-40.
- Haas PA, Fox TA Jr, Szilagy EJ. Endoscopic examination of the colon and rectum distal to a colostomy. *Am J Gastroenterol*. 1990;85(7):850-4.
- Haas PA, Haas GP. A critical evaluation of the Hartmann's procedure. *Am Sur*. 1988;54(6):380-5.
- Habr-Gama A, Teixeira MG, Vieira MJF, Miléu LF, Laurino Neto R, Pinotti HW. Operação de Hartmann e suas conseqüências. *Rev bras Coloproctol*. 1997;17(1):5-10.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*. 1986;246(2):501-14.
- Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 1990;280(1):1-8.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem*. 1997;69(3):1330-1.
- Hanai H, Sugimoto K. Curcumin has bright prospects for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des*. 2009;15(18):2087-94.
- Haque S, Eisen RN, West AB. The morphologic features of diversion colitis: studies of a pediatric population with no other disease of the intestinal mucosa. *Hum Pathol*. 1993;24(2):211-9.

- Harig JM, Soergel KH, Komorowski RA, Wood CM. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. *N Engl J Med.* 1989;320(1):23-8.
- Hayashi Y, Aoyagi K, Morita I, Yamamoto C, Sakisaka S. Oral administration of mesalazine protect against mucosa injury and permeation in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(11):1323-31.
- Hayman EG, Oldberg A, Martin GR, Ruoslahti E. Codistribution of heparan sulfate proteoglycan, laminin, and fibronectin in the extracellular matrix of normal rat kidney cells and their coordinate absence in transformed cells. *J Cell Biol.* 1982;94(1):28-35.
- Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(1):79-94.
- Hiller KO, Wilson RL. Hydroxyl-free radicals and antiinflammatory drugs : biological inactivation studies and reaction rates constants. *Biochem Pharmacol.* 1983;32:2109-11.
- Hollenbach E, Vieth M, Roessner A, Neumann M, Malfertheiner P, Naumann M. Inhibition of RICK/nuclear factor-kappaB and p38 signaling attenuates the inflammatory response in a murine model of Crohn disease. *J Biol Chem.* 2005;280(15):14981-8.
- Hoffmann JC, Pawlowski NN, Kühl AA, Höhne W, Zeitz M. Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. *Pathobiology.* 2002-2003;70(3):121-30.
- Ikeda I, Ominoto A, Wada K, Ujisawa , Ujita K, Yonemitsu, Nozaki Y, Endo H, Takahashi H, Yoneda M, Inamori M, Kubota K, Saito S, Nagashima Y, Nakagama H, Nakajima A. 5-aminosalicylic acid given in the remission stage of colitis suppresses colitis-associated cancer in a mouse colitis model. *Clin Cancer Res.* 2007;13(21):6527-31.
- Jiang H, Deng CS, Zhang M, Xia J. Curcumin-attenuated trinitrobenzene sulphonic acid induces chronic colitis by inhibiting expression of cyclooxygenase-2. *World J Gastroenterol.* 2006;12(24):3848-53.
- Jørgensen JR, Clausen MR, Mortensen PB. Oxidation of short and medium chain C2-C8 fatty acids in Sprague-Dawley rat colonocytes. *Gut.* 1997;40(3):400-5.
- Junqueira LCU, Martins EO. Aparelho Digestivo. In: Junqueira LCU, Martins EO. Atlas de anatomia microscópica do rato. 1ed. São Paulo: Tipografia Rossolillo; Publicação da Universidade de São Paulo. p 40-56, 1947.
- Kaya E, Gür ES, Ozqüç H, Bayer A, Tokyay R. L-glutamine enemas attenuate mucosal injury in experimental colitis. *Dis Colon Rectum.* 1999;42(9):1209-15.
- Keli E, Bouchoucha M, Devroede G, Carnot F, Ohrant T, Cugnenc PH. Diversion-related experimental colitis in rats. *Dis Colon Rectum.* 1997;40(2):222-8.
- Kenji T, Yoshitaka A, Toshiharu A, Takatoshi M, Toshitaka N. Comparative Absorption of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) after administration of a 5-ASA enema and salazosulfapyridine (SASP) after an SASP suppository in Japanese volunteers. *Biol Pharm Bull.* 2002;25:264-7.

- Kiely EM, Ajayi NA, Wheeler RA, Malone M. Diversion procto-colitis: response to treatment with short-chain fatty acids. *J Pediatr Surg.* 2001;36(10):1514-7.
- Kissmeyer-Nielsen P, Christensen H, Laurberg S. Diverting colostomy induces mucosal and muscular atrophy in rat distal colon. *Gut.* 1994;35(9):1275-82.
- Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim.* 1999;48(3):137-43.
- Komorowski RA. Histologic spectrum of diversion colitis. *Am J Sur Pathol.* 1990;14(6):548-54.
- Korelitz BI, Cheskin LJ, Sohn N, Sommers SC. The fate of the rectal segment after diversion of the fecal stream in Crohn's disease: its implications for surgical management. *J Clin Gastroenterol.* 1985;7(1):37-43.
- Koutroubakis IE. Spectrum of non-inflammatory bowel disease and non-infectious colitis. *World J Gastroenterol.* 2008;14(48):7277-9.
- Kretzmann NA, Fillmann H, Mauriz JL, Marroni CA, Marroni N, González-Gallego J, Tuñón MJ. Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14(11):1504-13
- Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease: radicals or ridiculous. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16(12):1997-2015.
- Lakatos PL, Lakatos L. Ulcerative proctitis: a review of pharmacotherapy and management. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9(5):741-9.
- Lapeyre B. The "frost sign" and the "snow white sign": intramucosal air injection or peroxide colitis? *Endoscopy.* 2005;37(7):679.
- Lavoine E, Vissuzaine C, Cadiot G, Sobhani I, Benhamou G, Mignon M, Potet F. Proctitis of diversion on an excluded rectum in patients with hemorrhagic rectocolitis. *Gastroenterol Clin Biol.* 1996;20(3):243-7.
- Lai JM, Chuang TY, Francisco GE, Strayer JR. Diversion colitis: a cause of abdominal discomfort in spinal cord injury patients with colostomy. *Arch Phys Med Rehabil.* 1997;78(6):670-1.
- Lechner GL, Frank W, Jantsch H, Pichler W, Hall DA, Waneck R, Wunderlich M. Lymphoid follicular hyperplasia in excluded colonic segments: a radiologic sign of diversion colitis. *Radiology.* 1990;176(1):135-6.
- Liu Q, Shimoyama T, Suzuki K, Umeda T, Nakaji S, Sugawara K. Effect of sodium butyrate on reactive oxygen species generation by human neutrophils. *Scand J Gastroenterol.* 2001;36(7):744-50.
- Longatti TS, Acedo SC, de Oliveira CC, Miranda DDC, Priolli DG, Ribeiro, ML, Gambero A, Martinez CAR. Inflammatory alterations in excluded colon in rats – a comparison with chemically-induced colitis. *Scand J Gastroenterol.* 2010. No prelo.

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

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

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

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

McKenzie SM, Doe WF, Buffinton GD. 5-aminosalicylic acid prevents oxidant mediated damage of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in colon epithelial cells. *Gut.* 1999;44(2):180-5.

Margarido NF, Nassri CGG, Nassri AB, Rotta CM, Soares LA. Método de limpeza mecânica anterógrada intra-operatória de colo excluído. Estudo experimental em ratos. *Rev Col Bras Cir.* 2003;30(Pt 2):42.

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

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

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

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

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

Máximo FR, Spadari APP, Nonose R, Pereira JA, Sousa MV, Martinez CAR. Avaliação dos efeitos antioxidantes da mesalazina na colite de exclusão. Estudo experimental em ratos. *Rev Bras Coloproct.* 2010. Submetido

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

Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983;52: 711-60.

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

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

Miranda DD, Arçari DP, Pedrazzoli J Jr, Carvalho Pde O, Cerutti SM, Bastos DH, Ribeiro ML. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis*. 2008;23(4):261-5.

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

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

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

Moshkovska T, Mayberry JF. Duration of treatment with 5-aminosalicylic acid compounds. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(32):4310-5

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

Miyashi Y, Yoshioka A, Iamamura S, Niwa I. Effect of sulphasalazine and its metabolites on the generation of reactive oxygen species. *Gut*. 1987;28:190-5.

Naganuma M, Iwao Y, Ogata H, Inoue N, Funakoshi S, Yamamoto S, Nakamura Y, Yshi H, Hibi T. Measurement of colonic mucosal concentrations of 5-aminosalicylic acid is useful for estimating its therapeutic efficacy in distal ulcerative colitis: comparison of orally administered mesalamine and sulfasalazine. *Inflamm Bowel Dis*. 2001;7(3):221-5.

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

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

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

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

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

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

Nonose R, Spadari APP, Priolli DG, Máximo FR, Pereira JA, Martinez CAR. Tissue quantification of neutral and acid mucins in the mucosa of the colon with and without fecal stream: Experimental study in rats. *Acta Cir Bras*. 2009; 24(4): 267-75.

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

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

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

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

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

Ostiling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;30;123(1):291-8.

Parks DA. Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut*. 1989; 30(3):293-8.

Pearson DC, Jourd'heuil D, Meddings JB. The anti-oxidant properties of 5-aminosalicylic acid. *Free Radic Biol Med*. 1996;21(3):367-73.

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

Pool-Zobel BL, Abrahamse SL, Collins AR, Kark W, Gugler R, Oberreuther D, Siegel EG, Treptow-van Lishaut S, Rechkemmer G. Analysis of DNA strand breaks, oxidized bases, and glutathione S-transferase P1 in human colon cells from biopsies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*. 1999;8(7):609-14.

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

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

Priolli DG, da Silva PLE, Betini AM, Pereira JA, Margarido NF, Martinez CAR. Is the peritoneal reflection the best anatomical repair landmark in experimental colorectal surgery in rats. *Acta Cir Bras*. 2009;24(6):484-9.

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

Repine JE, Eaton JW, Anders MW, Hoidal JR, Fox RB. Generation of hydroxyl radical by enzymes, chemicals and human phagocytes in vitro. Detection with the anti-inflammatory agent dimethyl sulphoxide. *J Clin Invest.* 1979; 64:1642-51.

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

Ribeiro ML, Priolli DG, Miranda DDC, Paiva DA, Pedrazzoli Júnior J, Martinez CAR. Avaliação do dano oxidativo ao DNA de células normais e neoplásicas da muco cólica de doentes com câncer colorretal. *Rev Bras Coloproct.* 2007;27(4): 391-402.

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

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

Riley SA. What dose of 5-aminosalicylic acid (mesalazine) in ulcerative colitis? *Gut.* 1998;42(6):761-3.

Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Herd ME, Dutt S, Turnberg LA. Comparison of delayed release 5 aminosalicylic acid (mesalazine) and sulphasalazine in the treatment of mild to moderate ulcerative colitis relapse. *Gut.* 1988;29(5):669-74.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Schmehl K, Florian S, Jacobasch G, Salomon A, Körber J. Deficiency of epithelial basement membrane laminin in ulcerative colitis affected human colonic mucosa. *Int J Colorectal Dis*. 2000; 15(1):39-48.

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

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

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

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

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

Sedghi S, Fields JZ, Klamut M, et al. Increased production of luminol enhanced chemiluminescence by the inflamed colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1993; 34: 1191-7.

Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animals models. *Carcinogenesis*. 2003;24:353-62.

Shan XQ, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther*. 1990;47(1):61-71.

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

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

Shimotoyodome A, Meguro S, Hase T, Tokimitsu I, Sakata T. Short chain fatty acids but not lactate or succinate stimulate mucus release in the rat colon. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2000;125(4):525-31.

Siddiqui A, Ancha H, Tedesco D, Lightfoot S, Stewart CA, Harty RF. Antioxidant therapy with N-acetylcysteine plus mesalamine accelerates mucosal healing in a rodent model of colitis. *Dig Dis Sci*. 2006;51(4):698-705.

Simmonds NJ, Allen RE, Stevens TRJ, van Someren RNM, Blake DR, Rampton DS. Chemiluminescence assay of mucosal reactive metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992; 103: 186-96.

Simmonds NJ, Millar AD, Blake DR, Rampton DS. Antioxidant effects of aminosalicylates and potential new drugs for inflammatory bowel disease: assessment in cell-free systems and inflamed human colorectal biopsies. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999;13(3):363-72.

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

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

Song M, Xia B, Li J. Effects of topical treatment of sodium butyrate and 5-aminosalicylic acid on expression of trefoil factor 3, interleukin 1beta, and nuclear factor kappaB in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. *Postgraduat Med J.* 2006;82(964):130-5.

Sousa MV, Priolli DG, Portes AV, Cardinalli IA, Pereira JA, Martinez CAR. Evaluation by computerized morphometry of histopathological alterations of the colon wall in segments with and without intestinal transit in rats. *Acta Cir Bras.* 2008;23(5):417-24.

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

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

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

Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279(6):1005-28.

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

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

Triantafillidis JK, Nicolakis D, Mountaneas G, Pomonis E. Treatment of diversion colitis with 5-aminosalicylic acid enemas: comparison with betamethasone enemas. *Am J Gastroenterol.* 1991;86(10):1552-3.

Tripodi J, Gorcey S, Burakoff R. A case of diversion colitis treated with 5-aminosalicylic acid enemas. *Am J Gastroenterol.* 1992;87(5):645-7.

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

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

Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, Büller HA, Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB, Einerhand AW. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology.* 2006;131(1):117-29.

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

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

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

Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40(3):235-43.

Yamada T, Grisham MB. Role of neutrophil-derived oxidants in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Klin Wochenschr.* 1991;69(21-23):988-94.

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

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

FONTES CONSULTADAS

1. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR-6023: Informação e documentação, referências-elaboração. Rio de Janeiro; 2000.
2. Cunha AC. Estrutura e Apresentação de Dissertações e Teses. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1991. 48p.
3. Guedes MLS, Guedes JS. Descrição da Amostra: Tabelas e Gráficos. In: Guedes MLS, Guedes JS. Bioestatística para profissionais da saúde. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico; 1988. p.43-58.
4. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. N Eng J Med. 1997;336(4):309-16.
5. International Committee of Medical Journal Editors. Requisitos uniformes para manuscritos apresentados a periódicos biomédicos. Ver Saúde Pública. 1999;33:6-15
6. Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. São Paulo, 2001. 85p.
7. Walker JR MLA. Style citations of eletronic sources. [online]. Available from: <http://www.cas.usf.edu/english/walker/mla.html>. (25 jan. 2009)
8. Guimarães CA. Normas para manuscritos submetidos às revistas biomédicas: Escrita e edição da publicação biomédica (tradução integral do texto). Rev Col Bras Cir. 2008;35(6):425-41.
9. Ayres M, Ayres Júnior M, dos Santos AS. In: Ayres M, Ayres Júnior M, dos Santos AS. Bioestat 2.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; 2000. 227p.
10. CIOMS Council for International Organization of Medical Sciences. Ethical code for animal experimentation. WHO Chronicle. 1985;39(2):51-6.
11. Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Princípios éticos para o uso de animais de laboratório. [online]. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20Eticos>. (25 jan. 2009)
12. Brasil. Presidência da República. Lei Federal n. 11.794 de 8 de outubro de 2008. [online]. Estabelece critérios para a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo território nacional. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm (02 jul. 2009)

ANEXO

Níveis de dano oxidativo ao DNA								
<i>(Tail moment - UA)</i>								
Duas Semanas					Quatro semanas			
Rato	Com trânsito		Sem trânsito		Com trânsito		Sem trânsito	
	S.F. 0,9%	5-ASA	S.F. 0,9%	5-ASA	S.F. 0,9%	5-ASA	S.F. 0,9%	5-ASA
1	2,60	1,78	3,74	1,93	3,21	1,87	3,59	2,56
2	3,32	1,87	3,81	2,20	2,97	2,02	3,01	2,50
3	2,43	1,85	3,08	2,17	3,02	2,30	3,20	2,66
4	2,01	1,83	2,49	2,23	2,78	1,93	3,02	2,40
5	-	1,73	-	1,87	-	2,09	-	2,23
6	-	1,82	-	2,00	-	2,04	-	2,31
7	-	1,86	-	2,30	-	1,98	-	2,22
8	-	1,77	-	1,99	-	2,13	-	2,53
9	-	1,75	-	1,98	-	2,23	-	2,67
M	2,59	1,80	3,28	2,07	2,99	2,06	3,20	2,45
DP	0,54	0,05	0,62	0,15	0,17	0,13	0,27	0,17

APÊNDICE

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



Bragança Paulista, 19 de Junho de 2008.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: " Avaliação dos Efeitos Antioxidantes da Mesalazina (5-ASA) na colite de exclusão". Estudo Experimental em ratos.

Curso: Medicina

Grupo:

Autor(es): Profº Dr. Carlos Augusto Real Martinez; Profª Denise G. Priolli, Felipe Rodrigues Máximo.

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou em reunião extraordinária do dia 19/06/2008 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,

MARCELO LIMA RIBEIRO

Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - USF

Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Arns CEP 13045-270 (19) 3779-3300
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036