

CAROLINE DE CASTRO FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO E
CONTEÚDO TECIDUAL DA PROTEÍNA OCLUDINA NA
MUCOSA CÓLICA DE RATOS COM E SEM TRÂNSITO
INTESTINAL**

**Bragança Paulista
2013**

CAROLINE DE CASTRO FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO E
CONTEÚDO TECIDUAL DA PROTEÍNA OCLUDINA NA
MUCOSA CÓLICA DE RATOS COM E SEM TRÂNSITO
INTESTINAL**

PROF. DR. CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ

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.

**Bragança Paulista
2013**

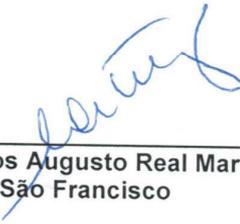
WI 522 Ferreira, Caroline de Castro.
F44a Avaliação do padrão de expressão e conteúdo tecidual da proteína ocludina na mucosa cólica de ratos com e sem trânsito intestinal / Caroline de Castro Ferreira. -- Bragança Paulista, 2013. 60 p.

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. Junções íntimas. 3. Ocludina. 4. Ratos.
I. Martinez, Carlos Augusto Real. II. Título.

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

FERREIRA C., Caroline, “Avaliação do padrão de expressão e conteúdo tecidual da proteína ocludina na mucosa cólica de ratos com e sem trânsito intestinal”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e três de agosto de 2013 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
Universidade São Francisco



Prof. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini
Universidade São Francisco



Prof. Dra. Ivana Maria Sodré Siviero
Institui o de Ensino São Francisco

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

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

Dedico este trabalho aos meus pais e minha irmã que sempre me fizeram acreditar nas realizações dos meus sonhos e contribuíram muito para que eu conseguisse realizá-los.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível sem a participação de várias pessoas. Gostaria de agradecer a todos aqueles que foram decisivos para a concretização de uma importante etapa da minha vida.

Ao Professor, Doutor e Livre Docente Carlos Augusto Martinez, por ter aceitado a orientação de minha dissertação e acompanhado todo o desenvolvimento do projeto, sempre presente e disposto a esclarecer minhas dúvidas.

Ao professor José Aires Pereira pela análise histopatológica e técnicas histológicas realizadas durante o estudo.

Aos acadêmicos, Paulo Pedroso Silveira Júnior, Daniela Tiemi Sato e Murilo Rocha Rodrigues, pelo auxílio na etapa experimental desta pesquisa.

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

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, pela oportunidade da concretização deste.

Agradeço de uma forma muito carinhosa, a todos os meus colegas de trabalho, que sempre incentivaram a realização do mestrado. Em especial, ao professor Guaracy Silva e a professora Nancy Christiane Ferreira Silva, que compartilharam seus conhecimentos, esclarecendo minhas dúvidas e acalmando minhas inquietações.

Aos meus pais, minha irmã e meu namorado, que em todos os momentos estiveram do meu lado, apoiando e compreendendo minhas aflições.

“O sucesso nasce do querer da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO:

O processo inflamatório que acontece em segmentos de intestino grosso desprovidos de trânsito intestinal é denominado colite de exclusão. Para o desenvolvimento da colite, a integridade funcional da barreira exercida pelo epitélio cólico estará danificada. As junções de oclusão, formadas principalmente pelas duas proteínas completas claudina e ocludina, apresentam papel fundamental neste sistema de defesa. Pesquisas sobre a expressão da ocludina em células epiteliais e endoteliais evidenciam o envolvimento da mesma em várias funções celulares e, as modificações no conteúdo e localização desta proteína têm sido associadas a mudanças nas funções fisiológicas das junções oclusivas. **Objetivo:** Mensurar o conteúdo tecidual total de ocludina, comparando a mucosa cólica provida e desprovida de trânsito intestinal; avaliar se existem modificações no local de expressão da proteína ocludina nas criptas da mucosa cólica comparando segmentos com e sem trânsito intestinal, e verificar a influência do tempo de exclusão nessas variáveis. **Método:** Quarenta e cinco ratos Wistar machos foram submetidos à cirurgia de derivação intestinal por meio de colostomia proximal no cólon esquerdo e fístula mucosa distal. Os animais foram divididos em três grupos experimentais, compostos por quinze animais, segundo o sacrifício ter sido realizado em seis, doze e dezoito semanas após o procedimento cirúrgico. A expressão tecidual da proteína ocludina foi analisada por imunohistoquímica. Para a comparação entre os níveis teciduais de ocludina segundo o local das criptas cólicas nos segmentos com e sem trânsito fecal utilizamos os testes não paramétricos de Willcoxon e de Man-Whitney. Para análise de variância entre os grupos experimentais utilizamos o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Student-Newman-Keuls, estabelecendo-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). **Resultados:** Houve redução no conteúdo tecidual de ocludina no ápice do segmento desprovido de trânsito fecal quando comparado ao ápice da cripta cólica com trânsito preservado, independente do tempo de exclusão. Constatou-se também, que existe variação no conteúdo de ocludina no ápice das criptas do cólon provido de trânsito em relação ao tempo de exclusão ($p = 0,0019$), esta variação ocorre entre a sexta e décima segunda semana estabilizando a partir de então. **Conclusões:** Existe redução no conteúdo tecidual de ocludina no ápice do segmento cólico desprovido de trânsito fecal, evidenciando a importância do substrato energético para o metabolismo das células da mucosa cólica. A variação do conteúdo de ocludina no ápice da cripta do cólon provido de trânsito possivelmente está relacionada com o aumento ponderal dos animais de acordo com o tempo de sacrifício.

Palavras-chave: Colite, junção de oclusão, ocludina.

ABSTRACT:

The inflammatory process that occurs in the large intestine segments without transit is termed diversion colitis. For the development of colitis, the functional integrity of the barrier exerted by the colonic epithelium is damaged. The occlusion junctions, formed mainly by two complete proteins claudin and occludin, have key role in this defense system. Research on the expression of occludin in epithelial and endothelial cells shows this protein is involved in a number of cell functions, and changes in the content and location of this protein have been associated with changes in physiological functions of occlusive junctions. **Objective:** To measure the total tissue content of occludin, comparing the colonic mucosa provided and devoid of intestine transit; to assess whether there are changes in local expression of occludin protein in the crypts of the colon mucosa comparing segments with and without intestine transit and to check the influence of time excluding these variables. **Method:** Forty-five male Wistar rats were submitted to the derivation of the left colon by a proximal colostomy and distal mucous fistula. The animals were divided into three groups consisting of fifteen animals, according to sacrifice being performed out in six, twelve, on eighteen weeks after surgery. Tissue expression of occludin protein was analyzed by immunohistochemistry. To compare tissue levels of occludin according to the location of colon crypts in segments with and without fecal stream, we used the nonparametrics Willcoxon and Mann Whitney test. For analysis of variance between experimental groups, we used the Kruskal-Wallis test and post-test of Student-Newman-Keuls, establishing a level of significance of 5% ($p < 0,05$). **Results:** There was a reduction in tissue content of occludin in the apical regions of the segment without fecal stream compared to the apical regions of the crypt with traffic preserved, regardless of time of exclusion. It was also found that there is variation in the content of occludin in the apical regions of the crypts of the colon with traffic in relation to the exclusion time ($p = 0.0019$), this variation occurs between the sixth and twelfth week stabilizing thereafter. **Conclusions:** There is a reduction in the tissue content of occludin in the apical regions of the colonic segment devoid of fecal stream, indicating the importance of the energy substrate for the metabolism of the cells of the colonic mucosa. The variation in the content of occludin in the apical regions of colon crypt provided with transit is related to the increase of animal weight in accordance with the time of sacrifice.

Key words: Colitis. Occlusion junctions. Occludin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

AB	Alcian Blue
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
CCR	Câncer Colorretal
CE	Colite de exclusão
CEMIB	Centro multidisciplinar de investigação biológica
CEP	Comitê de ética em pesquisa
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais
DAB	Tetrahydrocloro-diamianobenzidina
DC	Dual core
DII	Doença inflamatória intestinal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
F	French
HE	Hematoxilina-eosina
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
MPO	Mieloperoxidase
PAS	Periódico Ácido de Schiff
PBS	Tampão fosfato
RCUI	Retocolite ulcerativa inespecífica
RLO	Radicais livres de oxigênio
SPF	Specific Pathogen Free
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1 – Resumo de significância da variação dos valores médios para o conteúdo de ocludina, no cólon provido de trânsito intestinal.....	37
--	----

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1 - Junções intercelulares. Modificado de www.sobiologia.com.br , 2010.....	16
Figura 2 - Proteínas completas da junção de oclusão (occludina e claudina). Modificado de edithcruzmembrana.blogspot.com.br , 2010.	18
Figura 3 - Proteína occludina. Disponível em refuerzabiologia.blogspot.com.br	19
Figura 4 - Organograma dos grupos experimentais.	23
Figura 5 - Identificação da placa de Peyer (seta) como reparo anatômico.	25
Figura 6 – Ligadura da artéria marginal no ponto de secção do cólon.....	25
Figura 7 - Limpeza mecânica anterógrada do cólon excluído de trânsito fecal.	25
Figura 8 - Aspecto final da parede abdominal após confecção de estomas.....	25
Figura 9 - Parede cólica no segmento desprovido de trânsito fecal à derivação intestinal por doze semanas (HE – 100 X). c=criptas; mm= muscular da mucosa; sm = submucosa; mp= muscular própria...	28
Figura 10 - Parede cólica no segmento desprovido de trânsito fecal à derivação intestinal por doze semanas (HE – 100 X). c=criptas; mm= muscular da mucosa; sm = submucosa; mp= muscular própria...	28
Figura 11 - Parede do cólon provido de trânsito intestinal, seis semanas. (HE - 200 x).....	32
Figura 12 - Parede do cólon desprovido de trânsito intestinal, seis semanas. (HE - 200 x)	32
Figura 13 - Parede do cólon provido de trânsito intestinal, doze semanas. (200 x)	33
Figura 14 - Parede do cólon desprovido de trânsito intestinal, doze semanas. (200 x).....	33
Figura 15 - Parede do cólon provido de trânsito intestinal, dezoito semanas. (200 x)	33
Figura 16 – Parede do cólon desprovido de trânsito intestinal, dezoito semanas. (200 x).....	33
Figura 17 – Expressão de proteína occludina no fundo da cripta cólica provida de trânsito intestinal nos grupos de seis, doze e dezoito semanas < Ápice da cripta cólica provida de trânsito nos mesmos grupos (p<0,0001)**. Teste Willcoxon.....	34
Figura 18 – Expressão de proteína occludina no fundo da cripta cólica desprovida de trânsito intestinal nos grupos de seis, doze e dezoito semanas < Ápice da cripta cólica desprovida de trânsito nos mesmos grupos (p<0,0001)**. Teste Willcoxon.	35

Figura 19 – Expressão de proteína ocludina no ápice da cripta cólica desprovida e provida de trânsito intestinal nos grupos de seis, doze e dezoito semanas < Ápice da cripta cólica provida de trânsito nos mesmos grupos ($p < 0,0001$)**. Teste Mann-Whitney 36

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Colite de exclusão (CE)	7
1.2. Modelos experimentais de colite de exclusão.....	12
1.3. Junção de oclusão	16
1.3.1. Ocludina	19
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Animal de experimentação.....	22
3.2. Grupos experimentais	22
3.3. Etapa pré-operatória	23
3.4. Anestesia.....	23
3.5. Técnica operatória.....	24
3.6. Pós-operatório	25
3.7. Sacrifício dos animais	26
3.8. Confeção dos blocos de parafina e lâminas	27
3.9. Técnicas de coloração.....	27
3.10. Técnica imunoistoquímica (Ocludina)	28
3.11. Avaliação histológica	30
3.12. Análise da expressão tecidual de ocludina	30
3.13. Método estatístico	30
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Expressão e conteúdo tecidual de ocludina	32
4.2. Intensidade de expressão da ocludina segundo o local da cripta cólica.....	33
4.3. Variações segundo o tempo de exclusão	36

5. DISCUSSÃO.....	38
6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS	45
ANEXO I – Aprovação do comitê de ética no uso de animal em pesquisa (CEUAP) da Universidade São Francisco, Bragança Paulista.	55
ANEXO II – Intensidade da expressão da proteína ocludina – 6 semanas.	56
ANEXO III – Intensidade da expressão da proteína ocludina – 12 semanas.	57
ANEXO IV – Intensidade da expressão da proteína ocludina – 18 semanas.	59

1. INTRODUÇÃO

Mutações sequenciais do DNA das células do epitélio cólico foram discutidas no século XX como sendo responsáveis pela origem do câncer colorretal (CCR) (Fearon e Vogelstein, 1990). Essas mutações ocorrem devido a transversões ou inserções de bases anômalas, levando a erros de pareamento de nucleotídeos, e consequente formação de proteínas defeituosas. As proteínas danificadas perdem a funcionalidade na biologia celular normal, ocasionando a proliferação celular descontrolada e autônoma, resistência à apoptose, ausência de reconhecimento de erros de pareamento de bases, estímulo à proliferação vascular e alteração no mecanismo celular levando ao desencadeamento do câncer colorretal (CCR). Pesquisas identificaram que o mecanismo mais importante que ocasiona as mutações relacionadas ao CCR é a agressão inflamatória constante à mucosa cólica, tal como acontece nos portadores de diferentes formas de colite (Pravda, 2005). Portanto, a etiopatogenia das doenças inflamatórias do cólon, também vem sendo atribuída a modificações estruturais nos intrincados sistemas de junção intercelular que mantêm a integridade do epitélio intestinal (Pravda, 2005). Esses aspectos tornam o estudo estrutural das células da mucosa cólica um campo aberto para a pesquisa moderna.

A barreira funcional exercida pelo epitélio cólico representa um dos mais perfeitos mecanismos de defesa existente no organismo celular. Apesar de ser formada apenas por uma camada de células tem como tarefa separar as camadas estéreis da parede cólica da luz intestinal onde existe grande concentração bacteriana (Pravda, 2005). Essa capacidade da mucosa cólica pode ser melhor analisada ao considerar-se que a concentração estimada de bactérias na luz do cólon é de um trilhão de colônias por grama de fezes (Farrell e Peppercorn, 2002). Entretanto, caso uma única bactéria consiga romper a barreira funcional, imediatamente existe uma resposta inflamatória que evita sua disseminação para o meio interno. Estudos demonstraram que a barreira funcional descrita acima se encontra danificada antes mesmo da ocorrência da resposta inflamatória nos portadores de colite, sugerindo que o comprometimento desses sistemas de defesa, precede a infiltração neutrofílica que caracteriza a doença

Dogan *et al.*, 1995; Finnie *et al.*, 1995; Hanby *et al.*, 1996; Jankowski *et al.*, 1998; Karayiannakis *et al.*, 1998; Parrish *et al.*, 1999; Perry *et al.*, 1999; Schmehl *et al.*, 2000; Aust *et al.*, 2001; Gassler *et al.*, 2001, Kucharzik *et al.*, 2001; Berkes *et al.*, 2003; Swidsinski *et al.*, 2007; Laukoetter *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2008; Nonose, 2009; Nonose *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2010).

As células epiteliais da mucosa cólica são mantidas unidas umas às outras e à lâmina basal, por mecanismos específicos de adesão celular (Alberts *et al.*, 2004). Esse mecanismo deve ser permeável a nutrientes e outras moléculas importantes para o crescimento e desenvolvimento das células e, ao mesmo tempo, impedir a invasão do meio interno por bactérias e antígenos existentes na luz intestinal (Laukoetter *et al.*, 2008). A ruptura da integridade funcional exercida pelo epitélio cólico é considerada a etapa mais precoce e importante para a cascata de eventos que propiciam a invasão bacteriana, e a subsequente ativação local da resposta inflamatória (Pravda, 2005). Entretanto, para o desenvolvimento da colite os mecanismos de defesa do epitélio cólico devem estar danificados (Perry *et al.*, 1999; Demetter *et al.*, 2000; Aust *et al.*, 2001; Kucharzik *et al.*, 2001; Bruewer *et al.*, 2003; Pravda, 2005; Laukoetter *et al.*, 2008).

As linhas de defesa que formam a barreira epitelial cólica agem em conjunto impedindo a translocação bacteriana para o meio interno. Esse sistema é representado pela camada de muco, pelas membranas apical e basolateral das células epiteliais, as junções intercelulares, matriz extracelular e, finalmente pela lâmina (Kucharzik *et al.*, 2001; Gaudier e Hoebler, 2006; Laukoetter *et al.*, 2008). Nas fases iniciais das colites, todas essas linhas de defesa encontram-se comprometidas, sugerindo que a danificação funcional da barreira do epitélio cólico precede a infiltração neutrofílica que caracteriza a doença (Dogan *et al.*, 1995; Jankowski *et al.*, 1998; Parrish *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2010).

O complexo de adesão celular é aquele responsável por aderir as células do epitélio cólico umas às outras e à matriz extracelular. Esse sistema de adesão celular é composto por moléculas protéicas responsáveis pela manutenção da permeabilidade seletiva do epitélio intestinal (Laukoetter *et al.*, 2008). No epitélio cólico, o mecanismo

de adesão entre duas células vizinhas é composto por três tipos de junções intercelulares: as junções de oclusão, junções aderentes e junções comunicantes (Alberts *et al.*, 2004). Cada junção é formada por proteínas com funções específicas que atravessam as membranas plasmáticas e se fixam a proteínas componentes do citoesqueleto celular. As junções especializadas não só mantêm as células epiteliais firmemente aderidas como possibilitam, ainda, a comunicação funcional entre elas. Este sistema de comunicação permite que células precursoras localizadas na zona germinativa, sejam constantemente informadas do índice de apoptose nas células situadas na superfície das glândulas em constante descamação, repondo continuamente essa perda. Modificações no conteúdo e na estrutura química das proteínas que formam o complexo de junções intercelulares foram descritas em portadores de colite ulcerativa e CCR (Schmitz *et al.*, 1999; Clayburg *et al.*, 2004; Usami *et al.*, 2006).

As junções aderentes possuem papel relevante no reconhecimento entre duas células justapostas, mediando também, as comunicações entre elas (Gumbiner *et al.*, 1988; Gumbiner e Yamada, 1995). São formadas, principalmente, por uma proteína denominada E-caderina, que apresenta dois domínios funcionais, um localizado no espaço intercelular e outro no interior da célula, que se une a proteínas pertencentes à família das cateninas (α -catenina, β -catenina e γ -catenina) localizadas no citosol, próximas à membrana citoplasmática. As junções aderentes encontram-se intimamente relacionadas às proteínas do citoesqueleto celular, em particular a actina. Estudos mostraram que nos portadores de doença inflamatória intestinal, câncer colorretal (CCR) e câncer colorretal associado à colite ulcerativa, existe redução no conteúdo epitelial e modificações no local de expressão das proteínas E-caderina e β -catenina (Dorudi *et al.*, 1993; Jankowski *et al.*, 1997; Aust *et al.*, 2001).

As junções de oclusão formam uma barreira regulada e semipermeável nos espaços entre as células epiteliais e endoteliais; atuam também como uma “cerca” delimitando as diferentes composições dos domínios apical e basolateral da membrana plasmática (Stchneeberger e Lynch, 2004). As duas principais proteínas completas encontradas nessas junções são as ocludinas e as claudinas (Stevenson, 1999).

A ocludina é considerada um marcador imunistoquímico fidedigno de junções de oclusão, ou seja, as alterações na expressão e localização desta proteína têm sido associadas a mudanças nas funções fisiológicas das junções oclusivas (Balda *et al.*, 1996; Hirase *et al.*, 1997). Pesquisas sobre a expressão dessas proteínas em células epiteliais e endoteliais evidenciam o envolvimento das mesmas em várias funções celulares como a manutenção da permeabilidade paracelular, organização da polaridade da membrana, atuação no citoesqueleto celular e adesão celular (Furuse *et al.*, 1996).

A função da barreira da ocludina está alterada em diversos estados patológicos, tais como infecções por bactérias e vírus, processos alérgicos e tóxicos, hiperestimulação imune, processos inflamatórios, diabetes e neoplasias. Estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a expressão da ocludina em diferentes tipos de neoplasias em diferentes tecidos. Em estudo realizado registrou-se que a expressão da ocludina era reduzida em adenocarcinomas pouco diferenciados do trato gastrointestinal (Kimura *et al.*, 1997).

Os mecanismos moleculares que determinam a quebra de junções intercelulares, rompendo a barreira funcional nos doentes com colite ainda não foram totalmente esclarecidos. A teoria de indução da colite por radicais livres de oxigênio (RLO), foi proposta para explicar os fenômenos moleculares que desencadeiam a lesão da barreira epitelial e possibilitam a infiltração neutrofílica da mucosa cólica (Pravda, 2005). Segundo a teoria, existem duas fases distintas no dano à barreira epitelial chamadas, respectivamente, indução e propagação.

Na fase de indução, a lesão à barreira epitelial é ocasionada por RLO formados em excesso pelas próprias células epiteliais com modificação no seu metabolismo energético (Pravda, 2005). Alterações nas reações celulares de redução da molécula de oxigênio e água (H₂O), durante a fosforilação oxidativa mitocondrial, produzem grandes quantidades de RLO. Como são moléculas tóxicas para as células, por danificarem membranas e organelas celulares, os RLO podem romper as diferentes linhas de defesa que formam a barreira epitelial (Grisham *et al.*, 1990; Sheridan *et al.*, 1996; Sousa *et al.*, 2008; Nonose *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2010). A ruptura da

barreira epitelial possibilita a penetração de bactérias do lume cólico para a camada submucosa estéril (Pravda, 2005). Com objetivo de combater a infiltração bacteriana do meio interno estéril, neutrófilos migram para o local, levando às alterações inflamatórias que caracterizam a doença (Kucharzik *et al.*, 2001; Pravda, 2005). Segundo a teoria, a fase de propagação somente tem início após a quebra da barreira funcional e a migração neutrofílica. Nesta fase, a contínua infiltração bacteriana aumenta a quimiotaxia de neutrófilos, os quais liberam citocinas, mediadores inflamatórios, enzimas proteolíticas e produzem maior quantidade de RLO, agravando e perpetuando o dano tecidual (Pravda, 2005).

A ação deletéria dos RLO à mucosa cólica foi confirmada após demonstrar-se que a aplicação de clisteres contendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um potente formador de RLO, destrói a camada epitelial levando ao aparecimento de formas graves de colite, algumas vezes de evolução fatal (Pumphery, 1951; Hoffmann *et al.*, 2002; Gan e Price, 2003; Sheibani e Gerson, 2008). Estudos experimentais confirmaram o potencial tóxico dos RLO à barreira epitelial ao mostrarem que a exposição da mucosa cólica a pequenas concentrações de H_2O_2 provoca alterações histológicas semelhantes às encontradas na colite ulcerativa humana (Sheehan e Brynjolfsson, 1960; Marques *et al.*, 2009).

Uma vez que a aplicação de clisteres com H_2O_2 ocasiona danos à barreira epitelial e que as células epiteliais da mucosa intestinal com modificações em seu metabolismo energético, produzem grandes quantidades de RLO, é razoável supor que o estresse oxidativo resultante possa ser responsabilizado pela ruptura dos sistemas de barreira que caracteriza a fase de indução da colite (Pravda, 2005; Martinez *et al.*, 2010). No entanto, a maioria dos modelos experimentais de colite não permite avaliar essa possibilidade, pois o dano à mucosa cólica é infringido de forma artificial, pela aplicação de substâncias lesivas (Fillmann, 2007; Almalouf *et al.*, 2008). Na realidade esses modelos não reproduzem, com fidedignidade, os mecanismos moleculares iniciais que determinam a quebra da barreira epitelial, propostos pela teoria de indução da colite por radicais livres (Martinez, 2009). Todavia, mostram com clareza que a integridade epitelial é condição indispensável para evitar a infiltração bacteriana da

submucosa e manter a resposta imune do cólon num estado quiescente. Quando ocorre ruptura da barreira epitelial e a translocação bacteriana, o sistema imunológico induz a migração neutrofílica, capaz de desencadear a fase de propagação proposta pela teoria.

O modelo experimental ideal para avaliar a veracidade da teoria de indução da colite por RLO deveria provocar lesão da barreira epitelial apenas por alterações do metabolismo energético das células epiteliais, sem danificar a barreira funcional quimicamente. Na procura por um modelo que pudesse comprovar a teoria de indução da colite por RLO lembramos que a colite de exclusão (CE), uma forma de colite semelhante à ulcerativa, ocorre exclusivamente pela modificação do metabolismo energético das células epiteliais (Glotzer *et al.*, 1981; Agarwal e Schimmel, 1989). Estudos demonstraram que a CE surge após a interrupção no fornecimento de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), o principal substrato energético para as células epiteliais da mucosa cólica (Roediger, 1990; Giardiello *et al.*, 1995; Kiely *et al.*, 2001).

A possibilidade de que modificações no metabolismo das células epiteliais de segmentos sem trânsito fecal fossem capazes de produzir maiores quantidades de RLO, e que o estresse oxidativo decorrente pudesse romper a barreira epitelial levando ao aparecimento da CE, poderia ser uma explicação plausível para a etiopatogenia da doença. Portanto, confirmou-se essa possibilidade ao verificar-se que células do epitélio cólico, desprovidas do suprimento de AGCC apenas pela derivação do trânsito fecal, aumentam a produção de RLO, que ocasiona dano à mucosa cólica, idêntico ao encontrado na CE humana, e semelhante ao encontrado na colite ulcerativa (Martinez, 2009). Demonstrou-se atrofia das criptas da mucosa cólica, formação de ulcerações epiteliais em locais onde não existia infiltração neutrofílica e redução da população de células caliciformes produtoras de muco (Sousa *et al.*, 2008). Constatou-se que no cólon sem trânsito havia redução significativa do conteúdo tecidual de mucinas neutras e ácidas e modificações no padrão de expressão dos subtipos de mucinas ácidas nas criptas cólicas (Nonose, 2009; Martinez *et al.*, 2010). Todas essas alterações histológicas e histoquímicas relacionavam-se aos maiores níveis teciduais de RLO e, conseqüentemente, ao estresse oxidativo.

Uma série de estudos realizados em modelo de CE, pelo nosso grupo de pesquisa, demonstrou-se, que o estresse oxidativo danifica a camada de muco e ocasiona erosões nas células superficiais, as primeiras linhas de defesa da barreira funcional, e também comprometem as junções aderentes, ocorrendo modificação no conteúdo tecidual das principais proteínas que formam o complexo de adesão (Nonose, 2009; Kadri, 2010; Fabris, 2011). Baseando-se nesta linha de pesquisa, com o emprego de técnicas imunistoquímicas de identificação das proteínas das junções de oclusão tornou-se possível quantificar a expressão de ocludina na mucosa cólica, comparando segmentos providos e desprovidos de trânsito, verificando a influência do tempo de exclusão na intensidade e padrão de expressão dessas proteínas.

Do melhor de nosso conhecimento, modificações no conteúdo e local de expressão tecidual da proteína ocludina nas criptas intestinais ainda não foi avaliado em doentes ou modelos experimentais de colite de exclusão (CE).

1.1. Colite de exclusão (CE)

A colite de exclusão (CE) foi descrita na década de oitenta, desde então várias pesquisas estão sendo realizadas a fim de detectar o diagnóstico correto, principalmente nos doentes submetidos à derivação do trânsito intestinal por complicações decorrentes de doenças inflamatórias intestinais (Geraghty e Talbot, 1991). Esta enfermidade é definida como o processo inflamatório que acomete segmentos colorretais desprovidos de trânsito fecal (Glotzer *et al.*, 1981).

A colite de exclusão (CE), colite por desfuncionalização ou colite por derivação ocorre em segmentos distais do cólon ou reto de indivíduos submetidos à derivação intestinal por diversas situações clínicas, representadas pelas neoplasias obstrutivas do cólon, diverticulite aguda, doença de Chohn, colite ulcerativa, traumatismos ano-reto-cólico, doenças neurológicas, doenças inflamatórias intestinais (DII) e malformações congênitas (Keli *et al.*, 1997). A frequência de colite de exclusão (CE) vem aumentando proporcionalmente com a crescente incidência do câncer colorretal (CCR), doença

diverticular, doenças inflamatórias intestinais e da expansão da violência urbana nos grandes centros. A necessidade de realização de estomas de proteção também contribui para o aumento da freqüência de CE, estima-se que 22% dos pacientes submetidos a este tipo de estoma desenvolvem complicações das anastomoses baixas ou ultrabaixas e tenham que permanecer com a derivação intestinal pelo resto da vida (Fischer *et al.*, 2010). A CE também é encontrada em segmentos cólicos excluídos de trânsito, utilizados para a reconstituição do trânsito urinário ou confecção de neovaginas.

As bases fisiopatológicas para o desenvolvimento CE ainda não se encontram totalmente definidas. Alguns autores acreditam que esta enfermidade tenha origem isquêmica, outros propõem que a CE ocorre devido a mudanças na quantificação e caracterização da flora do cólon, com diminuição da população bacteriana e predomínio das bactérias redutoras de nitrato (Neut *et al.*, 1989; Neut *et al.*, 1997). Contudo, a maioria dos estudos, afirmam que a doença seja causada pela deficiência de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) na luz intestinal, decorrente derivação do trânsito fecal (Mortensen *et al.*, 1991; 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).

A possibilidade da etiopatogenia da CE ser da deficiência de AGCC na luz intestinal torna-se mais evidente quando revela-se 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 *et al.*, 1996; Filmann, 2007; Nassri *et al.*, 2008).

O butirato, acetato e propionato, principais combustíveis energéticos para as células são AGCC formado 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 responsáveis por 90% de todo o substrato utilizados pelas células da mucosa cólica para a obtenção de energia (Roediger, 1990; Soergel, 1994; Velazquez *et al.*, 1997). Através de reações oxidativas são ligeiramente

absorvidos para que as células epiteliais obtenham a energia para o seu funcionamento normal.

Os 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 (Scheppach e Weiler, 2004). Em pesquisas realizadas utilizando células, acrescidos butirato e acetato ou butirato e propionato demonstra-se que o butirato é a principal fonte de energia das células cólicas, ou seja, regula a expressão de genes associados à proliferação, diferenciação e apoptose celular sendo o responsável pela manutenção da homeostase do tecido cólico (Jorgensen *et al.*, 1997).

A ausência dos AGCC na luz intestinal libera enzimas citolíticas através dos lisossomos, destruindo as proteínas que compõem a membrana basal e matriz extracelular. Esta deficiência aumenta a formação de radicais livres de oxigênio (RLO) pelas células da mucosa cólica e pelos neutrófilos nos portadores de RCUI (Pravda, 2005). Portanto, sugere-se 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).

Com o propósito de analisar se o aumento da produção de RLO poderia provocar alterações na primeira linha de defesa do epitélio cólico, quantificou-se em modelo experimental de CE, semelhante ao utilizado no presente estudo, a expressão dos diferentes tipos e subtipos de mucinas nas criptas do epitélio cólico. Os autores identificaram que nos segmentos sem trânsito fecal ocorre redução significativa na expressão tecidual tanto das mucinas ácida quanto das neutras (Nonose, 2009; Nonose *et al.*, 2009). Estes resultados confirmam estudos anteriores mostrando que a presença de AGCC aumenta o trofismo do epitélio cólico e, conseqüentemente a produção de muco (Finnie *et al.*, 1995; Gaudier *et al.*; 2006). Portanto, todas estas pesquisas sugere-se que o estresse oxidativo é capaz de destruir a primeira linha de defesa epitelial, formada pela camada de muco que recobre o epitélio cólico (Nonose, 2009; Nonose *et al.* 2009; Martinez *et al.*, 2010).

Apesar de existirem estudos demonstrando que os RLO podem causar danos às junções aderentes que compõem o complexo de adesão intercelular, o comportamento das junções de oclusão que funcionam como uma barreira regulada e semipermeável nos espaços entre as células epiteliais e endoteliais, e principalmente o perfil da proteína ocludina em modelos experimentais de CE, ainda não foi estudado.

A sintomatologia da CE é variável e está diretamente relacionada ao tempo decorrido desde o processo cirúrgico do estoma derivativo e à extensão da mucosa cólica excluída de trânsito. No início da enfermidade, o paciente pode evoluir assintomático, pois o comprometimento da mucosa é pequeno (Keli et al., 1997). Os doentes com maior tempo de evolução e comprometimento intestinal mais extenso são sintomáticos apresentando dor abdominal, tenesmo e eliminação de sangue e muco pelo segmento excluído. O aparecimento de estenoses colorretais, úlceras perianais e fístulas pode ocorrer mais raramente, sobretudo quando o reto é o segmento mais comprometido (Ona e Boger, 1985).

O diagnóstico da CE, na maioria dos casos, é realizado pela endoscopia e estudo histopatológico da mucosa excluída de trânsito. No entanto, o enema opaco com a técnica do duplo contraste, possibilita o diagnóstico de hiperplasia linfóide folicular, alteração encontrada na CE em mais de 80% dos doentes (Lechner et al., 1990). A endoscopia do segmento excluído de trânsito encontra-se alterado em até 90% dos portadores de CE apresentando mucosa cólica hiperemiada, congesta, edemaciada, friável, com nítido apagamento dos vasos sangüíneos da submucosa e sangramento espontâneo ao contato do endoscópio (Lechner et al., 1990). Na exacerbação da doença, evidencia-se a formação de lesões aftóides dificilmente distinguíveis pela avaliação endoscópica, daquelas encontradas na RCUI (Nobels et al., 1989; Geraghty e Charles, 1994).

É difícil a realização do diagnóstico de CE microscopicamente, pois os indivíduos com esta enfermidade mostram uma variedade de modificações histológicas sem nenhuma alteração característica (Geraghty e Talbot, 1991). Apresenta-se infiltrado inflamatório misto na mucosa do cólon excluído, predominantemente composto por neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilos, acompanhado ou não de distorções na

arquitetura das células epiteliais e, paradoxalmente, depleção das células caliciformes (Geraghty e Talbot, 1991; Pinto Júnior *et al.*, 2007). É possível encontrar algumas alterações histológicas mais características como os abscessos glandulares na base das criptas e áreas de hiperplasia linfóide nodular, considerada a alteração histológica mais característica (Murray *et al.*, 1987; Yeong *et al.*, 1991).

Apesar de serem descritas no epitélio do cólon excluído displasias de diferentes graus, o desenvolvimento de neoplasias de origem epitelial é extremamente raro nos doentes submetidos à cirurgias de desvio de trânsito por enfermidade não relacionadas às DII (Kissmeyer Nielsen *et al.*, 1994).

Estudos experimentais demonstram, em modelos de CE, que a exclusão do trânsito fecal, determina alterações histológicas na espessura das diferentes camadas da parede cólica (Biondo-Simões *et al.* 2000; Lopes-Paulo, 2002; Sousa *et al.*, 2008). Em experimento analisando a altura das criptas cólicas de ratos desprovidos de trânsito intestinal por seis e dezessete semanas encontraram redução significativa na mucosa cólica do segmento excluído de trânsito, que se intensifica com tempo de exclusão (Keli *et al.*, 1997). Em outra pesquisa experimental, Lopes-Paulo (2002), afirma estes resultados, com o auxílio de análise estereológica, encontrou redução significativa nos segmentos cólicos desprovidos de trânsito intestinal.

A possibilidade de que a deficiência dos AGCC tenha a capacidade de provocar lesão epitelial é confirmada pela formação de úlceras aftóides na mucosa cólica de segmentos desprovidos de trânsito fecal (Geraghty e Charles, 1994; Edwards *et al.*, 1999). Estas ulcerações quebram a barreira epitelial, facilitando a migração de antígenos intraluminais para o interior da camada submucosa (Lechner *et al.*, 1990). Na descrição inicial da CE, os autores encontraram ulcerações na mucosa intestinal em todos os doentes estudados, relacionando-as ao tempo de exclusão (Glotzer *et al.*, 1981) A presença de ulcerações no epitélio é uma alteração histológica encontrada na maioria dos casos publicados de CE (Nobels *et al.*, 1989; Yeong *et al.*, 1991; Geraghty e Talbot, 1991; Roe *et al.*, 1993; Geraghty e Charles, 1994; Lopes-Paulo, 2002).

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 (Keli *et al.*, 1997, Martinez *et al.*, 2008; Martinez, 2009; Nonose *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 tornando o padrão de expressão tecidual dos subtipos de mucinas ácidas potencial marcador histoquímico para o diagnóstico histológico de CE (Swidsinski *et al.*, 2007).

1.2. Modelos experimentais de colite de exclusão

Verifica-se, através de pesquisas bibliográficas, que existem vários modelos experimentais de CE realizados com diferentes técnicas e períodos de exclusão de trânsito intestinal com o objetivo de avaliar o desenvolvimento da doença.

Estudo realizado, utilizando ratos como animal de experimentação, realizou a derivação intestinal através da confecção de colostomia em dupla boca exteriorizada em uma única abertura na parede abdominal. Não descreve nenhum cuidado em relação ao emprego de preparo mecânico no segmento cólico excluído de trânsito. Sacrificaram os animais uma, duas, quatro e doze semanas após o procedimento. Utilizaram a análise estereológica para mensurar diferentes aspectos da parede cólica, comparando segmentos providos e desprovidos de trânsito nos diferentes períodos de exclusão fecal. Encontraram redução significativa da espessura da camada mucosa bem como de seu peso. Demonstraram redução no número de células da camada superficial por menor capacidade proliferativa das células da base das criptas (Kissmeyer-Nielsen *et al.*, 1994).

Em estudo, Keli *et al.* (1997) utilizando o rato como modelo experimental, realizaram a derivação intestinal pela confecção de colostomia no cólon sigmóide proximal e a exteriorização do cólon distal como fístula mucosa. Os autores preferiram utilizar este tipo de procedimento, pois acreditavam que ele assegurava maior eficácia na exclusão fecal. Não descreveram qualquer cuidado tomado em relação à limpeza mecânica do segmento distal excluído. Sacrificaram os animais imediatamente, seis e

dezessete semanas após a operação. Não encontraram modificações na população de células caliciformes comparando segmentos com e sem trânsito intestinal.

Com o propósito de criar um modelo experimental de CE, Pinto Júnior *et al.* (2007), dividiram 65 ratos em 13 grupos experimentais segundo a data do sacrifício. Também não descreveram qualquer cuidado tomado em relação ao preparo mecânico do cólon excluso. Realizaram a derivação intestinal pela técnica de Hartmann. Encontraram redução estatisticamente significativa da espessura da mucosa cólica a partir do 40º pós-operatório. Concluíram que a colostomia desfuncionalizante realizada em ratos reproduz alterações histopatológicas compatíveis com a CE, e que estas alterações eram reversíveis após a reconstrução do trânsito intestinal.

Também utilizando o rato como animal de experimentação, Biondo-Simões *et al.* (2000), realizaram a derivação do trânsito fecal no cólon esquerdo, através da operação de Hartmann. Não tomaram qualquer cuidado com relação à limpeza mecânica do cólon excluso. Sacrificaram os animais após uma, duas, quatro e oito semanas após a derivação intestinal. Avaliaram as alterações histológicas da parede cólica, comparando segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal pela técnica da hematoxilina-eosina (HE). Mensuraram a quantidade de colágeno tecidual por morfometria computadorizada através da técnica do sirius-red e o número de células caliciformes pela técnica do Periódico Ácido de Schiff (PAS) e Alcian Blue (AB).

Encontraram redução da espessura das criptas cólicas e redução no conteúdo de colágeno tecidual nos segmentos sem trânsito fecal, mostrando menor capacidade do cólon excluso em sintetizar colágeno. Quando analisaram a população de células caliciformes pela técnica do PAS-AB (mucinas neutras + mucinas ácidas), não encontraram diferenças comparando segmentos providos e desprovidos de trânsito. Contudo, quando analisaram o número de células caliciformes produtoras de mucinas ácidas pela técnica do AB encontraram menor população nos segmentos desprovidos de trânsito relacionado à redução ao tempo de exclusão.

Lopes-Paulo (2002) realizou, em ratos, a derivação fecal através da confecção de colostomia em alça no cólon esquerdo. Da mesma forma, o autor não descreveu qualquer método de preparo mecânico no segmento intestinal excluso de trânsito.

Sacrificou os animais imediatamente e após quatro semanas da intervenção cirúrgica. Com o emprego de análise estereológica verificou redução significativa da espessura das criptas cólicas e do volume parcial da mucosa, entretanto não quantificou a população de células caliciformes.

Margarido *et al.* propuseram em 2003, um novo modelo experimental de CE onde preconizavam, de maneira rotineira, o preparo mecânico do segmento cólico a ser excluído de trânsito. Os autores chamavam a atenção, pela primeira vez, para a necessidade de eliminar todo o conteúdo fecal do segmento excluído de trânsito como etapa fundamental para a adequada interpretação das alterações histológicas encontradas em modelos experimentais de CE.

Com o objetivo de validar esse novo modelo experimental de CE, Nasri *et al.*, (2003) confirmaram a necessidade de realizar o preparo mecânico do cólon a ser excluído de trânsito. Os autores ressaltaram que a omissão desse cuidado, não permite assegurar que o cólon distal fique completamente livre de resíduos fecais, o que pode interferir no desenvolvimento da CE pela manutenção de um substrato fecal, rico em AGCC, nutrindo a mucosa cólica do segmento excluído de trânsito.

Pinto-Júnior *et al.* (2007), com o objetivo de avaliar a translocação bacteriana em segmentos excluídos de trânsito fecal, utilizaram o rato como animal de experimentação. Realizaram a derivação intestinal por meio de colostomia terminal no cólon proximal e fechamento do coto distal do cólon. Descreveram o emprego de preparo mecânico antes da realização da colostomia através da infusão de solução salina pelo ânus. Dividiram os animais em quatro grupos experimentais segundo o tipo de intervenção realizada no segmento excluído de trânsito (infusão retal de solução salina e soluções com concentrações crescentes de *Escherichia coli*). Concluíram que a derivação intestinal determina alterações importantes na função de barreira exercida pelo epitélio cólico sem, contudo, relacionar-se a maior possibilidade de translocação bacteriana.

Nasri *et al.* (2008) avaliaram a influência da infusão de soluções ricas em AGCC nas alterações histológicas da parede cólica em modelo experimental de CE. Utilizaram o rato como modelo experimental e realizaram a derivação intestinal por meio de colostomia proximal terminal e fístula mucosa distal. Dividiram trinta animais, em três

grupos experimentais, segundo a irrigação ter sido realizada pela instilação de solução salina a 0,9% (grupo controle), solução de glicose a 50% e solução de AGCC (butirato, acetato e propionato na proporção 3:2:1). Utilizaram de maneira rotineira o preparo mecânico anterógrado do cólon a ser excluído de trânsito, através da infusão de soro fisiológico pela fístula mucosa distal. Os enemas com as soluções de intervenção foram realizados no quarto, oitavo, 12º, 16º e 20º pós-operatório. Sacrificaram todos os animais no 21º pós-operatório. Encontraram significativa redução na altura das criptas cólicas, entretanto a atrofia era menor nos animais tratados com soluções de AGCC quando comparados aos tratados com glicose hipertônica. Verificaram menor congestão vascular e infiltrado inflamatório nos animais tratados com AGCC. Destacaram a importância dos AGCC na melhoria das alterações encontradas na superfície epitelial da mucosa cólica com CE.

Sousa *et al.* (2008) mensuraram por morfometria computadorizada as alterações na espessura das diferentes camadas da parede cólica, congestão vascular, infiltrado celular segundo escala de inflamação, e presença de células calciformes em modelo experimental de CE. Realizaram a derivação intestinal do cólon esquerdo por colostomia proximal terminal e fístula mucosa distal. Utilizaram de maneira rotineira o preparo mecânico anterógrado do cólon excluído pela fístula mucosa distal com infusão de solução salina a 0,9% na temperatura de 37°C. Dividiram os animais em três grupos experimentais segundo o sacrifício ter sido realizado seis, doze e dezoito semanas após a operação. Constataram que a população de células calciformes no segmento desprovidos de trânsito aumentava com o decorrer do tempo de exclusão, porém não utilizaram qualquer técnica histoquímica para avaliar o padrão expressão de mucinas nessas células.

A maioria dos estudos pesquisados não utilizou o preparo mecânico no segmento a ser excluído de trânsito o que também poderia modificar os resultados encontrados.

1.3. Junção de oclusão

A matriz extracelular representa uma rede complexa de macromoléculas extracelulares em contato com as células de um tecido, com a função de manter células e tecidos unidos. Frequentemente as células de um tecido são mantidas em um determinado local por adesão direta célula-célula (Alberts *et al.* 2004).

Existem quatro tipos de junções, as junções de aderência, as junções de oclusão ou junções *tight*, as junções comunicantes ou junções *gap* e desmossomos. Estas são especializadas e permitem que as camadas epiteliais, que revestem todas as cavidades e superfícies livres do corpo, formem barreiras de trânsito de água, solutos e células de um compartimento para outro. As junções intercelulares são consideradas como elementos de arquitetura responsáveis por unir células adjacentes e ancorá-las aos elementos do citoesqueleto (Alberts *et al.*, 2004).

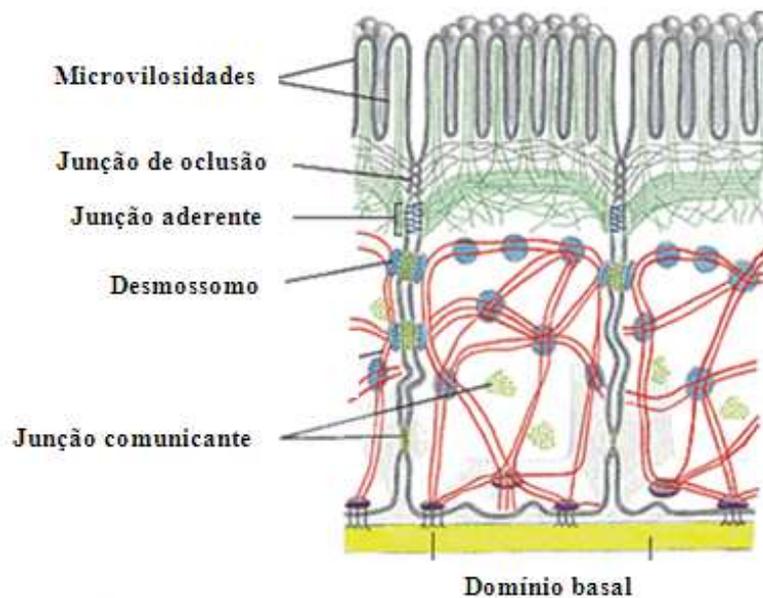


Figura 1 - Junções intercelulares. Modificado de www.sobiologia.com.br, 2010.

Segundo Feldman *et al.* (2005) as junções de oclusão têm como função proteger as células epiteliais adjacentes ajudando sua superfície apical, controlando a passagem de íons, água e outras moléculas entre células, conseqüentemente mantêm a polaridade dessas células.

As junções oclusivas estão presentes na membrana plasmática, formando uma barreira regulada e semipermeável no espaço paracelular, ou seja, nos espaços entre as células epiteliais e endoteliais. Atuam também como barreiras delimitando as diferentes composições dos domínios apical e basolateral da membrana plasmática (Stevenson, 1999).

Divide-se os componentes que constituem as junções oclusivas em três grupos; o primeiro grupo é representado pelas proteínas completas que ultrapassam o espaço intercelular apical que regulam a permeabilidade da barreira. O segundo grupo é composto por placas de proteínas, algumas das quais expressam domínios PDZ que servem como ligantes entre as proteínas completas e a actina do citoesqueleto e para o recrutamento de moléculas do citosol envolvidas no mecanismo de sinalização celular. E finalmente o terceiro grupo é representado por um misto de proteínas nucleares e citosólicas, que interagem direta ou indiretamente com as placas de proteínas para coordenar diversas funções, tais como a regulação da permeabilidade paracelular de solutos, proliferação celular, polaridade celular e supressão tumoral (Stchneeberger e Lynch, 2004).

As duas principais proteínas completas encontradas são as ocludinas e claudinas, cada uma composta por quatro alfa-hélices (Stevenson, 1999).

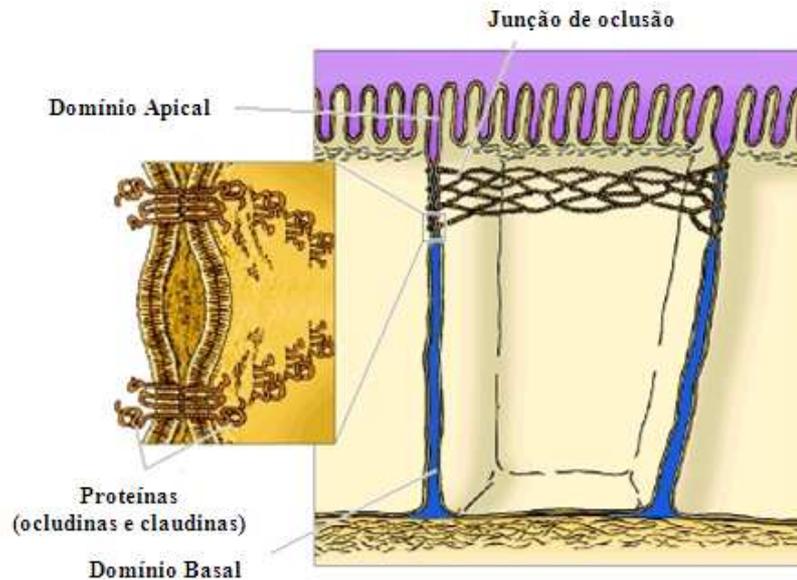


Figura 2 - Proteínas completas da junção de oclusão (occludina e claudina). Modificado de edithcruzmembrana.blogspot.com.br, 2010.

Durante a neoplasia, as junções de oclusão estão normalmente desordenadas, pouco reguladas ou ausentes. O processo iniciará muito precocemente na progressão da doença, podendo contribuir com o diagnóstico, prognóstico e mecanismos de desenvolvimento do tumor. O déficit da função da barreira está diretamente ligado ao desenvolvimento e estabelecimento de tumores epiteliais. Dependendo da proteína da junção oclusiva e do tecido que a neoplasia originou, pode ocorrer aumento da regulação, baixa da regulação ou mudança. Portanto, o processo de desordem, pouca regulação ou ausência não pode ser extrapolado para a generalização quando se trata de proteínas oclusivas específicas (Tobioka *et al.* 2004).

1.3.1. Ocludina

A proteína ocludina possui quatro domínios transmembrânicos, dois *loops* extracelulares de tamanhos iguais e três domínios intracitoplasmáticos. Os domínios extracelulares das fileiras de proteína de ocludina formam ligações estreitas com a célula adjacente, unindo as células e criando uma superfície impermeável. O domínio carboxi-terminal da ocludina é limitado por um grande grupo de proteínas citosólicas, que são limitadas por outras proteínas no citoesqueleto e as fibras de actina. Estas interações estabilizam a ligação entre as moléculas de ocludina que é essencial para a integridade da junção oclusiva (Stevenson, 1999; Feldman et al. 2005).

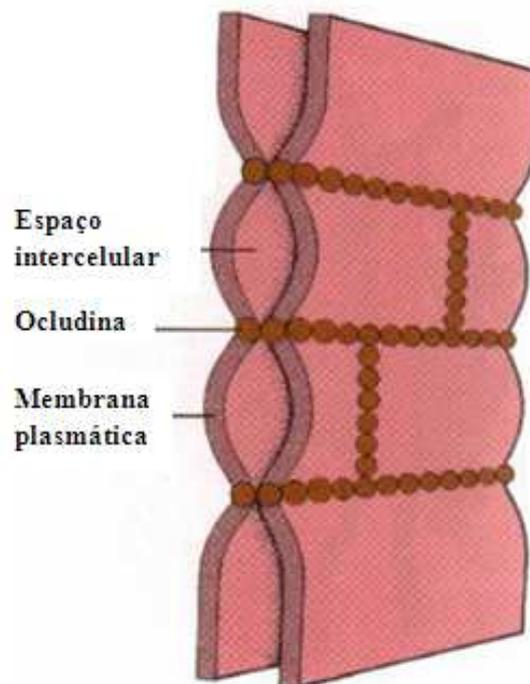


Figura 3 - Proteína ocludina. Disponível em refuerzabiologia.blogspot.com.br.

A ocludina não tem função apenas estrutural, esta proteína tem atuação importante como componente funcional das junções oclusivas e está estreitamente

ligada na formação da barreira de permeabilidade paracelular (Balda et al., 1996; Furuse et al., 1996).

O número de junções oclusivas nos vários tipos de células, geralmente, está diretamente relacionado com o nível de expressão de ocludina. As mudanças nas funções fisiológicas das junções oclusivas são associadas com as transformações na expressão e localização da proteína ocludina. Portanto, a ocludina é considerada um marcador imunoistoquímico fidedigno de junção de oclusão (Balda et al., 1996; Hirase et al., 1997; Tobioka et al., 2004).

A função de barreira da ocludina e de outras junções oclusivas está danificada em vários estados patológicos, como infecções por bactérias e vírus, processos alérgicos e tóxicos, hiperestimulação imune, processos inflamatórios, diabetes e neoplásicas. Tem sido realizados estudos com o objetivo de estabelecer a expressão tecidual das ocludinas em diferentes tipos de neoplasias (Tobioka et al., 2004).

A baixa regulação da expressão de proteínas de junções oclusivas é geralmente observada em tumores de origem epitelial. Tobioka et al. (2004) identificaram que a expressão de ocludina diminuiu sistematicamente com o aumento do grau de indiferenciação de carcinomas endometriais humanos. Em outra pesquisa realizada por Kimura et al. (1997), demonstraram que a expressão da ocludina era reduzida em adenocarcinomas pouco diferenciados do trato gastrointestinal.

Pesquisas sobre a importância e a expressão das proteínas relacionadas às junções oclusivas tem sido realizadas principalmente em alterações neoplásicas de vários epitélios, ressaltando-se o epitélio gastrointestinal (Tokunaga et al., 2004).

O presente estudo é inédito quando demonstra o padrão de expressão e conteúdo tecidual da proteína ocludina na mucosa cólica de ratos com e sem trânsito intestinal.

2. OBJETIVOS

- 1) Avaliar o conteúdo tecidual de ocludina, comparando a mucosa cólica de segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal;
- 2) Avaliar se há modificações no local de expressão da proteína ocludina nas criptas da mucosa cólica comparando os segmentos com e sem trânsito intestinal;
- 3) Verificar a influência do tempo de exclusão de trânsito fecal na quantidade tecidual de ocludina em segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito intestinal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

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 (Anexo 1).

3.1. Animal de experimentação

Foram utilizados 45 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, SPF, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP), com peso variando entre 300 a 320g e média de idade de quatro meses.

3.2. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais constituídos de quinze (15) animais, divididos segundo a data do sacrifício ser realizado em seis (06) semanas, doze (12) semanas e dezoito (18) semanas. Em cada grupo, com 15 animais, realizou-se a derivação do trânsito intestinal (grupo experimento).

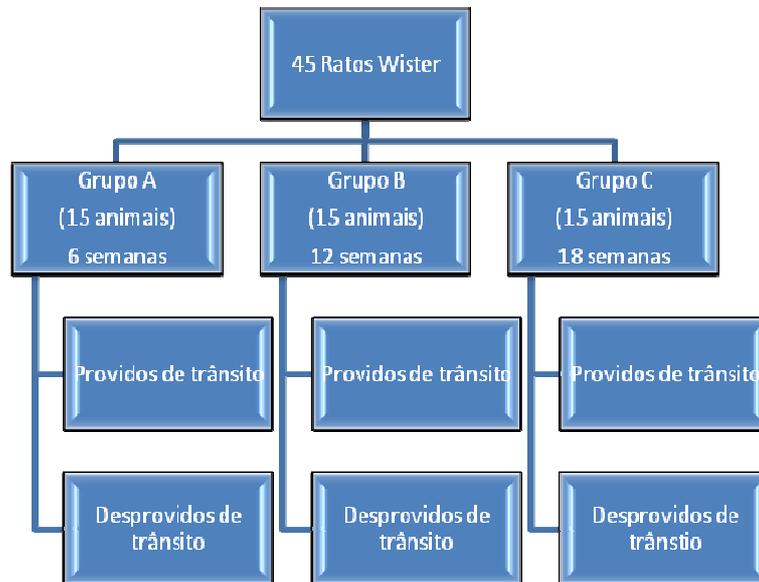


Figura 4 - Organograma dos grupos experimentais.

3.3. Etapa pré-operatória

Durante o período de vigilância epidemiológica (sete dias) todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais permanecendo em ambiente climatizado, com controle de temperatura, luminosidade e ruídos. Foram pesados e no dia anterior ao procedimento cirúrgico mantidos em jejum, exceto água, por 24 h. As gaiolas individuais foram identificadas pelo número do animal, grupo e subgrupo experimental aos quais pertenciam. Estes mesmos números foram tatuados na cauda de cada animal.

3.4. Anestesia

No dia da intervenção, os animais foram pesados e anestesiados com o emprego de cloridrato de xilazina 2% (Anasedan®)¹ + cloridrato de quetamina (Dopalen®)¹ na dose de 0,1ml/100g, administradas por via intra-muscular na perna traseira esquerda.

¹ Agribrands do Brasil Ltda. Brasil

3.5. Técnica operatória

Depois de anestesiados, os animais foram restringidos em mesa cirúrgica, em decúbito dorsal horizontal, realizando-se tricotomia abdominal e anti-sepsia com polivinil pirrolidona-iodo. A cavidade abdominal foi acessada por incisão longitudinal mediana com três centímetros de extensão, sendo identificada a placa de Peyer (Figura 5). Com o auxílio de paquímetro e, após ligadura dos vasos da arcada cólica marginal (Figura 6), seccionou-se o cólon três centímetros acima da placa de Peyer. Após remoção do conteúdo fecal eventualmente presente, o segmento proximal do cólon seccionado foi exteriorizado, como colostomia terminal, através de incisão circular, com três milímetros de diâmetro, realizada no hipocôndrio esquerdo. A fixação da colostomia foi realizada com o emprego de pontos separados de fio absorvível monofilamentar 4-0 (Monocryl®)² nos quatro pontos cardinais e entre eles, sempre amarrados com três nós.

Terminada a confecção da colostomia proximal, o segmento distal do intestino grosso seccionado foi cateterizado com sonda de polivinil 12 F, fixada por ligadura frouxa, e irrigado com 40ml de soro fisiológico 0,9% (Figura 7), até que o efluente drenado pelo ânus do animal não apresentasse mais saída de material fecal. Concluída a irrigação, o cateter foi removido e o cólon distal exteriorizado como colostomia (fístula mucosa distal) na face lateral inferior esquerda da parede abdominal (Figura 8). A fixação da colostomia distal foi realizada com a mesma técnica utilizada para a colostomia proximal. A parede abdominal foi fechada em dois planos de sutura: peritônio e aponeurose com pontos contínuos de fio de ácido poliglicólico 4-0 (Vicryl®)³ e a pele com pontos separados de nylon 4-0 (Mononylon®)³.

² Ethicon, Inc. Somerville, NJ, USA.

³ Ethicon, Inc. Somerville, NJ, USA

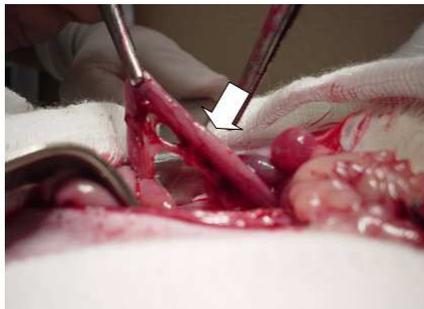


Figura 5 - Identificação da placa de Peyer (seta) como reparo anatômico.

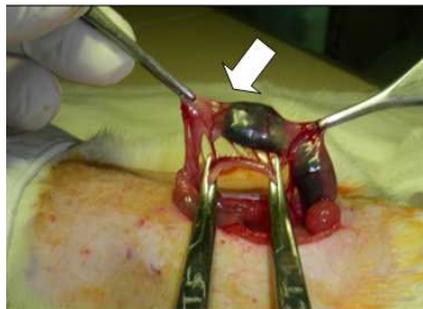


Figura 6 - Ligadura da artéria marginal no ponto de secção do cólon.

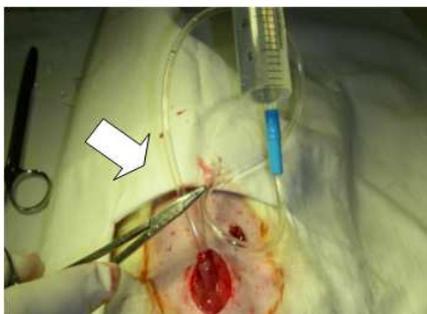


Figura 7 - Limpeza mecânica anterógrada do cólon excluído de trânsito fecal.



Figura 8 - Aspecto final da parede abdominal após confecção de estomas.

Fonte: Fotos da técnica operatória retiradas de Souza, *et. al.*, 2008.

3.6. Pós-operatório

Concluída a operação, os animais foram mantidos por 10 minutos sob lâmpada aquecida, e após recuperação anestésica, alojados em gaiolas individuais, sendo liberados para ingestão de água e ração padronizada (Nuvilab CR1®)⁴, após terem recuperado completamente o estado de vigília. Os ratos foram mantidos em gaiolas

⁴ NuVital Nutrientes SA, São Paulo, Brasil.

individuais até a data do sacrifício, permanecendo nas mesmas condições ambientais do período de vigilância epidemiológica, não tendo sido tomado nenhum cuidado adicional em relação à ferida operatória e ao estoma confeccionado. Todos os dados de acompanhamento pós-operatório (aceitação da dieta, aspecto da ferida cirúrgica, aspecto da colostomia, peso, características das evacuações) foram anotados em planilhas previamente elaboradas.

3.7. Sacrifício dos animais

Na véspera do dia programado para o sacrifício os animais foram novamente pesados e mantidos em jejum por 24 h, exceto para água. Foram anestesiados, com a mesma técnica anteriormente descrita, e submetidos à laparotomia mediana, que se prolongava até o apêndice xifóide, com abertura da cavidade por planos. Após liberação de aderências eventualmente presentes, o cólon provido e todo o segmento caudal do cólon desprovido de trânsito fecal incluindo o ânus, foram removidos em monobloco.

Os segmentos de cólon removidos foram abertos longitudinalmente pela borda anti-mesocólica e lavados com soro fisiológico a 0,9% para remoção de detritos fecais presentes. Foram removidos dois fragmentos da parede cólica, medindo cada um deles 30 mm de extensão, e interessando toda a circunferência da parede cólica, sendo um fragmento do cólon provido e outro do cólon desprovido de trânsito intestinal. No segmento provido de trânsito foram colhidos dois centímetros a partir da face interna do estoma. Nos segmentos sem trânsito foram colhidos, um centímetro abaixo da face interna do estoma e um centímetro acima do ânus.

3.8. Confeção dos blocos de parafina e lâminas

Após o período de fixação os espécimes, foram processados em cinco banhos de álcool absoluto durando uma hora cada banho. Em seguida, foram submetidos a três banhos sucessivos de xilol durando uma hora cada. Terminada esta etapa foram submetidos a três banhos de parafina durando uma hora cada banho à temperatura constante de 60°C. Terminada a impregnação pela parafina os espécimes foram incluídos em blocos e submetidos a cortes histológicos com 5 µ de espessura cada corte.

Para a confecção das lâminas, independente da técnica de coloração, os cortes foram desparafinados em dois banhos sucessivos de xilol, durando dez minutos cada banho. A seguir foram alcoolizados em três banhos sucessivos de álcool absoluto e hidratados com água destilada. Todas as lâminas foram confeccionadas por um mesmo técnico e analisadas com microscópio óptico comum (Nikon Eclipse DS-50) com magnificação final de 200 x, por três observadores da área de estudo que desconheciam os objetivos do estudo.

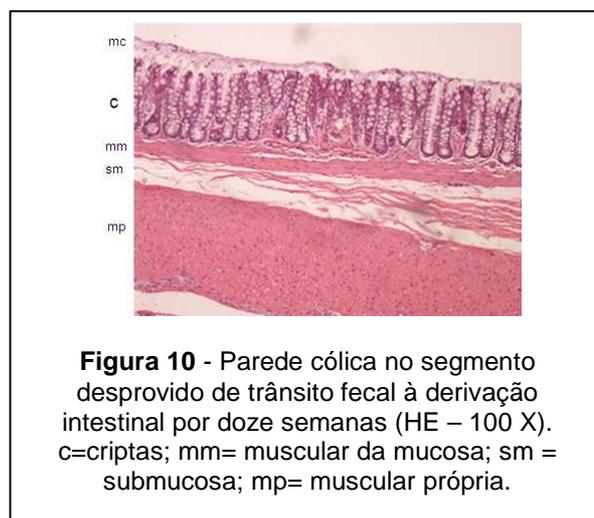
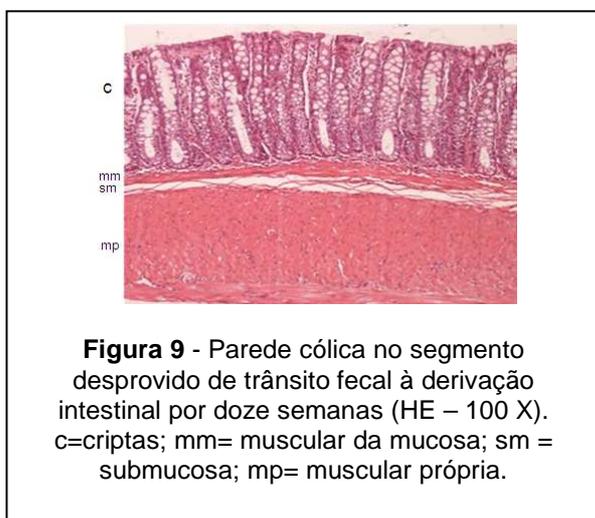
3.9. Técnicas de coloração

As lâminas obtidas dos animais (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal) foram submetidas a técnicas de coloração com hematoxilina-eosina (HE).

Para a realização da técnica da HE as lâminas após terem sido desparafinadas em dois banhos sucessivos de xilol, durando dez minutos cada banho, foram alcoolizadas em três banhos sucessivos de álcool absoluto e hidratadas com água destilada. A seguir, foram expostas a hematoxilina de Harris filtrada em temperatura ambiente por um minuto. Após a exposição à hematoxilina de Harris foram submetidas à lavagem contínua e cuidadosa com água corrente e, posteriormente água destilada

por três minutos cada etapa e expostas ao corante eosina por dois minutos a temperatura ambiente. A seguir foram inicialmente lavadas em água corrente e posteriormente em água destilada por mais dois minutos. Terminada esta etapa foram desidratadas em três banhos sucessivos de álcool absoluto, e diafanizadas em xilol. Terminada a diafanização, as lâminas foram montadas com resina e lamínulas.

As Figuras 9 e 10 mostram a parede cólica em segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal em animais submetidos à derivação intestinal por 12 semanas.



Fonte: Fotos de coloração retiradas de Souza, *et. al.*, 2008.

3.10. Técnica imunoistoquímica (Ocludina)

Para realização da técnica imunoistoquímica para pesquisa da proteína ocludina nos blocos previamente confeccionados, foram realizados cortes histológicos, com 5 μ de espessura em todas as amostras colhidas dos animais do grupo experimento (segmentos com e sem o fluxo fecal) nos três períodos de exclusão propostos. Os cortes foram dispostos em lâminas com margens foscas previamente identificadas com o grupo experimental, subgrupo, número do animal e local do cólon de onde o

fragmento tinha sido removido. As lâminas foram desparafinadas, reidratadas em álcool em concentrações decrescentes (absoluto, 95%, 80% e 50%) e lavadas em água destilada. Depois da lavagem, as lâminas foram submersas em tampão fosfato (PBS) (0,05 M, pH 7,2) por 10 minutos e secas com papel filtro. Realizou-se bloqueio da atividade de peroxidases endógenas com H₂O₂ a 3% em câmara umidificada, à temperatura ambiente por 10 minutos, seguida por outra lavagem com PBS por mais 10 minutos. Realizou-se a recuperação antigênica em recipientes especiais contendo citrato de sódio 10 mM (pH 6,0) em um banho de água a 95°C por 45 minutos. A seguir, as lâminas foram deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos e, novamente, lavadas em PBS por cinco minutos. Para a avaliação da expressão tecidual da ocludina utilizou-se anticorpo primário policlonal ocludina diluído à 1:100 em albumina bovina. As lâminas foram cobertas com 100 µL das solução contendo os anticorpos primários e mantidas em refrigeração a 4°C por 24 h. Concluída esta etapa foram então lavadas com PBS, incubadas com anticorpo secundário e submetidas ao complexo de coloração estreptavidina-biotina-peroxidase por 45 minutos, preparado com uma diluição de 1:100 em PBS. As lâminas foram desenvolvidas usando preparação recém preparada contendo tetrahidrocloreto diaminobenzidina (DAB, 10 mg em 10 mL de PBS com 3 mL H₂O₂), que foi gotejada sobre as lâminas e incubada por três minutos. Finda a contra coloração, foram desidratadas por imersão em soluções crescentes de etanol (50%, 80%, 95% e 100%) e xileno. Finalmente, as lâminas foram montadas, rotuladas e mantidas em posição horizontal por 24 h.

A imunocoloração foi considerada positiva quando se detectava coloração acastanhada difusamente presente, com pontos de intensidade variável e distribuição homogênea na membrana apical, basolateral ou citoplasma das células. Como recomenda o fabricante, o controle negativo para a imunocoloração foi realizado sem a adição do anticorpo primário e o positivo em tecido de cólon humano, sabidamente positivo para as proteínas.

3.11. Avaliação histológica

A análise das lâminas foi feita com microscópio óptico comum, Nikon Eclipse DS50, com magnificação final de 200 x, por patologista experiente em doenças colorretais e técnicas imunoistoquímicas e que desconhecia a origem do material e os objetivos do estudo. A documentação fotográfica das lâminas selecionadas foram feitas com câmera de vídeo-captura (DS-Fi-50), acoplada ao microscópio trinocular. As imagens capturadas foram, posteriormente, digitalizadas e armazenadas no computador.

3.12. Análise da expressão tecidual de ocludina

A expressão da proteína foi avaliada segundo o local e o conteúdo da imunocoloração. Inicialmente, consideramos o local onde ocorria a expressão das proteínas, ao longo das criptas cólicas (ápice ou base) classificando a intensidade da imunocoloração, em cada um dos locais, em cruces (+ a +++). O padrão de expressão tecidual final adotado para cada lâmina foi à mediana encontrada, após leitura de três campos diferentes que apresentassem pelo menos três criptas íntegras e contíguas. A graduação em cruces foi feita por três observadores independentes e os resultados conflitantes foram posteriormente analisados em conjunto. Nenhum deles conhecia o local do cólon de onde o material havia sido removido nem a proteína estudada.

3.13. Método estatístico

Os resultados foram sempre descritos pelo valor médio com respectivo desvio padrão. Adotamos sempre nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Utilizamos o teste de *Mann-Whitney* para analisar o conteúdo de ocludina, comparando animais do grupo

experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal). Utilizamos o teste não paramétrico de *Willcoxon* para comparar a intensidade de expressão da proteína ocludina nas regiões apical e basal das criptas cólicas nos grupos controle e experimento (segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito), nos diferentes tempos de exclusão. Empregamos o teste de *Kruskal-Wallis* e o pós-teste de *Student-Neuman-Keus* para análise de variância com relação ao tempo de exclusão do trânsito e as variações da expressão da proteína ocludina entre as regiões apicais e basais. Para o estudo estatístico utilizamos o programa SPSS (versão 13.0).

4. RESULTADOS

4.1. Expressão e conteúdo tecidual de ocludina

As Figuras 11 e 12 mostram a parede cólica em segmento provido e desprovido de trânsito em animal submetido à exclusão fecal por seis semanas. Na Figura 12, segmentos cólicos desprovidos de trânsito intestinal, observa-se uma irregularidade/atrofia das criptas cólicas e uma ruptura da camada muscular da mucosa.

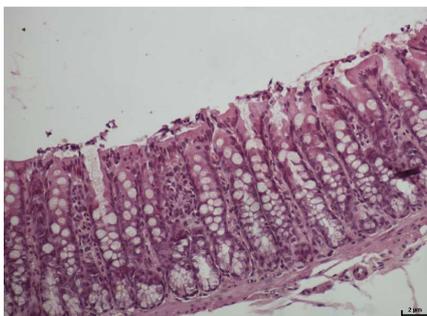


Figura 11 - Parede do cólon provido de trânsito intestinal, seis semanas. (HE - 200 x)

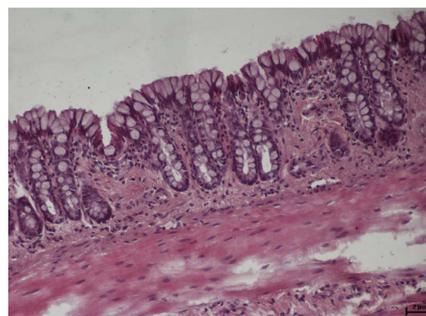


Figura 12 - Parede do cólon desprovido de trânsito intestinal, seis semanas. (HE - 200 x)

As Figuras 13 e 14 mostram que a expressão tecidual da proteína ocludina é menor no fundo das criptas do cólon provido e desprovido de trânsito intestinal do grupo de doze semanas do que no ápice. Observa-se também que a expressão da ocludina no ápice das criptas providas de trânsito intestinal é significativamente maior quando comparada com o ápice do segmento desprovido de trânsito intestinal.

As Figuras 15 e 16 mostram que a expressão tecidual da proteína ocludina é menor no fundo das criptas do cólon provido e desprovido de trânsito intestinal do grupo de dezoito semanas do que no ápice. Verificando-se então, que a expressão tecidual da proteína ocludina é maior na região apical dos segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal independente do tempo de exclusão. Na Figura 16, segmento cólico desprovido de trânsito intestinal, observa-se também um frangeamento das criptas.

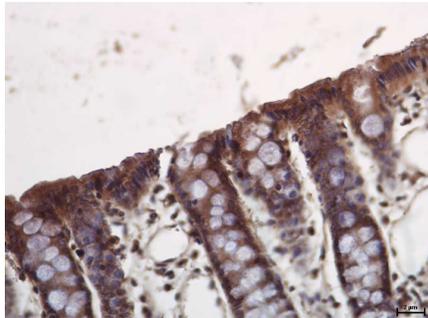


Figura 13 - Parede do cólon provido de trânsito intestinal, doze semanas. (200 x)

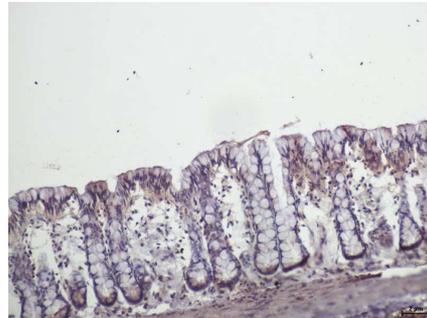


Figura 14 - Parede do cólon desprovido de trânsito intestinal, doze semanas. (200 x)

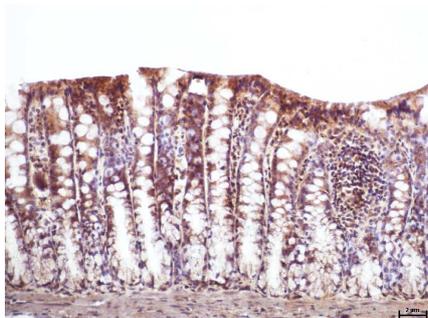


Figura 15 - Parede do cólon provido de trânsito intestinal, dezoito semanas. (200 x)

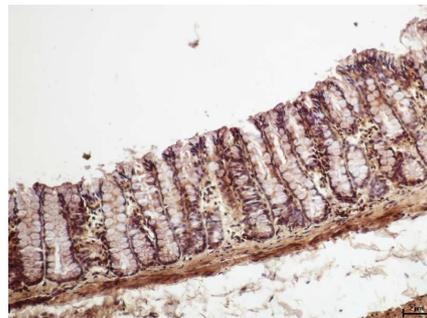


Figura 16 - Parede do cólon desprovido de trânsito intestinal, dezoito semanas. (200 x)

4.2. Intensidade de expressão da ocludina segundo o local da cripta cólica

A Figura 17 mostra em média a comparação da intensidade da expressão da proteína ocludina entre as regiões apicais e fundos das criptas da mucosa cólica nos segmentos providos de trânsito intestinal nos grupos de seis (6), doze (12) e dezoito (18) semanas com os respectivos desvios-padrão, sempre considerando a análise de três observadores. Constatou-se através do teste não paramétrico de Willcoxon que o conteúdo de ocludina é significativamente menor no fundo das criptas no cólon provido de trânsito intestinal em todos os tempos de exclusão considerados ($p < 0,0001$).

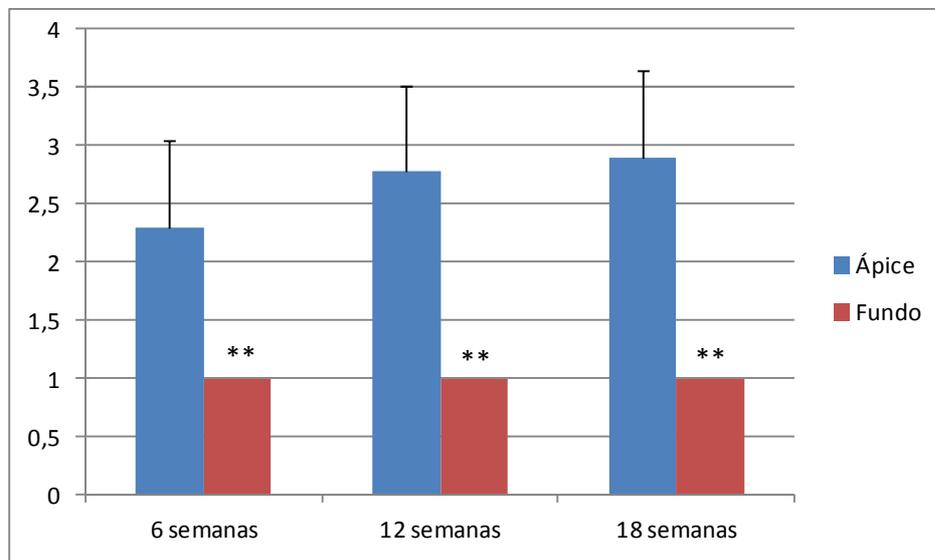


Figura 17 – Expressão de proteína ocludina no fundo da cripta cólica privada de trânsito intestinal nos grupos de seis, doze e dezoito semanas < Ápice da cripta cólica privada de trânsito nos mesmos grupos ($p < 0,0001$)**. Teste Willcoxon.

A Figura 18 mostra em média a comparação da intensidade da expressão da proteína ocludina entre as regiões apicais e fundos das criptas da mucosa cólica nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal nos grupos de seis (6), doze (12) e dezoito (18) semanas com os respectivos desvios-padrão, sempre considerando a análise de três observadores. Constatou-se através do teste não paramétrico de Willcoxon que o conteúdo de ocludina é significativamente menor no fundo das criptas no cólon desprovido de trânsito intestinal em todos os tempos de exclusão considerados ($p < 0,0001$).

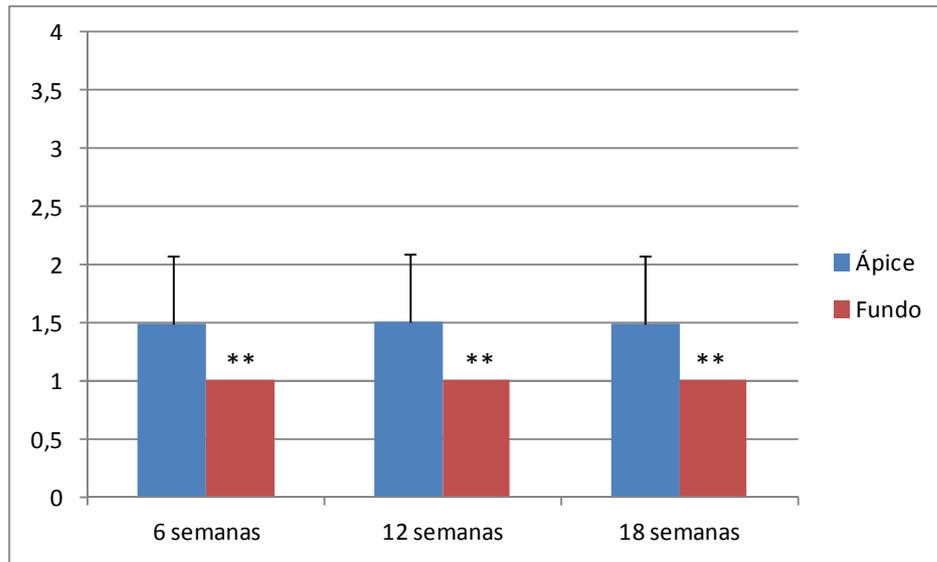


Figura 18 – Expressão de proteína ocludina no fundo da cripta cólica desprovida de trânsito intestinal nos grupos de seis, doze e dezoito semanas < Ápice da cripta cólica desprovida de trânsito nos mesmos grupos ($p < 0,0001$)**. Teste Willcoxon.

A Figura 19 mostra em média a comparação da intensidade da expressão da proteína ocludina entre as regiões apicais das criptas da mucosa cólica nos segmentos providos de trânsito intestinal e as regiões apicais dos segmentos desprovidos nos grupos de seis (6), doze (12) e dezoito (18) semanas com os respectivos desvios-padrão, sempre considerando a análise de três observadores. Constatou-se através do teste não paramétrico de Mann-Whitney que o conteúdo de ocludina é significativamente menor no ápice das criptas no cólon desprovido de trânsito intestinal em todos os tempos de exclusão considerados ($p < 0,0001$). Não existe diferença do conteúdo de ocludina no fundo das criptas com e sem trânsito nos animais de seis, doze e dezoito semanas.

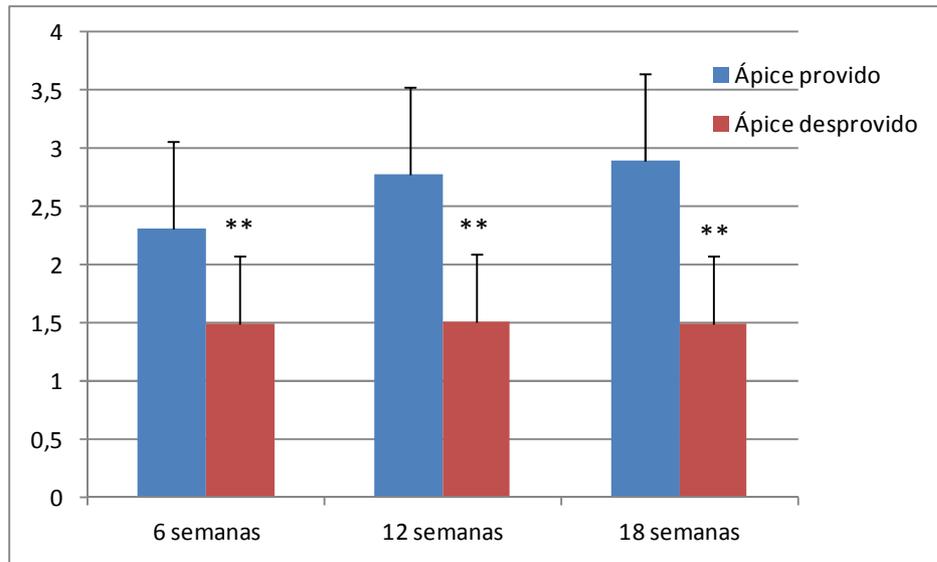


Figura 19 – Expressão de proteína ocludina no ápice da cripta cólica desprovida e provida de trânsito intestinal nos grupos de seis, doze e dezoito semanas < Ápice da cripta cólica provida de trânsito nos mesmos grupos ($p < 0,0001$)**. Teste Mann-Whitney

4.3. Variações segundo o tempo de exclusão

A Tabela 1 mostra a significância da variação do conteúdo total de ocludina na mucosa do cólon com trânsito intestinal, em relação aos tempos propostos. A análise realizada pelo teste Kruskal-Wallis mostrou que existe variação no conteúdo da ocludina no ápice das criptas do cólon provido de trânsito em relação ao tempo de exclusão ($p = 0,0019$). O pós-teste de Student-Neuman-Keuls mostra que esta variação ocorre entre a sexta e décima segunda semana, estabilizando a partir de então. Não existe variação do conteúdo de ocludina no fundo das criptas nos cólons providos de trânsito e também não há variação no conteúdo da proteína no ápice e fundo das criptas do cólon desprovidos de trânsito intestinal.

Tabela 1 – Resumo de significância da variação dos valores médios para o conteúdo de ocludina, no cólon provido de trânsito intestinal.

	6 e 12 semanas	6 e 18 semanas	12 e 18 semanas
Ápice	Sim (p=0,0107)	Sim (p=0,0024)	Não (p=0,3763)
Fundo	Não	Não	Não

5. DISCUSSÃO

Anteriormente, já tínhamos estudado, modelos experimentais de colite de exclusão (CE), as principais alterações nas diferentes camadas da parede intestinal, comparando segmentos com e sem trânsito fecal. Em pesquisa realizada por Souza *et al.* (2008), encontraram atrofia das criptas intestinais, com formação de úlceras epiteliais que se encontravam relacionadas ao tempo de exclusão, além de infiltrado neutrofílico, congestão vascular, edema e focos de hiperplasia nodular linfóide, aspectos histológicos comuns na CE. No presente estudo, confirmamos esses achados.

Para que ocorra o desenvolvimento da colite é necessária à ruptura da barreira funcional. A maior evidência da necessidade de violação da barreira epitelial para o desenvolvimento da colite foi demonstrada pelos modelos experimentais de colite quimicamente induzida. Nesses modelos, a translocação bacteriana e a consequente resposta imune ocorrem após induzir-se a lesão da camada epitelial, de forma artificial, pela aplicação de agentes químicos tóxicos. Demonstrou-se, em modelo animal de CE, que é possível infringir danos à barreira funcional, sem o emprego de substâncias químicas, apenas alterando o metabolismo energético das células epiteliais (Martinez, 2009; Nonose, 2009; Nonose *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2010).

Há oito anos, estudos em modelo experimental de CE avaliaram a possibilidade de que o estresse oxidativo, provocado pela maior produção de RLO poderia ser responsabilizado pelo dano às diferentes linhas de defesa do epitélio cólico. Esse interesse foi despertado pela teoria de indução das colites por radicais livres (Pravda, 2005).

Ao avaliarmos a primeira linha de defesa da barreira epitelial também encontramos, assim como ocorre em outras formas de colite, redução da produção de mucinas neutras e ácidas nos segmentos desprovidos de trânsito (Nonose *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2010). Esses achados confirmam resultados de pesquisas que demonstraram a importância do suprimento constante de AGCC para manutenção do trofismo epitelial e indução de genes que transcrevem as frações protéicas das mucinas (Nonose *et al.*, 2009).

Em segmentos derivados do cólon, a ausência do bolo fecal impede a formação dos AGCC, bem como sua absorção e utilização pelas células epiteliais. Os AGCC determinam maior fluxo sanguíneo para a parede intestinal, pela diminuição da resistência das arteríolas do cólon e reto, promovem aderência entre os colonócitos, aumentam a absorção de sódio e água, estimulam o crescimento normal das células do epitélio cólico, influenciam a motilidade cólica e favorecem a cicatrização de lesões da parede intestinal (Mortensen et al., 1991; Kissmeyer-Nielsen et al., 1994; Pinto et al., 2007). Os AGCC exercem papel protetor no desenvolvimento de neoplasias, em virtude de sua ação antiproliferativa interferir no processo de diferenciação celular favorecendo a apoptose (Velasques et al., 1997). Nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, a glutamina, substrato energético secundário para essas células, fornecida principalmente pelo suprimento sanguíneo passa a ser primordial, podendo ser utilizada preferencialmente à glicose como fonte energética (Roediger, 1990).

Com o modelo experimental de CE proposto, confirmou-se, inicialmente, que células da mucosa cólica desprovidas do suprimento regular de AGCC, conseqüente à derivação fecal sofrem modificações no seu metabolismo e aumentam a produção de RLO. O estresse oxidativo resultante ocasiona alterações histológicas idênticas às descritas na CE humana e semelhantes às encontradas na colite ulcerativa. Essas alterações histológicas pioram com o progredir do tempo de exclusão (Martinez, 2009; Martinez *et al.*, 2010).

Depois de ser confirmado que a falta do suprimento de AGCC, era capaz de provocar estresse oxidativo, que ocasiona atrofia das criptas cólicas, redução do conteúdo e modificações no padrão de expressão da camada de muco e dano ao DNA nuclear, faltava verificar se os RLO poderiam infringir dano às demais linhas de defesa do epitélio cólico.

Kadri (2010) e Fabris (2011) estudaram as modificações no conteúdo e padrão de expressão das proteínas E-caderina e β -cateninas em modelos experimentais de CE. Como já havia sido demonstrado que no modelo de CE o estresse oxidativo era capaz de danificar outros mecanismos de defesa da barreira epitelial assim como o DNA, julgou-se oportuno verificar se poderia existir dano às proteínas formadoras das

junções aderentes. O modelo de CE assegurava que a lesão das junções intercelulares não era provocada por agentes tóxicos ou pela infiltração contínua de bactérias a partir da luz intestinal, uma vez que o intestino estava desprovido de trânsito fecal e, apesar de não encontrar-se absolutamente estéril, possuía um menor contingente bacteriano (Pinto *et al.*, 2007).

Kadri (2010) quando mensurou-se os níveis teciduais de estresse oxidativo nos segmentos sem trânsito, verificou-se que eles eram significativamente mais elevados e encontravam-se diretamente relacionados à piora da inflamação e maiores níveis de MPO. Esses achados sugerem que os maiores níveis de estresse oxidativo no cólon excluso após seis semanas estejam relacionados tanto à maior formação de RLO pelos próprios neutrófilos presentes no tecido, quanto pelas células epiteliais desprovidas de AGCC .

Mensurou-se o conteúdo tecidual da proteína E-caderina nos animais submetidos à derivação intestinal por seis semanas, houve redução do conteúdo total da proteína nos segmentos sem trânsito fecal. Avaliando o conteúdo de E-caderina apenas na região apical das criptas cólicas, houve redução em relação aos animais do grupo controle e aos segmentos providos de trânsito dos animais do grupo experimento. Sugere-se que a redução do conteúdo total da E-caderina ocorria à custa da perda de expressão na superfície epitelial onde, habitualmente, as junções aderentes são mais numerosas pela maior proximidade da flora bacteriana luminal. A preservação do conteúdo de E-caderina na região basal em relação aos segmentos com trânsito preservado sugere que o dano às junções aderentes nas primeiras semanas ocorre a partir da superfície luminal (Kadri, 2010).

Até a presente data, não se estudou a possibilidade de que existam modificações no conteúdo e padrão de expressão das proteínas ocludina em modelos experimentais de CE. Após vários estudos sobre as alterações histológicas, modificações da barreira epitelial da mucosa cólica e modificações nas junções aderentes, julgou-se oportuno verificar se poderiam existir danos à proteína ocludina que compõe a junção de oclusão.

O modelo de CE utilizado assegurava que a lesão das junções de oclusão não era provocada por agentes tóxicos ou pela infiltração contínua de bactérias a partir da luz intestinal, uma vez que o intestino estava desprovido de trânsito fecal e, apesar de não encontrar-se absolutamente estéril, possuía um menor contingente bacteriano. Caso fosse possível demonstrar que modificações no metabolismo celular, aumentando a produção de RLO, também pudessem modificar o conteúdo ou o padrão de expressão das proteínas da junção de oclusão, destacando no estudo a ocludina, ter-se-ia mais uma evidência experimental a favor da teoria de indução da colite por radicais livres.

Desta forma podemos destacar que possivelmente alterações na expressão da proteína ocludina na mucosa cólica cronicamente inflamada e a maior possibilidade de desenvolvimento do CCR nessa situação confirmam a importância da preservação dessa proteína não só na manutenção da barreira funcional, mas na prevenção do CCR.

Os resultados encontrados no presente estudo constatou-se que segmentos cólicos desprovidos de trânsito, apresentam alterações histológicas e bioquímicas indistinguíveis daquelas encontradas na CE humana e semelhantes às descritas nos modelos experimentais de colite quimicamente induzida (Sousa *et al.*, 2008; Nonose, 2009; Nonose *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2010).

Quando mensuramos o conteúdo tecidual da proteína ocludina nos animais submetidos à derivação intestinal por seis semanas, doze e dezoito semanas, verificamos que há predominância da proteína na região apical dos segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito intestinal quanto comparado com o fundo. Provavelmente devido ao fato que a ocludina é uma proteína ligada adesão, adesão essa que deve acontecer no ápice, portanto a ocludina tende a uma mobilidade celular em direção a região apical e lateral.

A expressão da ocludina nas regiões basais nos segmentos sem trânsito fecal não se modificava em relação aos segmentos com trânsito preservado. Esses achados reforçam nossas suspeitas que o aumento da concentração da ocludina na região apical das criptas, quando comparado a região basal, provavelmente é devido ao

aumento da divisão celular na zona proliferativa das criptas (basal) e tentativa de substituir células da superfície apical cada vez mais danificadas pelo processo inflamatório, nos animais desprovidos de trânsito fecal.

Avaliando o conteúdo de ocludina apenas na região apical das criptas cólicas, verificamos que a expressão da proteína ocludina nos ápices das criptas cólicas dos segmentos desprovidos de trânsito intestinal é significativamente menor quando comparada com a região apical dos segmentos providos de trânsito intestinal. Os resultados apresentados são muito importantes ao considerarmos estudos anteriores dentro do nosso grupo de estudo, estudos estes que também encontraram resultados parecidos com os apresentados, embora tenham utilizados proteínas das junções aderentes (E-caderina e β -catenina) (Kadri, 2010; Fabris, 2011). Com estes resultados, constata-se que a deficiência de AGCC, provocada pela derivação intestinal, diminui significativamente a expressão da proteína ocludina na região apical dos segmentos desprovidos de trânsito intestinal.

Apesar de não existir consenso, a maioria dos estudos demonstrou o papel importante dos AGCC para manutenção do adequado trofismo das células epiteliais da mucosa cólica. Os AGCC são substratos importantes na preservação da integridade dos mecanismos de barreira, por induzirem a expressão de genes formadores das proteínas responsáveis pela permeabilidade seletiva das junções intercelulares e evitarem o estresse oxidativo que provoca lesões nesses sistemas de defesa (Sousa *et al.*, 2008; Gaudier *et al.*, 2009; Nonose, 2009; Nonose *et al.*, 2009).

A inibição da metabolização dos AGCC leva ao aparecimento de colite (Agarwal e Schimmel, 1989), enquanto o restabelecimento do trânsito fecal, a administração de AGCC, glutamina, soluções nutricionais mistas e ácidos graxos poliinsaturados ricos em ômega-3 e ômega-6 melhoram as alterações histológicas encontradas nas colites, provavelmente por diminuírem o estresse oxidativo tecidual. A importância do estresse oxidativo na etiopatogenia da CE fica evidente ao demonstrar-se que o uso de substâncias antioxidantes apresenta efeitos terapêuticos benéficos na colite ulcerativa, colite quimicamente induzida e na C. Em outras palavras, os resultados de todos esses estudos demonstram que o manutenção do fornecimento de AGCC às

células da mucosa cólica ou a neutralização dos RLO com substâncias antioxidantes são estratégias eficazes para o tratamento das colites. Essas evidências corroboram a importância dos RLO no desenvolvimento das colites (Martinez, 2009).

Não encontramos variação do conteúdo da proteína entre as regiões apicais e basais com relação ao tempo de exclusão. Houve variação no conteúdo da proteína ocludina em relação ao tempo de exclusão na região apical do segmento provido de trânsito intestinal entre a sexta e décima segunda semana, estabilizando a partir de então. Acreditamos que esta variação se dá pela evolução ponderal que o animal apresenta durante os diferentes tempos de exclusão.

Do ponto de vista prático, os resultados encontrados sugerem que o restabelecimento do suprimento de AGCC ao cólon excluído, quer pela reconstituição do trânsito fecal, quer pela administração de soluções nutricionais ou o uso de substâncias antioxidantes, deve ser considerado estratégia válida na prevenção e tratamento da CE independente do tempo de exclusão.

A presente pesquisa demonstra pela primeira vez na literatura, que a proteína ocludina, uma das principais componentes das junções oclusão encontra-se alterada na CE assim como ocorre na colite ulcerativa.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições de execução do presente estudo permitem concluir que:

- Existe menor conteúdo de ocludina na região profunda das criptas cólicas em segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal em relação a região apical;
- Existe redução do conteúdo tecidual de ocludina nos ápices das criptas cólicas nos segmentos desprovidos de trânsito fecal quando comparado com a região apical das criptas com trânsito preservado;
- Houve variação do conteúdo total de ocludina na região apical das criptas cólicas nos segmentos com trânsito intestinal, em relação aos tempos propostos. Não existe variação do conteúdo de ocludina no fundo das criptas nos cólons providos de trânsito e também não há variação no conteúdo da proteína no ápice e fundo das criptas do cólon desprovidos de trânsito intestinal.

7. REFERÊNCIAS

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

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. **Biologia molecular da célula.** 4a. ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. Cap. 19, p. 1065-126: Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular.

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.

AUST DE, TERDIMAN JP, WILLENBUCHER RF, CHEW K, FERRELL L, FLORENDO C, MOLINARO-CLARK A, BARETTON GB, LÖHRS U, WALDMAN FM. Altered Distribution of b-Catenin, and Its Binding Proteins E-Cadherin and APC, in Ulcerative Colitis-Related Colorectal Cancers. **Mod Pathol.** 2001;14(1):29-39.

BALDA, M. S., WHITNEY, J. A., FLORES, C., GONZALES, M., CEREIJIDO, M. AND MATTER, K. (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and TER and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant junction membrane protein. **J. Cell Biol.** 1996; 134, 1031-1049

BERKES J, VISWANANTHAN VK, SAVKOVIC SD, HECHT G. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, iron transport, and inflammation. **Gut.** 2003;52(3):439-51.

BIONDO-SIMÕES MLP, GRECA FH, ABICALAFFE MD, COLNAGHI MC, MATTOS E SILVA E, YAMASAKI ES, SMANIOTTO G. Colite do cólon exclusivo: modelo experimental em ratos. **Acta Cir Bras** 2000; 15(supl 3): 7-11.

BRUEWER M, LUEGERING A, KUCHARZIK T, PARKOS CA, MANDARA J, HOPKINS AM, NUSRAT A. Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms. **J Immunol.** 2003;171(11):6164-72.

CLAYBURGH DR, SHEN L, TURNER JR. A porous defense: the leaky epithelial barrier in the intestinal disease. **Lab Invest.** 2004;84(3):282-91.

COOK SI, SELLIN JH. Review article: short-chain fatty acids in healthy and disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 12, n. 6, p. 499-507, 1998.

DEMETTER P, DE VOS M, VAN DAMME N, BAETEN D, ELEWAUT D, VERMEULEN S, MAREEL M, BULLOCK G, MIELANTS H, VERBRUGGEN G, DE KEYSER F, VEYS EM, CUVELIER CA. Focal up-regulation of E-cadherin-catenin complex in inflamed bowel mucosa but reduced expression in ulcer-associated cell linkage. **Am J Clin Pathol.** 2000;114(3):364-70.

DOGAN A, WANG ZD, SPENCER J. E-Cadherin expression in intestinal epithelium. **J Clin Pathol.** 1995; 48(2):143-6.

DORUDI S, SHEFFIELD JP, POULSOM R, NORTHOVER JM, HART IR. E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. **Am J Pathol.** 1993;142(4):981-6.

EDWARDS CM, GEORGE B, WARREN B. Diversion colitis - new light through old windows. **Histopathology.** 1999;34:1-5.

FABRIS, F. M. Avaliação do conteúdo e padrão de expressão da proteína β -catenina na mucosa cólica com e sem transito intestinal: estudo experimental em ratos **Tese (Mestrado)**. Bragança Paulista: Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco; 2011.

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

FEARON ER, VOGELSTEIN B. A genetic model of carcinogenesis. **Cell.** 1990;61(5):759-67.

FELDMAN, G. J.; MULLIN, J. M.; RYAN, M. P. Occludin: Structure, function and regulation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam v.57, p.883– 917, 2005.

FILLMANN HS. O efeito protetor da glutamina na colite experimental induzida por ácido acético. [Tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.

FINNIE IA, DWARAKANATH AD, TAYLOR BA, RHODES JM. Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut*. 1995;36(1):93-9.

FISCHER A, TARANTINO I, WARSCHKOW R, LANGE J, ZERZ A, HETZER FH. Is sphincter preservation reasonable in all patients with rectal cancer? *Int J Colorectal Dis*. 2010;25(4):425-32.

FURUSE M, FUJITA K, HIIRAJI T, FUJIMOTO K, TSUKITA S.. Claudin – 1 and -2: novel integral membrane protein localizing and tight junctions. *J Cell Biol*. 1996.1539-1550.

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

GAUDIER E, HOEBLER C. Physiological role of mucins in the colonic barrier integrity. *Gastroenterol Clin Biol*. 2006;30(8-9):965-74.

GASSLER N, ROHR C, SCHNEIDER A, KARTENBECK J, BACH A, OBERMÜLLER N, OTTO HF, AUTSCHBACH F. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.2001;281(1):G216-28.

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 desfunctioning colostomy. *Gut*.1991;32:1020-3.

GIARDIELLO FM, LAZENBY AJ, BAYLESS TM. The new colitides: collagenous, lymphocytic, and diversion colitis. *Gastroenterology Clinics of North America*. 1995; 24 (3), 717-729.

GLOTZER DJ, GLICK ME, GOLDMAN H. Proctitis following diversion of fecal stream. **Gastroenterology**.1981;80:438-41.

GRISHAM MB, GAGINELLA TS, VON RITTER C, TAMAI H, BE RM, GRANGER DN. Effects of neutrophil-derived oxidants on intestinal permeability, electrolytic transport and epithelial cell viability. **Inflammation**. 1990; 14(5):531-42.

GUMBINER BM, YAMADA KM. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. **Curr Opin Cell Biol**. 1995 Oct;7(5):615-8.

GUMBINER B, STEVENSON B, GRIMALDI A. The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. **J Cell Biol**.1988;107:1575-87.

HANBY AM, CHINERY R, POULSOM R, PLAYFORD RJ, PIGNATELLI M. Down regulation of E-cadherin in the reparative epithelium of the human gastrointestinal tract. **Am J Pathol**. 1996; 148(3): 723-9.

HIRASE, T., STADDON, J. M., SAITOU, M., ANDO-AKATSUKA, Y., ITOH, M.,

FURUSE, M., FUJIMOTO, K., TSUKITA, S. AND RUBIN, L. L. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. **J. Cell Sci**. 1997. 110, 1603-1613.

HOFFMANN JC, PAWLOWSKI NN, KÜHL AA, HÖHNE W, ZEITZ M. Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. **Pathobiology**. 2002. ;70(3):121-30.

JEWELL, D.P.; PATEL, C. Immunology of inflammatory bowel disease. **Scan J Gastroenterol**. 1985;114:(suppl):119-26.)

JANKOWSKI JA, BEDFORD FK, BOULTON RA, CRUICKSHANK N, HALL C, ELDER J, ALLAN R, FORBES A, KIM YS, WRIGHT NA, SANDERS DS. Alterations in classical cadherins associated with progression in ulcerative and Crohn's colitis. **Lab Invest**. 1998;78(9):1155-67.

JANKOWSKI JA, BEDFORD FK, KIM YS. Changes in gene structure and regulation of E-Cadherin during epithelial development, differentiation, and disease. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.** 1997; 57: 187-215.

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.

KADRI CJ. Níveis de estresse oxidativo e conteúdo tecidual de E-caderina nos segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos. **Tese (Mestrado).** Bragança Paulista: Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco; 2010.

KARAYIANNAKIS AJ, SYRIGOS KN, EFSTATHIOU J, VALIZADEH A, NODA M, PLAYFORD RJ, KMIOT W, PIGNATELLI M. Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease. **J Pathol.** 1998; 185(4):413-8.

KELI E, BOUCHOUCHA M, DEVROEDE G, CARNOT F, OHRANT T, CUGNENC PH. Diversion-related experimental colitis in rats. **Dis Colon Rectum.**1997;40:222-8.

KIELY EM, AJAYI NA, WHEELER RA, MALONE M. Diversion procto-colitis: response to treatment with short-chain fatty acids. **Journal of Pediatric Surgery.** 2001. 36(10):1514-1517.

KIMURA K. D., TISSENBAUM H. A., LIU Y., RUVKUN G. Daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. **Science** 277, 1997, 942–946

KISSMEYER_NIELSEN P, CHRISTENSEN H, LAURBERG S. Diverting colostomy induces mucosal and muscular atrophy in rat distal colon. **Gut** 1994; 35:1275-82.

KUCHARZIK T, WALSH SV, CHEN J, PARKOS CA, NUSRAT A. Neutrophil Transmigration in Inflammatory Bowel Disease Is Associated with Differential Expression of Epithelial Intercellular Junction Proteins. **Am J Pathol.** 2001;159(6):2001-9.

LAUKOETTER MG, NAVA P, NUSRAT A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol.** 2008;14(3):401-7.

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.

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

MARGARIDO NF, NASSRI CGC, NASSRI AB, ROTTA CM. Modelo experimental em ratos de colite por exclusão. **Rev Col Bras Cir.** 2003;30(Supl.1):179.

MARQUES RG, MORALES MM, PETROIANU A. Brazilian law for scientific use of animals. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 24, n. 1, Feb. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502009000100015&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 Mar. 2011. doi: 10.1590/S0102-86502009000100015 Brazil. Law n.º 11.794, November 08, 2008.

MARTINEZ CAR, SOUZA CAF, NORONHA MR, ALFREDO CH, SPADARI APP, BARTOCCI PCM, PRIOLLI DG. Pseudolipomatose do cólon: relato de caso. **Rev Bras Coloproct.** 2008;28(1):104-7.

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

MARTINEZ CAR, NONOSE R, SPADARI AP, MÁXIMO FR, PRIOLLI DG, PEREIRA JA, MARGARIDO NF. Quantification by computerized morphometry of tissue levels of sulfomucins and sialomucins in diversion colitis in rats. **Acta Cir Bras.** 2010;25(3):231-40.

MORTENSEN FV, HESSOV I, BRIKE H, KORSGAARD N, NIELSEN H. Microcirculatory and trophic effects of short chain fatty acids in the human rectum after Hartmann's procedure. **Br J Surg** 1991;78:1208-11.

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.

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. Impaired bacterial flora in human excluded colon. **Gut**. 1989;30:1094-8.

NEUT C, GUILLEMONT F, COLOMBEL JF. Nitrate-reducing bacteria in diversion colitis. A clue to inflammation? **Digestive Diseases and Sciences**. 1997; 24 (12):2577-2580.

NOBELS F, COLEMONT L, VAN MOER E. A case of diversion rectitis. **Acta Clin Bel**. 1989;44(3):202-4.

NONOSE R. Avaliação do padrão de expressão e conteúdo de mucinas na mucosa cólica em modelo experimental de colite de exclusão: Estudo em ratos **[dissertação]**. Bragança Paulista, São Paulo: Universidade São Francisco; 2009.

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.

OLIVEIRA-NETO JP, AGUILAR-NASCIMENTO JE. Intraluminal irrigations with fibers improves inflammation and atrophy in diversion colitis. **Nutrition**.2004;20:197-9.

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

PARRISH AR, CATANIA JM, OROZCO J, GANDOLFI AJ. Chemically induced oxidative stress disrupts e-cadherin/catenin cell adhesion complex. **Toxicol Sci.** 1999; 51(1): 80-86.

PERRY I, HARDY R, JONES T, JANKOWSKI J. A colorectal cell line with alterations in E-cadherin and epithelial biology may be an in vitro model of colitis. **J Clin Pathol Mol Pathol.** 1999;52(4):231-42.

PINTO FE JR, BRANDT CT, MEDEIROS AC, OLIVEIRA AJ, JERÔNIMO SM, BRITO HM. Bacterial translocation in rats nonfunctioning diverted distal colon. **Acta Cir Bras.** 2007;22(3):195-201.

PRAVDA J. Radical Induction Theory of ulcerative colitis. **World J Gastroenterol.** 2005;11:2371-84.

PUMPHERY RE. Hydrogen peroxide proctitis. **Am J Surg** 1951;81:60-62.

ROE AM, WARREN AJM, BRODRIBB CB. Diversion colitis and involution of the defunctioned anorectum. **Gut.** 1993; 34:382-385.

ROEDIGER WE. The starved colon - diminished mucosal nutrition, diminished absorption, and colitis. **Dis Colon Rectum.** 1990;33:858-62.

SCHMEHL K, FLORIAN S, JACOBASCH G, SALOMON A, KORBER J. Deficiency of epithelial basement membrane laminin in ulcerative colitis affected human colonic mucosa. **Int J Colorectal Dis.** 2000;15(1):39-48.

SCHMITZ H, BARMAYER C, FROMM M, RUNKEL N, FOSS HD, BENTZEL CJ, RIECKEN EO, SCHULZKE JD. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. **Gastroenterology.** 1999;116(2):301-9.

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

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.

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.

SHEIBANI S, GERSON LB. Chemicals colitis. **J Clin Gastroenterol.** 2008;42(2):115-21.

SMITH MEF, PIGNATELLI M. The molecular histology of neoplasia: the role of the cadherin/catenin complex. **Histopathology.** 1997; 31(2):107-11.

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.

STEVENSON BR. The tight junctions: morphology to molecules. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 1999;14: 89-109.

STCHNEEBERGER, E. E.; LYNCH, R. D. The tight junction: a multifunctional complex. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.,** v. 286, p. C1213-C1228, 2004.

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

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.

TOBIOKA, H.; TOKUNAGA, Y.; ISOMURA, H.; KOKAI, Y.; YAMAGUCHI, J.; SAWADA, N. Expression of occludin, a tight-junction-associated protein, in human lung carcinomas. *Virchows Archives A., Pathological Anatomy And Histopathology*, Berlin, v.445, p.472–476, 2004.

TOKUNAGA, Y.; TOBIOKA, H.; ISOMURA, H.; KOKAI, Y.; SAWADA, N. Expression of occludin in human rectal carcinoid tumours as a possible marker for glandular differentiation. **Histopathology**, Oxford, v.44, p.247–250, 2004.

USAMI Y, CHIBA H, NAKAYAMA F, UEDA J, MATSUDA Y, SAWADA N, KOMORI T, ITO A, YOKOZAKI H. Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Hum Pathol** 2006.37(5):569-77.

VELAZQUEZ OC, LEDERER HM, ROMBEAU JL. Butyrate and colonocyte. Production, absorption, metabolism and therapeutic implications. **Adv Exp Med Biol.**1997;427:123.

YEONG ML, BETHWAIT PB, PRASAD J, ISBISTER WH. Lymphoid follicular hyperplasia - a distinctive feature of diversion colitis. **Histopathology.**1991;19:55-61.

]

**ANEXO I – Aprovação do comitê de ética no uso de animal em pesquisa
(CEUAP) da Universidade São Francisco, Bragança Paulista.**

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



Bragança Paulista, 22 de Novembro 2007.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

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

Instituição: Universidade São Francisco

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

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

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

Parecer: Aprovado

Atenciosamente,

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

ANEXO II – Intensidade da expressão da proteína ocludina – 6 semanas.

Observador 1			Observador 1		
Provido de trânsito intestinal			Desprovido de trânsito intestinal		
Animal	Ápice	Fundo	Animal	Ápice	Fundo
1	++	+	1	++	+
2	++	+	2	+++	+
3	++	+	3	++	+
4	+++	+	4	+	+
5	+	+	5	+	+
6	++	+	6	+	+
7	++	+	7	+	+
8	++	+	8	++	+
9	++	+	9	++	+

Observador 2			Observador 2		
Provido de trânsito intestinal			Desprovido de trânsito intestinal		
Animal	Ápice	Fundo	Animal	Ápice	Fundo
1	+++	+	1	+	+
2	++	+	2	++	+
3	++	+	3	+	+
4	+++	+	4	+	+
5	+	+	5	+	+
6	++	+	6	+	+
7	+++	+	7	+	+
8	++	+	8	++	+
9	++	+	9	++	+

Observador 3			Observador 3		
Provido de trânsito intestinal			Desprovido de trânsito intestinal		
Animal	Ápice	Fundo	Animal	Ápice	Fundo
1	+++	+	1	+	+
2	+++	+	2	++	+
3	++	+	3	+	+
4	+++	+	4	+	+
5	+	+	5	+	+
6	+++	+	6	+	+
7	+++	+	7	+	+
8	++	+	8	++	+
9	++	+	9	+++	+

ANEXO III – Intensidade da expressão da proteína ocludina – 12 semanas.

Observador 1			Observador 1		
Provido de trânsito intestinal			Desprovido de trânsito intestinal		
Animal	Ápice	Fundo	Animal	Ápice	Fundo
1	+++	+	1	+	+
2	+++	+	2	++	+
3	++	+	3	+	+
4	++	+	4	+	+
5	+++	+	5	+	+
6	+++	+	6	+++	+
7	++	+	7	+	+
8	+++	+	8	++	+
9	++	+	9	+	+
10	+++	+	10	+	+
11	+++	+	11	+	+
12	+++	+	12	+	+
13	+++	+	13	+	+
14	+++	+	14	+	+

Observador 2			Observador 2		
Provido de trânsito intestinal			Desprovido de trânsito intestinal		
Animal	Ápice	Fundo	Animal	Ápice	Fundo
1	+++	+	1	++	+
2	+++	+	2	++	+
3	++	+	3	+	+
4	+++	+	4	++	+
5	+++	+	5	+	+
6	+++	+	6	++	+
7	++	+	7	+	+
8	+++	+	8	++	+
9	++	+	9	++	+
10	+++	+	10	++	+
11	+++	+	11	++	+
12	+++	+	12	++	+
13	+++	+	13	+	+
14	++	+	14	++	+

Observador 3			Observador 3		
Provido de trânsito intestinal			Desprovido de trânsito intestinal		
Animal	Ápice	Fundo	Animal	Ápice	Fundo
1	+++	+	1	+	+
2	++	+	2	++	+
3	++	+	3	+	+
4	++	+	4	+	+
5	++	+	5	+	+
6	+++	+	6	+++	+
7	++	+	7	++	+
8	+++	+	8	++	+
9	++	+	9	++	+
10	+++	+	10	++	+
11	++	+	11	+	+
12	+++	+	12	++	+
13	+++	+	13	+	+
14	+++	+	14	+	+

ANEXO IV – Intensidade da expressão da proteína ocludina – 18 semanas.

Observador 1			Observador 1		
Provido de trânsito intestinal			Desprovido de trânsito intestinal		
Animal	Ápice	Fundo	Animal	Ápice	Fundo
1	+++	+	1	++	+
2	+++	+	2	+	+
3	+++	+	3	+	+
4	+++	+	4	++	+
5	+++	+	5	++	+
6	+++	+	6	+	+
7	+++	+	7	++	+
8	++	+	8	+	+
9	+++	+	9	++	+

Observador 2			Observador 2		
Provido de trânsito intestinal			Desprovido de trânsito intestinal		
Animal	Ápice	Fundo	Animal	Ápice	Fundo
1	+++	+	1	++	+
2	+++	+	2	++	+
3	+++	+	3	+	+
4	+++	+	4	+	+
5	+++	+	5	+	+
6	+++	+	6	+	+
7	+++	+	7	+	+
8	++	+	8	++	+
9	+++	+	9	++	+

Observador 3			Observador 3		
Provido de trânsito intestinal			Desprovido de trânsito intestinal		
Animal	Ápice	Fundo	Animal	Ápice	Fundo
1	+++	+	1	++	+
2	+++	+	2	++	+
3	+++	+	3	+	+
4	+++	+	4	+	+
5	+++	+	5	++	+
6	+++	+	6	+	+
7	++	+	7	++	+
8	+	+	8	+	+
9	+	+	9	+	+