

CALED JAUDAT KADRI

**EFEITO DO ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE OS NÍVEIS
DE E-CADERINA NA MUCOSA CÓLICA DE RATOS
COM E SEM TRÂNSITO INTESTINAL**

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

**BRAGANÇA PAULISTA
2010**

CALED JAUDAT KADRI

**EFEITO DO ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE OS NÍVEIS
DE E-CADERINA NA MUCOSA CÓLICA DE RATOS
COM E SEM TRÂNSITO INTESTINAL**

**Bragança Paulista
2010**

CALED JAOUDAT KADRI

**EFEITO DO ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE OS NÍVEIS
DE E-CADERINA NA MUCOSA CÓLICA DE RATOS
COM E SEM TRÂNSITO INTESTINAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco (USF) para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador Temático: Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

**BRAGANÇA PAULISTA
2010**

WI 522 Kadri, Caled Jaoudat.
K14e Efeito do estresse oxidativo sobre os níveis de e-caderina na mucosa cólica de ratos com e sem trânsito intestinal / Caled Jaoudat Kadri. -- Bragança Paulista, 2010. 106 p.

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

Orientação de: Carlos Augusto Real Martinez.

1. Cólon. 2. Colite. 3. Estresse oxidativo. 4. Junções aderentes. 5. Moléculas de adesão celular. 6. Caderinas. 7. Ácidos graxos de cadeia curta. 8. Ratos. I. Martinez, Carlos Augusto Real. II. Título.

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

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador Temático: Prof. Carlos Augusto Real Martinez

Membros Titulares:

1. Prof^a. Michelle Darrieux
 2. Prof. Marcos Antonio S. Castro
-
-

Membros suplentes:

Prof. Marcelo Luiz Ribeiro

Prof. René Crepaldi Filho

**Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco.
Data: 16/12/2010**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho inicialmente aos meus pais; pois os considero muito especiais; à minha esposa e filhos, o meu muito obrigado por compreenderem minha ausência e sempre me confortarem com muito amor.

“Há homens que lutam um dia e são bons; há outros que lutam um ano e são melhores; há os que lutam muitos anos e são muito bons. Mas há os que lutam toda a vida, e esses são os imprescindíveis”.

Bertold Brecht

AGRADECIMENTOS

Aos Professores José Aires Pereira e Izilda Aparecida Cardinali pela análise histopatológica e técnicas histológicas realizadas durante o estudo;

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, BRAGANÇA PAULISTA**, pela oportunidade da concretização deste.

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

Ao meu **Professor orientador Carlos Augusto Real Martinez**, que sempre esteve presente e disposto a discutir minhas dúvidas, colaborando assim com a construção deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	09
2.1 Colite de exclusão	09
2.2 Radicais livres de oxigênio	15
2.3 Defesas antioxidantes	19
2.4 Colite e estresse oxidativo	21
2.5 Mecanismos de adesão celular	24
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Grupos experimentais	31
4.2 Etapa pré-operatória	32
4.3 Anestesia	32
4.4 Técnica operatória	33
4.6 Pós operatório	36
4.7 Coleta do material	36
4.8 Técnica histológica	38
4.9 Técnica imunistoquímica (E-caderina)	38
4.10 Avaliação histológica	40
4.11 Análise da expressão tecidual de E-caderina	41
4.12 Atividade tecidual de Mieloperoxidase	44
4.13 Eletroforese em gel de célula isolada (ensaio do cometa)	44
4.14 Método Estatístico	46
5. RESULTADOS	48
5.1 Alterações histológicas	48
5.2 Ulcerações na mucosa cólica	50
5.3 Graduação inflamatória	51
5.4 Expressão tecidual de E-caderina	52
5.5 Conteúdo tecidual de E-caderina	54

5.6 Intensidade de expressão da E-caderina segundo o local da cripta cólica	55
5.7 Níveis teciduais Mieloperoxidase (MPO)	56
5.8 Níveis teciduais de estresse oxidativo tecidual	57
5.9 Variações segundo o tempo de exclusão	59
5.10 Correlações entre variáveis e o tempo de exclusão	61
6.DISSCUSSÃO	63
6.1 Quanto ao método	63
6.2 Quanto aos resultados	73
7. CONCLUSÕES	87
8. ANEXOS	88
A Aprovação do Comitê de Ética	89
B Correlação entre todas as variáveis	90
C Resultados das variáveis estudadas – 6 semanas	91
D Resultados das variáveis estudadas – 12 semanas	92
E Resultados das variáveis estudadas – 18 semanas	93
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE FIGURAS

Fig 1 - Redução tetravalente do oxigênio em água	17
Fig 2 – Reações de Fenton e Haber-Weiss para formar OH	18
Fig 3 – Junção de ancoramento do epitélio cólico	27
Fig 4 – Esquema de distribuição dos grupos experimentais	32
Fig 5 – Identificação da placa de Peyer na parede anterior da transcrição entre o reto e o cólon sigmóide	34
Fig 6 – Ligadura da artéria Marginal do cólon descendente no ponto determinado para confecção dos estomas	34
Fig 7 – Limpeza mecânica anterógrada do cólon distal a ser excluído de trânsito fecal.....	35
Fig 8 – Aspecto final da parede abdominal após confecção dos estomas	35
Fig 9 – Fragmentos de mucosa cólica dos segmentos desprovidos e providos de trânsito fecal	37
Fig 10 – Expressão da proteína E-caderina em segmento cólico provido de trânsito de animal submetido à exclusão fecal por 18 semanas	43
Fig 11 – Quantificação da expressão tecidual da proteína E-caderina por análise de imagem assistida por computador (200 x)	43
Fig 12 – Avaliação dos níveis de estresse oxidativo pelo ensaio do cometa	46
Fig 13 – Parede do cólon provido de trânsito após 12 semanas da exclusão do trânsito fecal	48
Fig 14 – Parede do cólon desprovido de trânsito após 12 semanas da exclusão do trânsito fecal	48
Fig 15 – Superfície epitelial de segmento cólico provido de trânsito após 18 semanas de exclusão fecal	49

Fig 16 – Superfície epitelial do cólon desprovido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal	49
Fig 17 – Superfície mucosa cólica no cólon provido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal	50
Fig 18 – Superfície mucosa no cólon desprovido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal	50
Fig 19 – Expressão tecidual de E-caderina na mucosa provida de trânsito após 18 semanas.....	53
Fig 20 – Padrão de expressão de E-caderina na mucosa de segmento cólico provido de trânsito fecal após 12 semanas de derivação intestinal	53
Fig 21 – Padrão de expressão de E-caderina na mucosa de segmento cólico provido de trânsito fecal após 18 semanas de derivação intestinal	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
Ca ⁺⁺	Cálcio
CAI	Complexo de adesão intercelular
CAM	Moléculas de adesão celular
CAT	Catalase
CCR	Câncer colorretal
CE	Colite de exclusão
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DC	Dual core
DII	Doenças inflamatórias intestinais
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
DSS	Sulfato sódico de dextrana
e ⁻	Elétron
EDTA	Etileno-diamino tetracético
F	French
Fe ⁺⁺⁺	Ferro
Gbyte	Gigabyte
GSH	Glutathione
GPX	Glutathione peroxidase
H ⁺	Hidrogênio
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HBSS	Solução tampão de Hank's
HE	Hematoxilina-eosina
KDa	Quilodáldons
M	Molar
mA	Miliamper
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidase
Na ⁺⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF – κβ	Fator de transcrição nuclear de Kappa-beta
Nm	nanômetros
O ₂	Oxigênio
°C	Graus centígrados
PBS	Tampão fosfato
RGB	Red Green and Blue

RLO	Radicais livres de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
SPF	Specific Pathogenic Free
TM	<i>Tail moment</i>
TNBS	Trinitrobenzenosulfônico
UA	Unidades arbitrarie
U- β -actina	Unidades de β -actina
V	Volt
w/v	Weight/volume
Wnt	Via de sinalização Wnt (<i>Wingless pathway</i>)
μ L	Microlitros
μ m	Micrometros

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Escala de Graduação do escore inflamatório	40
Tabela 2 - Variação dos valores médios mensurados para presença de úlceras, congestão vascular e escore inflamatório em segmentos desprovidos de trânsito fecal, em relação aos diferentes tempos de exclusão	59
Tabela 3 – Variação dos valores médios mensurados para níveis de atividade de MPO e níveis de estresse oxidativo, no cólon desprovido de trânsito fecal, em relação aos diferentes tempos de exclusão	60
Tabela 4 – Variação dos valores médios para o conteúdo total de E-caderina, no cólon desprovido de trânsito fecal, em relação aos diferentes tempos de exclusão.....	60
Tabela 5 – Variação dos valores médios mensurados para o conteúdo total de E-caderina, na região apical das criptas cólicas nos segmentos desprovidos de trânsito fecal em relação aos diferentes tempos de exclusão	61
Tabela 6 – Correlação entre a presença de úlceras e grau de inflamação, no cólon excluído de trânsito em relação ao tempo de exclusão	61
Tabela 7 – Correlação entre os níveis de MPO, estresse oxidativo, conteúdo total de E-caderina, no cólon excluído de trânsito em relação ao tempo de exclusão	62
Tabela 8 – Correlação entre o conteúdo de E-caderina nas regiões apicais e basais das criptas cólicas, nos segmentos desprovidos de trânsito fecal, em relação ao tempo de exclusão	62

LISTA DE GRÁFICOS

Graf. 1 – Ulcerações da mucosa cólica comparando os subgrupos controle e experimento nos diferentes períodos de exclusão	51
Graf. 2 – Escore inflamatório comparando os subgrupos controle e experimento nos diferentes períodos de exclusão	52
Graf. 3 – Conteúdo tecidual de E-caderina comparando animais dos subgrupos controle e experimento nos diferentes períodos de exclusão do trânsito intestinal.....	54
Graf. 4 – Variação do conteúdo tecidual de E-caderina na região apical das criptas comparando animais dos subgrupos controle e experimento nos diferentes períodos de exclusão do trânsito intestinal	55
Graf. 5 – Variação do conteúdo tecidual de E-caderina na região basal das criptas cólicas comparando animais dos subgrupos controle e experimento nos diferentes períodos de exclusão intestinal	56
Graf. 6 – Níveis de atividade da Mieloperoxidase (MPO) comparando animais dos subgrupos controle e experimento nos diferentes períodos de exclusão do trânsito intestinal.....	57
Graf. 7 – Níveis de estresse oxidativo do DNA comparando os subgrupos controle e experimento nos diferentes tempos de exclusão	58

RESUMO

Efeito do estresse oxidativo sobre os níveis de E-caderina na mucosa cólica de ratos com e sem trânsito intestinal.

A mucosa do cólon possui sistemas de defesa que protegem o meio interno contra a infiltração bacteriana. As junções aderentes, formadas pelas proteínas E-caderina e β -catenina, apresentam papel fundamental nesses mecanismos. Modificações no conteúdo e padrão de expressão dessas proteínas vêm sendo responsabilizadas pela invasão bacteriana e infiltração neutrofílica na mucosa dos pacientes com colite. **Objetivo:** Verificar se o estresse oxidativo encontra-se relacionado a modificações no conteúdo e padrão de expressão da proteína E-caderina em modelo experimental de colite de exclusão. **Métodos:** Sessenta ratos Wistar foram submetidos à cirurgia, sendo 45 a derivação intestinal por meio de colostomia proximal no cólon esquerdo e fístula mucosa distal (grupo experimento) e 15 apenas à laparotomia. Os animais foram divididos em três grupos experimentais segundo o sacrifício ter sido realizado seis, 12 e 18 semanas após a cirurgia. Para cada grupo, cinco animais foram submetidos apenas a laparotomia (grupo controle). A colite foi diagnosticada por estudo histopatológico e a gravidade por escala de graduação inflamatória. A infiltração neutrofílica tecidual foi estudada pelos níveis de mieloperoxidase e o estresse oxidativo pelo ensaio em cometa. A expressão tecidual da proteína E-caderina foi analisada por imunohistoquímica e a quantificação do conteúdo tecidual por morfometria computadorizada. Para análise estatística dos resultados foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, estabelecendo-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). **Resultados:** Após a análise estatística dos resultados observou-se que nos segmentos sem trânsito fecal havia presença de colite que piorava com o tempo de exclusão. Constatou-se que os níveis teciduais de infiltração neutrofílica eram maiores nos segmentos desprovidos de trânsito fecal, e reduziam com o progredir do tempo de exclusão ($p = 0,00001$). Os segmentos cólicos sem trânsito fecal apresentam níveis de estresse oxidativo maiores quando comparados àqueles com trânsito preservado ($p < 0,0001$), aumentando com o decorrer do tempo de exclusão ($p = 0,007$). Os níveis de estresse oxidativo encontram-se diretamente relacionados ao maior grau histológico de inflamação tecidual e inversamente relacionados aos níveis de mieloperoxidase ($p = 0,0001$). O conteúdo total de E-caderina no cólon sem trânsito diminui com o tempo de exclusão, principalmente na região apical das criptas cólicas ($p = 0,001$). O conteúdo tecidual total de E-caderina nos segmentos sem trânsito reduz após seis semanas de exclusão estabilizando-se, porém a partir de 12 semanas ($p = 0,90$). As modificações do conteúdo total de E-caderina relacionam-se ao maior grau de inflamação e o aumento do estresse oxidativo. **Conclusão:** Existem modificações no conteúdo tecidual de E-caderina, relacionada ao estresse oxidativo tecidual. **Descritores:** Cólon. Colite. Estresse oxidativo. Junções aderentes. Moléculas de adesão celular. Caderinas. Ácidos graxos de cadeia curta. Ratos.

ABSTRACT

Effect of oxidative stress on the levels of E-cadherin colon mucosa of rats with and without intestinal transit.

The mucosa of the colon has defense systems that protect the internal environment against bacterial translocation. The adherent junctions, formed by the proteins E-cadherin and β -cadherin, play a key role in the formation of these mechanisms. Changes in the content and pattern of expression of these proteins have been implicated in bacterial invasion and the infiltration of neutrophils in the mucosa of patients with colitis. **Objective:** to verify if oxidative stress is related to changes in the content and pattern of expression of the protein E-cadherin in model of diversion colitis. **Methods:** Sixty Wistar rats underwent surgery intestinal bypass through a left colon proximal colostomy and distal mucous fistula (experimental group) 15 only laparotomy. The animals were divided into three groups according to when they were sacrificed: six, twelve and eighteen weeks after surgery. For each group, five animals underwent a laparotomy only (control group). The presence of colitis was diagnosed by a histopathology study and the severity by an inflammation grading scale. The neutrophil infiltration was studied by myeloperoxidase levels and oxidative stress by comet assay. The tissue expression of protein E-cadherin was analysed by immunohistochemistry and the quantification of tissue content by computerized morphometry. The statistical analysis was performed using the Mann-Whitney and the Kruskal-Wallis test, using a significance level of 5% ($p < 0.05$). **Results:** the statistical analysis results showed that colon segments without a fecal stream contained colitis that worsened with the time of exclusion. We found that the tissue levels of neutrophil infiltration were greatest in the segments without a fecal stream and reduced with the time of deviation ($p = 0.0001$). The levels of oxidative stress are directly related to a higher histological grade of tissue inflammation and inversely related to levels of myeloperoxidase ($p = 0.0001$). The total tissue content of E-cadherin in the colon without a fecal stream decreases with the time of exclusion, especially in the apical region of colon crypts ($p = 0.001$). **Conclusion:** there are changes in tissue content of E-cadherin related to oxidative tissue stress.

Descriptors: Colon. Colitis. Adherens junctions. Cell adhesion molecules. Cadherins. Short-chain fatty acids. Rats.

1. INTRODUÇÃO

No final do século passado demonstrou-se que a origem do câncer colorretal, encontra-se relacionada a modificações funcionais das células epiteliais decorrentes de alterações estruturais do DNA (Fearon e Vogelstein, 1990). Transversões ou inserções de bases, erros de pareamento de nucleotídeos tornaram-se termos habitualmente utilizados para explicar os mecanismos genéticos responsáveis pelas mutações das células. Da mesma forma, a etiopatogenia das doenças inflamatórias do cólon, também vem sendo atribuída a modificações estruturais nos intrincados sistemas de adesão intercelular que mantém a integridade do epitélio intestinal (Pravda, 2005). Esses aspectos tornam o estudo da topografia estrutural das células da mucosa cólica um campo aberto para a pesquisa moderna.

A manutenção da integridade do trato gastrointestinal, permanentemente exposto à flora bacteriana patogênica, depende do estabelecimento e preservação de dois compartimentos distintos e separados, representados pelo lume intestinal e o meio interno. A função de barreira exercida pelo epitélio cólico representa um dos mais perfeitos mecanismos de defesa existentes no organismo humano (Clayburgh et al, 2004; Watson et al, 2005; Laukoetter et al, 2008). Apesar de ser formado apenas por uma única camada de células, separa a luz intestinal, onde existe uma das maiores concentrações bacterianas conhecidas, do meio interno estéril (Pravda, 2005). Essa capacidade funcional pode ser melhor avaliada ao considerar-se que a concentração estimada de bactérias na luz do cólon, é de 10^{12} (um trilhão) de colônias por grama de fezes (Farrell e Peppercorn, 2002).

As células epiteliais da mucosa cólica são mantidas unidas umas às outras e à lâmina basal, por complexos mecanismos de adesão celular. Esse sistema 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 exposição constante a agentes lesivos faz com que as células epiteliais sejam constantemente agredidas apresentando elevados índices de apoptose. A perda celular contínua na superfície mucosa luminal requer intensa renovação, garantida pelas células tronco multipotentes, localizadas na base das criptas intestinais, região conhecida como zona proliferativa (Gassler et al, 2001; Pinto e Clevers, 2005).

Estudos vêm demonstrando que, para o desenvolvimento da colite, os mecanismos de defesa do epitélio cólico devem estar comprometidos (Riedle e Kerjaschki, 1997; Kucharzik et al, 2001; Laukoetter et al, 2008). Portanto, a ruptura dessa integridade funcional deve ser uma etapa precoce e fundamental para a sequência de eventos que possibilitam a invasão bacteriana e a subsequente ativação da resposta inflamatória local (Pravda, 2005).

A barreira epitelial cólica é composta por várias linhas de defesa que, agindo em conjunto, impedem a translocação bacteriana para o meio interno (Sedman et al, 1994; Laukoetter et al, 2008). Os componentes que formam esse sistema de defesa são representados pela camada de muco, pelas membranas apical e basolateral das células epiteliais, as junções intercelulares, matriz extracelular e, finalmente, pela lâmina basal (Kucharzik et al, 2001; Gaudier e Hoebler, 2006; Laukoetter et al, 2008). Estudos demonstraram que todas essas barreiras fisiológicas encontram-se danificadas nas fases iniciais das colites, sugerindo que o comprometimento desses sistemas de defesa, precede a infiltração neutrofílica que caracteriza a doença (Dogan et al, 1995; Jankowski et al, 1998; Parrish et al, 1999; Martinez et al, 2010).

As células do epitélio cólico aderem umas às outras e à matriz extracelular por proteínas de superfície conhecidas como moléculas de adesão celular. As moléculas

protéicas que formam o complexo de adesão celular são as principais responsáveis pela manutenção da permeabilidade seletiva do epitélio intestinal (Laukoetter et al., 2008). Esse complexo é formado por três tipos de junções intercelulares: as junções bloqueadoras, também conhecidas como junções de oclusão ou íntimas; as junções de ancoramento ou aderentes e as junções comunicantes ou eletrotônicas (Alberts et al., 2004). Cada junção é composta 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 as células precursoras localizadas na zona germinativa sejam constantemente informadas do índice de apoptose nas células situadas na superfície das glândulas em constante descamação.

Modificações no conteúdo e na estrutura química das proteínas que formam o complexo de junções intercelulares foram descritas em doentes com colite ulcerativa (Ozawa; et al., 1990; Schimitz et al., 1999; Usami et al., 2006).

As junções aderentes encontram-se mais afetadas nos pacientes com doenças inflamatórias intestinais, quando comparadas aos demais mecanismos de adesão celular (Gassler et al., 2001). As junções aderentes possuem papel relevante no reconhecimento entre duas células justapostas, mediando também, as comunicações entre elas (Gumbiner et al., 1988; Gumbiner e McRea, 1993). 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., 1998; Aust et al., 2001). Nos portadores de colite ulcerativa, a redução do conteúdo é mais evidente em relação à proteína E-caderina, principalmente na superfície luminal das células (Gassler et al., 2001). Essas evidências foram confirmadas posteriormente, com os resultados de estudos experimentais demonstrando que camundongos transgênicos silenciados (knockout mice) para o gene da proteína E-caderina, apresentavam disfunções importantes nas junções aderentes, desenvolvendo quadros graves de colite (Jankowski et al., 1998). Os resultados em última análise confirmam a importância da proteína E-caderina na manutenção da integridade funcional da barreira epitelial (Jankowski et al., 1998).

Uma série de estudos que pesquisaram a expressão tecidual de E-caderina mostram que, na maioria dos doentes com colite ulcerativa, existe redução no conteúdo tecidual desta proteína (Hollander, 1992; Karayiannakis et al., 1998; Kucharzik et al., 2001). Esse resultado comprova a relação existente entre modificações do padrão de expressão tecidual de E-caderina e o agravamento da atividade inflamatória, bem como a progressão dos tecidos persistentemente inflamados para displasia e CCR (Takeishi, 1993; El-Bahrawy e Pignatelli, 1998; Nollet et al., 1999).

Os mecanismos moleculares que determinam a quebra de junções aderentes, rompendo a barreira funcional nos doentes com colite ainda não foram totalmente esclarecidos. Recentemente, 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 (H_2O), 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 e, em particular, as junções aderentes (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 intimidade da 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, as 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; Schwartz et al., 1995; Marques et al., 2010).

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; Longatti et al., 2010; 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 (Zingarelli et al., 1999; 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 (Liu et al., 2001).

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 AGCC, o principal substrato energético para as células epiteliais da mucosa cólica (Roediger, 1990; Giardiello *et al.*, 1995; Kiely *et al.*, 2001). Todavia, nenhum estudo experimental tinha examinado os mecanismos moleculares desencadeadores da CE. 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. Recentemente, 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; Longatti et al., 2010). 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., 2010b). Todas essas alterações histológicas e histoquímicas

relacionavam-se aos maiores níveis teciduais de RLO e, conseqüentemente, ao estresse oxidativo.

Ao demonstrar-se, experimentalmente, que o estresse oxidativo danifica a camada de muco e ocasiona erosões nas células superficiais, as primeiras linhas de defesa da barreira funcional, é possível que também possa comprometer as junções aderentes intercelulares. Estudos já demonstraram relação entre modificações na expressão tecidual das proteínas E-caderina e a colite ulcerativa e a colite quimicamente induzida (Dogan et al., 1995; Aust et al., 2001; Kucharzik et al., 2001). Entretanto, nos modelos experimentais de colite quimicamente induzida, sempre permanece a dúvida se o dano às junções ocorria em função do agente químico indutor da colite, pela ação de bactérias existentes no cólon com trânsito, ou por neutrófilos que migrariam para o local danificado pela substância química. Esses argumentos tornam o modelo de CE interessante para estudar a possibilidade de que o dano às junções aderentes possa ser ocasionado pelo estresse oxidativo.

Do melhor de nosso conhecimento, modificações no conteúdo e local de expressão tecidual das proteínas E-caderina nas criptas intestinais ainda não foi avaliado em doentes ou modelos experimentais de CE. Caso seja possível demonstrar que o estresse oxidativo também modifique o conteúdo e o local de expressão das proteínas nas criptas intestinais, estaríamos dando uma valiosa contribuição para subsidiar a teoria de indução da colite por radicais livres.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Colite de exclusão

Denomina-se de CE o processo inflamatório que se desenvolve na mucosa de segmentos do intestino grosso desprovidos de trânsito fecal (Glotzer *et al.*,1981). A doença foi descrita no início da década de oitenta e desde então, a melhor compreensão de seus mecanismos etiopatogênicos vem despertando interesse crescente. A CE apresenta aspectos clínicos e histopatológicos semelhantes aos encontrados na colite ulcerativa, tornando difícil o diagnóstico diferencial principalmente, nos doentes submetidos à derivação intestinal por complicações decorrentes das DII (Bosshardt e Abel, 1984; Geraghty e Talbot, 1991; Lavoine et al.,1996).

A necessidade de derivação do trânsito fecal pode ocorrer em diversas situações clínicas representadas pelas neoplasias obstrutivas do cólon, diverticulite aguda, doença de Crohn, colite ulcerativa, traumatismos ano-reto-cólico, doenças neurológicas e malformações congênitas (Korelitz et al., 1985; Keli et al., 1997; Bax e McNevin, 2007; Koutroubakis, 2008). Com o número crescente de cirurgias que visam preservar a função esfinteriana anorretal, confeccionando anastomoses cada vez mais próximas ao canal anal, a necessidade de realização de estomas de proteção também contribuiu para o aumento dos casos de CE (Huser et al., 2008; Tan et al., 2009; Ulrich et al., 2009).

Estima-se que 22% dos doentes submetidos a estomas de proteção temporários, e que desenvolvem complicações das anastomoses baixas ou ultra-baixas, tenham que conviver com a derivação intestinal pelo resto de suas vidas (Fischer et al., 2010). A necessidade de conviver indefinidamente com um segmento

de cólon sem trânsito fecal, também contribui para o aumento dos casos de CE (Keli et al., 1997; Fischer et al., 2010). Segmentos cólicos excluídos de trânsito fecal também são utilizados para reconstituição do trânsito urinário ou confecção de neovaginas (Desrayaud et al., 2003; Abbasakoor et al., 2004; Syed et al., 2001).

Com o progredir do tempo de exclusão, estudos vêm mostrando o aparecimento de CE nesses segmentos, com aspectos clínicos e histopatológicos semelhantes aos encontrados na doença inflamatória intestinal (Desrayaud et al., 2003; Abbasakoor et al., 2004).

A CE é diagnosticada em mais de 90% dos doentes submetidos ao exame endoscópico sistemático do intestino excluído de trânsito, após três meses da confecção do estoma (Haas et al., 1990). Cursa com intensidade leve em 52%, moderada em 44% e acentuada em 4% dos enfermos (Haas et al., 1990; Whelan et al., 1994). É provável que a incidência seja ainda maior, ao considerar-se que o trânsito intestinal só é restabelecido em 23,3% dos doentes submetidos, por exemplo, à cirurgia de Hartmann, condenando os demais a conviver pelo resto de suas vidas com o reto excluído (David et al., 2009). Nos doentes cujo trânsito intestinal é restabelecido, o período para a reconstituição é, em média, de 14 meses, podendo chegar até 60 meses, tempo mais do que suficiente para o desenvolvimento da CE (Habr-Gama et al., 1997; Curi et al., 2002; David et al., 2009).

O quadro clínico da CE encontra-se diretamente relacionado à extensão do cólon excluído de trânsito e ao tempo decorrido desde a derivação fecal (Glutzer et al., 1981; Sousa et al., 2008). Quando a extensão do cólon desprovido de trânsito e o tempo de exclusão são pequenos, o comprometimento da mucosa é menor, tornando os doentes praticamente assintomáticos (Lu et al., 1995). Naqueles que

evoluem com sintomas, as queixas mais comuns incluem dor abdominal, eliminação de sangue e muco pelo segmento excluído. Nos casos mais graves, pode haver sangramento de maior monta e formação de fissuras e fístulas perianais semelhante às encontradas nas DII (Ona e Boger, 1985; Habr-Gama et al., 1997). Esses mesmos sintomas também ocorrem nos doentes cujo cólon foi interposto para reconstituição do trato urogenital (Syed et al., 2001; Desrayaud et al., 2003; Abbasakoor et al., 2004).

O diagnóstico da enfermidade é feito pelo exame endoscópico com estudo histopatológico da mucosa excluída de trânsito. (Sousa et al., 2008). O exame mostra alterações em todos os doentes após 36 meses de exclusão intestinal (Lechner et al., 1990; Ferguson e Siegel, 1991). Macroscopicamente, a mucosa apresenta-se hiperemiada, congesta, friável, com apagamento dos vasos sanguíneos da submucosa e sangramento espontâneo ao mínimo contato do endoscópio (Lechner et al., 1990). Nos doentes muito sintomáticos, encontram-se úlceras aftóides na mucosa cólica, macroscopicamente indistinguíveis daquelas encontradas na colite ulcerativa, tornando problemático o diagnóstico diferencial (Lusk et al., 1984; Geraghty e Charles, 1994; Lu et al., 1995).

As alterações microscópicas diferem quando se compara os resultados de diferentes estudos, provavelmente pela falta de uniformidade em relação à doença de base que motivou a derivação fecal e, principalmente, pelas diferenças no tempo transcorrido desde a exclusão intestinal (Sousa et al., 2008). Estudos em seres humanos e em modelos experimentais de CE mostraram redução na espessura da camada mucosa, à custa de atrofia das criptas intestinais, bem como modificações na espessura das demais camadas da parede cólica (Ma et al., 1990; Biondo-Simões et al., 2000; Lopes-Paulo, 2002; Sousa et al., 2008). A depleção da

população de células caliciformes é aspecto controverso (Geraghty e Talbot, 1991, 2000; Lopes-Paulo, 2002; Sousa et al., 2008). Na mucosa encontra-se infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, linfócitos, macrófagos, plasmócitos e eosinófilos, (Roediger e Nance, 1986; Geraghty e Talbot, 1991; Sousa et al., 2008). Pode haver formação de abscessos na base das criptas e áreas de hiperplasia linfóide nodular, considerada a alteração histológica mais característica da doença (Murray et al., 1987; Yeong et al., 1991; Drut e Drut, 1992). Nessas áreas existe predomínio dos linfócitos B, em relação aos do tipo T, sugerindo que a resposta inflamatória na mucosa sem trânsito seja mais do tipo humoral, pela estimulação antigênica persistente, do que celular, pela menor possibilidade de infiltração bacteriana a partir de um segmento sem trânsito fecal (Grant et al., 1997; Chetty et al., 2009). Displasias nas criptas intestinais são raramente encontradas, mas podem desenvolver-se, sobretudo nos doentes submetidos à exclusão intestinal por tempo mais prolongado (Keli et al., 1997). Excepcionalmente, surgem microcarcinóides nessas áreas, principalmente naqueles enfermos com maior tempo de exclusão (Griffiths e Dixon, 1992). Entretanto, o desenvolvimento de neoplasias de origem epitelial nos doentes submetidos à derivação de trânsito, por moléstias não relacionadas às DII ou CCR, e que desenvolveram CE, ainda não foi descrito.

As bases fisiopatológicas para o desenvolvimento da CE não se encontram totalmente esclarecidas. Já se propôs que a doença tenha origem isquêmica, ou se deva a mudanças na quantidade e nas características da flora do cólon excluído, com redução da população bacteriana e predomínio das bactérias redutoras de nitrato (Villanacci *et al.*, 2007). Entretanto, a maioria dos autores propõe que a doença surja pela falta de AGCC na luz intestinal, provocada pela derivação fecal (Kiely et al., 2001; Oliveira-Neto e Aguilar-Nascimento, 2004; Wong et al., 2006). Essa

possibilidade fica mais evidente quando se demonstrou que a reconstituição do trânsito fecal, restabelecendo o substrato alimentar e a irrigação dos segmentos excluídos de trânsito, com soluções nutricionais ricas em AGCC, reverte as alterações clínicas e histopatológicas da CE (Wong et al., 2006; Szczepkowski et al., 2008).

Os AGCC, representados pelo butirato, acetato e propionato, são formados a partir da fermentação das fibras vegetais dietéticas e dos carboidratos, pelas bactérias anaeróbicas da luz intestinal. Respondem por 90% de todo o substrato metabolizável utilizado pelas células da mucosa cólica como fonte de energia (Jørgensen et al., 1997; Velazquez et al., 1997). Depois de formados, são rapidamente absorvidos para que as células epiteliais, através de reações oxidativas, obtenham a energia necessária para seu funcionamento normal (Roediger, 1982; Sousa et al., 2008).

Os mecanismos moleculares pelos quais a deficiência de AGCC leva ao aparecimento da CE não tinham sido totalmente esclarecidos. Estudos demonstram que quando ingeridos regularmente, os AGCC aumentam significativamente a taxa de consumo celular de oxigênio, confirmando sua importância como substrato metabolizável (Roediger, 1982 e 1990; Velazquez et al., 1997). Os AGCC possuem efeitos protetores contra o dano tecidual provocado pelos RLO por reduzirem os níveis de oxigênio tecidual (Liu et al., 2001).

Substâncias como o 2-bromo-octanoato sódico ou o ibuprofeno, que inibem a oxidação dos AGCC impedindo seu aproveitamento como substrato energético, provocam alterações histológicas características da colite, sugerindo que a redução do seu metabolismo seja um evento inicial na etiopatogenia da CE (Agarwal e Schimmel, 1989; Roediger e Millard, 1995). O desvio do trânsito intestinal,

impedindo a passagem dos AGCC para o segmento excluído, faz com que as células da mucosa cólica não disponham de seu principal substrato. Dessa forma, passam a usar a glutamina oferecida pela circulação sistêmica como fonte energética alternativa (Lopes-Paulo, 2002). Todavia, o suprimento sanguíneo de glutamina parece ser incapaz de fornecer todo substrato necessário, modificando, substancialmente, as reações celulares para obtenção de energia (Agarwal e Schimmel, 1989). Reforçam essas evidências resultados de estudos experimentais demonstrando que a administração intrarretal de altas concentrações de glutamina é capaz de reduzir a formação de RLO (Fillmann et al., 2007).

Recentemente mostrou-se em uma série de estudos seqüenciais que os mecanismos de lesão ao epitélio mucoso na CE, encontram-se relacionados ao estresse oxidativo decorrente da produção aumentada de RLO pelas células epiteliais carentes de AGCC (Martinez et al., 2007; Longatti et al., 2010; Martinez et al., 2010c). Os resultados encontrados sugerem, em última análise, que o estresse oxidativo pode ocasionar quebra da função da barreira epitelial, favorecendo o surgimento da colite. A melhora significativa do padrão histológico da CE, após administração de enemas com AGCC ou ácido 5 aminosalicílico (5-ASA), um potente antioxidante, no segmento excluído parece reforçar essas evidências (Nobels et al., 1989; Caltabiano et al., 2010).

Com objetivo de verificar se o aumento da produção de RLO poderia provocar alterações na primeira linha de defesa do epitélio cólico, representada pela camada de muco 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 (Nonose, 2009; Martinez et al., 2010b). Os autores constataram que nos segmentos sem trânsito fecal ocorre redução significativa na expressão

tecidual tanto das mucinas ácidas quanto das neutras (Nonose, 2009; Nonose et al., 2009). De modo peculiar, verificou-se que além da redução do conteúdo tecidual, ocorriam modificações no padrão de expressão dos subtipos de mucinas ácidas no cólon sem trânsito (Martinez et al., 2010b). Encontraram redução de ambos os subtipos de mucinas ácidas, porém mais significativa das sialomucinas, padrão oposto ao da colite ulcerativa, e no CCR associado à colite ulcerativa onde existe redução, principalmente, das sulfomucinas (Martinez et al., 2010b). Essas modificações encontravam-se relacionadas aos maiores níveis teciduais de estresse oxidativo (Martinez, 2009). Esses achados confirmam resultados de 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., 2009).

Todas essas evidências sugerem 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., 2010b).

Apesar de existirem estudos demonstrando que os RLO podem infringir danos às junções aderentes que compõem o complexo de adesão intercelular o comportamento das proteínas E-caderina/ β -catenina em modelos experimentais de CE, ainda não foi estudado (Rao et al., 2002; Ohata et al., 2005; Katsube et al., 2007).

2.2. Radicais Livres de Oxigênio

Radical livre refere-se a um átomo ou molécula com alta capacidade reativa, que contenha número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (Halliwell e Gutteridge, 1990). Este desemparelhamento eletrônico pode ocorrer pela perda ou aquisição de um elétron. As reações de redução implicam no ganho de elétrons

enquanto as de oxidação, em perda. Como exemplo, no metabolismo celular normal durante a fosforilação oxidativa no interior das mitocôndrias, quando ocorre redução do oxigênio molecular (O_2), existe ganho de um elétron, formando o radical superóxido (O_2^-), considerado um verdadeiro RLO por possuir número ímpar de elétrons na sua última camada atômica e pela sua alta reatividade (Ferreira e Matsubara, 1992).

Pesquisas vêm sendo realizadas para esclarecer a importância dos RLO em diversas enfermidades, tais como a aterosclerose, CCR e diferentes formas de DII, entre as quais as colites (Ribeiro et al., 2007 e 2008; Martinez et al., 2010a).

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

Os RLO são encontrados em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo energético celular o O_2 sofre redução gradual em quatro etapas. Esta redução tetravalente (aquisição seqüencial de quatro elétrons) resulta na formação de H_2O e energia (Figura 1) (Ferreira e Matsubara, 1992). Durante esse processo são formados produtos intermediários reativos, representados pelos radicais O_2^- , hidroperoxila (HO_2), hidroxila (OH) e H_2O_2 . Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre no interior das mitocôndrias, e a alta reatividade dos produtos intermediários formados é neutralizada pela aquisição progressiva de quatro elétrons formando a H_2O .

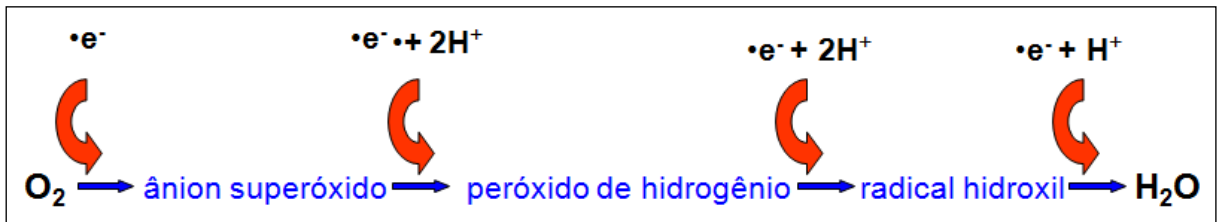


Figura 1 - Redução tetraivalente do oxigênio em água

Nos organismos aeróbios, o O_2 é reduzido à H_2O na fase final da respiração celular, conhecida como fosforilação oxidativa. A molécula de O_2 mantém-se unida ao complexo citocromo-oxidase na cadeia respiratória até que ocorra sua redução total em H_2O . Durante esse processo, ao receber o primeiro elétron ocorre formação, como produto intermediário inicial, do ânion O_2^- . Com a adição de um átomo de hidrogênio a duas moléculas do ânion O_2^- , este se reduz ao segundo produto intermediário, representado pelo H_2O_2 . Posteriormente, se um terceiro elétron for acrescentado, ocorrerá à formação do terceiro RLO, representado pela OH . Finalmente, após receber o quarto elétron ocorre a reação final formando H_2O e O_2 . Desse modo, todas as células do epitélio intestinal formam RLO permitindo a geração de moléculas ou íons reativos durante o seu processo de redução (Thannickal e Fanburg, 2000). Para que o ânion O_2^- , primeiro RLO formado no processo de transformação do O_2 em H_2O , não danifique a célula, ocorre sua remoção por dismutação, que consiste na reação entre dois átomos de O_2^- catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O produto formado pela dismutação do ânion O_2^- , pela SOD, é o H_2O_2 . Os sistemas enzimáticos intrínsecos das células, comumente encontrados nos peroxissomos, são capazes de degradar o H_2O_2 , substância muito tóxica para a célula pela sua alta capacidade de difusão e de destruição de proteínas e fosfolípedes que formam as membranas celulares (Pravda, 2005). Dentre os sistemas enzimáticos mais comuns que atuam

como neutralizantes do H₂O₂ encontram-se a catalase, β -oxidase dos AGCC e a glutathiona peroxidase. O H₂O₂, apesar de não ser considerado um RLO propriamente dito, por não apresentar elétrons em número ímpar na sua última camada eletrônica, pode reagir com outro ânion O₂^{-•} ou com o íon ferro (Fe⁺⁺⁺) pelas reações de Haber-Weiss e Fenton, formando o radical OH[•] (Figura 2) (Halliwell e Gutteridge, 1997; Thannickal e Fanburg, 2000).

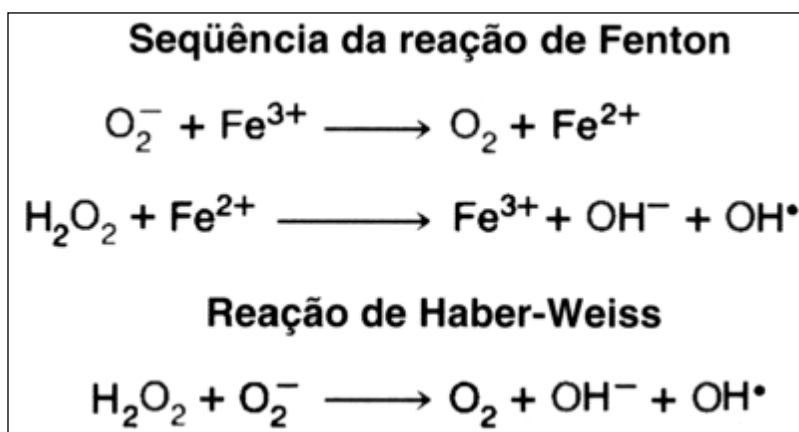


Figura 2 - Reações de Fenton e Haber-Weiss para formar OH

Estudos experimentais em ratos com colite induzida demonstram que a suplementação de Fe⁺⁺⁺ agrava o processo inflamatório à mucosa cólica, e a chance do desenvolvimento de CCR, provavelmente por aumentar a produção do radical OH pelas reações de Fenton e Haber-Weiss (Rigo et al., 1977; Seril et al., 2002). Este radical é extremamente tóxico para a célula, sendo considerado o mais danoso de todos os RLO, podendo danificar membranas, organelas, DNA e demais constituintes naturais (Ribeiro et al., 2008). Depreende-se do exposto que a formação de RLO ocorre, normalmente, durante os processos de oxidação de substratos alimentares, dentre os quais se destaca a fosforilação oxidativa. Alterações no suprimento de AGCC, tais como a que ocorre na derivação do trânsito intestinal, podem interferir nos mecanismos de redução do O₂ a H₂O na cadeia respiratória mitocondrial, aumentando a produção de RLO (Martinez, 2009).

2.3. Defesas Antioxidantes

É essencial para a célula manter sua homeostase, o perfeito equilíbrio entre produção e neutralização dos RLO, pelos sistemas de defesa antioxidante. As substâncias com atividade oxidante são constantemente formadas como consequência direta do metabolismo energético celular (Gutteridge e Halliwell, 2000). Para proteger-se dos RLO a célula possui sistemas de defesa antioxidante definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas àquelas de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou impede a oxidação daquele substrato (Fillmann, 2007). A função dessas substâncias é manter os níveis de RLO em baixas concentrações, e para isso podem atuar em duas linhas de defesa. Uma delas, preventiva, atua como detoxificadora do agente oxidante antes que ele cause lesão celular (Fillmann, 2007). Esta linha de defesa é constituída pelos sistemas enzimáticos da SOD, catalase, glutathiona reduzida, glutathiona peroxidase e vitamina E (α -tocoferol). A outra linha de defesa tem a função de combater os RLO depois de formados, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase e glutathiona peroxidase (Fillmann, 2007). Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana celular, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (Ferreira e Matsubara, 1992).

Os principais sistemas antioxidantes são formados por enzimas e podem atuar diretamente contra os RLO ou, ainda, reparar os danos causados ao organismo por essas moléculas. São conhecidos três sistemas enzimáticos antioxidantes: o primeiro é composto por dois tipos de enzimas SOD, que catalisam a destruição do ânion superóxido O_2^- convertendo-o em O_2 e H_2O_2 . A decomposição do ânion

superóxido O_2^- ocorre naturalmente porém, por ser uma reação de segunda ordem, necessita que ocorra colisão entre duas moléculas de O_2^- , de forma que há necessidade de maior concentração do radical ânion O_2^- . A presença da enzima SOD favorece essa dismutação tornando a reação de primeira ordem, eliminando a necessidade da colisão entre as moléculas (Barreiros et al, 2006). A ação desta enzima permite a eliminação do O_2^- mesmo em baixas concentrações.

Existem duas formas de SOD no organismo, a primeira contém Cu^{++} e Zn^{++} como agente de redução e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. A segunda contém Mn^{++} como agente de redução, ocorre na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo (Barreiros et al, 2006).

O segundo sistema de prevenção é muito mais simples, sendo formado pela enzima catalase que atua na dismutação do H_2O_2 em O_2 e H_2O . O terceiro sistema é composto pela GSH em conjunto com duas enzimas glutatona peroxidase e glutatona redutase. A presença do selênio na enzima (selenocisteína) explica a importância desse metal e sua atuação como antioxidante nos organismos vivos. Esse sistema também catalisa a dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2 , sendo que a glutatona opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida. A GSH reduz o H_2O_2 a H_2O em presença de glutatona peroxidase formando uma ponte dissulfeto e, em seguida, é regenerada (Ferreira e Matsubara, 1992; Barreiros et al., 2006).

Dentre os antioxidantes biológicos de baixo peso molecular, podem ser destacados os carotenóides, a bilirrubina, a ubiquinona e o ácido úrico. Porém, as mais importantes micromoléculas no combate ao estresse oxidativo são os tocoferóis e o ácido ascórbico (vitamina C).

2.4. Colite e Estresse Oxidativo

Nos últimos anos um acúmulo crescente de evidências experimentais sugere que a mucosa do cólon é exposta, constantemente, a consideráveis níveis de estresse oxidativo. As mais prováveis fontes de produção de RLO são os leucócitos fagocitários presentes em grande número na mucosa inflamada (Naito et al., 2007). Os leucócitos fagocitários são conhecidos pela capacidade de produzir quantidades significativas de RLO em resposta a determinados estímulos inflamatórios, como a infiltração bacteriana (Chance et al., 1979; Naito et al., 2007). Os RLO produzidos pelos neutrófilos atuam como potentes agentes bactericidas. Como as células da mucosa cólica apresentam deficiências em seus sistemas antioxidantes intrínsecos, por possuírem menores quantidades de SOD, catalase e glutathione peroxidase, é possível que o epitélio intestinal possa ser destruído por RLO durante os períodos de maior infiltração neutrofílica (Fillmann, 2007). Entretanto, há décadas se demonstrou que muitos doentes apresentam quebra da barreira epitelial sem que exista a presença de células inflamatórias, sugerindo que a lesão epitelial seja ocasionada por RLO produzidos anteriormente à infiltração leucocitária (Levine et al., 1951; Pravda, 2005). Estudos experimentais utilizando modelo de CE confirmaram essas suspeitas ao encontrarem maior grau de destruição tecidual e altos níveis de RLO na mucosa cólica sem trânsito fecal, sem que existisse infiltração neutrofílica avaliada pela dosagem tecidual da enzima mieloperoxidase (MPO) (Martinez, 2009; Longatti et al., 2010). Essas evidências sugerem que as próprias células epiteliais da mucosa cólica possam estar envolvidas no processo de agressão à membrana basal.

Assim, atualmente vem sendo proposto que o processo inicial para o desencadeamento da colite ocorre na interface entre as células epiteliais e a membrana basal por formação exagerada de RLO (Kruidenier e Verspaget, 2002; Pravda, 2005; Rezaie et al., 2007).

Em 1960 foi possível reproduzir em ratos quadros agudos e crônicos de colite pela infusão intrarretal de soluções de H₂O₂ a 3% (Sheehan e Brynjolfsson, 1960). Cabe destacar que esse foi o primeiro modelo experimental que reproduziu as alterações histológicas encontradas em doentes com colite ulcerativa. O exame microscópico *post-mortem* dos animais demonstrou ulcerações da mucosa cólica e infiltração neutrofílica próxima a segmentos com mucosa normal. Nos ratos sobreviventes as ulcerações cicatrizaram em tempo médio de 10 semanas, com exceção de algumas localizadas nas porções mais caudais do reto (Sheehan e Brynjolfsson, 1960). Estes três achados: áreas de inflamação mucosa convivendo com áreas normais, inflamação localizada principalmente no cólon esquerdo e o caráter recorrente do processo inflamatório, também são características encontradas em doentes com colite. A toxicidade do H₂O₂ é tão intensa que mesmo pequenas concentrações, quando em contato com a mucosa cólica, produzem quadro clínico e histológico indistinguíveis da colite (Pravda, 2005).

Essas mesmas alterações também podem ser encontradas em seres humanos. Uma série de casos relacionou a instilação de H₂O₂ intrarretal ao aparecimento de inflamações da mucosa do cólon e reto, semelhantes às que ocorrem na colite ulcerativa e na CE (Sheehan e Brynjolfsson, 1960; Bilotta e Waye, 1989). Contudo, surgiram referências ao desenvolvimento de formas graves de colite, até mesmo fatais, subseqüentes ao uso de enemas com H₂O₂ com esse objetivo terapêutico (Benson e Bargaen, 1939). Mesmo pequenas quantidades da

substância, como as utilizadas para a limpeza dos colonoscópios, podem causar colite (Bilotta e Wayne, 1989). Restava dúvida quanto à capacidade das células normais da mucosa cólica de produzir RLO.

Tais dúvidas foram dirimidas, quando se demonstrou que os colonócitos produzem, constantemente, H₂O₂ como produto do metabolismo celular aeróbico (Chance et al., 1979; Eaton e Qian, 2002). Verificou-se que em condições normais, 90% do H₂O₂ é formado como radical tóxico pela cadeia respiratória de transporte de elétrons no interior das mitocôndrias (Eaton e Qian, 2002).

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

A importância do estresse oxidativo na colite fica mais evidente com os resultados de estudos demonstrando que o emprego de substâncias antioxidantes, enzimáticas como a SOD e naturais ou sintéticas como a acetilcisteína, deferoxamina, quercitrina, rofecoxibe, curcumina e o ácido 5-ASA são capazes de diminuir, em animais experimentação, a agressão oxidativa na colite quimicamente induzida por sulfato sódico de dextrana (DSS) (Blau et al., 2000; Arafa et al., 2009). Da mesma forma, recentemente, demonstrou-se que o ácido 5-ASA, muito utilizado no tratamento da colite ulcerativa, também se mostrou eficaz no tratamento da CE por reduzir os níveis de estresse oxidativo tecidual (Máximo et al., 2009; Caltabiano et al., 2010).

2.5. Mecanismos de Adesão Celular

A adesão celular é uma característica primária da arquitetura de muitos tecidos. O tecido que reveste o tubo digestivo é formado por uma única camada de células epiteliais com funções absorptivas, intimamente aderidas entre si, e à lâmina basal, localizada subjacente ao epitélio mucoso (Alberts et al., 2004). As células epiteliais da mucosa cólica unem-se umas às outras por sistemas de adesão célula-célula, as quais suportam grande parte do estresse mecânico. Para manter esse mecanismo, filamentos protéicos de actina que formam o citoesqueleto celular, atravessam o citoplasma de cada célula epitelial e unem-se a junções especializadas localizadas na membrana plasmática. Esse mecanismo é composto por numerosas moléculas de adesão celular (CAM). As CAM podem ser moléculas de adesão entre duas células vizinhas ou entre uma célula e a lâmina basal. Na mucosa do cólon essas moléculas são dependentes de cálcio (Ca^{++}) e podem ser destruídas quando se expõe o epitélio a substâncias quelantes do Ca^{++} como o etileno-diamino-tetra-acético (EDTA).

As CAM quando unem células semelhantes o fazem através de adesões denominadas homofílicas e, quando unem células de diferentes tecidos formam as adesões heterofílicas. As CAM da família das integrinas são responsáveis por manter as células epiteliais firmemente aderidas à lâmina basal, enquanto as junções celulares e os desmossomos respondem pelo sistema de adesão intercelular (Alberts et al., 2004). As junções intercelulares especializadas localizam-se em pontos onde existe contato entre duas células ou entre uma célula e a matriz extracelular.

As junções íntimas têm como principal função selar, hermeticamente, as membranas entre duas células com intuito de evitar que moléculas pequenas migrem de um lado para outro do espaço intercelular (Lodish et al., 2004). Ao mesmo tempo, devem permitir a passagem de nutrientes selecionados através do epitélio para o fluido extracelular (Alberts et al., 2004) As junções íntimas são formadas principalmente, pelas claudinas, ocludinas e proteínas ZO responsáveis pela formação da zona ocludente.

Estudos analisando a mucosa inflamada de doentes com colite ulcerativa ou em modelos experimentais de colite induzida encontraram redução do conteúdo tecidual das proteínas que formam as junções bloqueadoras, principalmente as claudinas, facilitando a infiltração bacteriana e a migração neutrofílica pelo epitélio intestinal (Hanby et al., 1996; Gassler et al., 2001). As junções comunicantes controlam a passagem de impulsos elétricos ou químicos de uma célula à outra, estabelecendo uma fantástica rede de comunicação entre um grupo de células justapostas (Lodish et al., 2004). Finalmente, as junções aderentes conectam o citoesqueleto interno de uma célula a outra, através de um complexo protéico formado pelas proteínas das famílias das caderinas, cateninas, vinculinas e actinina. As junções aderentes também se comunicam com proteínas das vias de sinalização intracelulares, capacitando-as a participarem dos mecanismos de sinalização existentes no interior das células.

As caderinas são as principais proteínas constituintes das junções aderentes (Alberts et al., 2004). Pertencem a família das CAM dependentes de Ca^{++} e desempenham papel fundamental na diferenciação tecidual, polarização e estratificação epitelial (Duband e Thierry, 1990). Já foram descritos mais de 40 tipos de caderinas, segundo o tecido onde são encontradas; porém, as mais comuns são

as caderinas E (epitelial), P (trofoblasto) e N (sistema nervoso). A E-caderina, é principal molécula de adesão celular encontrada no epitélio cólico (Gumbiner e McRea,1993). É uma proteína transmembrana com peso molecular de 120 kDa, transcrita a partir do gene *cdh1*, localizado no cromossomo 16q22.1 que, caracteristicamente, possui duplo domínio funcional, um extracelular e outro citoplasmático. O domínio citoplasmático da E-caderina se une a uma ou mais proteínas de ancoramento intracelular, enquanto o domínio extracelular interage com o domínio extracelular de outra molécula homóloga, proveniente da célula vizinha, por um mecanismo dependente de Ca^{++} (Figura 3) (Alberts et al., 2004; Lodish et al., 2004). No espaço intercelular, íons Ca^{++} se posicionam entre cada molécula de E-caderina, mantendo as proteínas juntas com intuito de constituir um mecanismo de adesão mais rígido. A E-caderina atua como proteína de adesão transmembrana, ligando indiretamente a actina do citoesqueleto de duas células vizinhas. No domínio citoplasmático, a E-caderina interage com filamentos de actina de forma indireta, por meio de um grupo de proteínas de ancoramento denominadas cateninas, localizadas no citoplasma celular, paralelas ao folheto interno da membrana plasmática (Alberts, 2004).

Para que ocorra o ancoramento entre a E-caderina e a actina do citoesqueleto celular, proteínas da família das cateninas (α -catenina, β -catenina, γ -catenina e p120) são imprescindíveis. As cateninas comunicam o domínio citoplasmático da E-caderina com a actina celular por meio de interações entre as diferentes isoformas da proteína (Nagafuchi e Takeichi, 1988; Demetter et al., 2000).

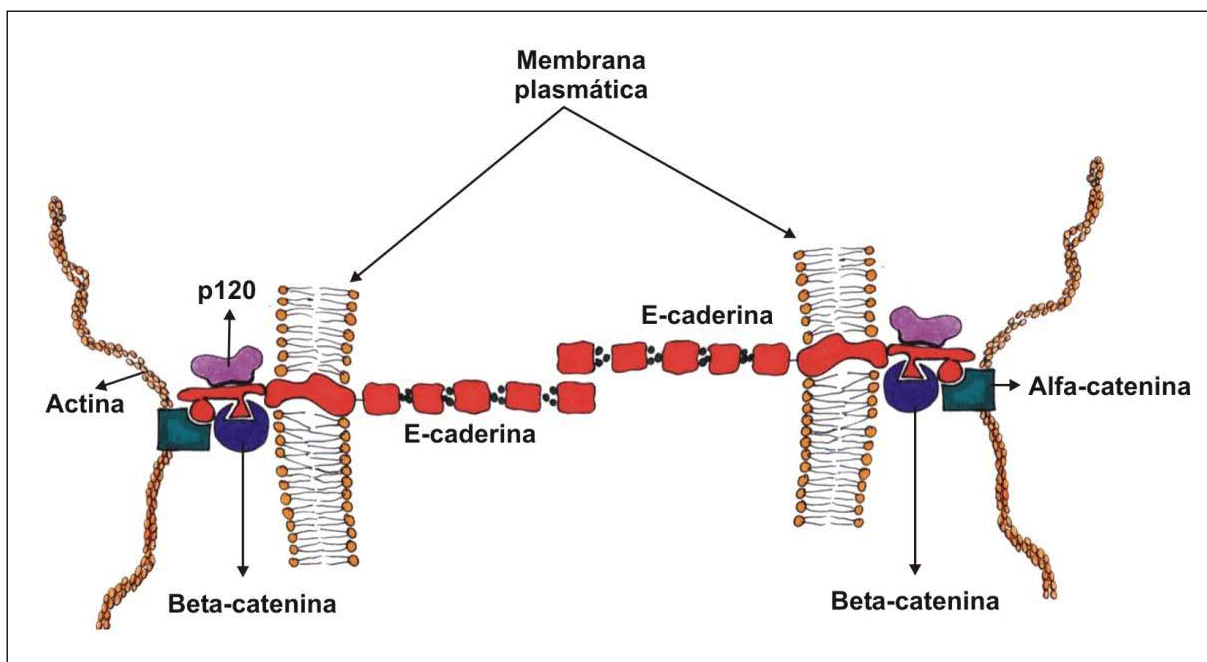


Figura 3 - Junção de ancoramento (junção aderente) do epitélio cólico [Modificado de Pećina-Slaus (2010)]

No epitélio cólico normal, o maior contingente da proteína E-caderina se expressa nas junções de aderência situadas logo abaixo das junções ocludentes na superfície luminal das células. Estudos utilizando técnicas imunohistoquímicas demonstraram que a E-caderina é encontrada principalmente nas membranas das células epiteliais especializadas voltadas para a luz intestinal (Jankowski et al., 1998). Durante a diferenciação celular e em algumas DII existe redução no conteúdo da E-caderina, alterando, sensivelmente, os mecanismos de adesão célula-célula. Estudos já demonstraram que ocorre redução substancial na expressão tecidual da proteína E-caderina nas células da superfície mucosa de doentes com colite ulcerativa, CCR associado à colite ulcerativa e CCR esporádico (Aust et al., 2001). A comparação entre tecidos normais e inflamados, em portadores de colite ulcerativa mostra redução significativa do conteúdo tecidual de E-caderina apenas nos locais onde existe doença ativa, mas em nenhum tecido normal (Karayiannakis et al., 1998). Esses resultados confirmam a forte relação existente entre redução no

conteúdo da E-caderina na superfície epitelial e a progressão das colites (Jankowski et al., 1998) Confirmaram esses achados pesquisas utilizando camundongos geneticamente silenciados para o gene que transcreve a E-caderina, mostrando que animais que não expressam a proteína desenvolvem alterações histológicas semelhantes às encontradas na colite ulcerativa humana, incluindo ulcerações epiteliais, abscessos nas criptas cólicas e infiltrado neutrofílico mucoso (Hermiston e Gordon, 1995).

Vários mecanismos são capazes de destruir as junções aderentes no epitélio cólico. Dentre esses mecanismos o estresse oxidativo merece lugar de destaque (Parrish et al., 1999). Estudos mostram que exposição da mucosa cólica a altas concentrações de RLO pode oxidar o Ca^{++} que mantém unidas as moléculas de E-caderina situadas entre duas células (Parrish et al., 1999). Quando existe oxidação das moléculas de Ca^{++} , aumenta o conteúdo citoplasmático da β -catenina e, conseqüentemente, a divisão celular (Parrish et al., 1999; Pravda, 2005). Os RLO também podem dissociar as junções entre a E-caderina e a β -catenina no citosol celular, por um mecanismo tirosina-quinase dependente, o que também pode levar ao acúmulo citoplasmático da β -catenina induzindo a divisão celular (Katsube et al., 2007). Todavia, essa possibilidade é difícil de ser estudada nos modelos de colite quimicamente induzida, pois a ruptura das junções aderentes pode ocorrer pela ação dos agentes lesivos.

Acreditamos que com o modelo de CE torna-se possível verificar se o estresse oxidativo é capaz de degradar as proteínas formadoras das junções aderentes. Como no modelo de CE não existe exposição das junções a nenhuma substância tóxica, talvez seja possível mostrar que eventuais modificações na expressão da E-caderina decorram apenas do estresse oxidativo, ocasionado apenas pelo aumento

da produção de RLO por células epiteliais metabolicamente alteradas. Embora estudos já tenham mostrado a relação entre modificações no conteúdo e padrão de expressão tecidual da proteína E-caderina em doentes e modelos experimentais de colite ulcerativa, do melhor de nosso conhecimento, esta possibilidade ainda não foi avaliada em enfermos ou modelos experimentais de colite de exclusão.

À luz dessas considerações, torna-se interessante verificar se o estresse oxidativo altera o conteúdo e modifica o local de expressão da proteína E-caderina. Caso essa possibilidade seja confirmada, teríamos mais uma evidência experimental em favor da teoria de indução da colite por RLO.

3. OBJETIVOS

1. Quantificar, por morfometria computadorizada, a expressão tecidual de E-Caderina na mucosa cólica de segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal;
2. Verificar a influência do tempo de exclusão de trânsito fecal na quantidade tecidual de E-Caderina em segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito intestinal.
3. Verificar a influência do estresse oxidativo na etiopatogenia da colite de exclusão.

4. 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 no Uso de Animal em Pesquisa (CEUAP) da Universidade São Francisco, Bragança Paulista (Anexo A).

4.1 Grupos experimentais

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

Foram constituídos, aleatoriamente, três grupos experimentais com 20 animais, divididos segundo o sacrifício ter sido realizado seis, 12 e 18 semanas após a intervenção cirúrgica. Cada grupo foi dividido em dois subgrupos denominados experimento e controle. No primeiro subgrupo, com 15 animais, foi realizada a derivação do trânsito intestinal o cólon esquerdo (subgrupo experimento) e no segundo, composto de cinco animais, foi realizada apenas laparotomia sem derivação do trânsito (subgrupo controle).

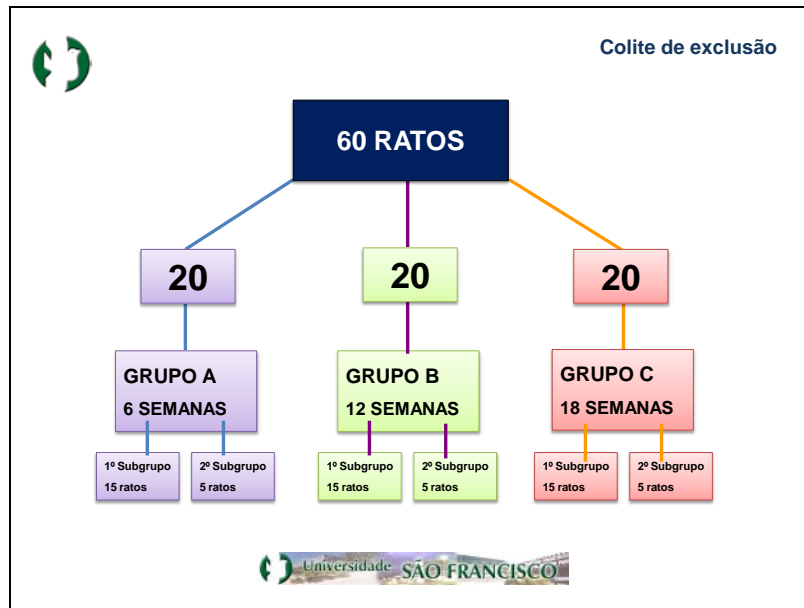


Figura 4 - Esquema da distribuição dos grupos experimentais

4.3 ETAPA PRÉ-OPERATÓRIA

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

4.4 ANESTESIA

No dia da intervenção, animais foram pesados para o cálculo da dose de anestésico. Para tal, foi utilizado o cloridrato de xilazina 2%1 e o cloridrato de quetamina na dose de 0,1mL/100g, administrado por via intramuscular na pata traseira esquerda.

Os animais foram pesados semanalmente durante todo o período do experimento até a data do sacrifício (Anexo C).

4.5 TÉCNICA OPERATÓRIA

Depois de anestesiados e fixos à mesa cirúrgica, em decúbito dorsal horizontal, foi realizada a tricotomia da região abdominal, da pelve até as rebordas costais, com aparelho elétrico de depilação. Utilizou-se a polivinilpirolidona-iodo para anti-sepsia da área depilada, posteriormente, recoberta por campo cirúrgico fenestrado estéril. A cavidade abdominal foi aberta por meio de incisão longitudinal mediana com três centímetros de extensão. Terminada essa etapa, foi identificada a placa de Peyer, estrutura linfóide situada na face anterior do cólon na transição entre o reto e o sigmóide (Figura 5). Com o auxílio de paquímetro, foi medida a distância entre a placa de Peyer e o local escolhido para a secção do cólon esquerdo, que seria a 4 cm acima da extremidade superior da placa. Após ligadura dos vasos da arcada cólica marginal (Figura 6), foi seccionado o cólon no ponto escolhido e exteriorizado o segmento proximal, como colostomia terminal, pela incisão circular, com 3 mm de diâmetro, realizada na região do hipocôndrio esquerdo. Fixou-se a colostomia à pele com pontos separados de fio absorvível monofilamentar 4-0³ nos quatro pontos cardinais, e depois entre eles, amarrando sempre com três nós.

Terminada a confecção da colostomia proximal, foi cateterizado o segmento caudal do intestino grosso com sonda de polivinil medindo 12 F de diâmetro interno, e o irrigou-se com 40 mL de solução fisiológica 0,9% aquecida a 37°C (Figura 7), até que o efluente drenado pelo ânus não apresentasse material fecal. Concluída a irrigação, o cateter foi removido, exteriorizado o cólon distal como colostomia (fístula mucosa distal) na face lateral inferior esquerda da parede abdominal (Figura 8). A

colostomia distal foi fixada com a mesma técnica utilizada na colostomia proximal. Realizou-se síntese da parede abdominal em dois planos de sutura: peritônio e aponeurose com pontos contínuos de fio de ácido poliglicólico 4-0 e a pele com pontos separados de nylon 4-0.

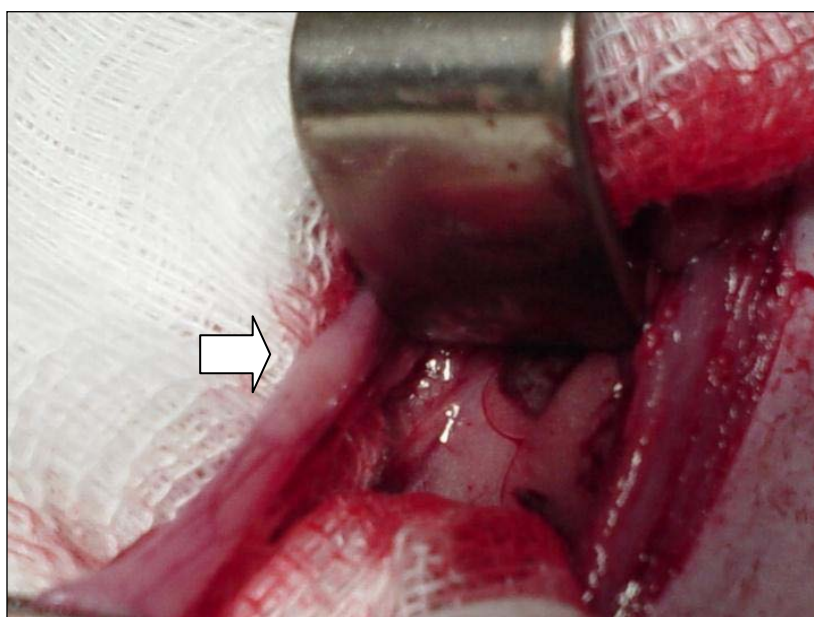


Figura 5 - Identificação da placa de Peyer (seta) na parede anterior da transição entre o reto e o cólon sigmóide

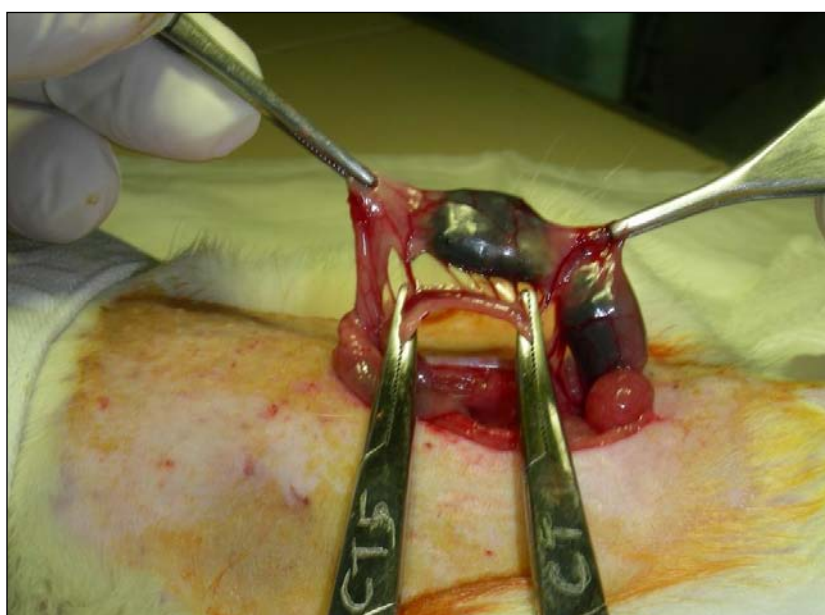


Figura 6 - Ligadura da artéria marginal do cólon descendente no ponto determinado para confecção dos estomas



Figura 7 - Limpeza mecânica anterógrada do cólon distal a ser excluído de trânsito fecal



Figura 8 - Aspecto final da parede abdominal após confecção dos estomas. Colostomia distal

4.6 PÓS-OPERATÓRIO

Concluída a operação, os animais foram mantidos por 10 minutos sob lâmpada aquecida e, após a recuperação anestésica, alojados nas gaiolas individuais previamente identificadas. Foi liberada a ingestão de H₂O e ração padronizada, após terem recuperado completamente o estado de vigília.

Os animais permaneceram em gaiolas individuais até a data do sacrifício, nas mesmas condições ambientais de umidade, luminosidade e temperatura do período de pós-operatório. Após a intervenção, não foi tomado qualquer cuidado adicional com relação à ferida operatória ou aos estomas, nem foram utilizados analgésicos ou antimicrobianos.

4.7 COLETA DO MATERIAL

Na véspera do dia programado para a coleta do material, os animais foram novamente pesados e mantidos em jejum por 12 h, exceto para água.

Para a remoção dos fragmentos cólicos a serem estudados, foram anestesiados com a mesma técnica anteriormente descrita, e foi realizada incisão xifopúbica. Após liberação das aderências, caso presentes, removeu-se o cólon provido de trânsito, incluindo a colostomia, e todo o segmento caudal do cólon desprovido de trânsito fecal, incluindo o ânus. Nos animais do subgrupo controle, ressecou-se todo o intestino grosso, incluindo o ânus. Os animais foram sacrificados, ainda sob efeito anestésico com dose inalatória letal de éter.

Depois de removidos os segmentos, foram abertos longitudinalmente, pela face anti-mesocólica, e lavados com soro fisiológico a 0,9% aquecido a 37°C, para remoção dos resíduos fecais ou muco. De cada segmento (providos e desprovidos de trânsito) foram retirados três fragmentos, medindo cada um deles 20 mm de

extensão, o primeiro destinado à confecção dos blocos de parafina e os outros para determinação dos níveis de MPO tecidual (infiltração neutrofílica) e de estresse oxidativo tecidual pelo ensaio em cometa. Os três fragmentos do segmento provido de trânsito foram colhidos a um centímetro da fixação do estoma no peritônio parietal, desprezando a região da colostomia e os fragmentos dos segmentos sem trânsito, 10 mm a partir da fixação do estoma ao peritônio parietal e 5 mm acima do ânus, desprezando o canal anal. Nos animais do grupo controle, foram colhidos, seqüencialmente, o mesmo número de fragmentos também com 20 mm de comprimento 10 mm acima da placa de Peyer. Nos fragmentos destinados à mensuração dos níveis de estresse oxidativo, foi isolada a mucosa (Figura 9) das demais camadas da parede, por micro-dissecação realizada com o auxílio de lupa entomológica, que foi acondicionada em frasco com solução tampão, após identificação, e refrigerada a -80°C .

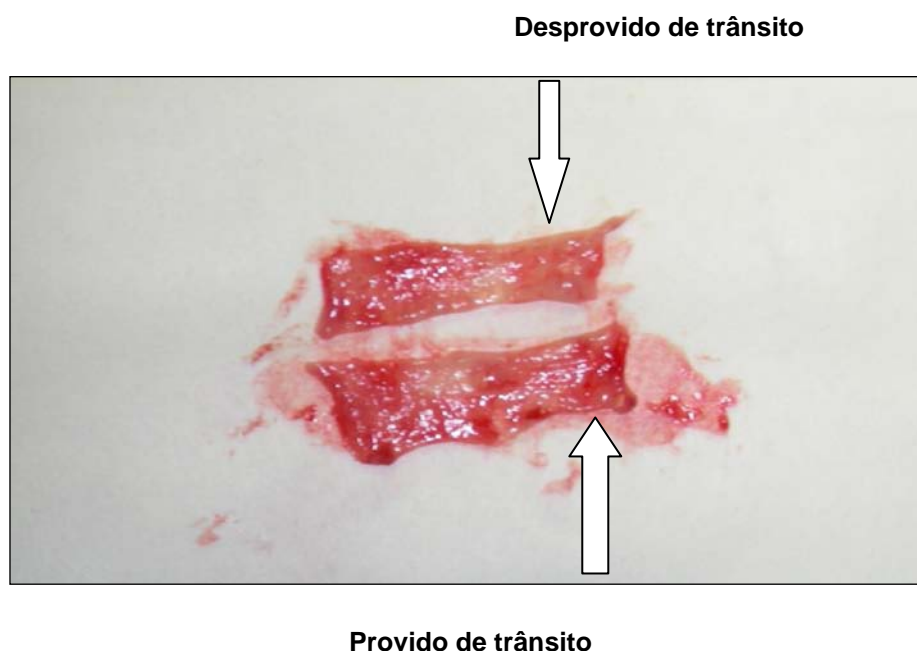


Figura 9 - Fragmentos de mucosa cólica dos segmentos desprovidos e providos de trânsito fecal.

4.8 TÉCNICA HISTOLÓGICA

Para a realização do estudo histopatológico, foram dispostos e fixados com alfinetes fragmentos com 20 mm de extensão, retirados dos cólons com e sem trânsito de cada animal do grupo experimento e do cólon esquerdo dos animais do grupo controle, em superfície plana de cortiça com a face mucosa voltada para cima. Após identificação, acondicionamos o material foi acondicionado em frascos contendo 20 mL de solução de formaldeído tamponado a 10%. Os espécimes foram dispostos tomando-se o cuidado para que ficassem totalmente imersos na solução onde permaneceram por 72 h. Depois deste período foram retirados, lavados em água corrente e água destilada para, em seguida, serem desidratados em sucessivas concentrações crescentes de álcool e clarificados em xilol. Após essa etapa, o material foi incluído em blocos de parafina. Cada bloco foi submetido a três cortes longitudinais, com 5 μ de espessura, para confecção das lâminas destinadas ao estudo histológico convencional e painel imunohistoquímico para as proteínas E-caderina e β -catenina. As lâminas destinadas à avaliação da presença de colite foram coradas com a técnica da hematoxilina-eosina (HE).

4.9 TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA (E-CADERINA)

Para realização da técnica imunohistoquímica para pesquisa da proteína E-caderina no bloco previamente confeccionado, foram realizados cortes histológicos, com 5 μ de espessura em todas as amostras colhidas dos animais do subgrupo controle e 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 pesquisa da expressão tecidual da E-caderina, as lâminas foram cobertas com anticorpo primário anti-E-caderina, específico de rato (Ref. M3612, Lote. 10026955)⁷, diluído a 1:50 em albumina bovina (1%). As lâminas foram cobertas com 100 µL da solução contendo o anticorpo primário, e mantidas em refrigeração a 4°C por 24 horas. As lâminas foram então lavadas com PBS, incubadas com anticorpo secundário e submetidas ao complexo de coloração estreptavidina-biotina-peroxidase¹⁰ por 45 minutos, preparado com uma diluição de 1:100 em PBS. As lâminas foram desenvolvidas usando preparação de 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. A seguir foram então lavadas, e contra coradas com verde de metila por um minuto e, novamente, lavadas em água destilada. Finda a contra coloração, foram então 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 horas.

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.

4.10 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A análise das lâminas foi feita com microscópio óptico comum, Nikon Eclipse DS-5011, com magnificação final de 200 x, por patologista experiente em doenças colorretais e técnicas imunohistoquímicas e que desconhecia a origem do material e os objetivos do estudo. A documentação fotográfica das lâminas selecionadas foi feita com câmera de vídeo-captura (DS-Fi- 50)12, acoplada ao microscópio trinocular. As imagens capturadas foram, posteriormente, digitalizadas e armazenadas no computador e em dispositivo de memória removível (*pen-drive*) para cópia de segurança [extensões de arquivo de imagem *tagged image file format* (tiff) e NISElements (NIS)].

Para avaliar a presença de colite, foram considerados os seguintes parâmetros histológicos: presença de ulcerações no epitélio e escore de graduação inflamatória, segundo escala anteriormente proposta, modificada quanto a sua estratificação (Gupta et al., 2007) (Tabela 1).

Tabela 1 - Escala de graduação do escore inflamatório

Grau de inflamação	Escore	Características histopatológicas
Ausente	0	Sem infiltração neutrofílica tecidual
Leve	1-3	Infiltração neutrofílica (<50% das criptas) OU Infiltração neutrofílica (<50% dos campos) + Ausência de erosões ou úlceras
Moderado	4-6	Infiltração neutrofílica (≥ 51% das criptas) OU Infiltração neutrofílica (≥ 51% dos campos) + Ausência de erosões ou úlceras
Intenso	7-8	Presença de erosões ou úlceras

Modificada de Gupta et al.(2007)

4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO TECIDUAL DE E-CADERINA

A expressão das proteínas 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 a mediana encontrada, após leitura de três campos diferentes que apresentassem pelo menos três criptas íntegras e contíguas, A graduação em cruces foi feita por dois observadores independentes e os resultados conflitantes foram posteriormente analisados em conjunto. As diferenças encontradas entre os observadores foram dirimidas por um terceiro observador. Nenhum deles conhecia o local do cólon de onde o material havia sido removido nem a proteína estudada.

O conteúdo tecidual total de E-caderina foi mensurado por análise de imagem assistida por computador (morfometria computadorizada), quantificando-se o conteúdo de ambas, em três criptas cólicas contíguas em três campos aleatórios. A imagem selecionada, após adequadamente focada, foi capturada por videocâmara acoplada ao microscópio óptico, e analisada pelo programa NIS-Elements13 instalado em um computador com boa capacidade de processamento de imagens (Pentium 4 *dual-core*, 4 Gbyte de Memória RAM (*Random Access Memory*), dois Hard Disk de 200 Gbyte, placa de vídeo-captura ASUS).

A quantificação da proteína foi sempre realizada após a calibração do programa para o aumento selecionado. A calibração foi sempre refeita após a leitura de cada lâmina. Para a quantificação da densidade de cor encontrada em cada campo selecionado, foi utilizado o filtro RGB adotando-se todo comprimento de onda que continha a cor marrom (cor que identificava a imunexpressão tecidual da proteína). Com o programa, transformou-se a coloração marrom, onde havia a imunexpressão, na cor branca e o restante do campo de visão capturado, sem imunocoloração, em preto. Os valores encontrados para o conteúdo tecidual da proteína estudada foram sempre expressos em porcentagem das proteínas por campo analisado. O valor final adotado para os animais dos subgrupos controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal) foi sempre representado pelo valor médio, com o respectivo desvio padrão. Todas as imagens selecionadas foram arquivadas para posterior documentação fotográfica.

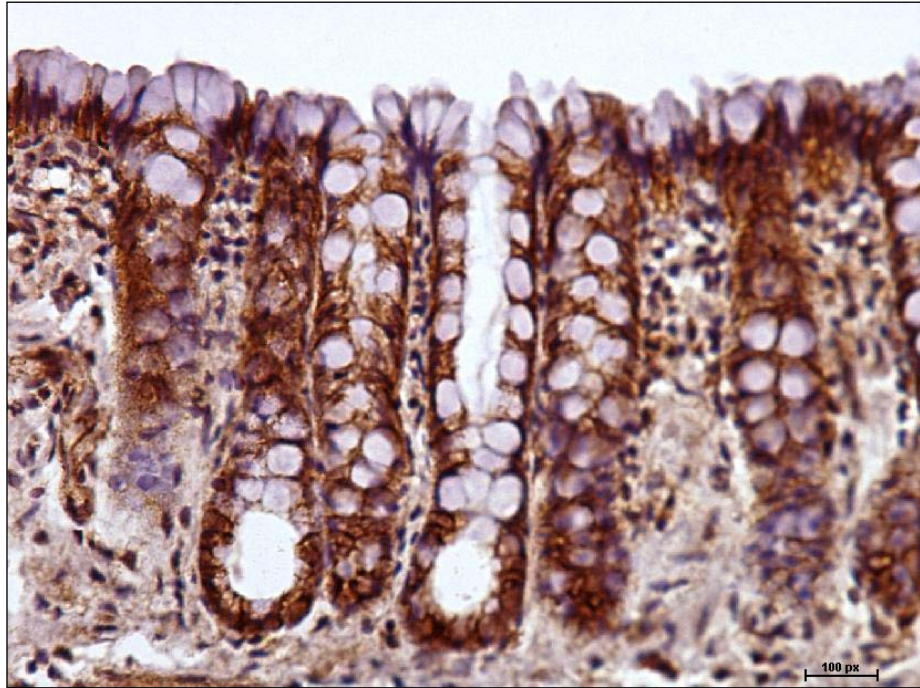


Figura 10 - Expressão da proteína E-caderina em segmento cólico provido de trânsito de animal submetido à exclusão fecal por 18 semanas (200x).



Figura 11 - Quantificação da expressão tecidual da proteína E-caderina (coloração branca) por análise de imagem assistida por computador (200 x)

4.12 ATIVIDADE TECIDUAL DE MIELOPEROXIDASE

A atividade da MPO foi avaliada como índice da infiltração neutrofílica da mucosa e da submucosa cólica, segundo método descrito por Bradley *et al.* (1982). Resumidamente, as amostras dos segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito fecal e do grupo controle pesando 50 mg cada, foram homogeneizadas em solução de brometo de hexadexi-trimetilamônio e em 50 mM de PBS em pH 6 por 15 a 20 segundos. A seguir, cada amostra foi centrifugada por 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante separado e colocado em placa de 96 poços, que foi mantida no gelo. Para a determinação dos níveis teciduais de MPO, em cada poço contendo 50ml de cada amostra, foram adicionados 200 µL de solução de o-dianisidina [(0,167 mg/mL o-dianiside dihidroclorido, 0,0005% H₂O₂ em 50 mM de PBS (pH 6,0)], imediatamente antes da leitura das mudanças da curva de absorbância a 460 nm, de 30 em 30 segundos por três minutos.

4.13 ELETROFORESE EM GEL DE CÉLULA ISOLADA (ENSAIO DO COMETA)

Foi realizada a quantificação dos níveis de estresse oxidativo pela eletroforese em gel de células isoladas (ensaio do cometa) segundo padronização técnica anteriormente proposta (Pool-Zobel *et al.*, 1999).

Resumidamente, para a detecção dos níveis de estresse oxidativo, foram utilizadas amostras provenientes dos animais do grupo controle e experimento da região cólica provida e desprovida de trânsito intestinal. Todas as amostras foram colhidas e analisadas em triplicata. Os espécimes foram incubados em 3 mL de solução tampão de Hank's15 contendo 5,5 mg de proteinase K16 e 3 mg de

colagenase¹⁰ por 45 minutos a 37°C para a o isolamento das células da mucosa cólica. Alíquotas foram retiradas e a viabilidade celular avaliada.

Foi realizado o ensaio do cometa apenas nas amostras que apresentassem viabilidade celular maior que 75%, avaliada pelo método do diacetato de fluoresceína (FDA)/brometo de etídio (EtBr)¹⁷. Resumidamente, a solução de coloração celular foi preparada imediatamente antes da sua utilização e contendo 30 mL de FDA em acetona (5mg/mL), 200 mL de EtBr em tampão fosfato (PBS; 200 mg/mL), e 4,8 ml de PBS¹⁸. A suspensão contendo células isoladas foi então misturada com 25 mL da solução corante, colocada sobre lâmina e recoberta com lamínula. As lâminas foram lidas no microscópio de imunofluorescência. O núcleo das células viáveis corava-se em verde, e em vermelho o das células inviáveis. Após análise das lâminas, foram selecionadas amostras dos tecidos que apresentassem mais de 75% das células viáveis.

A versão alcalina do ensaio do cometa foi realizada de acordo com protocolo publicado por Ladeira et al. (2005). Em resumo, 15 ml da suspensão celular previamente obtida foram misturados à agarose *low melting point* 0,5%⁹, postos sobre uma lâmina e cobertos com lamínula. Essas foram imersas em solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% SDS, pH 10 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) e permaneceram a 4°C por 12 horas. Subseqüentemente, foram expostas a um tampão alcalino (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH = 13,4) por 40 minutos a 4°C. A eletroforese foi realizada nesse tampão, no interior da geladeira a 4°C, por 30 minutos a 25 V e 300 mA. Após a corrida da eletroforese, as lâminas foram então neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5), coradas com *Sybr Safe*¹⁰, e analisadas ao microscópio de fluorescência.

Todo material foi processado e analisado simultaneamente para evitar variações da técnica empregada. Duzentas células foram aleatoriamente selecionadas (100 de cada segmento intestinal, provido e desprovido de trânsito) e analisadas usando o programa Komet 5.519. Com o auxílio do programa, foi obtido o valor da extensão da cauda do cometa (*Tail moment*) sendo seus valores médios determinados. Segundo o manual do fabricante, o *Tail moment* (*TM*) é definido como o produto entre os fragmentos de DNA da cauda e a distância média da migração da cauda do cometa, e reflete a extensão das rupturas das hélices de DNA (estresse oxidativo), podendo ser quantificado por métodos de intensificação de imagem e análise computacional (Ribeiro et al., 2008) (Figura 12). Para cada animal, utilizou-se a média dos valores obtidos com a leitura de 100 células de cada segmento cólico realizada pelo mesmo técnico, que desconhecia a origem do material e os objetivos do estudo.

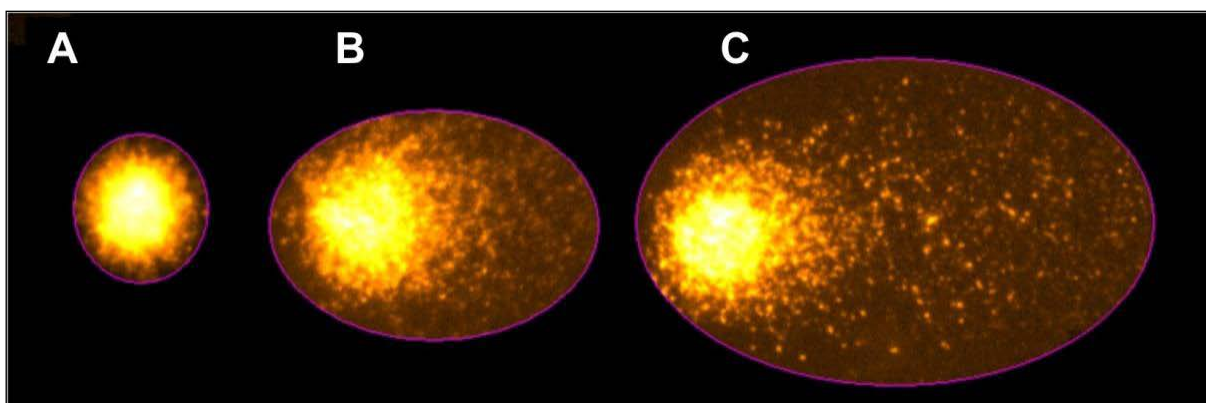


Figura 12 - Avaliação dos níveis de estresse oxidativo (*Tail Moment*), pelo ensaio do cometa. (A) Célula normal; (B) Célula com dano oxidativo moderado e (C) Célula com dano oxidativo intenso

4.14 MÉTODO ESTATÍSTICO

Os resultados foram sempre descritos pelo valor médio com respectivo desvio padrão. Nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste de Mann

Whitney para analisar a presença de úlceras, escore de graduação inflamatória, conteúdo de E-caderina, MPO, estresse oxidativo comparando animais do grupo controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal). Utilizou-se o teste de mediana para comparar a intensidade de expressão das proteínas E-caderina 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. Foi empregado o teste de Kruskal-Wallis para análise de variância com relação ao tempo de exclusão do trânsito e as variações da expressão da proteína E-caderina entre as regiões apicais e basais. Adotaram-se os testes de Pearson e Spearman para avaliar a correlação entre as variáveis e o tempo de exclusão fecal. Para o estudo estatístico foi usado o programa SPSS20 (versão 13.0).

5 RESULTADOS

5.1 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS

A Figura 13 mostra a parede cólica em segmento provido de trânsito após 12 semanas. Observa-se que a parede cólica apresenta criptas regulares, ordenadas, sem formação de úlceras epiteliais ou presença de infiltrado neutrofílico.

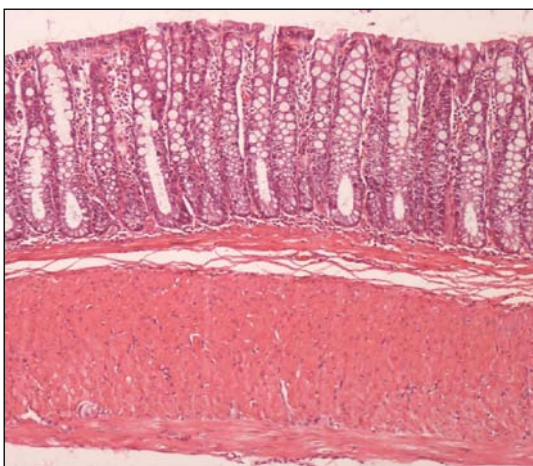


Figura 13 - Parede do cólon provido de trânsito após 12 semanas da exclusão do trânsito fecal (HE - 200 x)

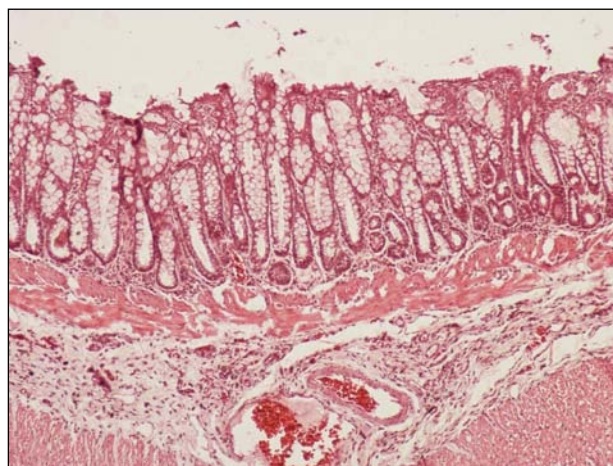


Figura 14 – Parede do cólon desprovido de trânsito após 12 semanas da exclusão do trânsito fecal (HE – 200 x)

A Figura 14 mostra as camadas da parede cólica em segmento desprovido de trânsito após 12 semanas de exclusão intestinal. Observam-se erosões na superfície mucosa cólica, irregularidades das criptas intestinais, ruptura da camada muscular da mucosa, congestão vascular da submucosa e infiltração de neutrófilos na camada submucosa e na base das criptas.

A Figura 15 mostra a superfície epitelial da mucosa cólica em segmento provido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal. As glândulas cólicas encontram-se alinhadas e as células caliciformes encontram-se repletas de muco.

As células da superfície apical (células absortivas) encontram-se justapostas sem soluções de continuidade.

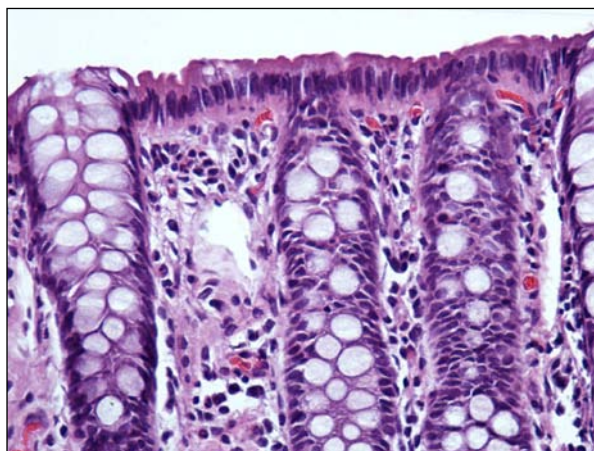


Figura 15 - Superfície epitelial de segmento cólico provido de trânsito após 18 semanas (400x)

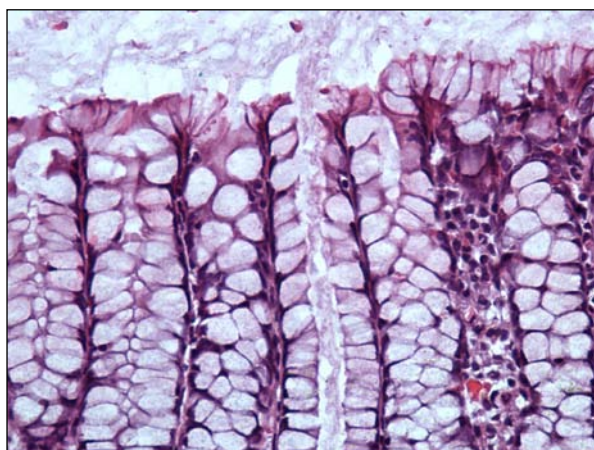


Figura 16 – Superfície epitelial do cólon desprovido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal (HE-400x)

A Figura 16 mostra superfície epitelial da mucosa cólica em segmento desprovido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal. As glândulas cólicas encontram-se dilatadas com grande quantidade de muco na sua luz.

As células calciformes encontram-se dilatadas e substituem as células absortivas na superfície apical que não mais apresentam a mesma justaposição. Encontra-se infiltrado neutrofílico e congestão vascular entre as criptas.

5.2 ULCERAÇÕES NA MUCOSA CÓLICA

A Figura 17 mostra a superfície mucosa cólica de segmento provido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal. Verificamos que as criptas cólicas encontravam-se preservadas sem a formação de úlceras epiteliais.

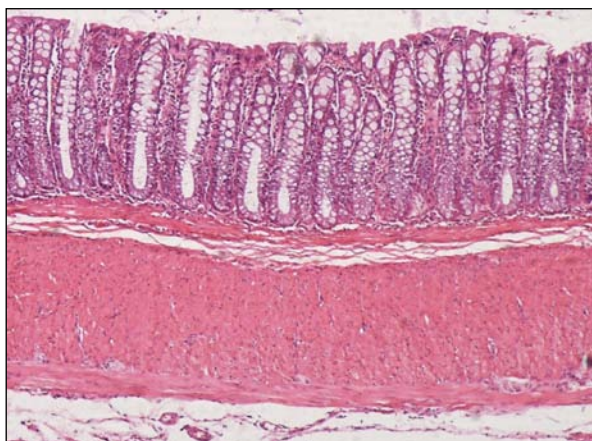


Figura 17 - Superfície mucosa cólica no cólon provido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal (HE - 100x)

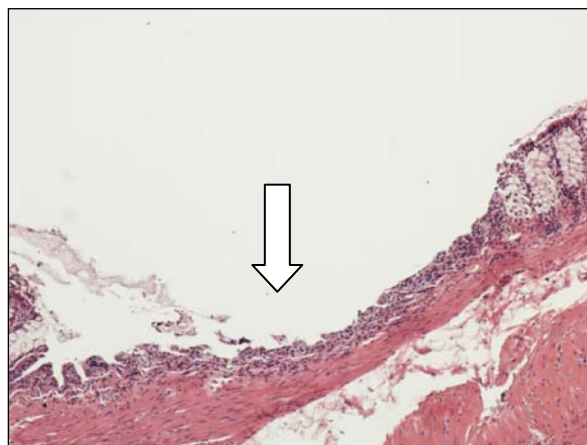


Figura 18 – Superfície mucosa no cólon desprovido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal. Presença de úlcera no epitélio (seta) (HE – 100 x)

A Figura 18 mostra a superfície mucosa cólica de segmento desprovido de trânsito após 18 semanas de exclusão intestinal. Verificamos a presença de infiltrado inflamatório na mucosa e submucosa, congestão vascular na submucosa e ulcerações com tamanho variável atingindo a camada muscular da mucosa em duas oportunidades.

O Gráfico 1 mostra a média, com o respectivo desvio padrão, dos valores encontrados para o número de ulcerações na mucosa cólica, comparando animais dos subgrupos controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal) nos diferentes períodos de exclusão propostos. Não foram encontradas úlceras epiteliais nos segmentos desprovidos de trânsito após seis semanas de exclusão. Verificou-se que surgiam ulcerações na mucosa cólica dos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, a partir da 12ª semana de exclusão e que aumentavam em número com o progredir do tempo de derivação fecal. Nos

segmentos excluídos de trânsito, após 12 semanas, o número de ulcerações encontradas era de $2,0 \pm 0,30$, enquanto após 18 semanas era de $2,9 \pm 0,30$. Comparando segmentos cólicos sem trânsito com o cólon com trânsito e animais do grupo controle, verificou-se que após 12 e 18 semanas o número de úlceras era significativamente maior ($p < 0,05$).

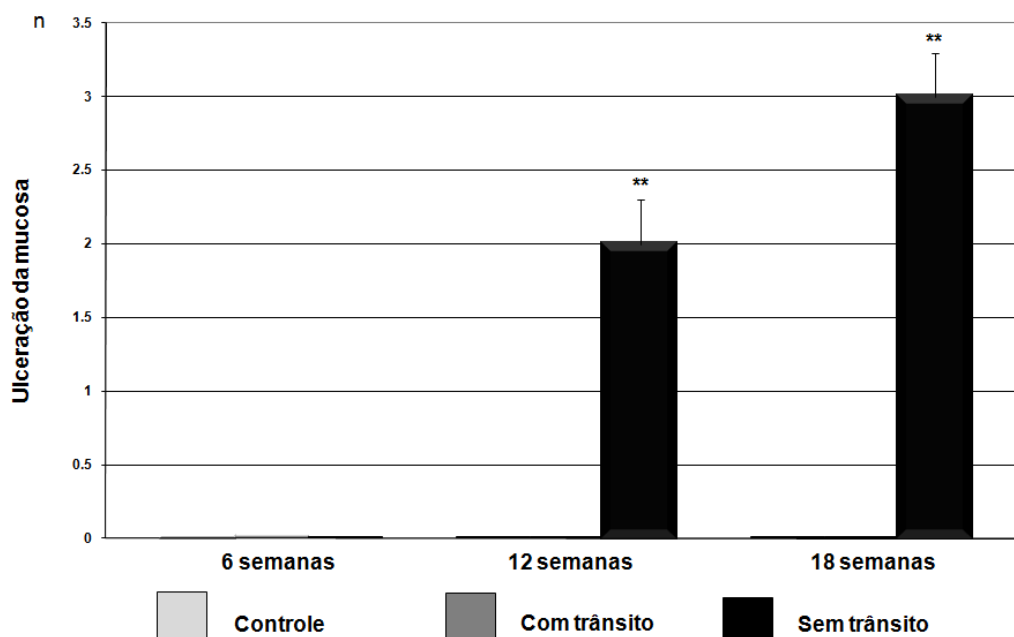


Gráfico 1 - Ulcerações da mucosa cólica comparando os subgrupos controle e experimento (cólon com e sem trânsito) nos diferentes períodos de exclusão.

5.3 GRADUAÇÃO INFLAMATÓRIA

O Gráfico 2 mostra, em média com o respectivo desvio padrão, os valores encontrados para o escore inflamatório, comparando animais dos subgrupos controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal) nos diferentes períodos de exclusão propostos. Encontramos maior escore inflamatório nos segmentos desprovidos de trânsito independente do tempo de exclusão considerado. O valor do escore inflamatório no cólon desprovido de trânsito por seis semanas era de $3 \pm 0,40$. Verificou-se que, nos segmentos cólicos desprovidos de

trânsito após 12 e 18 semanas de exclusão intestinal, esses valores eram de $8,0 \pm 0,37$, apresentando significância estatística quando comparados ao cólon com trânsito preservado e aos animais do grupo controle ($p < 0,05$).

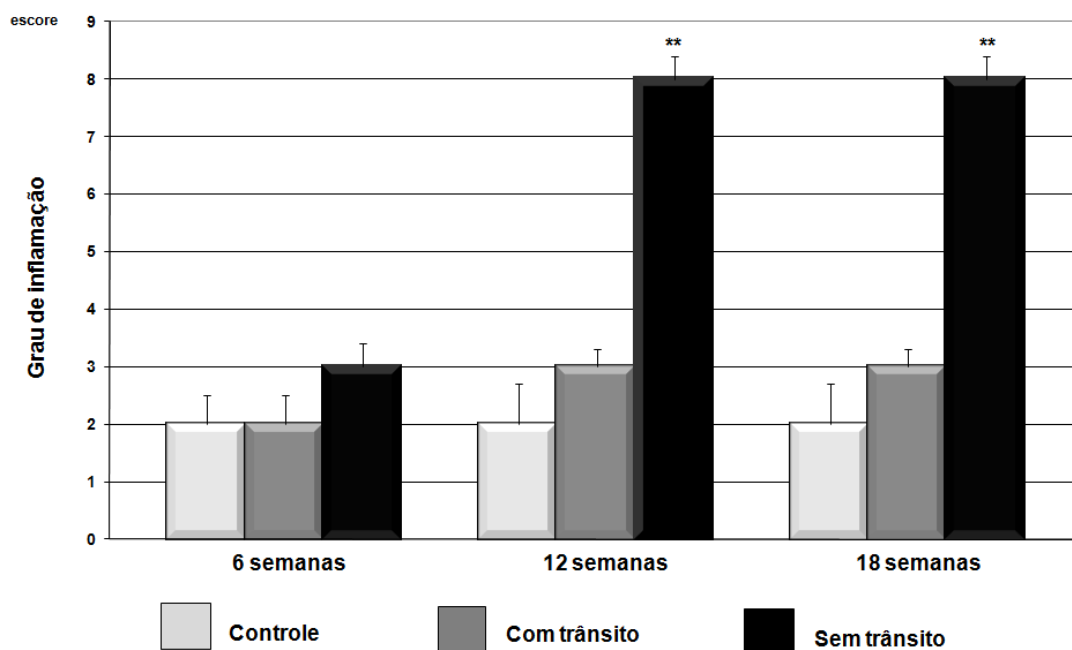


Gráfico 2 - Escore inflamatório comparando os subgrupos controle e experimento (cólon com e sem trânsito) nos diferentes períodos de exclusão.

5.4 EXPRESSÃO TECIDUAL DE E-CADERINA

A Figura 20 mostra a expressão tecidual da proteína E-caderina na mucosa cólica de segmentos desprovidos de trânsito fecal após 12 semanas de derivação intestinal.

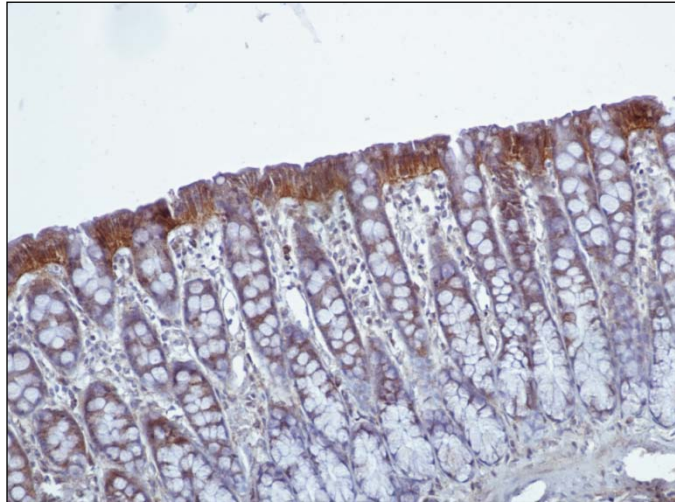


Figura 19. Expressão tecidual de E-caderina Provido de trânsito – 18 semanas

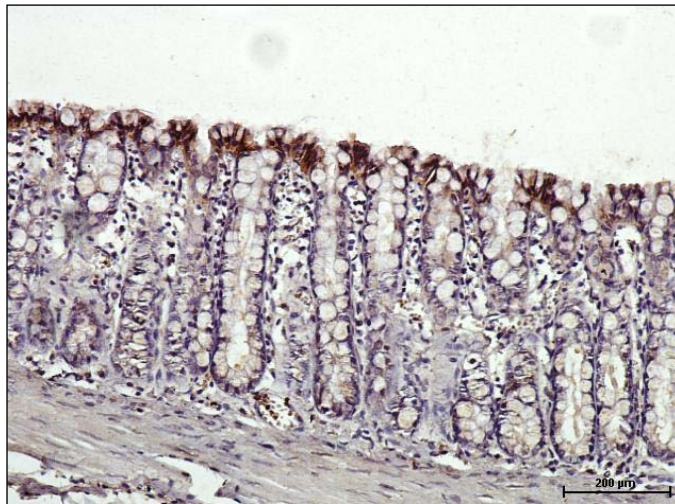


Figura 20- Padrão de expressão de E-caderina na mucosa de segmento cólico desprovido de trânsito fecal após 12 semanas de derivação intestinal. Imunohistoquímica para E-caderina (200 x)

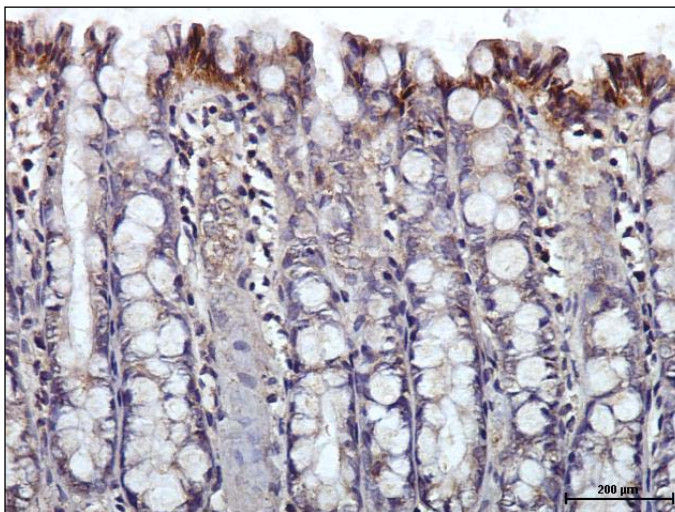


Figura 21 – Padrão de expressão de E-caderina na mucosa de segmento cólico desprovido de trânsito fecal após 18 semanas de derivação intestinal. Imunohistoquímica para E-caderina (200 x).

A Figura 21 mostra a expressão tecidual da proteína E-caderina na mucosa cólica de segmentos providos de trânsito fecal após 18 semanas de derivação intestinal.

5.5 CONTEÚDO TECIDUAL DE E-CADERINA

Gráfico 3 mostra em média, com o respectivo desvio padrão, o conteúdo tecidual de E-caderina, comparando os subgrupos controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal) nos diferentes períodos de exclusão de trânsito fecal. No cólon excluído por seis semanas, o conteúdo tecidual de E-caderina foi de $5,35 \pm 0,79\%$, enquanto nos animais submetidos à derivação por 12 e 18 semanas, foram de $5,44 \pm 1,23\%$ e $6,67 \pm 2,06\%$ respectivamente. Encontramos menor conteúdo tecidual de E-caderina nos segmentos desprovidos de trânsito fecal quando comparados aos do cólon com trânsito preservado e aos animais do grupo controle, independente do tempo de exclusão.

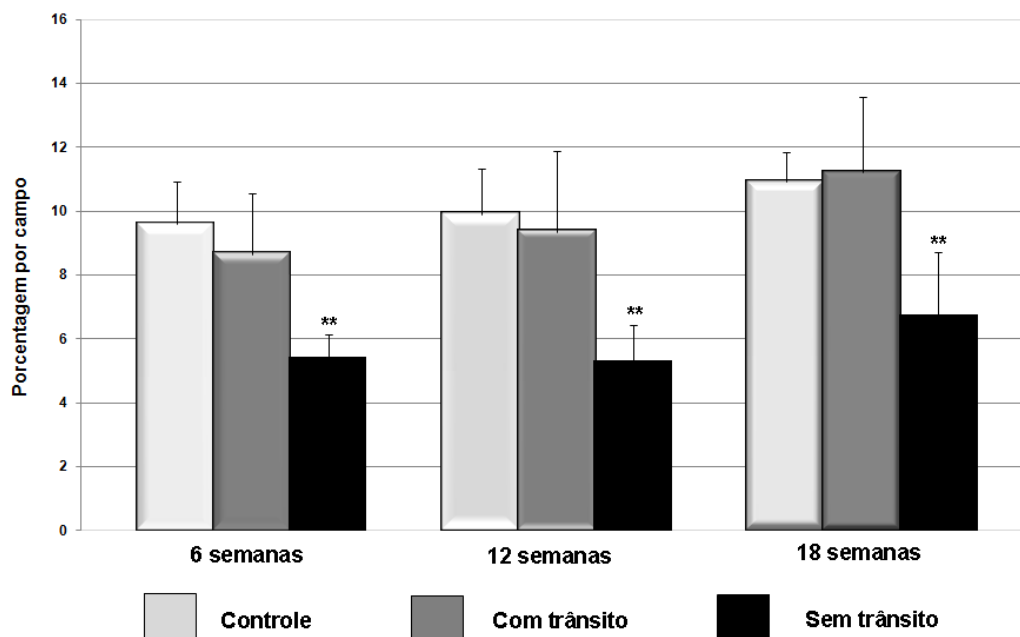


Gráfico 3 - Conteúdo tecidual de E-caderina comparando animais dos subgrupos controle e experimento (cólon com e sem trânsito) nos diferentes períodos de exclusão do trânsito intestinal

5.6 INTENSIDADE DE EXPRESSÃO DA E-CADERINA SEGUNDO O LOCAL DA CRIPTA CÓLICA

O Gráfico 4 mostra a intensidade de expressão da proteína E-caderina nas regiões apicais das criptas da mucosa cólica nos animais dos grupos controle e experimento (segmentos com e sem trânsito fecal nos diferentes tempos de exclusão considerados). Verificou-se que independente do tempo de exclusão considerado, ocorria redução significativa no conteúdo de E-caderina nas regiões apicais das criptas cólicas, nos segmentos sem trânsito.

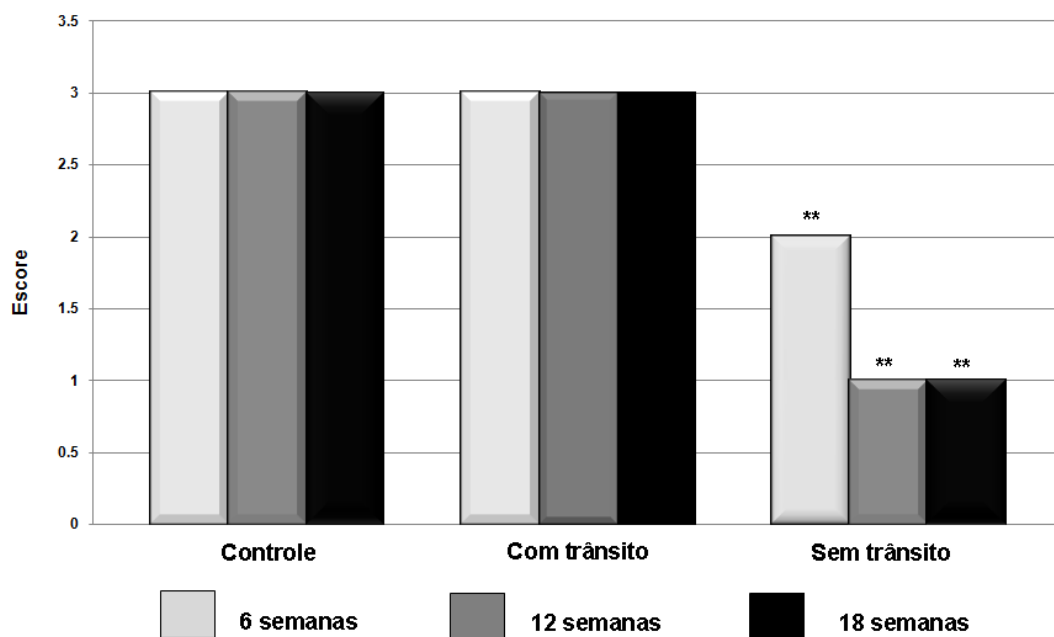


Gráfico 4 - Variação do conteúdo tecidual de E-caderina na região apical das criptas comparando animais dos subgrupos controle e experimento (cóloons com e sem trânsito) nos diferentes períodos de exclusão do trânsito intestinal.

Gráfico 5 mostra a intensidade de expressão da proteína E-caderina nas regiões basais das criptas da mucosa cólica nos animais dos grupos controle e

experimento (segmentos com e sem trânsito fecal) nos diferentes tempos de exclusão considerados. Verificou-se que no cólon desprovido de trânsito não houve modificações na intensidade de expressão das proteínas quando comparado com os animais do grupo controle e segmentos com trânsito fecal dos animais do grupo experimento.

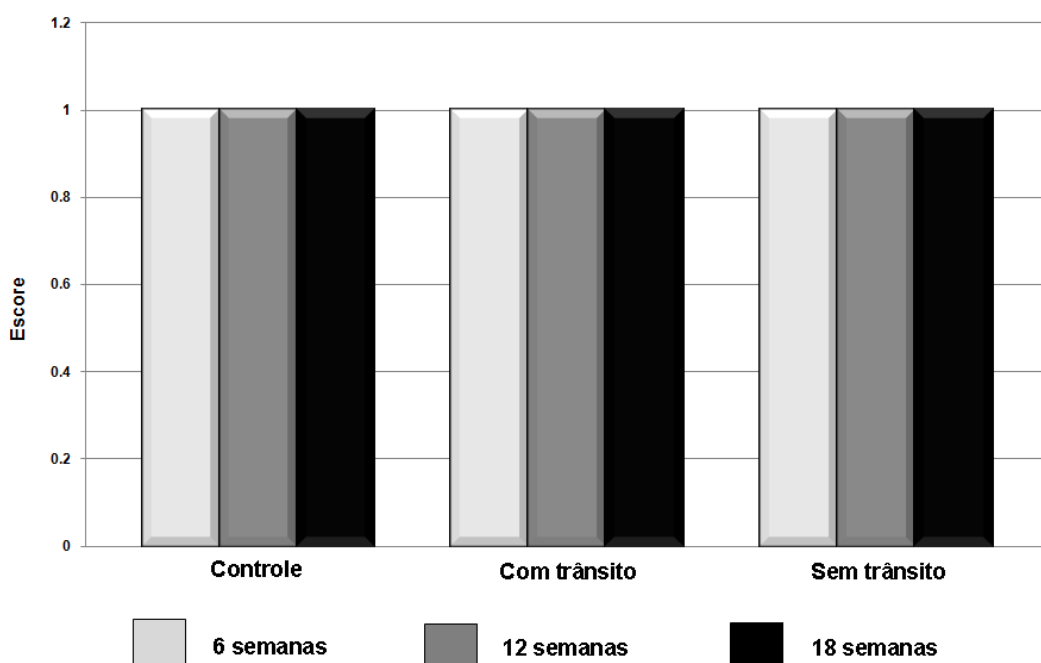


Gráfico 5 - Variação do conteúdo tecidual de E-caderina na região basal das criptas cólicas comparando animais dos subgrupos controle e experimento (cólon com e sem trânsito) nos diferentes períodos de exclusão do trânsito intestinal.

5.7 NÍVEIS TECIDUAIS MIELOPEROXIDASE (MPO)

O gráfico 6 mostra em média, com o respectivo desvio padrão, os níveis de MPO, comparando os subgrupos controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal) nos diferentes tempos de exclusão.

Os níveis de MPO foram semelhantes no subgrupo controle e nos segmentos providos de trânsito independente do tempo de exclusão. No cólon excluído por seis

semanas, os níveis de MPO foram de $1,96 \pm 0,51 \text{U.G}^{-1}$, enquanto nos animais submetidos à derivação por 12 e 18 semanas, foram de $1,09 \pm 0,12 \text{U.g}^{-1}$ e $0,70 \pm 0,12 \text{U.g}^{-1}$, respectivamente. Encontramos níveis de MPO maiores nos segmentos sem trânsito fecal após 6 e 12 semanas ($p < 0,05$) quando comparados aos do cólon com trânsito e aos animais do grupo controle. Após 18 semanas de exclusão, os níveis de MPO nos segmentos sem trânsito tornavam-se semelhantes aos do cólon provido de trânsito fecal e aos dos animais do grupo controle.

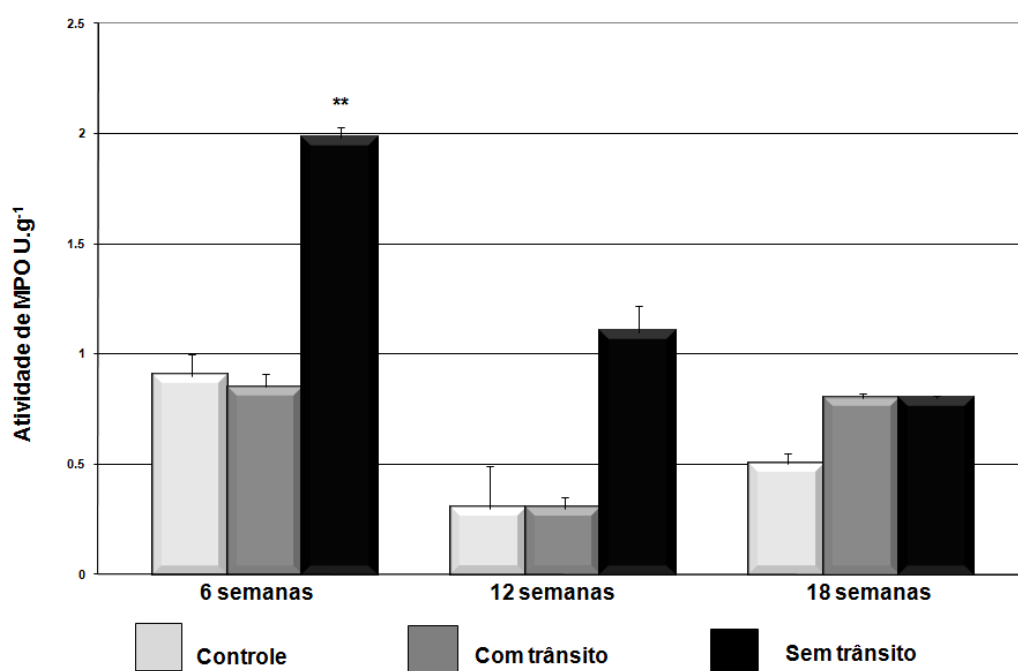


Gráfico 6 - Níveis de atividade da mieloperoxidase (MPO) comparando animais dos subgrupos controle e experimento (cólon com e sem trânsito) nos diferentes períodos de exclusão do trânsito intestinal

5.8 NÍVEIS TECIDUAIS DE ESTRESSE OXIDATIVO TECIDUAL

O Gráfico 7 mostra em média, com o respectivo desvio padrão, os valores encontrados para os níveis de estresse oxidativo tecidual, comparando animais dos subgrupos controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal) nos diferentes tempos de exclusão do trânsito. Os níveis de estresse oxidativo

ao DNA foram semelhantes no subgrupo controle e nos segmentos com trânsito, independentemente do tempo de exclusão considerado. Encontramos níveis teciduais de estresse oxidativo significativamente maiores nos segmentos desprovidos de trânsito quando comparados aos segmentos com trânsito e ao subgrupo controle, independente do tempo de exclusão considerado ($p < 0,05$). No cólon excluído de trânsito por seis semanas, esses valores eram de $3,24 \pm 0,44$ TM, enquanto após 12 e 18 semanas de exclusão os valores foram de $3,74 \pm 0,40$ TM e $4,37 \pm 0,32$ TM, respectivamente.

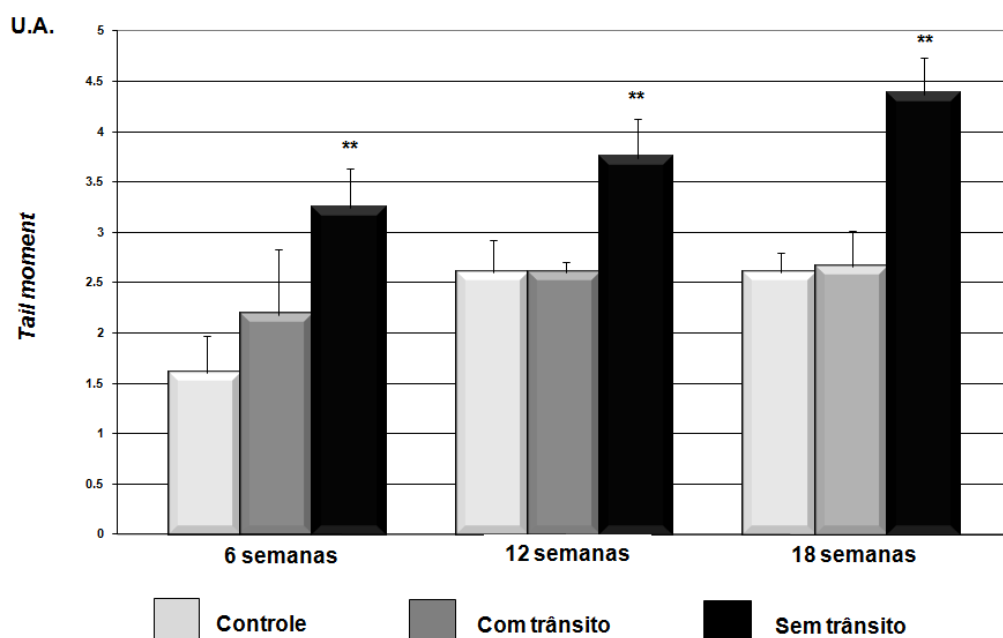


Gráfico 7 - Níveis de estresse oxidativo ao DNA comparando os subgrupos controle e experimento (cólon com e sem trânsito) nos diferentes tempos de exclusão

5.9 VARIAÇÕES SEGUNDO O TEMPO DE EXCLUSÃO

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

A Tabela 2 mostra a variação da presença de ulcerações na mucosa, e o escore inflamatório no cólon desprovido de trânsito fecal, em relação aos tempos de exclusão propostos. Verificamos que a formação de ulcerações no epitélio cólico dos segmentos desprovidos de trânsito aumentava com o decorrer do tempo de exclusão ($p = 0,001$). Do mesmo modo, constatamos que o grau de inflamação nos segmentos desprovidos de trânsito aumentou com o progredir do tempo de exclusão intestinal ($p = 0,001$).

Tabela 2 - Variação dos valores médios mensurados para presença de úlceras, congestão vascular e escore inflamatório em segmentos desprovidos de trânsito fecal, em relação aos diferentes tempos de exclusão

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

*=Significante; Teste de Kruskal-Wallis

A Tabela 3 mostra a variação dos níveis de atividade de MPO e níveis teciduais de estresse oxidativo no cólon sem trânsito fecal, em relação aos tempos de exclusão propostos. Verificamos que nesses segmentos os níveis teciduais de MPO diminuíam com o decorrer do tempo de exclusão fecal ($p = 0,00001$) enquanto os níveis de estresse oxidativo nos segmentos desprovidos de trânsito aumentaram

com o decorrer do tempo de exclusão intestinal ($p = 0,0001$ e $p = 0,0007$, respectivamente).

Tabela 3 - Variação dos valores médios mensurados para níveis de atividade de MPO e níveis de estresse oxidativo, no cólon desprovido de trânsito fecal, em relação aos diferentes tempos de exclusão.

Cólon sem trânsito				
	Média ± D.P.			p
	6 semanas	12 semanas	18 semanas	
MPO (U.g-1)	1,96 ± 0,51	1,09 ± 0,12	0,70 ± 0,12	0,00001*
Estresse oxidativo (TM)	3,24 ± 0,44	3,74 ± 0,40	4,37 ± 0,32	0,0007*

MPO = Mileoperoxidase; TM = Tail moment; DP = Desvio padrão; * Significante; Teste de Kruskal-Wallis.

A Tabela 4 mostra a variação do conteúdo total de E-caderina na superfície mucosa do cólon sem trânsito fecal, em relação aos tempos de exclusão propostos. Verificamos que nesses segmentos o conteúdo tecidual das proteínas não se modificava com o decorrer do tempo de exclusão ($p = 0,13$ e $p = 0,05$, respectivamente).

Tabela 4 - Variação dos valores médios mensurados para o conteúdo total de E-caderina, no cólon desprovido de trânsito fecal, em relação aos diferentes tempos de exclusão

Cólon sem trânsito				
	Média ± D.P. (% / campo)			p
	6 semanas	12 semanas	18 semanas	
E-caderina	5,35±0,79	5,44±1,23	6,67±2,06	0,13

DP = Desvio padrão; % = Porcentagem; Teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 5 - Variação dos valores médios mensurados para o conteúdo total de E-caderina, na região apical das criptas cólicas nos segmentos desprovidos de trânsito fecal, em relação aos diferentes tempos de exclusão.

Cólon sem trânsito			
	Mediana (cruzes)		p
	Apical	Basal	
6 semanas	++	+	0,04*
12 semanas	+	+	ns
18 semanas	+	+	ns

*Significante; ns= não significante; Teste de Kruskal-Wallis

5.10 CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS E O TEMPO DE EXCLUSÃO

A Tabela 6 mostra a correlação entre o número de úlceras e grau de inflamação nos segmentos desprovidos de trânsito fecal em relação ao tempo de exclusão. Verificamos que o maior número de ulcerações epiteliais e o escore inflamatório encontravam-se diretamente relacionados ao tempo de exclusão ($p = 0,0001$).

Tabela 6 - Correlação entre a presença de úlceras e grau de inflamação, no cólon excluído de trânsito em relação ao tempo de exclusão

	Coefficiente p	Tempo	Úlceras	Escore
tempo	rs	-	0,967	0,799
	p	-	0,0001*	0,0001*

rs = Coeficiente de Spearman; *Significante.

A Tabela 7 mostra a correlação entre os níveis de MPO, estresse oxidativo, conteúdo total de E-caderina, nos segmentos desprovidos de trânsito fecal em relação ao tempo de exclusão. Verificamos que os níveis de MPO estavam

inversamente relacionados ao tempo de exclusão, enquanto o estresse oxidativo estava diretamente relacionado. O conteúdo total de E-caderina não apresentava correlação com o tempo de exclusão.

Tabela 7 - Correlação entre os níveis de MPO, estresse oxidativo, conteúdo total de E-caderina, no cólon excluído de trânsito em relação ao tempo de exclusão

	Coefficiente p	MPO	Estresse Oxidativo	E-caderina total
Tempo	rs	- 0,9679	0,7721	0,2570
	p	0,00001*	0,00001*	0,08

rs = Coeficiente de Spearman; *Significante

A Tabela 8 mostra a correlação entre o conteúdo de E-caderina nas regiões apicais e basais das criptas cólicas, nos segmentos desprovidos de trânsito fecal, em relação ao tempo de exclusão. Verificamos que o conteúdo de E-caderina na região apical das criptas encontra-se inversamente relacionado ao tempo de exclusão, enquanto conteúdo na região basal, não houve correlação com o tempo de exclusão.

Tabela 8 - Correlação entre o conteúdo de E-caderina nas regiões apicais e basais das criptas cólicas, nos segmentos desprovidos de trânsito fecal, em relação ao tempo de exclusão

	Coefficiente p	Apical	Basal
Tempo	rs	- 0,3693	0,0655
	p	0,01*	0,6692

r = Coeficiente de Spearman; *Significante

6. DISCUSSÃO

6.1 QUANTO AO MÉTODO

A maioria dos estudos que avaliaram as alterações histológicas da mucosa cólica em modelos experimentais de CE considera o rato um bom modelo animal, pois desenvolvem atrofia de criptas, edema, congestão vascular da submucosa, infiltrado neutrofílico, ulcerações da mucosa e hiperplasia nodular linfóide, comparáveis às descritas nos seres humanos (Nassri et al., 2008; Martinez et al., 2010a e 2010b).

Entretanto, outros autores não consideram o rato como um animal de experimentação adequado para o estudo da CE, pois a frequência com que se encontram alterações histológicas que caracterizam a CE é muito baixa (Biondo-Simões et al., 2000). É provável que essas opiniões divergentes estejam relacionadas aos diferentes modelos experimentais adotados para indução da CE. Anteriormente, já tínhamos estudado, por análise de imagem assistida por computador, as principais alterações nas diferentes camadas da parede intestinal, comparando segmentos com e sem trânsito fecal (Sousa et al., 2008). Nesse estudo adotamos a mesma metodologia usada na presente pesquisa e encontramos 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 (Sousa et al., 2008). No presente estudo, confirmamos esses achados.

Optou-se por um período jejum de 12 horas antes da intervenção cirúrgica programada, com intuito de reduzir ao máximo o conteúdo fecal no interior do cólon. O isolamento dos animais em gaiolas individuais tornou possível o melhor controle

das características das evacuações, tais como presença de sangue ou muco, assim como aspectos relacionados à cicatriz cirúrgica e ao estoma. O isolamento também evitou que um animal agredisse o estoma do outro, fato observado durante a elaboração do estudo piloto para padronização das etapas experimentais adotadas nesta pesquisa. Revisando a literatura recente, não encontramos estudos mencionando os cuidados dispensados no preparo pré-operatório em modelos de CE (Pinto et al., 2007).

De modo semelhante ao anteriormente proposto, optamos pelo fornecimento de ração padronizada e esterilizada, nos dias que antecederam a intervenção cirúrgica (Keli et al., 1997). Durante o período pré-operatório, não observamos diarreia ou outro sinal que sugerisse a presença de colite em qualquer dos animais selecionados para o estudo. A padronização da dieta também assegurou que todos recebessem o mesmo conteúdo de fibras dietéticas, mantendo uniforme o fornecimento de AGCC para o cólon provido de trânsito.

Adotamos a placa de Peyer como reparo anatômico para estabelecer o local da secção do cólon. Outros preferem utilizar a reflexão peritoneal como reparo anatômico ou padronizar o local de secção pela introdução de cateter graduado em centímetros por via anal para confecção do estoma (Kissmeyer-Nielsen et al. 1994). Acreditamos que introdução de um cateter via anal, poderia ocasionar traumatismos à mucosa reto-cólica levando ao aparecimento de lesões epiteliais. Como na escala de graduação inflamatória utilizada a presença de ulcerações no epitélio cólico era a variável com maior peso na estratificação do grau de inflamação, evitamos esse método de mensuração, com o receio de provocar lesões epiteliais iatrogênicas. Além do mais, ulcerações traumáticas da mucosa cólica poderiam ocasionar soluções de continuidade no epitélio intestinal que permitiriam a infiltração

bacteriana, e a conseqüente migração neutrofílica, que além de interferirem na estratificação da graduação inflamatória poderiam aumentar os níveis de RLO produzidos pela maior quantidade de neutrófilos ativados.

A placa de Peyer é uma estrutura linfóide, invariavelmente localizada na região terminal do cólon dos ratos (Priolli et al., 2009). Encontra-se anteriormente ao epidídimo, em machos, ou ao útero, nas fêmeas. Pela rápida localização permite que a medida das distâncias intracavitárias seja mais facilmente obtida quando comparada a outros reparos anatômicos (Priolli et al., 2009). Acreditamos que a adoção da placa de Peyer, como reparo anatômico para o ponto de escolha da secção cólica reduziu a extensão da incisão cirúrgica e o tempo necessário para identificação do local padronizado para secção cólica. O emprego do paquímetro garantiu ainda uniformidade na identificação do local para confecção dos estomas.

Entretanto, é importante salientar que a placa de Peyer é estrutura linfóide, rica em células inflamatórias e capazes de produzir RLO. Para o estudo dos níveis de estresse oxidativo e avaliação da expressão das proteínas de adesão celular selecionadas, sempre tivemos o cuidado de coletar os fragmentos cólicos fora da região que continha a placa. Com isso acreditamos que os níveis de estresse oxidativo e a determinação do conteúdo e local de expressão das proteínas E-caderina e β -catenina foram mensurados sempre na mucosa cólica, e não sobre uma estrutura que substitui parte da mucosa cólica (Priolli et al., 2009).

A maioria dos estudos avaliando a CE foi feita a partir de espécimes obtidos de doentes, submetidos à exclusão fecal realizada por diferentes enfermidades e com diferentes períodos de exclusão intestinal (Frisbie et al., 2000). Assim, não é possível estabelecer comparação uniforme entre os diferentes aspectos histológicos, bem como avaliar o tempo necessário para o desenvolvimento da doença.

De modo semelhante, revisando os estudos experimentais que utilizaram modelos de CE, verificamos diferenças, não só quanto à técnica, mas também com relação ao tempo adotado de exclusão intestinal (Pinto et al. 2007).

Essa falta de uniformidade impossibilita comparação fidedigna entre os resultados publicados nos diferentes estudos. A própria escolha do grupo que serviria de controle para o experimento, também não apresenta qualquer padronização. Alguns excluíram o trânsito fecal por uma, duas, quatro e doze semanas adotando como grupo controle animais sacrificados logo após a derivação. (Kissmeyer-Nielsen et al., 1994). Outros elaboraram grupos experimentais, comparando animais sacrificados imediatamente após a cirurgia e depois de 17 semanas, adotando como controle fragmentos cólicos obtidos do segmento provido de trânsito no início do experimento (Keli et al., 1997). Outro autor sacrificou animais no início do experimento e retirou uma porção do cólon para análise comparativa com o segundo grupo, sacrificado após quatro semanas (Lopes-Paulo, 2002). Outra pesquisa avaliou animais submetidos à exclusão, sacrificando-os após uma, duas, quatro e oito semanas, porém, diferente dos demais, adotou como grupo controle espécimes obtidos do cólon provido de trânsito dos mesmos animais (Biondo-Simões et al., 2000).

Percebe-se, portanto, que não existe consenso em relação ao tempo de exclusão proposto, bem como na forma de se constituir o grupo controle.

No presente estudo preferimos constituir dois grupos experimentais um controle onde os animais só eram submetidos ao procedimento anestésico e a manipulação intestinal sem a derivação fecal e outro experimento composto por animais colostomizados. Adotamos esta estratégia por acreditarmos que as diferentes intervenções realizadas nos dois grupos poderiam determinar alterações

histológicas, bioquímicas e níveis de estresse oxidativo tecidual distintas, tornando os resultados difíceis de serem comparados. Foi por esta razão que propusemos, também, a comparação entre espécimes retirados do cólon com trânsito preservado do mesmo animal. Desta forma, avaliamos dois segmentos cólicos obtidos de animais submetidos à mesma operação, sem a interferência da técnica cirúrgica adotada.

Como já tínhamos padronizado o tempo de exclusão em estudos anteriores, neste optamos por excluir o trânsito fecal também por seis, 12 e 18 semanas (Sousa et al., 2008; Nonose et al., 2009; Martinez, 2009). Com essa padronização, encontramos alterações histológicas nos segmentos desprovidos de trânsito de todos os animais características de colite, independente do tempo de exclusão. Utilizando a mesma metodologia já tínhamos encontrado alterações histológicas semelhantes (Sousa et al., 2008). 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., 2010b). 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).

Para o estudo histopatológico, todos os espécimes previamente fixados, foram submetidos a cortes de 5 μ m, sempre no sentido longitudinal em relação às camadas da parede cólica. Esse cuidado tinha como objetivo seccionar a parede cólica no sentido paralelo as camadas da parede cólica facilitando a interpretação das variáveis histológicas estudadas e, principalmente o local de expressão da E-caderina. Cortes transversais dificultam à identificação de ulcerações no epitélio

cólico, a intensidade do infiltrado inflamatório na mucosa e submucosa e, principalmente, o local de expressão das proteínas (apical ou basal) nas criptas intestinais. Acreditamos que este detalhe foi importante para análise histológica de campos que continham uma seqüência de três criptas íntegras e contíguas.

Durante a análise das lâminas, em nenhum momento os patologistas foram informados com relação ao local do cólon onde o fragmento tinha sido removido, bem como a que grupo experimental pertencia. Com isso, acreditamos ter tornado a interpretação das variáveis histopatológicas e imunoistoquímicas mais fidedignas. Esse mesmo cuidado foi adotado pelos técnicos que realizaram a dosagem de MPO e o ensaio do cometa.

Apesar da possibilidade de analisarmos a expressão dos genes codificadores da proteína E-caderina empregando técnica amplificação em cadeia pela reação de polimerase em tempo real (RT-PCR), optamos pelo estudo imunohistoquímico. Essa análise pode ser feita com diferentes métodos, principalmente representados pelas técnicas de imunoblot, imunofluorescência ou imunohistoquímica. Optamos pela técnica imunoistoquímica, pois além de estarmos familiarizados com o método, pretendíamos analisar não só o conteúdo tecidual, mas mudanças no local de expressão das proteínas nas criptas intestinais. Este tipo de análise seria difícil de ser feita avaliando apenas a expressão gênica ou dosagem bioquímica. Estudos anteriores demonstraram que a análise por imunohistoquímica ou imunofluorescência apresenta vantagens em relação ao imunoblot para pesquisa das proteínas formadoras das junções intercelulares (Kucharzik et al., 2001). Entretanto, a técnica imunohistoquímica requer cuidados especiais.

A reatividade cruzada do anticorpo primário permitiu identificar, qualitativamente e quantitativamente, a presença da E-caderina nas células normais

e inflamadas das criptas cólicas. Um terceiro aspecto a ser considerado é que a positividade da imunocoloração ou sua ausência devem ser sempre complementadas por estudos morfológicos e histológicos convencionais. A imunocoloração também deve ser comparada com controles positivos e negativos para as proteínas selecionadas. Para tanto, tivemos o cuidado de realizar a análise da expressão imunohistoquímica da E-caderina no mesmo corte histológico onde antes, o patologista tinha avaliado os aspectos histológicos pela técnica da HE. Nos animais que apresentam imunoexpressão positiva, o anticorpo anti-E-caderina se liga nas membranas celulares ou no citoplasma. Para pesquisa da proteína estabelecemos controles negativos e positivos adotando as orientações recomendadas pelo fabricante. Para o controle negativo, utilizamos tecidos obtidos do cólon humano e de ratos onde a técnica imunohistoquímica foi realizada sem a adição do anticorpo primário.

Para o controle positivo empregamos tecido obtido de carcinoma de cólon, sabidamente positivo para ambas as proteínas.

A avaliação das alterações histopatológicas e imunohistoquímicas em modelos de colite geralmente são feitos de forma subjetiva, dependendo da experiência do patologista. O emprego de método de análise de imagem que permita avaliação objetiva trás maior fidedignidade e uniformidade em relação aos resultados obtidos. Variáveis passíveis de mensuração, tais como o conteúdo tecidual das proteínas coradas por imunohistoquímica podem ser determinadas objetivamente, possibilitando comparações mais precisas entre tecidos normais e inflamados. A análise de imagem assistida por computador vem sendo utilizada com vários objetivos e apresenta como vantagens, em relação aos métodos convencionais, a avaliação quantitativa das estruturas microscópicas, de forma

objetiva e rápida (Nonose, 2009; Nonose et al., 2009; Martinez et al., 2010b). Do melhor do nosso conhecimento, a morfometria computadorizada, nunca foi utilizada para quantificar os níveis de teciduais de E-caderina em modelos de CE.

A presença de neutrófilos no tecido inflamado é situação freqüente nos portadores de colite (Yamada e Grisham, 1991; Nosál'ová et al., 2000). Representam o PMN mais comuns no infiltrado inflamatório e, vem sendo constatado, que contribuem significativamente para a piora da lesão tecidual (Nosál'ová et al., 2000). Os neutrófilos ativados são capazes de produzir altos níveis de RLO como agentes bactericidas e, portanto, relacionados ao surgimento de estresse oxidativo tecidual (Naito et al., 2007). A quantidade de RLO formada pelos neutrófilos aumenta com a gravidade da inflamação (Fillmann, 2007). Os neutrófilos produzem grande quantidade do radical O_2^- , substrato importante para a formação, por dismutação, do H_2O_2 e do radical OH quando na presença do íon Fe^{++} (Fillmann, 2007). O excesso desses RLO, apesar de bactericidas, provoca morte celular pela peroxidação dos fosfolípedes constituintes da membrana plasmática (Sheridan et al., 1996; Pravda, 2005).

O infiltrado tecidual por neutrófilos também é encontrado nos modelos de colite quimicamente induzida, assim como nos modelos experimentais de CE (Keli et al., 1997; Martinez, 2010a). A avaliação do infiltrado neutrofílico tecidual pode ser feita por técnicas histológicas e bioquímicas. A pesquisa da MPO é um dos métodos mais utilizado para avaliar a intensidade do infiltrado inflamatório por neutrófilos na colite humana ou em modelos experimentais (Longatti et al., 2010). A MPO é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos estimando-se que mais de 95% do seu total está presente nessas células. Os restantes 5% são encontrados

nos monócitos circulantes (Naito et al., 2007). Como o maior contingente de MPO é proveniente dos neutrófilos, a dosagem dos níveis da enzima nos tecidos é utilizada como marcador da presença de infiltração tecidual por neutrófilos (Fillmann, 2007; Naito et al., 2007). A maioria dos estudos experimentais adotou a quantificação dos níveis teciduais de MPO para avaliar o grau de infiltração neutrofílica nos modelos de colite induzida por TNBS (Yamada e Grisham, 1991; Barros et al., 2010) e ácido acético (Almalouf et al., 2008). Todos encontraram altos níveis de MPO nos tecidos cólicos inflamados, fazendo com que sua determinação possa ser considerada como índice fidedigno para a avaliação da infiltração neutrofílica e, indiretamente, como confirmação da presença da colite (Nosál'ová et al., 2000;). A dosagem da atividade da MPO também é utilizada para avaliar o potencial de resposta terapêutica de várias substâncias em modelos de colite (Schwartz et al., 1995). Estudo recente demonstrou que ratos com colite induzida, quando tratados com enemas de AGCC, apresentaram melhora no escore histológico inflamatório e redução nos níveis teciduais de MPO, concluindo que os AGCC devem ser utilizados no tratamento da doença (Cetinkaya et al., 2005).

O método que utilizamos vem sendo adotado nos estudos mais recentes que avaliaram sua presença em modelos experimentais de colite (Martinez, 2009; Barros et al., 2010; Martinez et al., 2010c). Optamos por avaliar a intensidade do infiltrado neutrofílico associando o estudo histológico aos níveis teciduais de MPO com o intuito de conferir maior fidedignidade aos resultados. Apesar da dosagem tecidual da MPO ser considerada parâmetro útil para a avaliação da presença de inflamação mediada por neutrófilos, apenas o nosso grupo avaliou os níveis teciduais de MPO em modelos experimentais de CE (Martinez, 2009; Longatti et al., 2010; Martinez et al., 2010c). A avaliação do grau de infiltração neutrofílica, associando método

histológico e bioquímico, em modelos experimentais de CE, relacionando-a ao estudo das proteínas que compõe as junções aderentes é uma contribuição inédita.

A quantificação dos níveis de estresse oxidativo tecidual também pode ser realizada por várias técnicas. Dentre as mais utilizadas encontra-se a dosagem tecidual de malondialdeído, produto da peroxidação de fosfolípedes da membrana celular, dosagem plasmática ou urinária dos níveis de 8-hidroxideoxiguanosina ou de produtos da oxidação avançada de proteínas (Baskol et al., 2008; Marques et al., 2010). Todavia, são técnicas bioquímicas sensíveis, sujeitas a variações e que necessitam razoável quantidade de tecido para a sua determinação (Møller, 2005 e 2006; Ribeiro et al., 2008). Em virtude dos limites relacionados com a obtenção de material suficiente para todas as análises envolvidas no presente estudo, essas técnicas não podiam ser aplicadas. Com o advento da técnica da eletroforese em gel de célula única (ensaio em cometa), tornou-se possível quantificar os níveis de estresse oxidativo em uma única célula, o que reflete de maneira mais precisa os níveis de estresse oxidativo em todo o tecido (Møller, 2006; Glej et al., 2009).

Através da relação obtida entre a extensão distância do DNA migrado (cauda do cometa) e o DNA íntegro (núcleo do cometa) é possível quantificar os níveis de estresse oxidativo em cada célula isolada. A técnica possibilita a comparação das células da mucosa cólica normal com as do epitélio inflamado (Glej et al., 2009).

A possibilidade de quantificar os níveis de estresse oxidativo em pequenos fragmentos de tecido o ensaio do cometa também permite a avaliação dos efeitos terapêuticos de substâncias, na prevenção da agressão inflamatória mediada pelos RLO nas diversas etapas da seqüência colite e carcinoma (Caltabiano et al., 2010). O ensaio do cometa é um dos métodos mais sensíveis para avaliação dos níveis de estresse oxidativo, apresentando maior acurácia quando comparado a outras

técnicas (Glei et al., 2009). Sua alta sensibilidade aliada ao seu baixo custo faz com que venha sendo cada vez mais empregado (Abrahamse et al., 1999; Glei et al., 2009).

O ensaio do cometa já tinha sido utilizado pelo nosso grupo na avaliação dos níveis teciduais de estresse oxidativo no modelo experimental de CE adotado no presente estudo (Martinez, 2009; Longatti et al., 2010). No entanto, ainda não tinha sido empregado para avaliar a relação entre níveis de estresse oxidativo e modificações do conteúdo e expressão tecidual da proteína E-caderina em modelos de colite.

6.2 QUANTO AOS RESULTADOS

A superfície luminal do intestino dos mamíferos é revestida por epitélio com uma única camada de células especializadas intimamente aderidas e em constante processo de renovação (Gassler et al., 2001). A capacidade de impermeabilidade e estabilidade do epitélio intestinal é assegurada por um complexo mecanismo de junções celulares, representados pelas junções de oclusão, ancoramento, comunicação, desmossomos e hemidesmossomos (Gassler et al., 2001). A capacidade de permeabilidade seletiva, vedação e isolamento do conteúdo luminal dos tecidos estéreis subjacentes é o principal preceito funcional do epitélio intestinal (Gassler et al., 2001).

Para que ocorra o desenvolvimento das colites é necessária a ruptura dessa 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. Recentemente

demonstrou-se, em modelo animal de CE, que é possível infringir danos a 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., 2010c).

Há seis 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).

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., 2010c). Em estudo subsequente, com o objetivo de avaliar a intensidade dessas alterações na parede intestinal, verificou-se que nos segmentos excluídos de trânsito, o estresse oxidativo relaciona-se à atrofia das criptas intestinais, formações de úlceras epiteliais, edema submucoso e congestão vascular. (Sousa et al., 2009; Martinez, 2009). Com objetivo de avaliar se as alterações histológicas e bioquímicas encontradas no modelo de CE proposto, eram semelhantes às provocadas pela colite quimicamente induzida, verificou-se que na colite por TNBS, a maior formação de RLO ocorre imediatamente após a exposição da mucosa ao TNBS que, contudo, normaliza-se após a segunda semana da intervenção (Longatti et al., 2010). De modo distinto, no modelo de CE a produção

de RLO e, conseqüentemente, o estresse oxidativo resultante, mantinham-se elevados no cólon excluído, durante todo período de exclusão. (Longatti et al., 2010). Esses achados confirmaram não só a maior capacidade de formação de RLO pelas células epiteliais com modificações metabólicas, mas a importância da flora bacteriana intestinal para manutenção infiltração neutrofílica que caracteriza a fase de propagação proposta pela teoria de indução da colite ulcerativa por radicais livres (Pravda, 2005).

Com o intuito de verificar se o estresse oxidativo era capaz de provocar dano à primeira linha de defesa da barreira intestinal avaliou-se as modificações no conteúdo e padrão de expressão dos principais tipos e subtipos de mucinas no epitélio cólico (Nonose, 2009; Nonose et al., 2009; Martinez et al., 2010b). Constatou-se que existe redução no conteúdo de ambos os tipos de mucinas nos segmentos desprovidos de trânsito. As mucinas ácidas apresentam redução mais expressiva quando comparada às neutras (Nonose, 2009; Nonose et al., 2009).

Mostrou-se que as modificações do conteúdo e padrão de expressão das mucinas ácidas relacionavam-se com o tempo de exclusão. Esses resultados não só reforçaram as particularidades da expressão das mucinas na CE, como confirmaram que as modificações do metabolismo celular relacionam-se às alterações morfofuncionais da primeira linha de defesa da barreira epitelial, representada pela camada de muco (Martinez et al., 2010b). Os AGCC têm importância fundamental na produção regular de mucinas pelas células epiteliais, pois induzem a transcrição de genes responsáveis pela produção da fração protéica das mucinas (Gaudier et al., 2004 e 2009). É possível que na CE as modificações no conteúdo e padrão de expressão das mucinas ácidas estejam relacionadas ao menor suprimento de AGCC provocado pela derivação intestinal. Cabe destacar que em ambos os estudos onde

mensurou-se o conteúdo e analisou-se o padrão de expressão das mucinas ácidas as alterações encontradas relacionavam-se aos maiores níveis de estresse oxidativo e as alterações histológicas características da CE. Esses achados sugerem os maiores níveis de apoptose na superfície epitelial, ocasionado pelo estresse oxidativo, aumentem os índices de divisão celular na zona proliferativa das criptas, interferindo no subtipo de mucina produzida.

Estudos mostraram que o estresse oxidativo constante ao DNA das células do epitélio cólico é um dos mecanismos responsáveis pelo surgimento de mutações relacionadas ao CCR e ao CCR associado à colite ulcerativa (Seril et al., 2003).

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. Revisando a literatura, uma série de estudos mostrou alterações na expressão das proteínas que formam as junções de oclusão e junções aderentes nas DII (Laukoetter et al., 2008).

Estudos avaliando especificamente as junções aderentes encontraram redução e modificações no padrão de expressão das proteínas E-caderina, β -catenina e p-120 nas células da mucosa intestinal cronicamente inflamada e na mucosa normal próximo de locais onde já existia a infiltração neutrofílica das criptas intestinais (Gassler et al., 2001; Kucharzik et al., 2001). Nos tecidos inflamados de doentes com colite ulcerativa ativa, a desorganização das junções aderentes era mais evidente quando comparada a dos tecidos normais ou tecidos em fase de reparação (Gassler et al., 2001). Modificações nas junções aderentes interferem na diferenciação celular, na maturação epitelial, possibilitam a infiltração bacteriana e

encontram-se diretamente relacionadas carcinogênese colorretal (Nollet et al., 1999; Jankowski et al., 1997; Larsson, 2006).

Alterações na expressão das proteínas E-caderina e β -catenina na mucosa cólica cronicamente inflamada e a maior possibilidade de desenvolvimento do CCR nessa situação, confirmam a importância da preservação dessas proteínas não só na manutenção da barreira funcional, mas na prevenção do CCR (Gassler et al., 2001).

Uma prova inequívoca da relação existente entre ruptura das junções aderentes e o desenvolvimento de colite veio a partir de estudos experimentais que, utilizando ratos transgênicos silenciados para o gene CDH1 que transcreve a proteína E-caderina, mostraram que a menor expressão do gene relacionava-se a indução e progressão da colite (Hermiston e Gordon, 1995). Os resultados encontrados nesses estudos sugerem que a ruptura do complexo E-caderina/ β -catenina é condição necessária para que ocorra infiltração bacteriana do meio interno estéril e a subsequente resposta inflamatória celular proposta pela teoria de indução da colite por radicais livres. Outros autores também mostraram que modificações no padrão de expressão das junções aderentes, encontravam-se relacionadas à maior possibilidade de CCR nos portadores de colite ulcerativa mostrando que a proteína tem papel importante no controle da divisão celular (Jankowski et al., 1997; Jankowski et al., 1998; Aust et al., 2001).

Todavia, os modelos de colite quimicamente induzida também não permitem avaliar se a quebra das proteínas que formam as junções aderentes é provocada pela própria ação da substância química utilizada, por toxinas liberadas pelas bactérias ao invadirem a parede intestinal ou, até mesmo, por proteases liberadas por neutrófilos ativados. Estudos analisando a expressão tecidual das proteínas

cludina, E-caderina e β -catenina, a primeira componente das junções de oclusão e as duas últimas das junções aderentes, mostraram que a migração de neutrófilos ativados durante a fase aguda da colite é associada à menor expressão das proteínas, principalmente nos sítios de inflamação ativa (Kucharzik et al., 2001; Usami et al., 2006). Entretanto, outros autores sugerem que a ruptura do complexo de adesão formado pelas proteínas, não ocorre pela ação de proteases liberadas pelos neutrófilos, mas por interleucinas, interferon gama ($INF\gamma$) e o fator de necrose tumoral (TNF) liberados no local (Kucharzik et al., 2001).

Cabe destacar que nesses estudos, apesar de existirem referências a possibilidade de que neutrófilos ativados possam produzir altas concentrações de RLO, nenhum deles faz menção ao estresse oxidativo como possível causa da quebra do complexo E-caderina/ β -catenina (Grisham et al., 1990; Thews et al., 2009).

Até a presente data, não se estudou a possibilidade de que existam 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, no presente estudo julgou-se oportuno verificar se poderia existir dano às proteínas formadoras das junções aderentes. O modelo de CE assegurava que a lesão das junções aderentes 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). 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 E-caderina, ter-se-ia mais uma evidência experimental a favor da teoria de indução da colite por radicais livres.

No presente estudo, inicialmente nos preocupamos em confirmar se os animais de experimentação desenvolviam colite nos segmentos excluídos de trânsito. Adotando a mesma metodologia anteriormente empregada, avaliamos a presença de colite pelos estudos histopatológico e bioquímico analisando as principais alterações microscópicas da parede cólica e o infiltrado neutrofílico pelos níveis teciduais de MPO (Martinez, 2009; Longatti et al., 2010). Constatamos que nos animais do grupo controle e nos segmentos cólicos com trânsito preservado dos animais do grupo, não houve formação experimental de úlceras epiteliais, embora identificássemos algum grau de infiltrado neutrofílico. No cólon sem trânsito, havia maior número de úlceras e maior grau de inflamação tecidual independente do grupo considerado. Cabe destacar que nos segmentos desprovidos de trânsito após 12 semanas de exclusão os níveis de MPO reduziam, mas o escore inflamatório aumentava, sugerindo que a manutenção da agressão epitelial estivesse relacionada a outro fenômeno.

Os níveis de estresse oxidativo nos segmentos excluídos aumentavam com o decorrer do experimento mostrando que os RLO produzidos em excesso, talvez pudessem ser responsabilizados pela maior número de úlceras e, conseqüentemente, pelo maior escore de graduação inflamatória.

Nos animais submetidos à exclusão fecal por seis semanas, apesar de não evidenciarmos úlceras epiteliais nos segmentos desprovidos de trânsito, encontramos maior grau de infiltração neutrofílica, confirmado pela avaliação histológica e pelos níveis elevados de MPO. Os segmentos sem trânsito apresentavam maior escore inflamatório em relação aos animais do grupo controle e

aos segmentos com trânsito preservado. É provável que o maior grau de inflamação esteja relacionado ao maior infiltrado neutrofílico, uma vez que nesse período de exclusão não encontramos úlceras epiteliais.

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 excluído após seis semanas estejam relacionados tanto à maior formação de RLO pelos próprios neutrófilos presentes no tecido, quanto pelas células epiteliais desprovidas de AGCC .

Quando mensurou-se o conteúdo tecidual da proteína E-caderina nos animais submetidos à derivação intestinal por seis semanas, encontramos redução do conteúdo total da proteína nos segmentos sem trânsito fecal.

Avaliando o conteúdo de E-caderina apenas na região apical das criptas cólicas, encontramos redução em relação aos animais do grupo controle e aos segmentos providos de trânsito dos animais do grupo experimento. Ao analisarmos o conteúdo da proteína, exclusivamente nas regiões basais das criptas cólicas não encontramos diferenças quando comparado aos animais do grupo controle e aos segmentos com trânsito fecal dos animais do grupo experimento. Esses resultados sugerem 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 as junções aderentes nas primeiras semanas ocorre a partir da superfície luminal. Nas primeiras seis semanas de exclusão com o

progredir do tempo de exclusão encontramos redução do conteúdo da proteína nas regiões apicais em relação às basais.

Contudo, existia aumento da atividade da MPO nos segmentos sem trânsito desses animais, não sendo possível afirmar que a maior degradação da proteína estivesse relacionada apenas aos maiores níveis de estresse oxidativo. É possível que citocinas e proteases produzidas pelos neutrófilos ativados, presentes nessa fase do experimento, também pudessem ser responsabilizadas pela maior degradação da E-caderina.

Nos animais submetidos à derivação intestinal por 12 semanas, encontramos maior escore de graduação inflamatória nos segmentos cólicos sem trânsito fecal. É provável que o aumento no escore esteja relacionado à maior quantidade de úlceras epiteliais. Ao analisarmos a variação dos níveis de MPO no cólon sem trânsito, comparando animais submetidos à derivação por seis e 12 semanas, verificamos redução do conteúdo tecidual de MPO com o decorrer do tempo de exclusão, demonstrando menor infiltrado neutrofílico. Os níveis de estresse oxidativo nos segmentos sem trânsito aumentavam após 12 semanas de derivação e estavam diretamente relacionados ao aumento do número de úlceras, escore de graduação inflamatória, e inversamente aos níveis de MPO. Entretanto, o aumento do estresse oxidativo tecidual no cólon sem trânsito dos animais derivados por 12 semanas, ainda poderia ser atribuído, pelo menos em parte, a presença de infiltrado neutrofílico. A relação inversa com os níveis de MPO sugere, contudo que outros mecanismos moleculares também estejam contribuindo para o aumento da produção de RLO. Talvez, a piora do metabolismo das células epiteliais do cólon, pelo déficit mais prolongado de AGCC, pudesse ser responsabilizada pela maior formação de RLO e piora do dano tecidual.

Mensurando o conteúdo total de E-caderina nos animais submetidos à derivação de trânsito por 12 semanas, da mesma forma com ocorria nos animais derivados por seis semanas, encontramos redução nos segmentos desprovidos de trânsito em relação ao grupo controle e segmentos providos de trânsito fecal dos animais do grupo experimento. Ao analisarmos a presença da E-caderina exclusivamente nas regiões apicais, encontramos menor expressão em relação ao grupo controle e segmentos com trânsito preservado. Verificamos que a redução na expressão da proteína era ainda maior quando comparada a dos animais submetidos à derivação por seis semanas. A expressão da E-caderina nas regiões basais nos segmentos sem trânsito fecal não se modificava em relação aos segmentos com trânsito preservado e aos do grupo controle. Não encontramos variação do conteúdo da proteína entre as regiões apicais e basais com relação ao tempo de exclusão.

O cólon sem trânsito dos animais derivados por 18 semanas apresentava piora do escore de graduação inflamatória, assim como da presença de úlceras epiteliais, apesar de não sofrerem variações em relação aos animais derivados por 12 semanas. No entanto, nos segmentos excluídos por 18 semanas, encontramos níveis de MPO semelhantes aos do grupo controle e ao do cólon com trânsito fecal. Esses achados sugerem que o maior número de úlceras e o maior escore inflamatório não pudessem ser atribuídos apenas ao infiltrado neutrofílico. Encontramos níveis teciduais de estresse oxidativo nos segmentos sem trânsito fecal maiores ao dos animais derivados por 12 semanas. Esses resultados sugerem que, no modelo experimental de CE adotado no presente estudo, nas primeiras 12 semanas, o maior grau de inflamação relaciona-se a infiltração neutrofílica e ao estresse oxidativo. Como após 12 semanas os níveis de MPO diminuem, é provável

que o estresse oxidativo possa ser o principal elemento responsável pela piora da inflamação.

Quando mensurou-se o conteúdo tecidual total da proteína E-caderina nos animais submetidos à derivação intestinal por 18 semanas, encontramos redução da proteína nos segmentos sem trânsito intestinal. Ao analisarmos a expressão da proteína apenas na região apical das criptas cólicas encontramos redução em relação ao grupo controle e aos segmentos providos de trânsito do grupo experimento. A intensidade de expressão da E-caderina, na região basal das criptas cólicas não reduzia quando comparada ao encontrado nos animais do grupo controle e aos segmentos com trânsito do grupo experimento. Apesar de não ocorrer redução na intensidade de expressão apical de E-caderina, notamos que se encontrava inversamente relacionado ao tempo de exclusão. Esses resultados sugerem que o menor conteúdo tecidual total da proteína, após 18 semanas de exclusão, se deve à redução na intensidade de expressão na região apical das criptas cólicas, uma vez que houve modificações na região basal. Os níveis de E-caderina na região apical relacionavam-se diretamente aos níveis de estresse oxidativo e inversamente aos níveis de MPO. Apesar de alguns autores sugerirem que a quebra das junções intercelulares esteja relacionada à liberação de enzimas proteolíticas pelos neutrófilos durante a penetração no espaço intercelular, refazendo-se após a migração dessas células, a manutenção da menor expressão de E-caderina nos animais deste grupo experimental, onde já não existia infiltração neutrofílica, sugere que outro mecanismo possa estar relacionado à manutenção da degradação das pontes de E-caderina (Kucharzik et al., 2001). É possível que o estresse oxidativo seja o principal mecanismo de danos às junções aderentes, pois após 18 semanas, os níveis de infiltração neutrofílica nos segmentos sem trânsito

fecal eram semelhantes aos do grupo controle e segmentos com trânsito fecal dos animais do grupo experimento.

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 aderentes 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; Roediger e Millard, 1995), 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 (Harig et al., 1989; Vieira de Barros et al., 2010). 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 CE (Nosál'ová et al., 2000; Caltabiano et al., 2010). 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 (Bajka et al., 2008) Essas evidências corroboram a importância dos RLO no desenvolvimento das colites (Martinez, 2009).

Os resultados encontrados no presente estudo acrescentam uma nova evidência para subsidiar a teoria de indução da colite por radicais livres. Neste estudo, novamente demonstramos que as células da mucosa cólica de segmentos intestinais excluídos de trânsito fecal sofrem maior estresse oxidativo (Martinez, 2009; Martinez et al., 2010c).

Confirmou-se que as células epiteliais, com modificações no metabolismo energético, produzem maiores níveis de RLO, principalmente nas fases mais tardias da exclusão fecal, possibilitando maior dano tecidual e ao DNA nuclear (Carmo, 2010; Martinez et al., 2010a). 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; Longatti et al., 2010; Martinez et al., 2010b). Finalmente, demonstramos que o estresse oxidativo altera o conteúdo e modifica o padrão de expressão das proteínas que formam as junções aderentes. Esses achados mostram, pela primeira vez na literatura, que a proteína E-caderina, uma das principais componentes das junções aderentes encontra-se alterada na CE assim como ocorre na colite ulcerativa.

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. Recentemente, com o objetivo de avaliar, experimentalmente essa possibilidade iniciamos um novo Projeto de Pesquisa, estudando a ação de várias substâncias antioxidantes, nos diferentes sistemas de defesa da barreira epitelial cólica. Os resultados iniciais vêm demonstrando que a aplicação de clisteres

com ácido 5-ASA em segmentos excluídos de trânsito reduz, significativamente, os níveis de dano oxidativo ao DNA das células epiteliais, mesmo após a exposição *ex vivo* com H₂O₂ (Máximo et al., 2009; Caltabiano, 2010; Caltabiano et al., 2010).

Os efeitos antioxidantes do 5-ASA melhoraram as alterações histológicas encontradas na CE confirmando o potencial benefício terapêutico do antioxidante (Caltabiano, 2010; Caltabiano et al., 2010).

No momento estamos avaliando, por análise imunohistoquímica, a expressão tecidual das mucinas do tipo 2, proteínas E-caderina e, por RT-PCR, a expressão dos genes *cdh1* nos mesmos animais. Os resultados preliminares sugerem que o ácido 5-ASA é capaz de modular a expressão desses genes e preservar a expressão tecidual das proteínas por eles transcritas. Todavia, novos ensaios, e em seres humanos ainda serão necessários para confirmar o potencial terapêutico dos antioxidantes no tratamento e prevenção da CE no homem.

7 CONCLUSÕES

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

- a) Existe redução no conteúdo tecidual da proteína E-caderina nas criptas cólicas de segmentos desprovidos de trânsito fecal.
- b) A redução do conteúdo de E-caderina ocorre pela menor intensidade de expressão tecidual nas regiões apicais das criptas cólicas.
- c) Com o progredir do tempo de exclusão existe redução da expressão tecidual da proteína E-caderina.
- d) O estresse oxidativo encontra-se inversamente relacionado ao conteúdo apical de E-caderina.

8. ANEXOS

Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa (CEUAP) da Universidade São Francisco, Bragança Paulista

Anexo B - Correlação entre todas as variáveis

	Coeficiente valor de p	Tempo	MPO	TM	E-caderina total	E-caderina Apical	E-caderina Basal
Tempo	rs = p =		-0,9679 0,00001**	0,7721 0,00001**	0,257 0,008	0,3693 0,01*	0,068 0,657
MPO	rs = p =	-0,9679 0,00001**		-0,7173 0,00001**	-0,2873 0,05	0,4186 0,002**	0,0941 0,31
TM	rs = p =	0,7721 0,00001**	-0,7173 0,00001**		0,067 0,66	-0,445 0,002**	0,0941 0,53
E-caderina total	rs = p =	0,257 0,008	-0,2873 0,05	0,067 0,66		-0,1956 0,19	0,3383 0,02*
E-caderina Apical	rs = p =	0,3693 0,01*	0,4186 0,002**	-0,445 0,002**	-0,1956 0,19		-0,0503 0,74
E-caderina Basal	rs = p =	0,068 0,657	0,0941 0,31	0,0941 0,53	0,3383 0,02*	-0,0503 0,74	

MPO = mieloperoxidase TM = Tail moment; * = p < 0,05; ** p < 0,01

ANEXO C - RESULTADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS - 6 SEMANAS

	Úlceras			Escore Inflamatório			Mieloperoxidase - MPO			Estresse oxidativo - TM			E-caderina	
	Controle	Com trânsito	Sem trânsito	Controle	Com trânsito	Sem trânsito	Controle	Com trânsito	Sem trânsito	Controle	Com trânsito	Sem trânsito	Controle	Com trânsito
	0	0	0	2	3	3	0,98	0,96	2,01	1,66	1,62	3,09	9,96	10,17
	0	0	0	2	1	3	0,81	0,8	1,97	2,22	1,98	2,4	7,89	9,69
	0	0	0	2	2	3	1,07	1,05	1,98	1,52	2,5	3,52	10,92	10,28
	0	0	0	2	2	3	0,97	0,95	1,98	1,34	2,13	3,66	9,96	10,16
	0	0	0	3	3	3	0,94	0,96	2	1,28	2,49	2,57	7,79	9,72
		0	0		1	3		0,99	1,96		3,2	3,21		10,21
		0	0		2	3		0,89	2,01		1,68	3,72		10,24
		0	0		2	3		0,9	1,95		3,5	3,46		9,7
		0	0		2	3		0,92	1,96		2,13	2,93		10,29
		0	0		2	3		0,85	1,94		2,09	3,4		7,21
		0	0		2	2		0,89	1,9		1,48	3,11		6,12
		0	0		2	3		0,92	1,89		1,64	3,51		8,56
		0	0		2	4		0,97	1,93		1,54	3,5		6,68
		0	0		2	3		0,84	1,94		1,38	3,7		5,6
		0	0		2	3		0,99	2,1		1,8	2,64		5,21
M	0	0	0	2	2	3	0,95	0,92	1,96	1,6	2,2	3,24	9,3	8,65
DP	0	0	0	0,53	0,53	0,37	0,09	0,06	0,05	0,37	0,62	0,44	1,39	1,92

Estresse Oxidativo (TM) = Unidades Arbitrárias

Úlceras = número de úlceras

Graduação inflamatória = escore

Mieloperoxidase (MPO) = unidade β -actina g¹

E-caderina = % por campo

M = Média

DP = Desvio Padrão

ANEXO D - RESULTADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS - 12 SEMANAS

	Úlceras			Escore Inflamatório			Mieloperoxidase - MPO			Estresse oxidativo - TM			E-caderina	
	Controle	Com trânsito	Sem trânsito	Controle	Com trânsito	Sem trânsito	Controle	Com trânsito	Sem trânsito	Controle	Com trânsito	Sem trânsito	Controle	Com trânsito
	0	0	2	1	3	8	0,48	0,49	1,1	2,13	2,52	3,69	10,35	9,07
	0	0	2	2	3	8	0,46	0,5	1,3	3,01	3,42	4,42	10,8	16,9
	0	0	2	2	3	8	0,5	0,47	0,9	2,75	2,73	3,89	10,01	11,7
	0	0	2	2	2	8	0,45	0,42	1	2,7	2,07	3,75	11,03	10,17
	0	0	2	3	3	7	0,47	0,49	1,15	2,43	2,74	4,24	10,11	9,71
		0	2		3	8		0,49	1,18		2,97	4,05	7,07	10,28
		0	2		3	8		0,49	1,19		2,56	3,97		8,91
		0	2		3	8		0,46	1,27		2,41	3,86		8,34
		0	2		3	8		0,5	1,08		2,53	3,2		8,27
		0	3		3	8		0,43	1,05		2,3	3,3		7,31
		0	2		3	8		0,48	1,03		2,63	3,23		9,46
		0	2		2	7		0,48	1,04		2,75	3,53		7,84
		0	2		3	8		0,48	1,06		2,94	3,98		7,77
		0	2		3	8		0,47	0,89		2,39	3,04		6,93
		0	2		3	8		0,47	1,2		2,17	3,97		7,57
M	0	0	2,06	2	2,9	7,96	0,47	0,47	1,09	2,6	2,6	3,74	9,89	9,34
DP	0	0	0,25	0,7	0,25	0,37	0,19	0,02	0,12	0,3	0,34	0,4	1,43	2,45

Estresse Oxidativo (TM) = Unidades Arbitrárias

Úlceras = número de úlceras

Graduação inflamatória = escore

Mieloperoxidase (MPO) = unidade β -actina g¹

E-caderina = % por campo

M = Média

DP = Desvio Padrão

ANEXO E - RESULTADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS - 18 SEMANAS

	Úlceras			Escore Inflamatório			Mieloperoxidase - MPO			Estresse oxidativo - TM			E-caderina	
	Controle	Com trânsito	Sem trânsito	Controle	Com trânsito	Sem trânsito	Controle	Com trânsito	Sem trânsito	Controle	Com trânsito	Sem trânsito	Controle	Com trânsito
	0	0	3	2	3	8	0,61	0,71	0,69	2,56	2,84	4,95	10,35	11,1
	0	0	3	2	3	8	0,52	0,72	0,71	2,39	2,16	4,45	10,8	9,29
	0	0	3	2	3	8	0,66	0,7	0,7	2,93	2,32	4,53	10,01	9,77
	0	0	3	2	3	8	0,6	0,69	0,7	2,63	2,61	4,08	11,18	11,03
	0	0	3	2	3	7	0,59	0,68	0,69	2,51	2,71	4,62	12,39	10,11
		0	3		3	8		0,72	0,71		2,74	4,21		7,07
		0	3		3	8		0,73	0,72		3,56	4,02		9,73
		0	2		3	8		0,69	0,7		2,67	3,95		12,96
		0	3		3	8		0,68	0,69		2,34	4,97		7,8
		0	3		3	8		0,7	0,69		2,38	4,56		12,9
		0	3		3	7		0,69	0,69		2,63	4,07		14,22
		0	3		3	8		0,68	0,71		2,98	4,22		15,4
		0	3		3	8		0,72	0,7		2,6	4,39		12,57
		0	3		3	8		0,71	0,69		2,62	4,46		10,88
		0	3		2	8		0,7	0,73		2,58	4,08		13,75
M	0	0	2,9	2	2,9	8	0,59	0,71	0,7	2,6	2,6	4,37	11,28	11,23
DP	0	0	0,3	0,7	0,3	0,4	0,05	0,01	0,01	0,18	0,36	0,31	1,04	2,37

Estresse Oxidativo (TM) = Unidades Arbitrárias

Úlceras = número de úlceras

Graduação inflamatória = escore

Mieloperoxidase (MPO) = unidade β -actina g¹

E-caderina = % por campo

M = Média

DP = Desvio Padrão

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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.

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

Aust DE, Terdiman JP, Willenbacher 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.

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

Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo. Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova.* 2006;29(1):113-23.

Baskol M, Baskol G, Koçer D, Ozbakir O, Yucesoy M. Advanced oxidation protein products: a novel marker of oxidative stress in ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol.* 2008;42(6):687-91.

Barros KV, Xavier RA, Abreu GG, Martinez CAR, Ribeiro ML, Gambero A, Carvalho PO, Oller do Nascimento CM, Silveira VLF. Soybean and fish oil mixture increases IL-10, protects against DNA damage and decreases colonic inflammation in rats with dextran sulfate sodium (DSS) colitis. *Lipids Health Dis.* 2010; 9(1): 68.

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

Bilotta J, Wayne JD. Hydrogen peroxide enteritis: the "snow white" sign. *Gastrointest Endosc* 1989; 35(5): 428-30.

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

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

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

Caltabiano C. *Avaliação dos efeitos antioxidantes do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) contra o dano oxidativo ao DNA na colite de exclusão. Estudo experimental em ratos.* [Dissertação]. Bragança Paulista, São Paulo: Universidade São Francisco; 2010.

Caltabiano C, Máximo FR, Spadari APP, Miranda DDC, Serra MMP, Ribeiro ML, Martinez CAR. 5-aminosalicylic (5-ASA) can reduce the levels of oxidative DNA damage in cells of the colonic mucosa with and without fecal stream. *Dig Dis Sci.* 2010. No prelo

Carmo CV. *Avaliação dos níveis de estresse oxidativo ao DNA e expressão tecidual da proteína p53 na mucosa cólica de segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal. Estudo experimental em ratos.* [dissertação]. Bragança Paulista, São Paulo: Universidade São Francisco; 2010.

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

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

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

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

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

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

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.

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

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.

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

Duband JL, Thierry JP. Spatio-temporal distribution of the adherens junction-associated molecules vinculin and talin in early avian embryo. *Cell Differ Dev.* 1990;30(1):55-76.

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

El-Bahrawy MA, Pignatelli M. E-cadherin and catenins: molecules with versatile roles in normal and neoplastic epithelial cell biology. *Microsc Res Tech.* 1998;43(3):224-32.

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.

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

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Bras.* 1997;43(1):61-8.

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.

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

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

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.

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

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

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.

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

Gaudier E, Jarry A, Blottière HM, de Coppet P, Buisine MP, Aubert JP, Laboisie C, Cherbut C, Hoebler C. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287(6):1168-74.

Gaudier E, Rival M, Buisine MP, Robineau I, Hoebler C. Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. *Physiol Res*. 2009;58(1):111-9.

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

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

Giardiello, FM, Lazenby, AJ, Bayless, TM. The new colitides: collagenous, lymphocytic, and diversion colitis. *Gastroenterol Clin N Am*. 1995; 24:717-29.

- Glei M, Hovhannisyan G, Pool-Zobel BL. Use of comet-fish in the study of DNA damage and repair: review. *Mutat Res.* 2009;681(1):33-43.
- Glotzer DJ, Glick ME, Goldman H. Proctitis following diversion of fecal stream. *Gastroenterology.* 1981; 80(3):438-41.
- Grant NJ, Van Kruiningen HJ, Haque S, West AB. Mucosal inflammation in pediatric diversion colitis: a quantitative analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997;25(3):273-80.
- Griffiths AP, Dixon MF. Microcarcinoids and diversion colitis in a colon defunctioned for 18 years. Report of a case. *Dis Colon Rectum.* 1992;35(7):685-8.
- Grisham MB, 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, McRea PD. Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins. *J Cell Sci Suppl.* 1993;17:155-8
- 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.
- Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:136-47.
- Haas PA, Fox TA Jr, Szilagy EJ. Endoscopic examination of the colon and rectum distal to a colostomy. *Am J Gastroenterol.* 1990;85(7):850-4.
- Habr-Gama A, Teixeira MG, Vieira MJF, Miléu LF, Laurino Neto R, Pinotti HW. Operação de Hartmann e suas conseqüências. *Rev bras Coloproctol.* 1997;17(1):5-10.
- Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 1990;280(1):1-8.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem.* 1997;69(3):1330-1.
- Hanby AM, Chinery R, Poulson 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.
- Harig JM, Soergel KH, Komorowski RA, Wood CM. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. *N Engl J Med.* 1989;320(1):23-8.
- Hermiston ML, Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science.* 1995; 270(5239):1203–7.

- Hoffmann JC, Pawlowski NN, Kühl AA, Höhne W, Zeitz M. Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. *Pathobiology*. 2002-2003;70(3):121-30.
- Hollander D. The intestinal permeability barrier: a hypothesis to its regulation and involvement in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 1992;27(9):721-6.
- Huser N, Michalski CW, Erka M, Schuster T, Rosenberg R, Kleeff J, Friess H. Systematic review and meta-analysis of the role of defunctioning stoma in low rectal cancer surgery. *Ann Sur*. 2008;248(1):52-60.
- 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.
- 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.
- 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.
- Katsube T, Tsuji H, Onoda M. Nitric oxide attenuates hydrogen peroxide-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in monolayers of intestinal epithelial cell. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(6):794-803.
- Keli E, Bouchoucha M, Devroede G, Carnot F, Ohrant T, Cugnenc PH. Diversion-related experimental colitis in rats. *Dis Colon Rectum*. 1997;40(2):222-8.
- Kiely EM, Ajayi NA, Wheele RA, Malone M. Diversion procto-colitis: response to treatment with short-chain fatty acids. *J Pediatric Surg*. 2001; 36(10):1514-7.
- Kissmeyer-Nielsen P, Christensen H, Laurberg S. Diverting colostomy induces mucosal and muscular atrophy in rat distal colon. *Gut*. 1994;35(9):1275-82.
- Korelitz BI, Cheskin LJ, Sohn N, Sommers SC. The fate of the rectal segment after diversion of the fecal stream in Crohn's disease: its implications for surgical management. *J Clin Gastroenterol*. 1985;7(1):37-43.
- Koutroubakis IE. Spectrum of non-inflammatory bowel disease and non-infectious colitis. *World J Gastroenterol*. 2008;14(48):7277-9.
- Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease: radicals or ridiculous. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16(12):1997-2015.

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.

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

Larsson LI. Distribution of E-cadherin and beta-catenin in relation to cell maturation and cell extrusion in rat and mouse small intestines *Histochem Cell Biol.* 2006;126(5):575-82.

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

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

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.

Levine MD, Kirsner JB, Klotz AP. A new concept of the pathogenesis of ulcerative colitis. *Science* 1951; 114: 52-53

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

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Biologia celular e molecular.* 4^a.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. Cap.22, p.968-1002: A integração das células nos tecidos.

Longatti TS, Acedo SC, de Oliveira CC, Miranda DD, Priolli DG, Ribeiro ML, Gambero A, Martinez CA. Inflammatory alterations in excluded colon in rats: a comparison with chemically induced colitis. *Scand J Gastroenterol.* 2010;45(3):315-24.

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

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

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

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

Marques LHS, Silva CMG, Lameiro TMM, Almeida MG, Cunha FL, Pereira JA, Martinez CAR. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica em células da mucosa cólica após aplicação de enemas com peróxido de hidrogênio. Estudo experimental em ratos. Rev Bras Coloproct. 2010. No prelo.

Martinez CA, Bartocci PC, do Carmo CV, Pereira JA, Miranda DD, Ribeiro ML. The effects of oxidative DNA damage and mutations in the p53 protein on cells of the colonic mucosa with and without the fecal stream: an experimental study in rats. Scand J Gastroenterol. 2010;45(6):714-24 (a).

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. 2010b;25(3):231-40.

Martinez CAR, Priolli DG, Portes AV, Cardinali IA, Pereira JA; Margarido NF. Avaliação por processamento de imagem assistida por computador das alterações histopatológicas da parede cólica de segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal. Rev Bras Coloproct. 2007;27(Supl.1):36-7

Martinez CAR, Priolli DG, Ribeiro ML, Gambero A, Miranda DDC, Pereira JA, Nadal SR. The importance of oxygen free radicals in the etiopathogenesis of diversion colitis in rats. Acta Cir Bras. No prelo, 2010c.

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, Waisberg J, Palma RT, Silva FZ, Cimerman G, Goffi FS. Morphometric study of gastric mucosa in dogs submitted to proximal gastric vagotomy, splenectomy or proximal gastric vagotomy associated with splenectomy. Acta Cir Bras. 2002; 17(5): 289-98.

Máximo FR, Spadari APP, Miranda DDC, Ribeiro ML, Priolli DG, Martinez CAR. Avaliação dos efeitos da mesalazina na proteção contra o dano oxidativo ao DNA nuclear na colite de exclusão. Estudo experimental em ratos. Rev Bras Coloproct. 2009;29(Supl.1): 22.

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

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

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.

Nagafuchi A, Takeichi M. Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J*. 1988; 7(12):3679-84.

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

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

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

Nollet F, Berx G, van Roy F. The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer *Mol Cell Biol Res Commun*. 1999;(2):77-85.

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.

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

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

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

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

Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(11):4246-50.

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.

Pinto D, Clevers H. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res*. 2005; 306(2):357-63.

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(16):2371-84.

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

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

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

Rao RK, Basuroy S, Rao VU, Karnaky Jr KJ, Gupta A. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin- β -catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem J.* 2002;368(Pt2):471-81

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

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

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

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

Rigo A, Stevanato R, Finazzi-Agro A, Rotilio G. An attempt to evaluate the rate of the Haber-Weiss reaction by using OH radical scavengers. *FEBS Lett.* 1977;80(1):130-2.

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

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

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

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

Schmitz H, Barmeyer 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.

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

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

Seril DN, Liao J, Ho KL, Warsi A, Yang CS, Yang GY. Dietary iron supplementation enhances DSS-induced colitis and associated colorectal carcinoma development in mice. *Dig Dis Sci.* 2002;47(6):1266-78.

Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animals models. *Carcinogenesis.* 2003;24(3):353-62.

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.

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.

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, Keon BH. The tight junctions: morphology to molecules. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14: 89-109.

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

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

Takeishi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5(5);806-11.

- Tan WS, Tang CL, Shi L, Eu KW. Meta-analysis of defunctioning stomas in low anterior resection for rectal cancer. *Br J Surg*. 2009;96(5):462-72.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(6):1005-28.
- Thews O, Lambert C, Kelleher DK, Biesalski HK, Vaupel P, Frank J. Impact of reactive oxygen species on the expression of adhesion molecules in vivo. *Adv Exp Med Biol*. 2009;645:95-100.
- Ulrich AB, Seiler C, Rahbari N, Weitz J, Büchler MW. Diverting stoma after low anterior resection: more arguments in favor. *Dis Colon Rectum*. 2009;52(3):412-8.
- 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;427:123-34.
- Vieira de Barros K, Gomes de Abreu G, Navarro Xavier RA, Rel Martinez CA, Ribeiro ML, Gambero A, Oliveira PC, Silveira VLF. Effects of a high fat or a balanced omega 3/omega 6 diet on cytokines levels and DNA damage in experimental colitis. *Nutrition*. In Press, 2010.
- Villanacci V, Talbot IC, Rossi E, Bassotti G. Ischaemia: a pathogenetic clue in diversion colitis? *Colorectal Dis*. 2007;9(7):601-5.
- Watson AJ, Chu S, Sieck L, Gerasimenko O, Bullen T, Campbell F, McKenna M, Rose T, Montrose MH. Epithelial barrier function in vivo sustained despite gaps in epithelial layers. *Gastroenterology*. 2005;129(3):902-12.
- Whelan RL, Abramson D, Kim DS, Hashmi HF. Diversion colitis: a prospective study. *Surg Endosc*. 1994;8(1):19-24.
- Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40(3):235-43.
- Yamada T, Grisham MB. Role of neutrophil-derived oxidants in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Klin Wochenschr*. 1991;69(21-23):988-94.
- Yeong ML, Bethwaite PB, Prasad J, Isbister WH. Lymphoid follicular hyperplasia – a distinctive feature of diversion colitis. *Histopathology*. 1991;19(1):55-61.
- Zingarelli B, Szabó C, Salzman AL. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. *Gut*. 1999;45(2):199-209.

