

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

RONALDO PARISSI BUAINAIN

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA BIOLÓGICA
COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-TNF- α NA
MUCOSA CÓLICA DE RATOS SUBMETIDOS A
DERIVAÇÃO INTESTINAL**

Bragança Paulista

2018

RONALDO PARISSI BUAINAIN – RA: 001201603564

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA BIOLÓGICA
COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-TNF- α NA
MUCOSA CÓLICA DE RATOS SUBMETIDOS A
DERIVAÇÃO INTESTINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientadora: Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

Bragança Paulista

2018

WI 522 Buainain, Ronaldo Parissi.
B93a Avaliação dos efeitos da terapia biológica com anticorpos monoclonais anti-TNF-alfa na mucosa cólica de ratos submetidos a derivação intestinal / Ronaldo Parissi Buainain. -- Bragança Paulista, 2018.
73 p.

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

Orientação de: Carlos Augusto Real Martinez.

1. Colite. 2. Colostomia. 3. Ácidos graxos. 4. Voláteis.
5. Imuno-histoquímica. 6. Fator de necrose. 7. Tumoral alfa.
8. Ratos. I. Martinez, Carlos Augusto Real. II. Título.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, **ADIB BUAINAIN**, exemplo de dignidade e integridade, incentivador e orientador. Nesse momento, não presente fisicamente, mas com certeza torcendo pela minha trajetória.

A minha mãe, **MARIA HELENA PARISSI BUAINAIN**, que sempre me ensinou os verdadeiros valores da vida.

Aos meus irmãos, Renata e Ricardo, pelo constante apoio e pela grande torcida nessa caminhada, até o término desse projeto.

A minha FAMÍLIA, minha amada esposa Anamélia e aos meus filhos, Davi e Laura, pela compreensão da minha ausência em várias ocasiões, porém nunca deixando de incentivar e apoiar esse sonho.

A minha segunda casa, Universidade São Francisco, a todos os professores e funcionários que me acompanharam desde o início da minha vida acadêmica, me orientando e incentivando.

Ao Professor, Doutor e Livre Docente **CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ** pela extrema habilidade, competência, honestidade e paciência com que me orientou nessa Dissertação.

E a todos os funcionários envolvidos na experimentação animal.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor, Doutor e Livre Docente CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ, pela paciência, apoio, compreensão e orientação em mais este estudo.

Ao Professor JOSÉ AIRES PEREIRA pela realização das técnicas histológicas presentes no trabalho;

Aos meus COLEGAS do Setor de ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO SÃO FRANCISCO, pelo apoio e incentivo para realização desse projeto.

Aos professores e funcionários do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO na cidade de Bragança Paulista/SP, pela dedicação e pela oportunidade de enriquecimento profissional;

A UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO, minha CASA desde a Graduação, pela infraestrutura e pela concretização de mais este sonho.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

Racional: De modo semelhante ao que ocorre nas doenças inflamatórias intestinais (DII), na colite de desuso (CD) a mucosa do cólon derivado apresenta alterações estruturais, principalmente representadas pela atrofia epitelial, abscessos de criptas, aumento do infiltrado inflamatório e maior produção de fator de necrose tumoral- α (TNF- α). A terapia biológica com anticorpos monoclonais anti-TNF- α representa a estratégia terapêutica mais eficaz para o tratamento clínico das DII, pois encontra-se associada a redução do processo inflamatório, cicatrização epitelial e restabelecimento da integridade da barreira mucosa cólica. Entretanto, os efeitos da terapia com anti-TNF- α ainda não foram avaliados em modelos experimentais ou portadores de CD. Objetivo: Avaliar o uso do anti-TNF- α nas alterações inflamatórias da mucosa cólica de ratos submetidos ao desvio do trânsito intestinal. Método: Vinte e dois ratos Wistar foram submetidos à derivação intestinal por meio da confecção de uma colostomia terminal proximal à Hartmann. Os animais permaneceram por 12 semanas com a derivação fecal para o desenvolvimento da CD. A seguir foram divididos em três grupos experimentais, segundo serem submetidos, semanalmente, à aplicação subcutânea de soro fisiológico 0,9% (2,0 ml/sem) e infliximabe nas dosagens de 5mg/kg/sem e 10 mg/kg/sem, por 5 semanas consecutivas. Um dia após a conclusão do período de intervenção, todos animais foram eutanasiados para retirada de segmentos dos cólons providos e desprovidos de trânsito fecal. As alterações histopatológicas foram avaliadas por estudo histológico utilizando a técnica da hematoxilina-eosina. O escore inflamatório nos cólons com e sem trânsito fecal foi estabelecido considerando-se as seguintes variáveis: intensidade de atrofia epitelial, perda epitelial, presença de abscessos nas criptas, número de células caliciformes nas glândulas cólicas e infiltrado leucocitário mensurados por morfometria computadorizada. O escore inflamatório para cada animal foi estratificado segundo escala previamente validada. O infiltrado neutrofílico foi avaliado pela pesquisa da expressão tecidual da enzima mieloperoxidase (MPO) por estudo imuno-histoquímico. Resultados: Houve menor atrofia epitelial nos segmentos desprovidos de trânsito fecal dos animais tratados com infliximabe na dose de 10 mg/kg/sem ($p=0,02$). Nos segmentos sem trânsito fecal houve menor perda epitelial ($p=0,004$ e $p=0,03$), redução na formação de abscessos em criptas ($p=0,03$ e $p=0,01$), no infiltrado inflamatório ($p=0,01$ e $p=0,01$), das células caliciformes ($p=0,06$ e $p=0,005$) e no escore inflamatório ($p=0,01$ e $p=0,006$) nos animais tratados com infliximabe, independente da concentração utilizada. O conteúdo tecidual de MPO foi menor no cólon sem trânsito fecal dos animais tratados com infliximabe ($p=0,0001$ e $p=0,001$) independente da dose utilizada. Conclusão: O uso de anticorpo anti-TNF α reduziu o processo inflamatório dos segmentos excluídos de trânsito fecal sugerindo que a substância possa ser utilizada como tratamento para os casos graves colite de desuso.

Palavras-Chave: Colostomia, Ácidos Graxos, Imuno-histoquímica, Fator de Necrose Tumoral Alfa.

ABSTRACT

Background: As is similar to the case of intestine bowel disease (IBD), in diversion colitis (DC) the mucous membrane of the diverted colon presents structural alterations, namely atrophy of the epithelial glands, crypt abscesses, increased intensity of the inflammatory infiltrate and higher production of TNF- α . Biological therapy using anti-TNF- α monoclonal antibodies has proven to be the most effective form of therapeutic strategy for IBD. Biological therapy is associated with alleviating inflammation, epithelial healing and restoring the mucous integrity of the colonic membrane. However, the effects of anti-TNF- α therapy have not yet been assessed in experiments or DC patients. **Objective:** To assess the effects of anti-TNF- α therapy on inflammatory alterations of the colonic mucous membrane in rats undergoing bowel diversion. **Method:** Twenty-Two Wistar rats underwent bowel diversion via Hartmann colostomy (proximal terminal colostomy). The rats were subject to faecal diversion for 12 weeks in order to trigger DC. The specimens were then split into three experimental groups and began receiving a weekly subcutaneous application of 0.9% (2.0 ml/week) saline, and Infliximab in a 05-mg/kg weekly dose and a 10-mg/kg weekly dose for 5 consecutive weeks. One day after the intervention period had ended, all specimens were euthanised in order to have the segments of their colons with and without diversion removed. The histopathological alterations were assessed by a histological study using the haematoxylin-eosin technique. The inflammatory score in the colons with and without diversion was determined by using the following variables: intensity of epithelial atrophy, epithelial loss, presence of crypt abscesses, number of goblet cells in the colic glands and leukocytic infiltration measured by computerized morphometry. Each specimen's inflammatory score was classified according to a previously validated scale. The neutrophilic infiltrate was evaluated by determining the tissue expression of the enzyme myeloperoxidase (MPO) by an immunohistochemical study. **Results:** There was less epithelial atrophy in the segments with diversion in specimens receiving a weekly 10 mg/kg dose of Infliximab ($p=0.02$). Diverted segments experienced less epithelial loss ($p=0.004$ and $p=0.03$), fewer crypt abscesses ($p=0.03$ and $p=0.01$), less inflammatory infiltrate ($p=0.01$ and $p=0.01$), less goblet cells ($p=0.06$ and $p=0.005$) and a lower inflammatory score in animals given Infliximab ($p=0.01$ and $p=0.006$), regardless of the concentration. The MPO tissue content was lower in the diverted segments of colon in specimens given Infliximab, regardless of the dose ($p=0.0001$ and $p=0.001$). **Conclusion:** Using the anti-TNF- α antibody reduced the inflammatory process in the diverted segments, thereby indicating that the substance can be used as a treatment for serious cases of diversion colitis.

Key terms: Colostomy, Fatty Acids, Immunohistochemical, Tumour Necrosis Factor Alpha.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta

5-ASA - Ácido 5-aminosalicílico

CD – Colite de Desuso

CM - Centímetro

DII – Doença Inflamatória Intestinal

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ERMO – Espécies Reativas do Metabolismo de Oxigênio

MPO - Mieloperoxidase

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

RLO – Radicais Livres de Oxigênio

RLN – Radicais Livres de Nitrogênio

RCUI - Retocolite ulcerativa inespecífica

TNF-R – Receptores - fator de necrose tumoral

SF – Soro Fisiológico

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TGF- β - Fator de necrose tumoral beta

TNBS – Ácido Trinitrobenzenesulfônico

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Corte histológico – hematoxilina-eosina.....	31
FIGURA 2. Atrofia epitelial nos cólons providos e desprovidos de trânsito intestinal.....	32
FIGURA 3. Perda epitelial nos cólons providos e desprovidos de trânsito intestinal.....	33
FIGURA 4. Abscesso de cripta nos cólons providos e desprovidos de trânsito intestinal..	34
FIGURA 5. Infiltrado inflamatório nos cólons providos e desprovidos de trânsito intestinal.....	35
FIGURA 6. Células calciformes.....	36
FIGURA 7. Escore inflamatório nos cólons providos e desprovidos de trânsito intestinal	37
FIGURA 8. Imuno-histoquímica – Mieloperoxidase.....	38
FIGURA 9. Concentração tecidual da MPO nos cólons providos e desprovidos de trânsito intestinal.....	39

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC).....	13
1.2.	Ausência de Ácidos Graxos de Cadeia Curta.....	13
1.3.	Impacto da Derivação Intestinal.....	14
1.4.	Colite de Desuso.....	16
1.5.	Colite e Estresse Oxidativo.....	18
1.6.	Colite de Desuso, Estresse Oxidativo e Inflamação.....	20
1.7.	O Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)	21
1.8.	Anticorpo Monoclonal Quimérico Anti-TNF- α (Infliximabe).....	22
2.	OBJETIVOS	24
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1.	Animal de experimentação.....	25
3.2.	Técnica cirúrgica.....	25
3.3.	Grupos experimentais.....	26
3.4.	Eutanásia dos animais.....	27
3.5.	Histologia.....	27
3.6.	Morfometria computadorizada.....	28
3.7.	Técnica imuno-histoquímica para mieloperoxidase.....	28
3.8.	Escore Inflamatório.....	29
3.9.	Análise Estatística.....	29
4.	RESULTADOS.....	31
4.1.	Avaliação das Variáveis Histológicas.....	31
4.1.1.	Atrofia Epitelial.....	32
4.1.2.	Perda Epitelial.....	33
4.1.3.	Abscessos de Criptas.....	34
4.1.4.	Infiltrado Inflamatório.....	35

4.1.5. Células Caliciformes.....	36
4.2. Escore Inflamatório.....	37
4.3. Avaliação Imuno-histoquímica (Mieloperoxidase).....	38
5. DISCUSSAO.....	40
6. CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXO I.....	58
ANEXO II.....	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC)

Os AGCC são formados a partir da fermentação de fibras vegetais dietéticas pelas bactérias existentes na luz intestinal e representam o principal substrato nutritivo para as células epiteliais da mucosa cólica. Assim, a nutrição da mucosa do cólon ocorre, principalmente, pela absorção e metabolização dos AGCC existentes na luz intestinal. Os AGCC respondem por cerca de 80% de todo substrato energético fornecido à mucosa intestinal (ROEDIGER, 1990).

Dentre os AGCC, o butirato representa o substrato energético mais importante para as células mucosas. No cólon distal, sua absorção ocorre predominantemente por difusão passiva possuindo importante papel na prevenção de algumas formas de colite (SZCZEPKOWSKI et al., 2014). Os AGCC estimulam o crescimento normal das células do epitélio cólico, influenciam a motilidade, aumentam o fluxo sanguíneo mucoso e favorecem a cicatrização de lesões da parede intestinal. Já se demonstrou a influência dos AGCC na melhora das alterações histológicas em modelos experimentais de colite de desuso (CD) (OLIVEIRA-NETO; AGUIAR-NASCIMENTO, 2004; NASRRI et al., 2008; LAMEIRO et al., 2011). Todos esses aspectos reforçam a importância dos AGCC no tratamento e prevenção das DII (VELAZQUEZ; LEDERER; ROMBEAU, 1997; LOPES-PAULO, 2002).

Os AGCC parecem exercer também, papel protetor contra o desenvolvimento de neoplasias por sua ação antioxidante (BONDY; LE BEL, 1993; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VELAZQUEZ; LEDERER; ROMBEAU, 1997; SERIL et al., 2003; BERRA; MENK, 2006).

1.2. Ausência de Ácidos Graxos de Cadeia Curta

A derivação do trânsito intestinal impedindo a passagem dos AGCC para o segmento excluído faz com que as células epiteliais não possam dispor de seu principal substrato nutritivo. Com isso, essas células passam a usar como fonte energética alternativa, aminoácidos oferecidos pela circulação sistêmica (VELAZQUEZ; LEDERER; ROMBEAU, 1997; LOPES-PAULO, 2002; LAMEIRO et al., 2011). Todavia, o suprimento sanguíneo é incapaz de fornecer a quantidade necessária de substrato ocasionando alterações importantes nos mecanismos de respiração celular. Essas modificações levam à formação de altas concentrações de radicais livres de oxigênio (RLO) e nitrogênio (RLN), substâncias tóxicas e determinantes de agressão inflamatória tecidual. A melhora clínica e histológica da

CD, após restabelecimento do trânsito intestinal ou administração de enemas com AGCC no segmento excluído, reforçam essas evidências (NASRRI et al., 2008; LAMEIRO et al., 2011).

1.3. Impacto da Derivação Intestinal

Os estomas são frequentemente utilizados no manejo de várias condições clínicas, principalmente representadas pela diverticulite aguda do cólon esquerdo, câncer colorretal, DII e no trauma abdominal (SHERMAN; WEXNER, 2017). Estas derivações do trânsito intestinal, geralmente temporárias, são também rotineiramente utilizadas como estratégia cirúrgica visando minimizar as complicações sépticas decorrentes da deiscência de anastomoses confeccionadas em doentes com condições clínicas desfavoráveis (peritonite, choque, hipoproteinemia, anemia). A maioria dos cirurgiões colorretais, sempre que possível, evita a realização de um estoma de derivação intestinal, pois sabem que sua reversão não é um procedimento fácil de ser realizado ou isento de risco. Estudos mostram que o restabelecimento do trânsito intestinal aumenta exponencialmente o risco de complicações pós-operatórias que incluem o vazamento anastomótico, íleo pós-operatório, obstrução intestinal, fístulas enterocutâneas e, mais comumente, infecção no sítio cirúrgico (BRIDOUX et al., 2017; SHERMAN; WEXNER, 2017; TSUCHIYA et al., 2017). Estudos multicêntricos e randomizados, com elevado nível de evidência sugerem sempre que, quando possível, a derivação intestinal deve ser evitada (BRIDOUX et al., 2017; TSUCHIYA et al., 2017). Além de todas essas complicações descritas, muitos estomas confeccionados com intenção de serem temporários, não podem ser revertidos devido a complicações pós-operatórias, terapia adjuvante ou comorbidades clínicas proibitivas fazendo com que um número significativo desses estomas temporários se torne permanentes (HOLMGREN et al., 2017; SHERMAN; WEXNER, 2017).

No Brasil, estima-se que existam cerca de 33.864 indivíduos que possuem colostomia, sendo que só no Estado de São Paulo somam aproximadamente 9.200. Esses pacientes não passam apenas por uma transformação física, mas também por alterações psicossociais, tais como, problemas sexuais, depressão, constipação, gases intestinais e insatisfação com a aparência (CAMPOS et al., 2017). Quando não é possível restabelecer o trânsito intestinal nos pacientes submetidos a estomas temporários, o segmento de cólon ou reto a jusante do mesmo fica desprovido do trânsito fecal pelo resto da vida dos enfermos. A falta da passagem do bolo fecal faz com que o segmento excluído desenvolva uma síndrome de deficiência energética ocasionada pela privação do suprimento regular de AGCC às células da mucosa excluída (HARTY, 2013).

O processo inflamatório crônico que se desenvolve em segmentos do cólon ou reto desprovidos do suprimento regular de AGCC foi reconhecido, pela primeira vez em 1981 (GLOTZER; GLICK; GOLDMAN, 1981). Neste estudo pioneiro, os autores descreveram o desenvolvimento de processo inflamatório crônico na mucosa do cólon ou reto desprovida de trânsito fecal, em 10 doentes submetidos a derivação intestinal. Cabe destacar que todos esses doentes não apresentavam antecedentes de DII pré-existente. Os autores encontraram alterações endoscópicas no cólon derivado, semelhantes às aquelas encontradas nas DII, em particular às da retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI). Dentre as principais alterações histológicas encontradas os autores chamavam a atenção para a importante perda de células especializadas que formavam a camada epitelial, presença de abscessos no interior das criptas cólicas, infiltrado inflamatório na lâmina própria da mucosa e alterações regenerativas das glândulas intestinais (GLOTZER; GLICK; GOLDMAN, 1981). A partir dessa publicação inicial, essa nova forma de DII começou a ser reconhecida com maior frequência, recebendo diferentes denominações: colite de derivação, colite do cólon derivado, colite do cólon exclusivo, colite de privação fecal, colite de exclusão e, mais recentemente CD.

Com o passar dos anos, a importância do diagnóstico e tratamento da CD vem aumentando consideravelmente (SZCZEPKOWSKI; BANASIEWICZ; KOBUS, 2017). A maior preocupação com a doença está intimamente relacionada ao aumento no emprego das operações de derivação intestinal para o tratamento das mais diferentes enfermidades (HOLMGREEN et al., 2017). As mudanças dietéticas que ocorreram na sociedade moderna, a maior violência nos grandes centros urbanos, aliada a maior expectativa de vida do homem contemporâneo, aumentaram a possibilidade de doenças degenerativas e neoplásicas no intestino grosso que, em muitas ocasiões, requerem a realização de operações de derivação intestinal para seu correto tratamento (SHERMAN; WEXNER, 2017). Como exemplo dessas enfermidades merece destaque: as DII principalmente representadas pela RCUI e doença de Crohn, os traumatismos anorretocólicos, o câncer colorretal e a doença diverticular complicada (BRIDOUX et al., 2017; SHERMAN; WEXNER, 2017; TSUCHIYA et al., 2017). Sob esse prisma a CD, apesar de já ser um importante problema de saúde pública nos nossos dias, provavelmente sua importância epidemiológica continuará aumentando nas próximas décadas (SZCZEPKOWSKI et al., 2014).

1.4. Colite de Desuso

Colite de desuso, também conhecida como colite de exclusão, é uma DII caracterizada pelo desenvolvimento de atrofia das glândulas da mucosa cólica, redução do número de células caliciformes e presença de infiltrado inflamatório na mucosa intestinal de segmentos do intestino grosso excluídos de trânsito fecal. A partir de sua descrição inicial, a enfermidade vem apresentando incidência crescente em todo o mundo (GLOTZER; GLICK; GOLDMAN, 1981; MARDANAS; DEVROEDE, 1981; KELI et al., 1997; EDWARDS; GEORGE; WARREN, 1999). É provável que a incidência da CD esteja subestimada ao constatar-se que o trânsito intestinal é restabelecido em menos de 60% dos enfermos submetidos ao desvio temporário do fluxo fecal, fazendo com que um número significativo de enfermos desenvolva a CD (GLOTZER; GLICK; GOLDMAN, 1981; MARDANAS; DEVROEDE, 1981). Em países desenvolvidos o tempo médio para a reversão do estoma é de cerca de um ano, tempo mais do que suficiente para o surgimento da CD (HABR-GAMA et al., 1997). Estima-se que a doença seja encontrada na maioria dos doentes submetidos a colonoscopia após três meses da confecção do estoma e que cerca de 10% dos doentes cursem com sintomas mais intensos que piora, consideravelmente, a qualidade de vida (WHELAN et al., 1994).

O quadro clínico da CD é variável e encontra-se diretamente relacionado à extensão do segmento cólico excluído de trânsito fecal e ao tempo decorrido desde realização do desvio fecal. A maioria dos doentes torna-se sintomática 36 meses após o desvio do fluxo fecal (GLOTZER; GLICK; GOLDMAN, 1981; KELI et al., 1997; DAVID et al., 2009). Os doentes com CD queixam-se da eliminação de sangue e muco a partir do intestino excluído, dor abdominal e tenesmo. A colonoscopia do intestino derivado mostra uma mucosa hiperemiada, congesta, edemaciada, friável com apagamento dos vasos sanguíneos da submucosa e formação de ulcerações mucosas praticamente indistinguíveis daquelas encontradas na RCUI. Esses aspectos tornam o diagnóstico diferencial entre as duas doenças difícil de ser estabelecido, sobretudo nos pacientes submetidos a estomas derivativos decorrentes de complicações das DII (GERAGHTY; TALBOT, 1991).

Microscopicamente a parede cólica dos portadores de CD mostra uma variedade de aspectos histológicos, porém sem nenhuma alteração característica (LU et al., 1995). Nos casos graves, essas alterações histopatológicas são semelhantes àquelas encontradas na RCUI, porém com intensidade menor. Na maioria dos enfermos, a análise microscópica revela atrofia da camada epitelial com formações de pequenas úlceras mucosas, fragmentação da camada muscular da mucosa, importante congestão vascular da submucosa, edema e infiltrado inflamatório entre as glândulas do cólon excluído acompanhado ou não de alterações

arquiteturais nas criptas de Lieberkühn (LU et al., 1995). Nos casos mais graves desenvolvem-se abscessos no interior das criptas cólicas, particularmente nos locais onde existem áreas com hiperplasia linfóide nodular (GLOTZER; GLICK; GOLDMAN, 1981; MARDANAS; DEVROEDE, 1981; EDWARDS, GEORGE; WARREN, 1999). O desenvolvimento de displasias pode ser encontrado, mas, curiosamente, de modo distinto ao que ocorre nos portadores de RCUI, a presença de displasias graves na CD é extremamente rara, não se descrevendo até a presente data o desenvolvimento de neoplasias de origem epitelial em segmentos excluídos de trânsito por doenças distintas das DII (SERIL et al., 2003). É possível, não obstante, as duas enfermidades terem como denominador comum o intenso processo inflamatório crônico da mucosa cólica, que nos portadores de CD, a derivação do trânsito intestinal possa determinar menor agressão antigênica às células do epitélio cólico a partir de agentes químicos e biológicos normalmente encontrados na luz intestinal dos indivíduos com trânsito preservado.

Há mais de uma década demonstrou-se que existem alterações histológicas nas diferentes camadas que compõem a parede cólica quando se comparam segmentos com ou sem fluxo fecal (SOUSA et al., 2008). Constatou-se que ocorre redução significativa da altura das criptas da mucosa cólica, aumento da espessura e fragmentação da camada muscular da mucosa, aumento da espessura da camada submucosa, maior congestão vascular da camada submucosa, maior infiltrado de células inflamatórias. Todas essas alterações encontram-se relacionadas à duração do desvio fecal (SOUSA et al., 2008). Já se demonstrou que essas alterações em muito se assemelham às encontradas em modelos experimentais de colite quimicamente induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) (LONGATTI et al., 2010).

Os mecanismos etiopatogênicos da CD ainda provocam intenso debate. Há mais de quatro décadas estudos experimentais recentes vêm demonstrando, à semelhança do que ocorre na RCUI, a importância dos AGCC na prevenção e tratamento da doença (NEUT et al., 1995; CLAUSEN, 1996; SCHEPPACH et al., 1997; COOK; SELLIN, 1998; KIELY et al., 2001; NASRRI et al., 2008; MARTINEZ et al., 2010; LAMEIRO et al., 2011).

Recentemente vem sendo proposto que o mecanismo inicial responsável pela lesão do epitélio cólico em doentes com RCUI e CD encontra-se relacionado à produção de níveis elevados de RLO e RLN pela própria célula epitelial da mucosa cólica com alterações de seu metabolismo energético celular (PRAVDA, 2005; MARTINEZ et al., 2010). Evidências sugerem que os RLO e RLN, produzidos pelas células do epitélio cólico seriam os radicais responsáveis pelo dano aos eficientes sistemas de defesa que formam a parede intestinal

(MORTENSEN; CLAUSEN, 1996; LONGATTI et al., 2010; MARQUES et al., 2010; MARTINEZ et al., 2010). A reconstrução do trânsito intestinal, restabelecendo o fornecimento de AGCC, restitui os mecanismos habituais de obtenção energética pelas células, diminuindo a formação de RLO e RLN e, conseqüentemente, o dano inflamatório à mucosa cólica.

1.5. Colite e Estresse Oxidativo

A literatura atual vem dando importância crescente ao papel desempenhado pelos RLO na etiopatogenia de diversas doenças inflamatórias e neoplásicas (SHAMI; MOREIRA, 2004). Nos últimos anos, pesquisas vêm demonstrando, de maneira inequívoca, que os RLO se encontram relacionados à etiopatogenia das DII representadas, principalmente, pela RCUI (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SHAMI; MOREIRA, 2004; BERRA; MENK, 2006). A relação entre RLO e RCUI vem despertando cada vez mais curiosidade, fazendo com que um número crescente de estudos avalie o papel representado pelos RLO nas etapas iniciais da agressão a mucosa intestinal em portadores das DII (SHEENAN; BRYNJOLFSSON, 1960; BILOTTA; WAYE, 1989; LE BEL, 1993; BONDY; CADENAS; DAVIES, 2000; KEHRER, 2000; SHAMI; MOREIRA, 2004; CETINKAYA et al., 2005; PRAVDA, 2005; MARQUES et al., 2010; MARTINEZ et al., 2010; KADRI et al., 2013; KADRI et al., 2017).

Os RLO são normalmente formados durante o metabolismo energético das células. Habitualmente, a célula possui defesas antioxidantes naturais, enzimáticas e não-enzimáticas, que atuam contra a toxicidade desses radicais sendo responsáveis pela manutenção do equilíbrio entre a produção e eliminação destes agentes oxidantes (CADENAS; DAVIES, 2000). Todavia, em certas condições, quer pela diminuição da capacidade antioxidante do organismo, quer pelo aumento exagerado na produção de RLO, ocorre desequilíbrio determinando o aparecimento de fenômeno conhecido como estresse oxidativo (CADENAS; DAVIES, 2000; CETINKAYA et al., 2005).

O desequilíbrio do mecanismo oxidante/antioxidante em doentes com RCUI é motivo de constante investigação (SHEENAN; BRYNJOLFSSON, 1960). Já se demonstrou que a capacidade dos sistemas antioxidantes do cólon é deficiente, quando comparada a outros órgãos e tecidos, determinando maior vulnerabilidade da mucosa cólica ao estresse oxidativo e conseqüentemente a deflagração de processo inflamatório (THAM; WITHIN; COHEN, 2002). A possibilidade de colite ocasionada por RLO já é conhecida há vários anos, quando se verificou que a infusão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um potente formador de RLO, no interior do cólon e reto, era seguida por grave quadro de colite, histologicamente muito semelhante à RCUI e a CD (BILOTTA; WAYE, 1969; MARQUES et al., 2010; MARTINEZ et al., 2010). Os resultados desses estudos sugerem que o estresse oxidativo desencadeando

o processo inflamatório são responsáveis pela quebra dos mecanismos de defesa epitelial relacionados ao surgimento da colite.

Teorias relacionando a etiopatogenia da RCUI a distúrbios imunológicos foram propostas, contudo, todas falharam em explicar, claramente, os mecanismos iniciais envolvidos na agressão ao epitélio cólico (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002). Essas teorias não apresentaram bases experimentais concretas para esclarecer o mecanismo inicial de agressão ao epitélio e não foram capazes de explicar todos os aspectos histológicos e bioquímicos iniciais responsáveis pela quebra da barreira epitelial e, conseqüentemente, desencadeantes da doença (HENDRICKSON; GOKHALE; CHO, 2002). Apesar do infiltrado inflamatório celular ser encontrado na maioria dos portadores de RCUI, não existia uma teoria capaz de explicar satisfatoriamente o mecanismo de quebra da eficiente barreira epitelial, o que possibilitaria a migração de bactérias para o interior da submucosa do cólon, bem como a deflagração da resposta inflamatória. Diante destas evidências propôs-se que a produção aumentada de RLO e RLN seria responsável pelos fenômenos iniciais que precedem à infiltração inflamatória da mucosa intestinal em portadores de RCUI (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A agressão inicial à mucosa desencadeadora da doença é atribuída à formação aumentada de RLO pela própria célula epitelial da mucosa com modificações em seu metabolismo energético. Essa produção aumentada, aliada às deficiências do sistema antioxidante intracelular, permite a formação exagerada do radical hidroxil OH (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A produção aumentada do radical OH, difundindo-se pelo interior da célula, seria o fator determinante para a lesão das diferentes camadas da mucosa intestinal permitindo a migração de antígenos e bactérias existentes no interior da luz intestinal para a camada submucosa estéril (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Na tentativa de combater esta infiltração bacteriana, células de defesa migram para o interior da parede intestinal, dando origem ao processo inflamatório encontrado na doença. As enzimas citolíticas liberadas a partir das células aliadas a maior produção de RLO decorrentes da resposta inflamatória, alterariam, ainda mais, a permeabilidade seletiva (MILLAR et al., 1996; SHERIDAN et al., 1996; HOFFMAN et al., 2003). Contudo, é difícil demonstrar, nos modelos experimentais de colite quimicamente induzida essa possibilidade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Nenhum modelo experimental adotado para o estudo da RCUI é capaz de reproduzir, com fidelidade, as etapas moleculares iniciais da agressão à mucosa cólica. A maioria deles parte da agressão química ao epitélio mucoso, não levando em conta a possibilidade de que o estresse oxidativo possa estar relacionado aos mecanismos iniciais de agressão epitelial. Nos modelos de colite induzida quimicamente, a lesão é provocada pela infusão de substâncias químicas que destroem as diferentes camadas da parede intestinal (HOFFMANN et al., 2003).

1.6. Colite de Desuso, Estresse Oxidativo e Inflamação

Apesar de serem consideradas entidades distintas, a CD e a RCUI apresentam vários aspectos semelhantes quando se consideram a sintomatologia, aspectos endoscópicos, histológicos e as propostas terapêuticas. O denominador comum de ambas é o intenso processo inflamatório crônico existente na mucosa cólica que se agrava com o passar do tempo. Recentemente, a CD vem sendo considerada como uma síndrome de deficiência nutricional (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1998; THAM; WITHIN; COHEN, 2002; BERRA; MENCK, 2006). Reforçando essa possibilidade, estudos experimentais demonstraram que a interferência no metabolismo normal dos colonócitos, pelo uso dos inibidores da β -oxidação dos AGCC, pode ser um dos eventos iniciais no aparecimento da RCUI e que os RLO se encontram relacionados à colite experimental (AGARWALL; SCHIMMEL, 1989; CHRISTL; DUSEL; EISNER, 1996; LIU, SHIMOYAMA; SUZUKI, 2001). As semelhanças se tornam mais claras ao se constatar que a infusão de agentes antioxidantes e anti-inflamatórios como o ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), sucralfato, n-acetilcisteína, é estratégia terapêutica eficaz no tratamento de ambas as enfermidades (IINO et al., 1990; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1998; BINGHAM, 2002; CALTABIANO et al., 2011). Essas evidências sugerem, no mínimo, a existência de bases etiopatogênicas semelhantes entre CD e RCUI. Contudo, estudos experimentais e em seres humanos geralmente limitam-se à análise qualitativa e quantitativa das alterações histológicas encontradas na CD, ou a eficácia de várias substâncias no tratamento da doença (TRIANAFILLIDIS et al., 1991; TRIPOD; GORCEY; BURAKOFF, 1992; LOPES-PAULO, 2002; CALTABIANO et al., 2011; CUNHA et al., 2011).

Quando se considera que o processo inflamatório se encontra relacionado à etiopatogenia da CD, o emprego de substâncias com eficiente ação anti-inflamatória, tais como os anticorpos anti-citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), talvez pudesse reduzir o processo inflamatório mucoso e melhorar o dano as diferentes camadas que formam a parede intestinal, em particular a mucosa cólica. O uso de anticorpos anti-TNF- α já faz parte da rotina terapêutica dos portadores de DII, sendo seu uso associado a altos índices de cicatrização da mucosa intestinal comprometida. Caso o anticorpo se mostre eficaz no controle da agressão inflamatória, devolvendo a integridade à parede intestinal e reduzindo o infiltrado inflamatório, poderia se tornar uma nova estratégia terapêutica para o tratamento das formas graves de CD. Todavia, o uso de anticorpos anti-TNF- α ainda não foi utilizado em ensaios clínicos ou estudos experimentais de CD. Desse modo, a proposta deste estudo é pioneira.

1.7. O Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)

O TNF- α é uma citocina diretamente envolvida nas reações de fase aguda nos processos de inflamações sistêmicas. Seu principal papel está relacionado à regulação e equilíbrio da ação das células imunes. Desse modo, o desequilíbrio na produção e na quantidade de TNF- α disponíveis no organismo ocasiona uma série de complicações, especialmente influenciando na ocorrência de uma série de doenças humanas, como: artrite reumatóide; artrite psoriática e espondilite anquilosante; doença de Crohn; Doença de Behçet; amiloidose; sarcoidose; escleroderma; poliomiosite; doença de Still do adulto e ciático severo agudo; lúpus; nefrite e artrite lúpica. Estudos experimentais também mostraram que existe aumento nos níveis teciduais de TNF- α na mucosa cólica desprovida do suprimento regular de AGCC (OLIVEIRA et al., 2010; PACHECO et al., 2012).

O TNF- α pode ser produzido por macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos (BRINGHAM, 2002). O principal estímulo para a sua produção é a presença de lipopolissacarídeos que compõem a membrana das bactérias Gram negativas, abundantes no interior da luz do cólon (IIONO et al., 1990). Após ser produzido e liberado, o TNF- α irá ligar-se a receptores específicos denominados de receptores de TNF (TNF-R) I e II, para que possa produzir o seu efeito biológico. Os receptores de TNF (principalmente o TNF-RII) podem, ainda, desencadear o gatilho para a apoptose. Desta forma, o principal efeito fisiológico do TNF- α é promover a resposta imune e a inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los. Para isto, o TNF- α provocará uma série de efeitos no organismo (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1998). O TNF- α , quando liberado em baixas concentrações, age nas células endoteliais promovendo vasodilatação e estimulando-as a secretarem um grupo de citocinas (denominadas quimiocinas) que tem ação quimiotáxica em relação aos leucócitos promovendo, desta forma, um processo inflamatório local que possibilita o combate a quadros infecciosos. No hipotálamo ele age como pirógeno endógeno induzindo febre, enquanto que no fígado vai estimular a produção das proteínas da fase aguda do processo inflamatório e de fibrinogênio.

1.8. Anticorpo Monoclonal Quimérico Anti-TNF- α (Infliximabe)

O infliximabe (Remicade™) é um anticorpo monoclonal quimérico que atua contra o TNF- α . A substância vem sendo utilizada para o tratamento de doenças inflamatórias de origem autoimune. O anticorpo foi originalmente desenvolvido em camundongos como um anticorpo de ratos. Porque os seres humanos têm reações imunológicas a proteínas do rato, os domínios comuns do rato foram substituídos por domínios de anticorpos humanos semelhantes. Eles são anticorpos monoclonais e têm estruturas idênticas e afinidades para o alvo. Por ser uma combinação de sequências de aminoácidos do anticorpo de camundongos e humanos, são chamados de "anticorpos monoclonais quiméricos". O infliximabe é administrado por via endovenosa ou subcutânea tipicamente com intervalo entre as doses de seis a oito semanas. O infliximabe funciona através da sua ligação ao TNF- α . O TNF- α é um mensageiro químico (citocinas) e parte fundamental da reação autoimune habitualmente encontradas nas DII. O anticorpo também parece agir impedindo o TNF- α de se ligar ao seu receptor na célula.

A terapia utilizando o anti-TNF- α representa, no momento, a estratégia terapêutica de última geração para o tratamento das DII. Dentre os vários anticorpos monoclonais existentes, o infliximabe é o anticorpo mais estudado e disponível comercialmente desde outubro de 1998. Sua eficácia vem sendo comprovada por trabalhos científicos de diversas instituições. A dose preconizada varia entre 5 mg/kg a 10 mg/kg em infusão endovenosa e o efeito terapêutico geralmente se mostra ainda dentro da primeira semana de administração. Nos casos de DII com manifestações cutâneas como as fístulas, devem-se repetir infusões após duas e seis semanas. A remissão ou melhora do quadro, via de regra, perdura por 10 a 12 semanas, quando, então, existe necessidade de nova infusão do produto. Os estudos de segurança da droga mostraram que, em curto prazo, a incidência de efeitos adversos é relativamente pequena, mas, em longo prazo, é preciso atenção especial quanto à possibilidade de infecções, principalmente naqueles doentes em uso de imunossupressores associados e que tenham necessidade de uso contínuo ou eventual de corticoides. Estudos indicaram que o infliximabe foi seguro e benéfico para os pacientes com RCUI, tendo sido superior ao placebo na indução e na manutenção da resposta e remissão clínica e da cicatrização da mucosa. Uma proporção significativamente maior de pacientes tratados com infliximabe conseguiu remissão, tendo a droga sido geralmente bem tolerada com perfil de segurança consistente com os estudos prévios e custo-efetiva (CROSS, 2017; STAWOWCZYK, KAWALEC, 2017).

Do melhor do nosso conhecimento, o uso de anticorpos anti-TNF- α ainda não foi utilizado em doentes ou modelos experimentais de CD. Como a substância é considerada nos dias de hoje o tratamento de eleição para os portadores de colite ulcerativa é possível que a droga possa ser útil para o tratamento dos doentes que cursam com as formas graves da CD.

2. OBJETIVOS

1. Verificar se a administração de anticorpos monoclonais anti-TNF- α melhora as alterações estruturais encontradas no epitélio cólico desprovido de trânsito fecal;
2. Verificar se a administração de anticorpos monoclonais anti-TNF- α melhora as alterações inflamatórias na mucosa cólica desprovida de trânsito fecal;
3. Verificar se a administração de anticorpos monoclonais anti-TNF- α reduz o infiltrado neutrofílico na mucosa cólica desprovida de trânsito fecal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A realização deste estudo obedeceu à Lei Federal 6.638 e às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa da Universidade São Francisco, através do número 0102262014 (Anexo A).

3.1. Animal de experimentação

Foram utilizados 22 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, provenientes da ANILAB (Animais de Laboratório Criação e Comércio, Laboratórios Veterinários) com peso variando entre 250 e 300 g e média de idade de quatro meses.

3.2. Técnica cirúrgica

Nos sete dias antecedentes a operação, os animais foram confinados em gaiolas individuais recebendo ração específica para roedores e água a vontade. A partir do dia anterior a operação os animais foram mantidos em jejum, exceto água, por 12 horas.

No dia da intervenção os ratos foram anestesiados com o emprego do cloridrato de cetamina, na dose de 5 mg/kg, associado ao sedativo analgésico e relaxante muscular cloridrato de xilazina, na dose de 60 mg/kg, administradas por via intramuscular na pata traseira direita.

A cavidade abdominal foi acessada por meio de incisão longitudinal mediana, infra-umbilical com quatro centímetros de extensão. A abertura da cavidade abdominal foi efetuada por planos, identificando-se a porção retossigmoideana do intestino grosso. Após a localização da placa de Peyer e mobilização do conteúdo fecal, foi feita a secção do cólon 8 cm acima da extremidade proximal da placa. Após secção do cólon, em todos os animais foi realizada remoção de segmento de intestino grosso com 2 cm de extensão, que serviu como controle dos parâmetros estudados.

O segmento distal do intestino grosso seccionado foi cateterizado com sonda de polivinil 10F fixada por meio de ligadura frouxa e irrigado com 40 ml de soro fisiológico 0,9% para promover a remoção de resíduos fecais do segmento distal, até que o efluente fecal drenado pelo ânus do animal estivesse claro. Esta etapa visava remover detritos fecais que por ventura tenham remanescido após a mobilização manual e que poderiam influenciar no desenvolvimento da CD.

Terminada a irrigação, o segmento caudal intestinal remanescente distal foi sepultado. O cólon proximal (provido de trânsito fecal) seccionado foi exteriorizado através de um segundo estoma no hipocôndrio esquerdo. Após a fixação da colostomia e revisão da cavidade abdominal, a parede abdominal foi fechada em dois planos de sutura. Após a recuperação anestésica os animais foram liberados para ingestão de água e, após seis horas, ração padronizada (Nuvilab CR1™ Nuvital Nutrientes AS, Brasil).

Aguardou-se 12 semanas depois do procedimento cirúrgico, para que se produzisse a CD no cólon desprovido de trânsito em todos os ratos, tempo mais que suficiente para desenvolver a doença.

Após randomização, os animais foram divididos em três grupos experimentais segundo a intervenção ser realizada com: A – solução fisiológica 0,9% (controle), B – Infiximabe na dose de 5 mg/kg/semana e C – infliximabe na dose de 10 mg/kg/semana.

Todos os animais foram submetidos à administração das soluções de intervenção por via subcutânea na região dorsal, na prega cutânea cervical uma vez por semana durante cinco semanas consecutivas.

3.3. Grupos experimentais

Todos os animais foram sacrificados cinco semanas após a intervenção com as soluções;

- **Grupo 1** - Intervenção com Solução Fisiológica (Controle) (6 animais)
- **Grupo 2** - Intervenção com infliximabe na dose de 5 mg/kg/semana (Experimento 1) (8 animais)
- **Grupo 3** - Intervenção com infliximabe na dose de 10 mg/kg/semana (Experimento 2) (8 animais)

Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais por 12 semanas até a data do sacrifício onde permaneceram em ambiente climatizado e com controle de umidade, temperatura e luminosidade sem restrição hídrica ou alimentar. Foi administrada dose de 20 mg/kg/dia de dipirona misturada na água do bebedouro (CARBON; AUSTIN, 2016). Os animais foram pesados semanalmente e nenhum cuidado adicional foi tomado em relação ao estoma confeccionado. Na véspera do dia programado para o sacrifício todos os animais foram novamente mantidos em jejum de 12 horas, exceto para água.

3.4. Eutanásia dos animais

Concluída as 5 semanas de intervenção com as substâncias propostas, todos os roedores foram novamente anestesiados com a mesma metodologia anteriormente descrita para a retirada dos segmentos cólicos a serem estudados.

Após a anestesia, a incisão mediana anterior foi reaberta e por ela foram removidos os segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito fecal. Os segmentos cólicos foram abertos longitudinalmente pela borda anti-mesocólica sendo subdivididos em três segmentos sempre 1 cm a partir do ponto de fixação do estoma no peritônio parietal. Os segmentos cólicos com três centímetros de extensão (um do cólon provido outro do desprovido de trânsito) foram enviados para os estudos histológicos e imuno-histoquímico.

Concluída a exérese dos espécimes cirúrgicos, os animais foram submetidos à eutanásia por injeção intra-cardíaca de dose única e letal de tiopental (120 mg/kg). A morte do animal foi constatada pela ausência de reflexos córneo-palpebral e de batimentos cardíacos por 5 minutos.

3.5. Histologia

Os espécimes extirpados destinados ao estudo histológico permaneceram fixados em formalaldeído a 10% por 72 horas e posteriormente foram desidratados em sucessivas concentrações crescentes de álcool. Terminado o processo, foi realizada a clarificação dos espécimes em xileno. A seguir o material foi incluído em blocos de parafina e submetido a cortes longitudinais, com 4 μ de espessura para montagem das lâminas.

Após montagem, as lâminas foram posteriormente coradas pelas técnicas da hematoxilina-eosina (para análise das alterações histológicas dos espécimes) e imuno-histoquímica para avaliação da expressão tecidual da mieloperoxidase (MPO) que traduz o grau de infiltração neutrofilica.

A análise de cada lâmina foi feita em microscópio óptico comum com aumento final de 200x. Os parâmetros histológicos foram analisados qualitativamente e quantitativamente (morfometria computadorizada) por patologista experiente em enfermidades do trato digestivo sem conhecimento com relação ao grupo experimental analisado. Foram analisados os seguintes parâmetros histológicos principais: grau de atrofia epitelial, grau de perda epitelial,

número de células caliciformes presentes nas glândulas cólicas, presença de abscessos em criptas cólicas e grau de infiltrado inflamatório nas camadas mucosa e submucosa.

A quantificação da expressão tecidual de MPO foi mensurada por morfometria computadorizada em três campos em que existam pelo menos três criptas íntegras em toda sua extensão.

3.6. Morfometria computadorizada

A leitura das lâminas nos segmentos com e sem trânsito intestinal foram sempre realizadas em local onde existiam pelo menos três criptas contíguas íntegras. A imagem selecionada foi capturada por câmera de vídeo previamente acoplada a microscópio óptico (Eclipse DS50[®] - Nikon Inc., Japan). A imagem capturada foi processada e analisada pelo programa NIS-Elements[®] (Nikon Inc., Japan) instalado em um computador (Pentium[®] 4 DC, 1 Gbyte Memória RAM, 2 HD de 200Gbyte, placa de vídeo-captura ASUS[®]). O conteúdo tecidual de MPO foi mensurado por morfometria computadorizada. Para medida do conteúdo tecidual de MPO utilizou-se microscópio óptico comum, com magnificação final de 200 vezes. Considerou-se como reação positiva à coloração acastanhada que identificava a presença da MPO nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. O programa de análise de imagens, através de histogramas de cor determinava a intensidade de cor de cada área selecionada para a mensuração (neutrófilos marcados pelo anticorpo anti-MPO), transformando a cor escolhida (acastanhada) em expressão numérica porcentual para cada campo de visão selecionado. O valor final adotado para cada campo mensurado nos segmentos provido e desprovido de trânsito intestinal foi representado pela média dos valores encontrados na avaliação de três campos diferentes. Classificou-se o conteúdo tecidual de MPO (infiltrado neutrofílico) segundo a porcentagem de neutrófilos corados por campo histológico (%/campo).

3.7. Técnica imuno-histoquímica para mieloperoxidase

Para realização do ensaio imuno-histoquímico para pesquisa da enzima MPO nos animais do grupo controle e naqueles tratados com infliximabe na dose de 5 mg/kg/sem e 10 mg/kg/sem utilizou-se como anticorpo primário anti-MPO (Dako Cytomation[®], Copenhagen, Dinamarca).

A técnica para realização do estudo imuno-histoquímico do presente trabalho baseou-se em procedimento padronizado no laboratório de investigação médica da Universidade São Francisco e anteriormente publicados (MARTINEZ et al., 2015).

Conforme orientação do fabricante do anticorpo primário, o controle positivo foi realizado em espécimes de apêndice vermiforme humano com apendicite aguda, que devido a grande presença de infiltração neutrofílica, apresentam alta positividade para a imunocoloração tecidual.

O controle negativo foi realizado no mesmo material, sem, contudo, adicionar-se o anticorpo primário anti-MPO (MARTINEZ et al., 2015).

3.8. Escore Inflamatório

No estudo histológico foram consideradas as seguintes alterações histológicas: grau de atrofia epitelial, grau de perda epitelial, número de células caliciformes presentes nas glândulas cólicas, presença de abscessos em criptas cólicas e grau de infiltrado inflamatório nas camadas mucosa e submucosa. Para cada uma dessas variáveis foram atribuídas, em cruzes, as seguintes pontuações: 0 = ausente; + = leve; ++ = moderada; +++ intensa; ++++ muito intensa. A análise de cada uma dessas variáveis foi sempre realizada em três campos histológicos distintos.

O escore inflamatório de cada animal foi obtido pela soma simples do valor médio encontrado após análise de cada uma dessas variáveis (grau de atrofia epitelial, grau de perda epitelial, número de células caliciformes presentes nas glândulas cólicas, presença de abscessos em criptas cólicas e grau de infiltrado inflamatório nas camadas mucosa e submucosa). O escore inflamatório foi calculado em cada um dos animais, em cada segmento cólico (com e sem trânsito intestinal) e para cada um dos grupos experimentais (SF 0,9%, infliximabe 5mg/kg/sem e 10mg/kg/sem).

3.9. Análise Estatística

Para o cálculo dos valores encontrados após as medidas de cada variável em cada segmento cólico (com e sem trânsito fecal) e em cada grupo experimental (SF 0,9%, infliximabe 5mg/kg/sem e infliximabe 10mg/kg/sem) utilizou-se estatística descritiva e os resultados foram expressos pelo valor médio e respectivo erro padrão. Para avaliação do padrão de distribuição amostral utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a análise de

todas as variáveis utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados significantes obtidos quando se comparou de forma pareada os valores obtidos nos cólons com e sem trânsito fecal foram marcados com um asterisco (*) quando o valor de p era menor que 5% ($p < 0,05$) e com dois asteriscos (**) quando menor que 1% ($p < 0,01$). Os resultados significantes obtidos quando se comparou de forma pareada os valores obtidos nos animais submetidos a intervenção com SF 0,9%, infliximabe 5mg/kg/sem e infliximabe 10mg/kg/sem, dentro de um mesmo segmento cólico (com ou sem trânsito intestinal) foram marcados com uma cruz (†) quando o valor de p era menor que 5% ($p < 0,05$) e com duas cruces (††) quando menor do que 1% ($p < 0,01$).

4. RESULTADOS

A figura 1A mostra os segmentos do cólon proximal nos animais submetidos a intervenção com soro fisiológico (SF).

A figura 1B e 1C mostram segmentos do cólon provido de trânsito intestinal nos animais submetidos a intervenção com infliximabe nas doses de 5 e 10 mg/kg/sem, respectivamente.

A figura 1D mostra segmento do cólon desprovido de trânsito intestinal nos animais submetidos a intervenção com SF, enquanto as figuras 1E e 1F, mostram segmentos sem trânsito fecal, dos animais submetidos a intervenção com infliximabe nas dosagens de 5 e 10 mg/kg/sem, respectivamente.

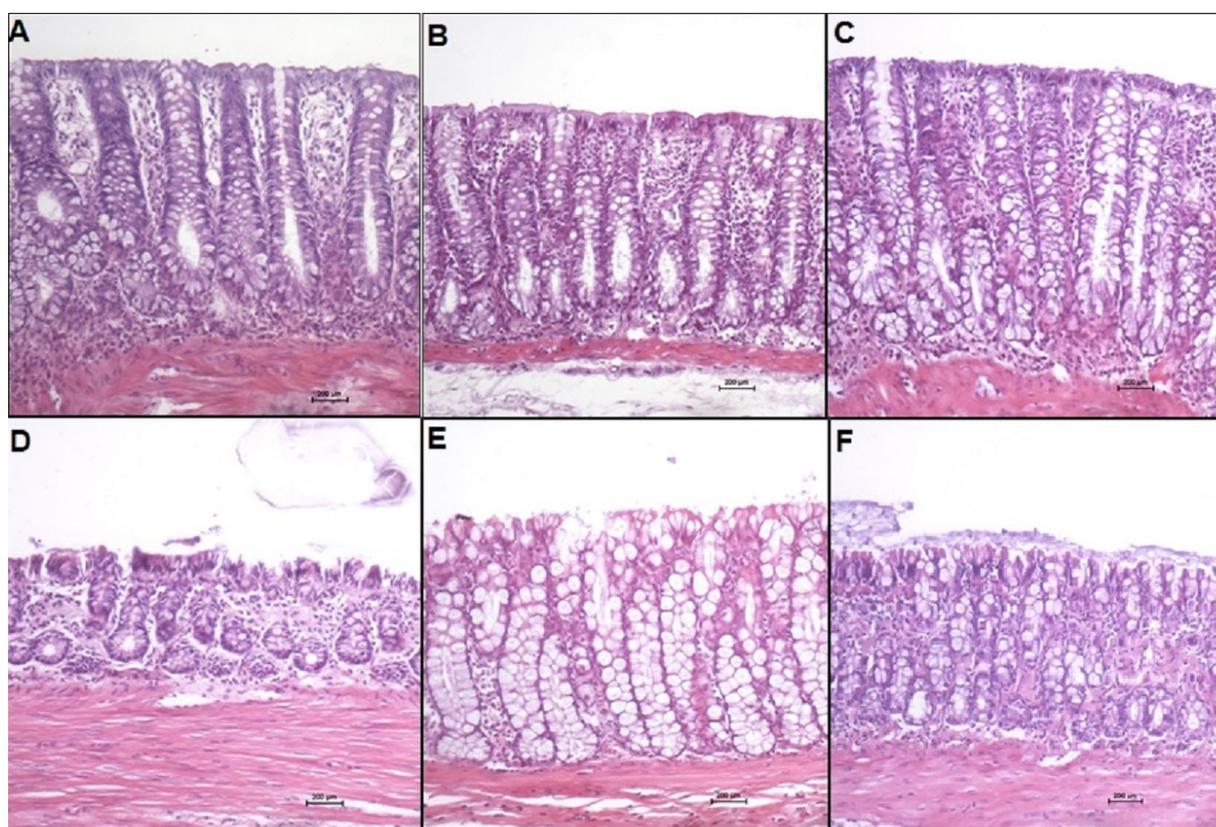


FIGURA 1. (A) Cólon proximal após intervenção com SF; (B) Cólon proximal após intervenção com infliximabe 5 mg/kg/sem; (C) Cólon proximal após intervenção com infliximabe 10 mg/kg/sem; (D) Cólon distal após intervenção com SF; (E) Cólon distal após intervenção com infliximabe 5 mg/kg/sem; (F) Cólon distal após intervenção com infliximabe 10 mg/kg/sem. (HE 200x)

4.1. Avaliação das Variáveis Histológicas

4.1.1. Atrofia Epitelial

O grau de atrofia epitelial foi avaliado nos segmentos cólicos providos (cólón proximal) e desprovidos de trânsito intestinal (cólón distal), onde observou-se uma redução da atrofia epitelial no cólón distal dos animais tratados com a maior dose de infliximabe (10 mg/kg/sem) quando comparado ao grupo submetido a intervenção com SF 0,9%. Porém, o mesmo não foi observado na menor dose e também ao avaliarmos o cólón proximal, apenas um aumento da atrofia quando comparado o cólón distal ao proximal (Figura 2).

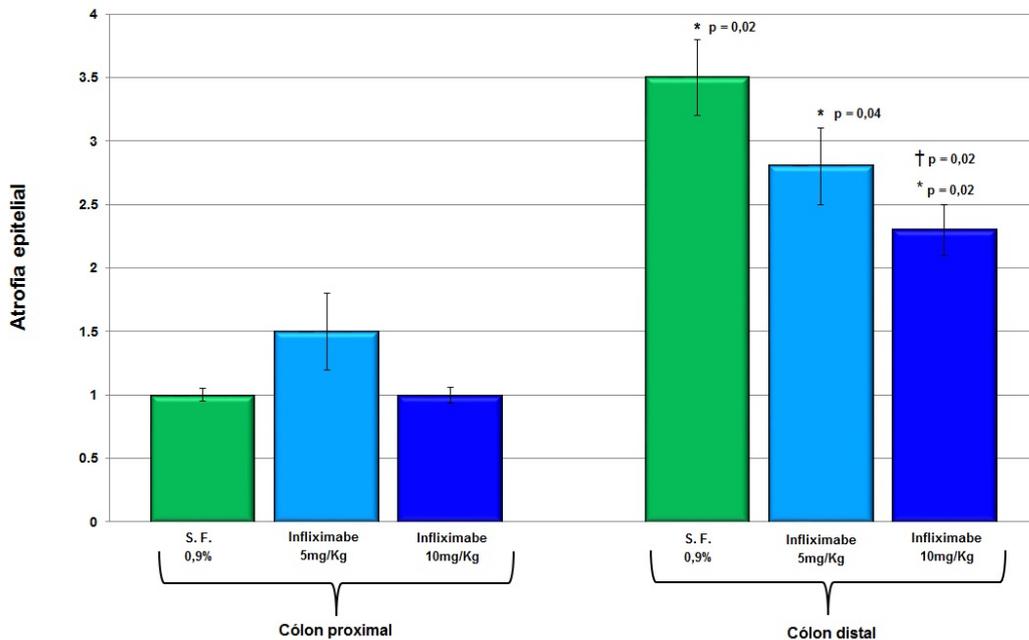


FIGURA 2. Atrofia epitelial nos cólons providos e desprovidos de trânsito intestinal. Observa-se, em média, com o respectivo erro padrão, o grau de atrofia epitelial nos segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito intestinal, nos animais tratados com SF 0,9%, infliximabe 5mg/kg/sem e infliximabe 10mg/kg/sem. * = $p < 0,05$ (SF distal > SF Proximal; Infliximabe 5mg/kg/sem distal > Infliximabe 10 mg/kg/sem proximal; Infliximabe 10mg/kg/dia distal > Infliximabe 10 mg/kg/sem proximal). † = $p < 0,05$ Infliximabe 10mg/kg/sem distal < SF distal). Teste de Mann-Whitney.

4.1.2. Perda Epitelial

Ao avaliarmos a intensidade de perda epitelial, observa-se uma redução dessa perda no cólon distal dos grupos tratados com infliximabe em ambas as doses, quando comparados ao grupo SF 0,9%. O mesmo não foi observado no cólon proximal (Figura 3).

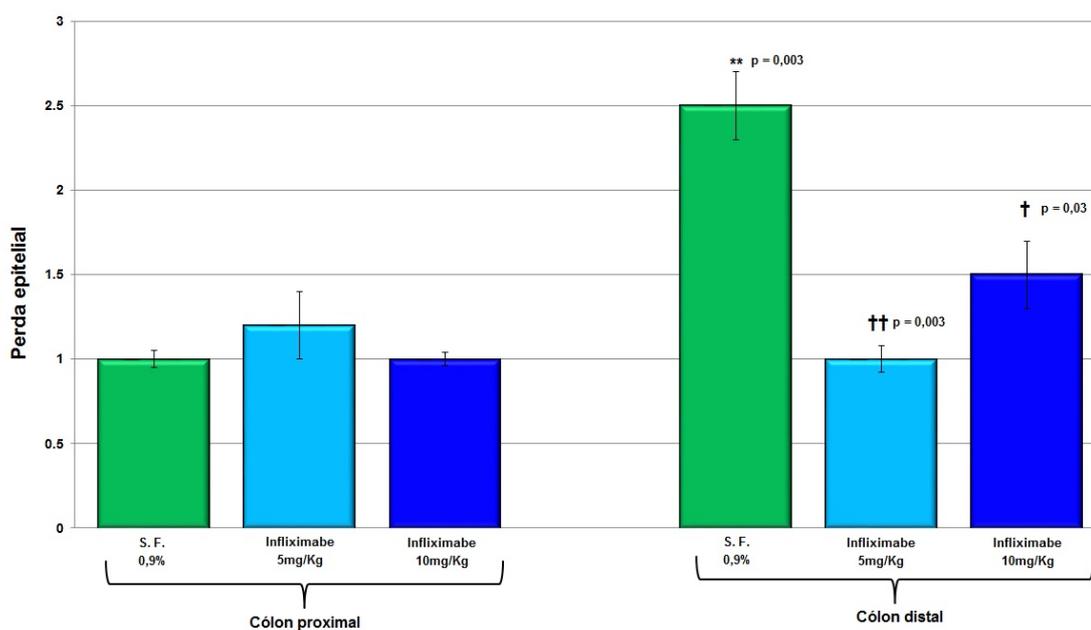


FIGURA 3. Perda epitelial nos cólons providos e desprovidos de trânsito intestinal. Observa-se, em média, com o respectivo erro padrão, o grau de perda epitelial nos segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito intestinal, nos animais tratados com SF 0,9%, infliximabe 5mg/kg/sem e infliximabe 10mg/kg/sem. ** = $p < 0,01$ (SF distal > SF Proximal). † = $p < 0,05$ Infliximabe 10mg/kg/sem distal < SF distal). †† = $p < 0,01$ (Infliximabe 5mg/kg/sem distal < SF distal). Teste de Mann-Whitney.

4.1.3. Abscessos de Criptas

A presença de abscessos no interior das criptas cólicas também foi avaliada, mostrando uma menor quantidade de abscessos crípticos no cólon distal dos animais que foram tratados com ambas as doses de infliximabe (5 e 10 mg/kg/sem), quando comparado ao grupo que recebeu intervenção de SF 0,9%. Já no colón proximal, não houve alteração da presença de abscessos de criptas (Figura 4).

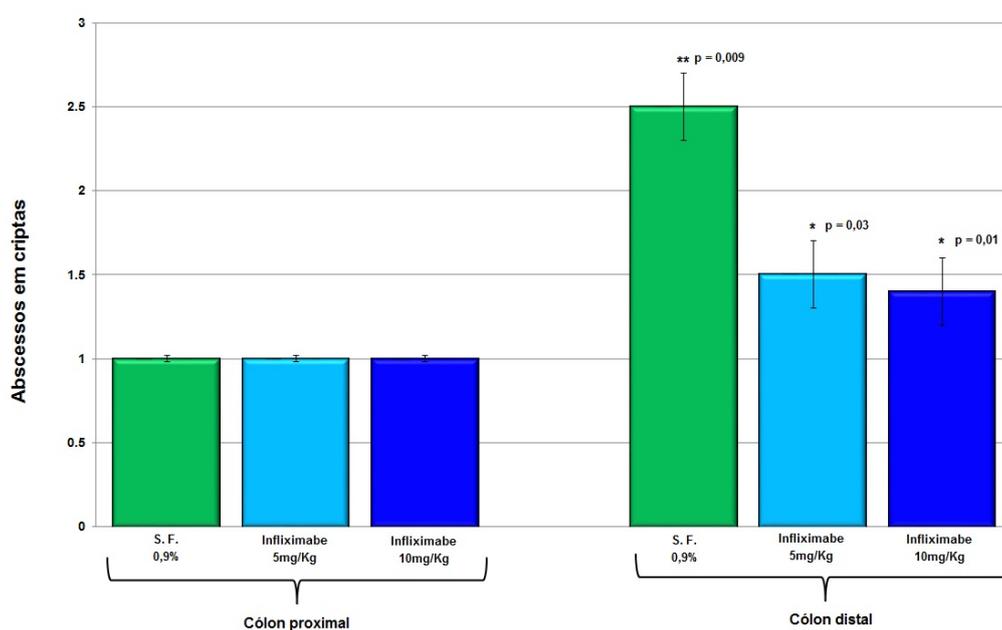


FIGURA 4. Abscesso de cripta nos cólons providos e desprovidos de trânsito intestinal. Observe, em média, com o respectivo erro padrão, a intensidade da presença de abscessos em criptas cólicas nos segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito intestinal, nos animais tratados com SF 0,9%, infliximabe 5mg/kg/sem e infliximabe 10mg/kg/sem. ** = $p < 0,01$ (SF distal > SF Proximal). † = $p < 0,05$ Infliximabe 5mg/kg/sem distal < SF distal; Infliximabe 10mg/kg/sem distal < SF distal). Teste de Mann-Whitney.

4.1.4. Infiltrado Inflamatório

O infiltrado inflamatório foi avaliado, e considerando-se apenas o estudo histológico, observou-se uma redução significativa do infiltrado no cólon distal dos grupos tratados com infliximabe quando comparados ao grupo SF 0,9%, enquanto que não houveram modificações desse infiltrado no cólon proximal (Figura 5).

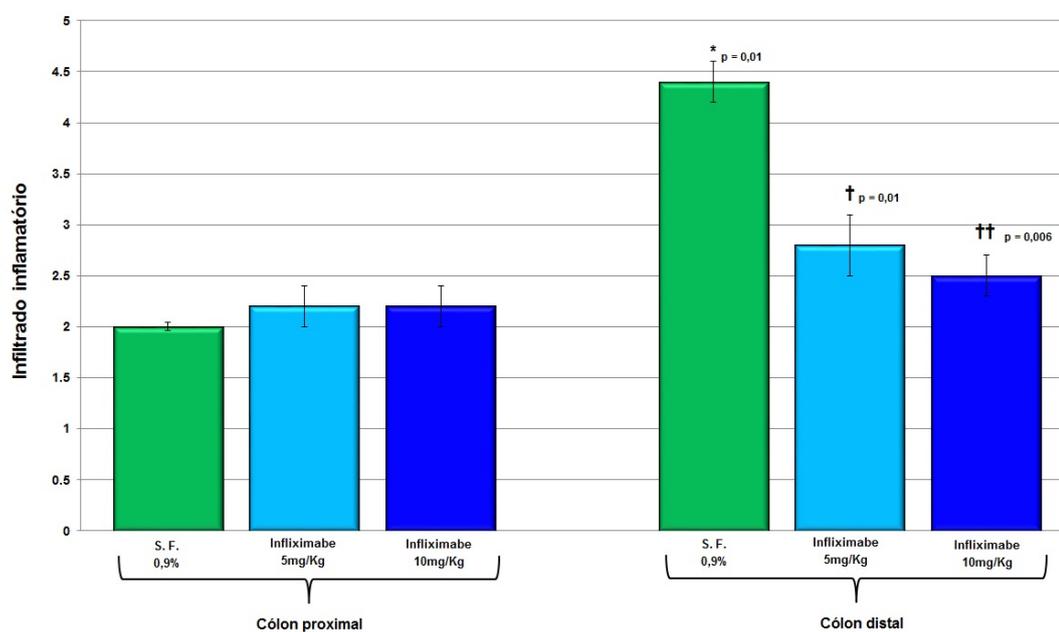


FIGURA 5. Infiltrado inflamatório nos cólons providos e desprovidos de trânsito intestinal. Observa-se, em média, com o respectivo erro padrão, o grau de infiltrado inflamatório na mucosa cólica nos segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito intestinal, nos animais tratados com SF 0,9%, infliximabe 5mg/kg/sem e infliximabe 10mg/kg/sem. * = $p < 0,05$ (SF distal > SF Proximal). † = $p < 0,05$ Infliximabe 5mg/kg/sem distal < SF distal). †† = $p < 0,01$ (Infliximabe 10mg/kg/sem distal < SF distal). Teste de Mann-Whitney.

4.1.5. Células Caliciformes

O número de células caliciformes está aumentado nos segmentos cólicos exclusivos de trânsito fecal (cólon distal) dos animais tratados com SF 0,9%, quando comparado aos grupos tratados com infliximabe, onde observa-se uma redução significativa da população dessas células. O tratamento com 10 mg/kg/sem de infliximabe mostrou uma redução mais evidente de células caliciformes (Figura 6).

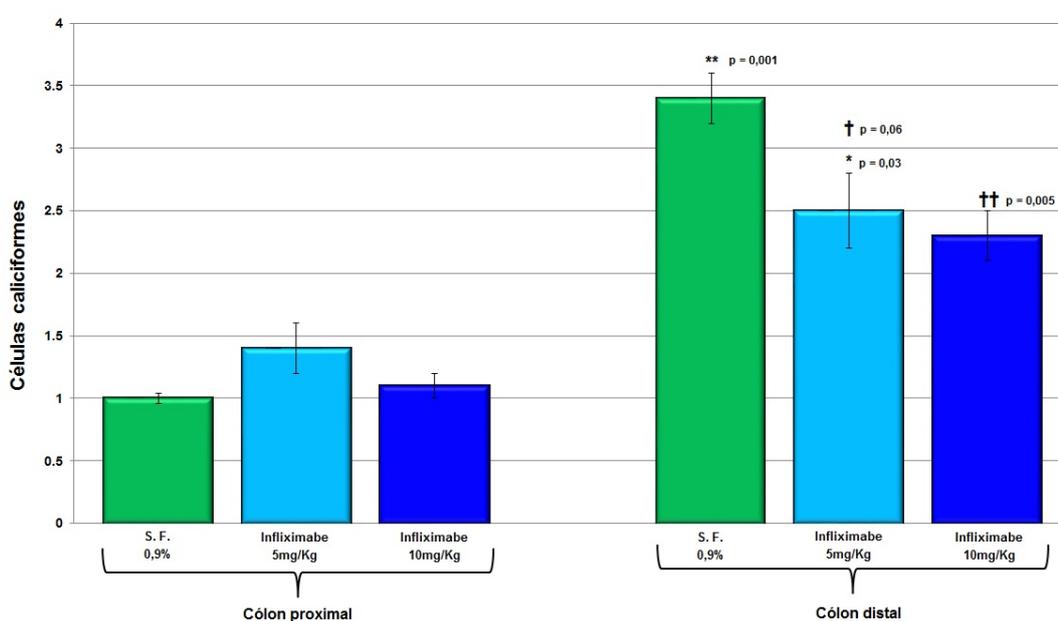


FIGURA 6. Células caliciformes. Observa-se, em média, com o respectivo erro padrão, o número de células caliciformes nas criptas cólicas nos segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito intestinal, nos animais tratados com SF 0,9%, infliximabe 5mg/kg/sem e infliximabe 10mg/kg/sem. ** = $p < 0,01$ (SF distal > SF Proximal). † = $p < 0,05$ (Infliximabe 5mg/kg/sem distal < SF distal). †† = $p < 0,01$ (Infliximabe 10mg/kg/sem distal < SF distal).

4.2. Escore Inflamatório

Para o escore inflamatório, todas as variáveis histológicas foram consideradas. Os animais tratados com ambas as doses de infliximabe, 5 e 10 mg/kg/sem, apresentaram redução do escore inflamatório no cólon distal quando comparados ao grupo SF 0,9% (Figura 7).

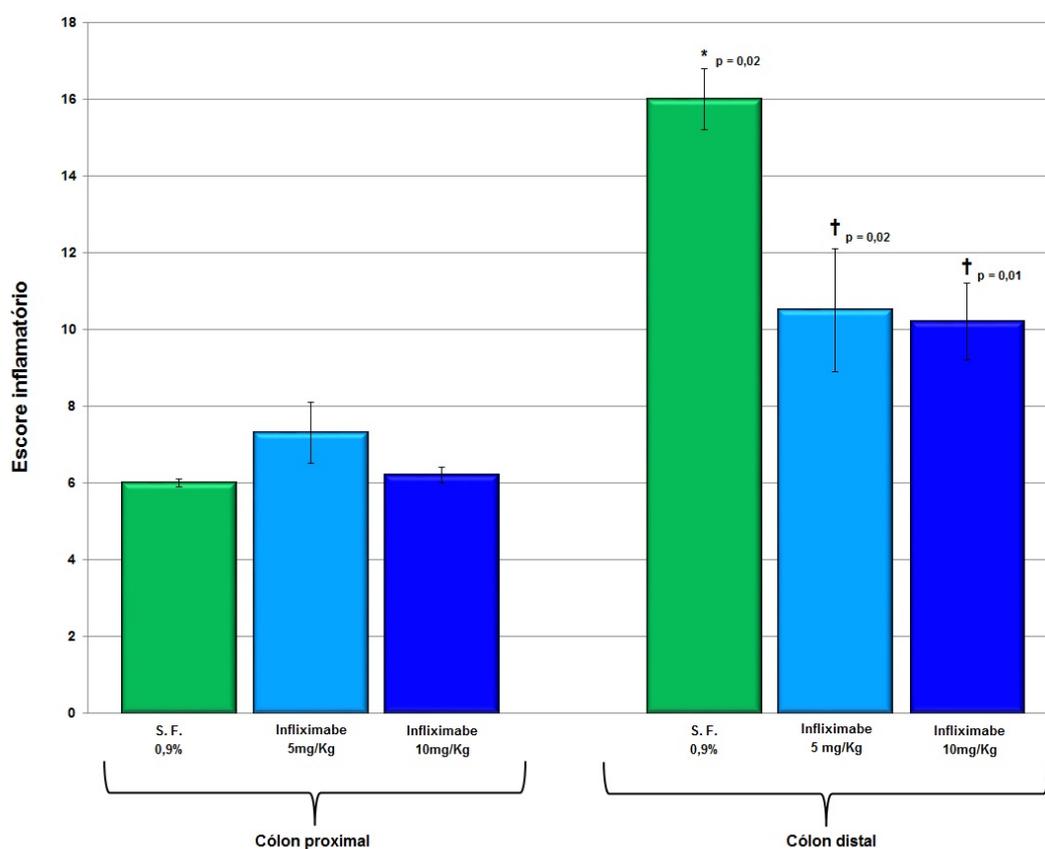


FIGURA 7. Escore inflamatório nos cólons providos e desprovidos de trânsito intestinal. Observa-se, em média, com o respectivo erro padrão, o escore inflamatório nos segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito intestinal, nos animais tratados com SF 0,9%, infliximabe 5mg/kg/sem e infliximabe 10mg/kg/sem. * = $p < 0,05$ (SF distal > SF Proximal). † = $p < 0,05$ Infliximabe 5mg/kg/sem distal < SF distal; Infliximabe 10mg/kg/sem distal < SF distal). Teste de Mann-Whitney.

4.3. Avaliação Imuno-histoquímica (Mieloperoxidase)

A figura 8A mostra os segmentos do cólon proximal nos animais submetidos a intervenção com soro fisiológico.

A figura 8B e 8C mostram segmentos do cólon provido de trânsito intestinal nos animais submetidos a intervenção com infliximabe nas doses de 5 e 10 mg/kg/sem, respectivamente.

A figura 8D mostra segmento do cólon desprovido de trânsito intestinal nos animais submetidos a intervenção com soro fisiológico, enquanto as figuras 8E e 8F, mostram segmentos sem trânsito fecal, dos animais submetidos a intervenção com Infliximabe nas dosagens de 5 e 10 mg/kg/sem, respectivamente.

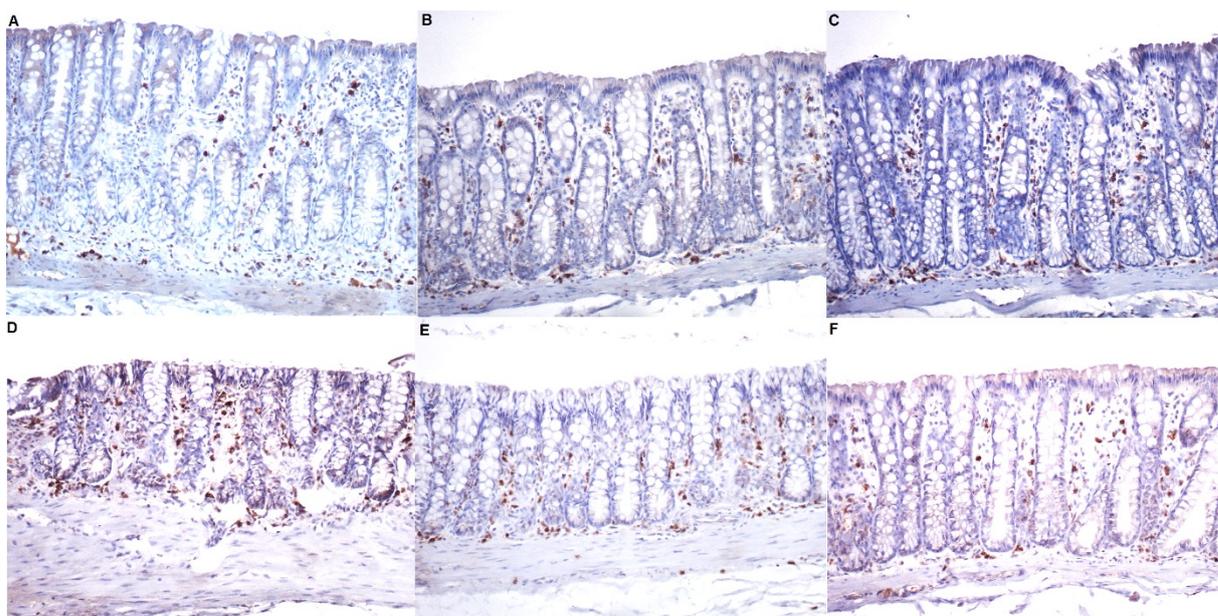


FIGURA 8. Imuno-histoquímica – Mieloperoxidase. (A) MPO cólon proximal após intervenção com SF (B) MPO cólon proximal após intervenção com Infliximabe 5 mg/kg/sem (C) MPO cólon proximal após intervenção com Infliximabe 10 mg/kg/sem (D) MPO cólon distal após intervenção com SF (E) MPO cólon distal após intervenção com Infliximabe 5 mg/kg/sem (F) MPO cólon distal após intervenção com Infliximabe 10 mg/kg/sem.

Quando avaliado o conteúdo tecidual de MPO, observou-se um aumento do infiltrado neutrofílico no cólon distal do grupo SF 0,9%, mas o tratamento com ambas as doses de infliximabe foi capaz de reverter esse quadro, mostrando uma redução do infiltrado (Figura 9).

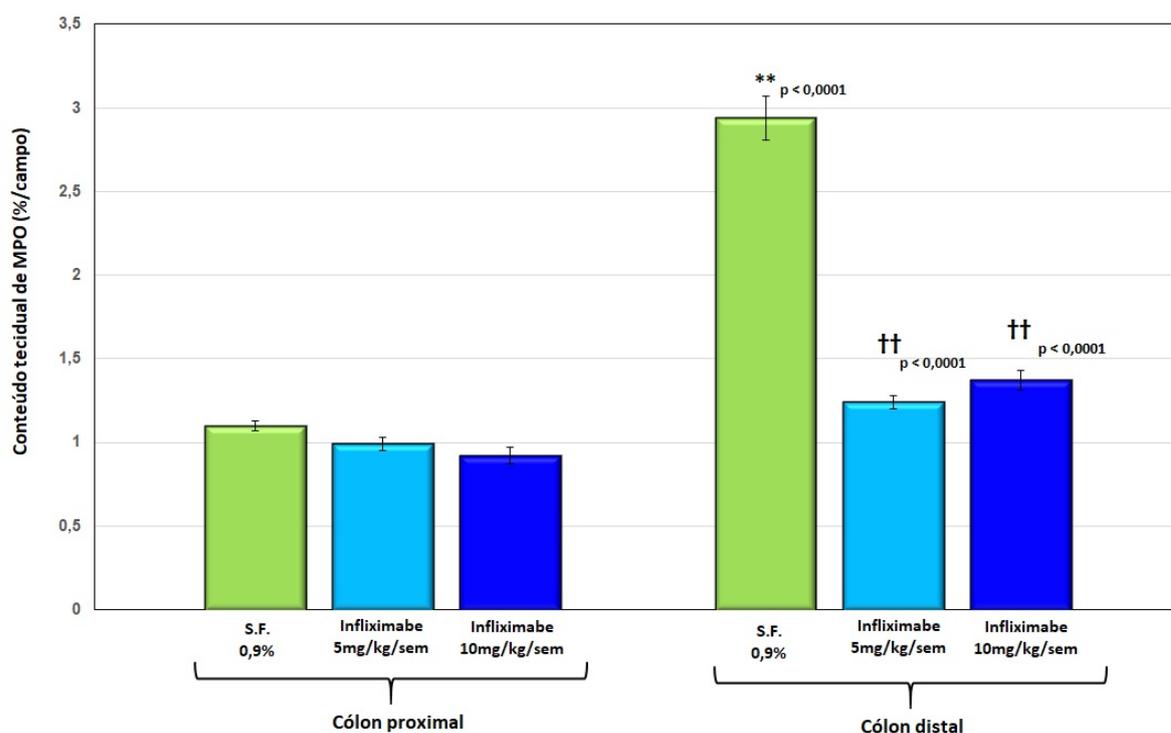


FIGURA 9. Concentração tecidual da MPO nos cólons providos e desprovidos de trânsito intestinal. Observa-se a concentração tecidual da MPO nos cólons providos e desprovidos de trânsito intestinal nos animais tratados com SF 0,9% infliximabe 5mg/kg/sem e infliximabe 10 mg/kg/semana. ** = $p < 0,01$ (SF distal > SF Proximal). †† = $p < 0,01$ (Infliximabe 5mg/kg/sem distal < SF distal; Infliximabe 10mg/kg/sem distal < SF distal). Teste de Mann-Whitney.

5. DISCUSSÃO

O correto tratamento da CD torna-se relevante quando se considera que muitos doentes submetidos a operações de derivação intestinal, necessitam manter o estoma por longos períodos de tempo e que alguns destes pacientes nunca terão seu trânsito intestinal restabelecido (SZCZEPKOWSKI et al., 2014). Estudo avaliando 162 doentes submetidos a intervenções para o tratamento do câncer de reto mostrou que não foi possível realizar-se o fechamento do estoma em 14,5%, condenando a maioria deles, a conviverem não só com a presença do estoma, mas com os limitantes sintomas CD pelo resto de suas vidas (CHIU et al., 2014).

A CD apresenta curso clínico variado. Boa parte dos doentes permanecerá pouco sintomática por um longo período da vida, porém, a maior parte deles, com o passar dos anos vai apresentar os sintomas da doença com intensidade variada (SOUSA et al., 2008; NONOSE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010). Os doentes que evoluem com as formas leves e moderadas da CD geralmente queixam-se de hematoquezia, eliminação de muco fétido pelo ânus, dor abdominal e febre (SOUSA et al., 2008). Já os doentes que evoluem com as formas graves da CD desenvolvem ulcerações superficiais e profundas na mucosa do cólon excluso, infiltrado fibrino-purulento na superfície mucosa, abscessos perianais e fístulas. Essas condições além de agravarem os sintomas tornam o diagnóstico diferencial com as formas mais graves das DII um grande desafio, mesmo após análise de médicos patologistas com experiência em DII (MARTINEZ et al., 2010).

Não obstante, o restabelecimento do trânsito fecal ser a estratégia mais lógica e eficaz para o tratamento da CD nos enfermos com as formas mais graves da doença, torna-se um procedimento de risco, pois o cirurgião terá que realizar uma anastomose cirúrgica num segmento intestinal inflamado e, portanto, com maior risco de complicações da anastomose (HABR-GAMA et al., 1997). O maior risco de complicações tornando o restabelecimento do trânsito intestinal um procedimento de risco não desprezível, aliado à necessidade de convivência com os sintomas limitantes da CD, impactam negativamente na qualidade de vida de pacientes que já convivem com as limitações na qualidade de vida impostas pela presença do estoma (PACHECO et al., 2012).

Diferentes teorias foram propostas para explicar a etiopatogenia da CD. Desde o trabalho pioneiro de Harig et al. (1989), a CD vem sendo considerada uma síndrome de deficiência energética atribuída a falta no suprimento de AGCC decorrente da derivação fecal. Os autores, estudando quatro doentes, mostraram que a aplicação de clisteres contendo AGCC duas vezes ao dia, por quatro a seis semanas, nos segmentos sem trânsito intestinal

de doentes submetidos à derivação intestinal, foi capaz de reverter os sintomas e as alterações histológicas por um período sustentado de até 14 meses (HARIG et al., 1989). A partir desses resultados os autores propuseram que a CD poderia representar um estado inflamatório crônico resultante de uma deficiência nutricional do epitélio cólico, que poderia ser revertida pela aplicação tópica de AGCC. Depois deste estudo pioneiro, uma série de autores confirmaram, clínica e experimentalmente, a eficácia do tratamento da CD por meio da aplicação de clisteres contendo AGCC. (AGARWAL; SCHIMMEL, 1989; ROEDIGER, 1990; GUILLEMOT et al., 1991; HAQUE; WEST, 1992; NEUT et al., 1995; MORTENSEN; CLAUSEN, 1996; SCHEPPACH et al., 1997; VELÁZQUEZ; LEDERER; ROMBEAU, 1997; COOK; SELLIN; 1998; EDWARDS; GEORGE; WARREN, 1999; OLIVEIRA-NETO; AGUILAR-NASCIMENTO, 2004; NASRRI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; PACHECO et al., 2012; KABIR et al., 2014; LUCERI et al., 2016). Todavia, uma das principais limitações do tratamento da CD através da aplicação de clisteres ou supositórios contendo AGCC se deve à falta de aderência dos doentes ao tratamento. Os enfermos queixam-se do forte odor exalado pelo ácido butírico, componente das soluções nutricionais ricas em AGCC, que se impregna nas mãos dos pacientes tornando extremamente desagradável a manipulação da substância (LAMEIRO et al., 2011). Os doentes queixam-se de que apesar da higiene constante e vigorosa das mãos e do períneo o forte odor fecal é difícil de ser eliminado.

Com o objetivo de corrigir o processo inflamatório mucoso sem os inconvenientes do uso de soluções de AGCC, outras estratégias terapêuticas foram propostas para o tratamento da CD. Estudos clínicos mostraram que a aplicação de enemas com ácido 5-ASA (mesalazina) é uma estratégia terapêutica eficaz para o tratamento da doença (TRANTAFILLIDIS et al., 1991; TRIPODI; GORCEY; BURAKOFF, 1992; KOMINAMI et al., 2013; MATSUMOTO; MASHIMA, 2016). A maioria desses estudos atribui a eficácia da droga às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. O uso de antioxidantes para o tratamento da CD baseia-se em evidências clínicas e experimentais mostrando que a falta do suprimento regular de AGCC à mucosa cólica, modifica o metabolismo energético das células do epitélio cólico excluído de trânsito, que passam a produzir maiores quantidades de RLO (PRAVDA, 2005; MARTINEZ et al., 2010). Esses radicais livres apresentam alta toxicidade aos diferentes mecanismos de defesa que compõem a barreira epitelial cólica (MARTINEZ et al., 2010; CALTABIANO, et al., 2011; KADRI et al., 2013). A maior produção de RLO aliada à reconhecida deficiência dos sistemas antioxidantes presentes na mucosa cólica resultam num permanente estado de estresse oxidativo (MARTINEZ et al., 2010). Assim, diferentes substâncias químicas naturais ou sintéticas que possuam atividade antioxidante e anti-inflamatória passaram a ser avaliadas, experimentalmente, no tratamento da CD com

resultados promissores. Todavia, o uso de clisteres com substâncias antioxidantes utilizados como terapia isolada para o tratamento das formas graves da CD, assim como ocorre nas formas graves de DII, mostra-se menos eficaz (MARTINEZ et al., 2015).

Quando se considera o tratamento das formas graves das DII, a terapia biológica utilizando anticorpos anti-TNF- α como o infliximabe ou adalimumabe, ou anticorpos anti-integrinas inflamatórias como o vedolizumabe, representa a estratégia terapêutica mais eficiente conhecida até a presente data. A terapia com anti-TNF- α em portadores de RCUI e doença de Crohn, associada ou não a imunossupressores é reconhecida como a estratégia terapêutica padrão ouro para o tratamento dessas enfermidades, pois está associada aos melhores resultados no que concerne ao alívio dos sintomas, regressão do processo inflamatório mucoso e reparação cicatricial do epitélio intestinal e manutenção de uma resposta clínica sustentada (BAU et al., 2017; FUCHS et al., 2017; ZACHARIAS et al., 2017). A utilização da terapia biológica em portadores de DII baseia-se nas evidências que esses doentes produzem níveis teciduais elevados de citocinas pró-inflamatórias e, em particular o TNF- α (BAU et al., 2017). Estudos recentes mostraram que, com o uso da terapia biológica com anti-TNF- α , mais de 40% dos doentes apresentam remissão total dos sintomas após oito semanas de tratamento e que a maioria dos enfermos se mantém assintomático após um ano de tratamento (ZACHARIAS et al., 2017).

Apesar de estudos experimentais em modelos de CD terem mostrado que a medida que o processo inflamatório no cólon excluso se agrava existe aumento na formação tecidual de citocinas pró-inflamatórias, particularmente, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , até a presente data o uso da terapia biológica com anti-TNF- α nos casos graves de CD nunca foi avaliada. Do mesmo modo, não se conhecem os efeitos da terapia biológica com anticorpos anti-TNF- α em modelos experimentais de CD, o que torna este estudo pioneiro.

A produção aumentada de TNF- α a partir de células inflamatórias no cólon excluso de trânsito fecal já foi descrita anteriormente (PACHECO et al., 2012; ALVARENGA et al., 2014). Estudo experimental submetem 60 ratos à derivação do trânsito intestinal por meio de uma colostomia proximal terminal e sepultamento do segmento distal do cólon no interior do abdômen (PACHECO et al., 2012). Os autores subdividiram os animais em três grupos experimentais, segundo serem submetidos à aplicação de clisteres no reto excluso contendo SF 0,9%, butirato ou glutamina. Ao avaliarem os conteúdos teciduais de TNF- α , IL-1 β e TGF- β após oito semanas de intervenção, os autores verificaram que nos animais tratados com SF 0,9%, havia aumento significativo do conteúdo tecidual de todas as citocinas, particularmente do TNF- α . Os valores teciduais de TNF- α , IL-1 β e TGF- β diminuía significativamente, nos

animais tratados com ambas as soluções nutricionais propostas (PACHECO et al., 2012). Os autores acreditam que o importante aumento do infiltrado inflamatório na lâmina própria, as alterações atróficas do epitélio cólico, conjuntamente com a maior produção local de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) torna a resposta inflamatória da CD do tipo Th1, portanto, semelhante a que ocorre nos doentes com RCUI. Contudo, nesse estudo, os autores não avaliaram os efeitos do uso de anticorpos anti-TNF- α no modelo proposto.

Outros autores avaliaram os efeitos da aplicação de clisteres no colón excluso com *Styela plicata*, substância com atividade anti-inflamatória (ALVARENGA et al., 2014). Os resultados encontrados mostraram que nos animais do grupo controle havia significativo aumento no conteúdo tecidual de TNF- α . De modo contrário, nos animais tratados com *Styela plicata* havia redução no processo inflamatório tecidual, avaliado por histologia, assim como nos níveis teciduais de TNF- α mensurados por meio de ensaio bioquímico (ALVARENGA et al., 2014). Do melhor do nosso conhecimento, até a presente data, esses são os únicos dois estudos disponíveis na literatura onde se mensurou o conteúdo tecidual de TNF- α em modelos experimentais de CD. Os resultados desses dois estudos, em síntese, mostraram que no cólon excluso de trânsito fecal não submetido a intervenção, existe um aumento na produção tecidual de TNF- α (PACHECO et al., 2012; ALVARENGA et al., 2014). Diante desses achados, seria interessante avaliar se a terapia biológica empregando anti-TNF- α é capaz de melhorar o processo inflamatório na mucosa cólica desprovida de trânsito fecal que desenvolve CD. Entretanto, como referido anteriormente, essa possibilidade ainda não tinha sido avaliada.

O uso de anticorpos anti-TNF- α já foi utilizado em modelos experimentais de colite induzida por TNBS (TRIAANTAFILLIDIS et al., 2005; FRIES et al., 2008; CLEMENTE et al., 2012; GOTARDO et al., 2014). Os resultados mostraram que a terapia com anti-TNF- α foi capaz de melhorar o processo inflamatório tecidual e reduzir os níveis teciduais de TNF- α (TRIAANTAFILLIDIS et al., 2005; FRIES et al., 2008; CLEMENTE et al., 2012;). Nesses modelos de colite induzida, os autores verificaram que a aplicação subcutânea de infliximabe nas doses de 5 mg/kg/sem e 10 mg/kg/sem reduziram o escore de atividade inflamatório na mucosa cólica, os níveis de TNF- α e os níveis teciduais de malondialdeído, um importante marcador de estresse oxidativo tecidual (TRIAANTAFILLIDIS et al., 2005). Outro estudo avaliando o uso de anti-TNF- α associado ou não a substâncias antioxidantes também mostrou que essa estratégia de medicamentos é eficaz para o tratamento da colite induzida por sulfato de dextrana reduzindo os níveis teciduais de TNF- α e melhorando as alterações inflamatórias da mucosa cólica (BAROLLO et al., 2011).

Quando se mostra que terapia biológica com anti-TNF- α foi eficaz para reduzir o processo inflamatório mucoso em modelos de colite quimicamente induzida, é possível que essa estratégia terapêutica, também pudesse se mostrar eficaz no tratamento da CD experimental. Caso a substância mostre-se eficaz em modelos experimentais de CD, talvez possa ser utilizada com uma estratégia terapêutica alternativa para o tratamento das formas mais graves de CD que acomete o homem. Contudo, como já referido, do melhor do nosso conhecimento essa estratégia terapêutica sequer foi avaliada experimentalmente.

Os resultados do presente estudo mostraram que nos segmentos cólicos providos de trânsito fecal, onde o suprimento de AGCC encontra-se preservado (cólon proximal), todos os parâmetros inflamatórios estudados (atrofia epitelial, perda epitelial, presença de abscessos de criptas, número de células caliciformes e infiltrado inflamatório) não se modificaram independente da substância de intervenção utilizada (SF 0,9% ou infliximabe). Essas variáveis histológicas também não sofreram modificação independente da concentração de infliximabe utilizada (5 mg/kg/sem ou 10 mg/kg/sem). Quando se utilizou os resultados encontrados com a somatória dessas variáveis para estratificar o escore inflamatório constatou-se que também não houve modificações significativas, independente da substância ou da concentração empregada. Da mesma forma, os níveis de MPO mensurados também não se modificaram nos segmentos cólicos com trânsito preservado, independente da substância de intervenção ou da sua concentração. Esses resultados confirmam a importância do suprimento regular de AGCC na preservação da integridade do epitélio mucoso intestinal, assim como na prevenção da inflamação local. É provável que o suprimento regular de AGCC no cólon provido de trânsito intestinal mantenha os mecanismos de produção de energia pelas células epiteliais do cólon (respiração celular) normais, evitando a produção excessiva de RLO e, conseqüentemente, sem dano oxidativo aos diferentes sistemas de defesa que compõe a barreira mucosa (MARTINEZ et al., 2010).

Todavia, quando se avaliou no presente estudo as alterações histológicas nos segmentos desprovidos de trânsito fecal (portanto sem oferta regular de AGCC) os resultados encontrados mostraram alterações significativas. Verificou-se que nos animais tratados com infliximabe na concentração de 10 mg/kg/sem havia menor atrofia epitelial quando comparado aos animais submetidos a intervenção com SF 0,9%. Apesar na atrofia epitelial também ser menor nos animais tratados com concentração menor de infliximabe (5 mg/kg/sem) essa redução no grau de atrofia não se mostrou significativa quando comparados aos animais tratados com SF 0,9%. Esses achados sugerem que o uso de anti-TNF- α em concentrações mais elevadas é capaz de preservar a altura das glândulas cólicas, fato importante para preservação das funções absorptivas da mucosa intestinal.

Quando se avaliou a intensidade de perda epitelial nos segmentos excluídos de trânsito fecal, os resultados encontrados mostram que nos animais tratados com infliximabe, independente da concentração utilizada (5 mg/kg/dia ou 10 mg/kg/sem), havia redução significativa no grau de perda epitelial quando comparado àqueles submetidos a intervenção com SF 0,9%. Esses mesmos resultados já tinham sido descritos em estudos experimentais que avaliaram os efeitos da terapia com anti-TNF- α na regeneração do epitélio cólico em modelos de colite-induzida (TRANTAFILLIDIS et al., 2005). Nesses estudos os autores também mostraram que independente da concentração utilizada (5 mg/k/sem, 10 mg/kg/sem ou 15 mg/kg/sem), a semelhança dos resultados encontrados neste estudo, a redução da perda epitelial não se modificou. Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que o uso de anti-TNF- α , mesmo em concentrações menores, já é capaz de reduzir a perda epitelial, um importante parâmetro utilizado para a avaliação da eficácia terapêutica de diferentes medicamentos utilizados para o tratamento das DII. Em última análise, os resultados sugerem que o emprego da terapia biológica com anti-TNF- α foi capaz de preservar o epitélio do cólon excluído de trânsito, não obstante o intestino grosso estar sob uma privação no fornecimento de AGCC. É possível que o fornecimento de soluções nutricionais ricas em AGCC, concomitante com a terapia biológica talvez pudesse reduzir ainda mais a perda epitelial. Essa associação terapêutica será avaliada em breve pelo nosso grupo.

Quando se avaliou a presença de abscessos no interior das criptas cólicas (importante parâmetro histológico para o diagnóstico das diferentes formas de colite) nos segmentos excluídos de trânsito fecal, os resultados encontrados mostraram que os animais tratados com infliximabe independente da concentração utilizada (5 mg/kg/dia ou 10 mg/kg/sem) cursavam com menor quantidade de abscessos crípticos em relação aos submetidos a intervenção com SF 0,9%. Esses achados mostram que a terapia com anti-TNF- α diminuiu a formação de abscessos. Os resultados encontrados mostraram ainda que, quando ao se utilizar concentrações mais elevadas, a redução na formação dos abscessos é ainda maior. Um estudo que avaliou a porcentagem de mucosa sem processo inflamatório agudo em modelo experimental de colite quimicamente induzida mostrou que concentrações de 5 mg/kg/sem e 10 mg/kg/sem apresentaram melhora da inflamação mucosa e que quando se utilizava concentrações mais elevadas não havia melhora desses resultados (TRANTAFILLIDIS et al., 2005). Neste estudo, apesar de não ter sido utilizado concentrações maiores que 10 mg/kg/sem os resultados encontrados no modelo de CD foram semelhantes os encontrados por autores que utilizaram modelos de colite induzida por TNBS (TRANTAFILLIDIS et al.,

2005). Assim a aplicação subcutânea de anti-TNF- α mostrou eficácia na prevenção da formação de abscessos nas criptas cólicas.

De modo semelhante, quando se avaliou o infiltrado inflamatório, considerando apenas o estudo histológico, verificou-se redução significativa nos animais tratados com infliximabe quando comparado aos animais tratados com SF 0,9%, independente da concentração empregada (5 mg/kg/sem ou 10 mg/kg/sem). Verificou-se, contudo, que quando foram utilizadas concentrações mais elevadas à redução do infiltrado inflamatório em relação aos animais do grupo controle foi ainda mais evidente. Esses achados sugerem que exista uma relação entre dose e efeito quando se considera a redução do infiltrado inflamatório tecidual. Resultados semelhantes, também foram encontrados em outros estudos que utilizaram modelos de colite induzida quimicamente (SHEN et al., 2007).

A produção do muco que recobre o epitélio cólico está na dependência direta de uma população normal de células caliciformes. O muco que recobre o epitélio intestinal constitui-se na primeira linha de defesa contra a infiltração de patógenos e antígenos presentes na luz do cólon. Estudos experimentais mostraram que no cólon desprovido de trânsito fecal ocorrem modificações no conteúdo e na forma de expressão dos diferentes subtipos de mucinas, principal glicoproteína presente na camada de muco (NONOSE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010). Essa alteração na produção de mucinas encontra-se diretamente relacionada a modificações na população de células caliciformes no cólon excluído de trânsito intestinal (MELLO et al., 2012). Os resultados do presente estudo mostraram que no cólon com trânsito intestinal existe preservação do número de células caliciformes, independente da solução de intervenção utilizada. Esses achados sugerem que o suprimento regular de AGCC reduzindo o processo inflamatório seja o fator mais importante na preservação da população dessas células nas glândulas intestinais. De modo distinto, no cólon excluído, com o menor fornecimento de AGCC, instala-se o processo inflamatório mucoso com conseqüente aumento na produção de muco. Cabe lembrar que um dos principais sintomas dos portadores de CD é justamente a eliminação de muco em grande quantidade a partir do cólon excluído (GLOTZER; GLICK; GOLDMAN, 1981; KELI et al., 1997; DAVID et al., 2009). Assim, com o aumento do processo inflamatório ocorre maior produção de muco pelas células caliciformes como tentativa de proteger a mucosa cólica. Os resultados encontrados neste estudo parecem confirmar essa possibilidade. Nos segmentos cólicos excluídos de trânsito fecal dos animais tratados com SF 0,9% houve um aumento significativo da população de células caliciformes quando comparados os segmentos providos de trânsito desses mesmos animais. Quando se analisa o número de células caliciformes nos segmentos sem trânsito fecal dos animais tratados com infliximabe verifica-se redução significativa na população dessas células quando

comparado com animais submetidos à intervenção com SF 0,9%. Quando se utilizou concentração maior (10 mg/kg/dia) esses achados foram ainda mais evidentes. Assim, esses resultados sugerem que a melhora do processo inflamatório nos animais tratados com infliximabe, independente da concentração empregada, reduzindo o processo inflamatório diminui a população de células caliciformes e, conseqüentemente, a população de células caliciformes. Contudo, é importante lembrar que mesmo nos animais tratados com infliximabe na maior concentração a população de células caliciformes nas glândulas cólicas é ainda maior que no cólon provido de trânsito. Esse achado reforça a importância do suprimento adequado de AGCC com conseqüente redução da formação de RLO para a homeostase da produção de muco. Estudos utilizando clisteres com substâncias antioxidantes no cólon excluído mostraram melhora do processo inflamatório e manutenção da produção de muco (CHAIM et al., 2014; BONASSA et al., 2015)

Quando foram consideradas todas as variáveis histológicas em conjunto para estratificar-se o escore inflamatório verificou-se que os animais tratados com infliximabe, independente da concentração utilizada (5 mg/kg/sem ou 10 mg/kg/sem) apresentou redução significativa do escore, quando comparado aos animais submetidos à intervenção com SF 0,9%. Esses achados sugerem que, quando se consideram vários parâmetros utilizados para avaliar a eficácia da terapia biológica utilizando-se anticorpos monoclonais anti-TNF- α , a estratégia terapêutica mostrou-se eficaz no tratamento da CD experimental, tornando-se uma estratégia terapêutica eficaz para o tratamento da doença.

A eficácia do tratamento da CD experimental com a terapia biológica com anti-TNF- α fica ainda mais evidente quando se avalia os resultados encontrados em relação ao infiltrado neutrofílico avaliado pelo conteúdo tecidual de MPO. Verificou-se que os animais tratados com infliximabe, independente da concentração utilizada, apresentaram importante redução do conteúdo tecidual de MPO quando comparado aos animais submetidos à intervenção com SF 0,9%. A redução nos níveis teciduais de MPO se manteve independente da concentração empregada. A melhora do infiltrado neutrofílico pela medida do conteúdo tecidual de MPO mostrou-se relacionada à melhora de todos os outros parâmetros histológicos avaliados, confirmando a eficácia do medicamento.

Todos os resultados encontrados no presente estudo sugerem que, apesar do tratamento da CD com emprego da terapia biológica com anti-TNF- α ainda não estar estabelecido, é possível que essa estratégia possa ter lugar no arsenal terapêutico para o tratamento da doença, particularmente nas formas graves da enfermidade. Não obstante este estudo ter caráter experimental, a terapia biológica com anti-TNF- α já vem sendo utilizada

rotineiramente em todo o mundo para o tratamento das principais formas de DII que acometem o homem. Essa evidência, aliada aos resultados de estudos experimentais mostrando que o uso de anticorpos anti-TNF- α melhora o processo inflamatório mucoso, sugere que o emprego da terapia biológica na CD humana torne-se uma possibilidade terapêutica factível de ser avaliada. Os resultados encontrados neste estudo experimental mostrando que a terapia biológica com anti-TNF- α foi eficaz no tratamento da CD experimental abrem uma nova perspectiva para indicação da terapia com anti-TNF- α nas formas mais graves da CD humana.

6. CONCLUSÕES

1. A administração de anticorpos monoclonais anti-TNF- α diminui a atrofia de criptas cólicas e reduz a perda epitelial da mucosa cólica desprovida de trânsito fecal;
2. A administração de anticorpos monoclonais anti-TNF- α reduz a formação de abscessos de criptas cólicas, diminui o infiltrado inflamatório e melhora o escore inflamatório na mucosa cólica desprovida de trânsito fecal;
3. A terapia biológica com anticorpos monoclonais anti-TNF- α reduz o infiltrado neutrofílico na mucosa cólica desprovida de trânsito fecal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S.; CITOCINAS. In: **Imunologia celular e molecular**, 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1998.
- AGARWAL, V. P.; SCHIMMEL, E. M. Diversion colitis: a nutritional deficiency syndrome? **Nutrition Reviews**, v. 47, p. 257-261, 1989.
- ALVARENGA, V. J. R.; PACHECO, R. G.; ESPOSITO, C. C.; BUONGUSTO, F.; CASTELO-BRANCO, M. T.; MAD, I. K.; BELMIRO, C. R.; PAVÃO, M. S.; DE SOUZA, H. S.; SCHANAIDER, A. Ascidian (chordate-tunicate) and mammalian heparin enemas attenuate experimental diversion colitis. **Surgery**, v. 155, n. 2, p. 217-227, 2014.
- ANDERSEN, J. C.; BUNDGAARD, L.; ELBRØND, H.; LAURBERG, S.; WALKER, L. R.; STØVRING, J. Danish national guidelines for treatment of diverticular disease. **Danish Medical Journal**, v. 59, n. 5, p. C4453, 2012.
- BAROLLO, M.; MEDICI, V.; D'INCÀ, R.; BANERJEE, A.; INGRAVALLO, G.; SCARPA M, PATAK, S.; RUFFOLO, C.; CARDIN, R.; STURNIOLO, G.C. Antioxidative potential of a combined therapy of anti TNF α and Zn acetate in experimental colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 36, p. 4099-4103, 2011.
- BAU, M.; ZACHARIAS, P.; RIBEIRO, D. A.; BOARON, L.; STECKERT FILHO, A.; KOTZE, P.G. Safety profile of anti-TNF therapy in Crohn's disease management: a Brazilian single-center direct retrospective comparison between infliximab and adalimumab. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 54, n. 4, p. 328-332. 2017.
- BERRA, C. M.; MENK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, p. 1340-1344, 2006.
- BILOTTA, J.; WAYE, J. D. Hydrogen peroxide enteritis: the "snow white" sign. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 35, p. 428-430, 1989.
- BINGHAM, C. O. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. **The Journal of Rheumatology. Supplement**, v. 65, p. 3-9, 2002.
- BONASSA, C. E.; PEREIRA, J. A.; CAMPOS, F. G.; RODRIGUES, M. R.; SATO, D. T.; CHAIM, F. D.; MARTINEZ, C. A. Tissue content of sulfomucins and sialomucins in the colonic mucosa, without fecal stream, undergoing daily intervention with sucralfate. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 328-338, 2015.
- BONDY, S.C.; LE BEL, C. P. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 633- 642, 1993.
- BRIDOUX, V.; REGIMBEAU, J. M.; OUAISSI, M.; MATHONNET, M.; MAUVAIS, F.; HOUIVET, E.; SCHWARZ, L.; MEGE, D.; SIELEZNEFF, I.; SABBAGH, C.; TUECH, J. J. Hartmann's procedure or primary anastomosis for generalized peritonitis due to perforated diverticulitis: a prospective multicenter randomized trial (DIVERTI). **Journal of the American College of Surgeons**, v. 225, n. 6, p. 798-805, 2017.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 222-230, 2000.

CALTABIANO, C.; MÁXIMO, F. R.; SPADARI, A. P.; DA CONCEIÇÃO MIRANDA, D. D.; SERRA, M. M.; RIBEIRO, M.L.; MARTINEZ, C.A. Aminosalicilic acid (5-ASA) can reduce levels of oxidative DNA damage in cells of colonic mucosa with and without fecal stream. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 4, p. 1037-1046, 2011.

CAMPOS, K. DE; BOT, L. H. B.; PETROIANU, A.; REBELO, P. A.; SOUZA, A. A. C. D. E.; PANHOCA, I. The impact of colostomy on the patient's life. **Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)**, v. 37, n. 3, p. 205–210, 2017.

CARBONE, L.; AUSTIN, J. Pain and Laboratory Animals: Publication Practices for Better Data Reproducibility and Better Animal Welfare. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. 1-24, 2016.

CETINKAYA, A.; BULBULOGLU, E.; KURUTAS, E. B.; CIRALIK, H.; KANTARCEKEN, B.; BUYUKBESE, M. A. Beneficial effects of n-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 206, p. 131-139, 2005.

CHAIM, F. M.; SATO, D. T.; RODRIGUES, M. R.; DIAS, A. M.; SILVEIRA JÚNIOR, P. P.; PEREIRA, J. A.; MARTINEZ, C. A. Evaluation of the application of enemas containing sucalfate in tissue content of neutral and acid mucins in experimental model of diversion colitis. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 544-552, 2014.

CHIU, A.; CHAN, H. T.; BROWN, C. J.; RAVAL, M. J.; PHANG, P. T. Failing to reverse a diverting stoma after lower anterior resection of rectal cancer. **The American Journal of Surgery**, v. 207, n. 5, p. 708-711, 2014.

CHRISTL, S. U.; EISNER, H. D.; DUSEL, G. Antagonistic effects of sulfide and butyrate on proliferation of colonic mucosa: a potential role for these agents in the pathogenesis of ulcerative colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 41, p. 2477-2481, 1996.

CLEMENTE, T. R.; DOS SANTOS, A. N.; STURARO, J. N.; GOTARDO, E. M.; DE OLIVEIRA, C. C.; ACEDO, S. C.; CARIA, C. R.; PEDRAZZOLI, J. JR.; RIBEIRO, M. L.; GAMBERO, A. Infliximab modifies mesenteric adipose tissue alterations and intestinal inflammation in rats with TNBS-induced colitis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 47, n. 8-9, p. 943-950, 2012.

COOK, S. I.; SELLIN, J. H. Review article: shorty-chain fatty acids in healthy and disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 12, p. 499-507, 1998.

CROSS, R. K. Safety Considerations with the Use of Corticosteroids and Biologic Therapies in Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 23, n. 10, p. 1689-1701, 2017.

CUNHA, F. L.; SILVA, C. M. G.; ALMEIDA, M. G.; LAMEIRO, T. M. M.; MARQUES, L. H. S.; MARGARIDO, N. F.; MARTINEZ, C. A. R. Reduction in oxidative stress levels in the colonic mucosa without fecal stream after the application of enemas containing aqueous *Ilex paraguariensis* extract. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 289-296, 2011.

DAVID, G. G.; AL-SARIRA, A. A.; WILLMOTT, S., Cade, D.; Corless, D. J.; Slavin, J. P. Use of Hartmann's procedure in England. **Colorectal Disease**, v. 11, p. 308-312, 2009.

EDWARDS, C. M.; GEORGE, B.; WARREN, B. Diversion colitis – new light through old windows. **Histopathology**, v. 34, p. 1-5, 1999.

FEINGOLD, D.; STEELE, S. R.; LEE, S.; KAISER, A.; BOUSHEY, R.; BUIE, W. D.; RAFFERTY, J. F. Practice parameters for the treatment of sigmoid diverticulitis. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 57, n. 3, p. 284-294, 2014.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-8, 1997.

FUCHS, F.; SCHILLINGER, D.; ATREYA, R.; HIRSCHMANN, S.; FISCHER, S.; NEUFERT, C.; ATREYA, I.; NEURATH, M. F.; ZUNDLER, S. Clinical response to vedolizumab in ulcerative colitis patients is associated with changes in integrin expression profiles. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 8, p. 764, 2017.

GERAGHTY, J. M.; TALBOT, I. C. Diversion colitis: histological features in the colon and rectum after defunctioning colostomy. **Gut**, v. 32, p. 1020-1023, 1991.

GLOTZER, D. J.; GLICK, M. E.; GOLDMAN, H. Proctitis following diversion of fecal stream. **Gastroenterology**, v. 80, p. 438-441, 1981.

GOTARDO, E.M.; RIBEIRO, G.A.; CLEMENTE, T.R.; MOSCATO, C.H.; TOMÉ, R.B.; ROCHA, T.; PEDRAZZOLI, J. Jr.; RIBEIRO, M.L.; GAMBERO, A. Hepcidin expression in colon during trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 15, p. 4345-4352, 2014.

GUILLEMOT, F.; COLOMBEL, J. F.; NEUT, C.; VERPLANCK, N.; LECOMTE, M.; ROMOND, C.; PARIS, J. C.; CORTOT, A. Treatment of diversion colitis by short-chain fatty acids. Prospective and double-blind study. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 34, n. 10, p. 861-864, 1991.

HABR-GAMA, A.; TEIXEIRA, M. G.; VIEIRA, M. J. F.; MILÉU, L. F.; LAURINO NETO, R.; PINOTTI, H. W. Operação de Hartmann e suas conseqüências. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 17, p. 5-10, 1997.

HAQUE, S.; WEST, A. B. Diversion colitis--20 years a-growing. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 15, n. 4, p. 281-283, 1992.

HARIG, J. M.; SOERGEL, K. H.; KOMOROWSKI, R. A.; WOOD, C. M. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 1, p. 23-28, 1989.

HARTY, R. F. Energy, oxidative stress, and inflammation in the colon. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 12, p. 3386-3388, 2013.

HENDRICKSON, B. A.; GOKHALE, R.; CHO, J. H. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 79-94, 2002.

HOFFMANN, J. C.; PAWLOWSKI, N. N.; KUHL, A. A.; HOHNE, W.; ZEITZ, M. Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. **Pathobiology**, v. 20, p. 121-130, 2003.

HOLMGREEN, K.; KVERNENG HULTBERG, D.; HAAPAMÄKI, M. M.; MATTHIESSEN, P.; RUTEGÅRD, J.; RUTEGÅRD, M. High stoma prevalence and stoma reversal complications following anterior resection for rectal cancer: A population-based multi-centre study. **Colorectal Disease**, v. 19, n. 12, p. 1067-1075, 2017.

IINO, K.; TORYAMA, M.; OGAWA, H.; KAWAKAMI, M. Cholesteatoma debris as an activator of human monocytes. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 110, p. 410-415, 1990.

KADRI, C. J.; PEREIRA, J. A.; CAMPOS, F. G.; ORTEGA, M. M.; BRAGION, C. B.; MARTINEZ, C. A. Anti-inflammatory effects of enemas containing an oily extract of curcumin in an experimental model of diversion colitis. **Histology and Histopathology**, v. 32, n. 2, p. 161-169, 2017.

KADRI, C. J.; PEREIRA, J. A.; DA SILVA, C. M.; NONOSE, R.; NASCIMENTO, E. F.; JACOMO, A. L.; MARTINEZ, C. A. E-cadherin expression in colonic mucosa with and without fecal stream. **Journal of Investigative Surgery**, v. 26, n. 2, p. 72-79, 2013.

KABIR, S.; KABIR, S. A.; RICHARDS, R.; AHMED, J.; MACFIE, J. Pathophysiology, clinical presentation and management of diversion colitis: a review of current literature. **International Journal of Surgery**, v. 12, n. 10, p. 1088-1092, 2014.

KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, p. 43-50, 2000.

KELI, E.; BOUCHOUCHA, M.; DEVROEDE, G.; CARNOT, F.; OHRANT, T.; CUGNENC, P. H. Diversion-related experimental colitis in rats. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 40, p. 222-228, 1997.

KIELY, E. M.; AJAYI, N. A.; WHEELER, R. A.; MALONE, M. Diversion procto-colitis: response to treatment with short-chain fatty acids. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 36, p. 1514-1517, 2001.

KOMINAM, I. Y.; OHE, H.; HIGASHI, R.; HIRAO, K.; OGAWA, T.; NAKAGAWA, M.; ARAKI, Y.; MIZUNO, M.; CHAYAMA, K. A case of diversion colitis successfully treated with 5-aminosalicylic acid. **Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi**, v. 110, n. 8, p. 1447-53, 2013.

LAMEIRO T. M. M.; SILVA C. M. G.; MARQUES, L. H. S.; CUNHA, F. L.; ALMEIDA, M. G.; PEREIRA, J. A.; MARTINEZ, C. A. R. Efeitos do butirato nos níveis de peroxidação lipídica em células da mucosa cólica sem trânsito fecal: estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 31, n. 2, p. 155-164, 2011.

LIU, Q.; SHIMOYAMA, T.; SUZUKI, K. et al. Effect of sodium butyrate on reactive oxygen species generation by human neutrophils. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 36, p. 744-750, 2001.

LONGATTI, T. S.; ACEDO, S. C.; DE OLIVEIRA, C. C.; MIRANDA, D. D.; PRIOLLI, D. G.; RIBEIRO, M. L.; GAMBERO, A.; MARTINEZ, C. A. Inflammatory alterations in excluded colon in rats: a comparison with chemically induced colitis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 45, n. 3, p. 315-324, 2010.

LOPES-PAULO, F. Alterações estruturais na mucosa do cólon derivado – Estudo estereológico experimental em ratos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 22, p. 164-169, 2002.

- LU, E. S.; LIN, T.; HARMS, B. L.; GAUMNITZ, E. A.; SINGARAM, C. A severe case of diversion colitis with large ulcerations. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 90, p. 1508-1510, 1995.
- LUCERI, C.; FEMIA, A. P.; FAZI, M.; DI MARTINO, C.; ZOLFANELLI, F.; DOLARA, P.; ONELLI, F. Effect of butyrate enemas on gene expression profiles and endoscopic/histopathological scores of diverted colorectal mucosa: a randomized trial. **Digestive and Liver Disease**, v. 48, n. 1, p. 27-33, 2016.
- MARDANAS, P.; DEVROEDE, G. Diversion-Related Colitis: Un-used segments colitis revisited [Letter]. **Gastroenterology**, v. 81, p. 824, 1981.
- MARQUES, L. H. S.; SILVA C. M. G.; LAMEIRO T. M. M.; ALMEIDA, M. G.; CUNHA, F. L.; PEREIRA, J. A.; MARTINEZ, C. A. R. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica em células da mucosa cólica após aplicação de enemas com peróxido de hidrogênio: estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 30, n. 3, p. 272-280, 2010.
- MARTINEZ, C. A. R.; RODRIGUES M. R.; SATO D. T.; SILVA C. M. G.; KANNO D. T.; MENDONÇA, R. L. S.; PEREIRA, J. A. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant effects of the sucralfate in diversion colitis. **Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)**, v. 35, n. 2, p. 90-99, 2015.
- MARTINEZ, C. A. R.; DE ALMEIDA, M. G.; DA SILVA, C. M.; RIBEIRO, M. L.; DA CUNHA, F. L.; RODRIGUES, M. R.; SATO, D. T.; PEREIRA, J. A. Enemas with N-acetylcysteine can reduce the level of oxidative damage in cells of the colonic mucosa diverted from the faecal stream. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 12, p. 3452-3459, 2013.
- MARTINEZ, C. A. R.; RIBEIRO, M. L.; GAMBERO, A.; MIRANDA, D. D.; PEREIRA, J. A.; NADAL, S. R. The importance of oxygen free radicals in the etiopathogenesis of diversion colitis in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 25, n. 5, p. 387-395, 2010.
- MARTINEZ, C. A. R.; NONOSE, R.; SPADARI, A. P.; MÁXIMO, F. R.; PRIOLLI, D. G.; PEREIRA, J. A.; MARGARIDO, N. F. Quantification by computerized morphometry of tissue levels of sulfomucins and sialomucins in diversion colitis in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 231-240, 2010.
- MARTINEZ, C. A. R.; BARTOCCI, P. C.; DO CARMO, C. V.; PEREIRA, J. A.; MIRANDA, D. D.; RIBEIRO, M. L. The effects of oxidative DNA damage and mutations in the p53 protein on cells of the colonic mucosa with and without the fecal stream: an experimental study in rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 45, n. 6, p. 714-724, 2010.
- MATSUMOTO, S.; MASHIMA, H. Efficacy of Combined Mesalazine Plus Corticosteroid Enemas for Diversion Colitis after Subtotal Colectomy for Ulcerative Colitis. **Case Reports in Gastroenterology**, v. 10, n. 1, p. 157-160, 2016.
- MELLO, R.O.; SILVA, C.M.; FONTE, F.P.; SILVA, D.L.; PEREIRA, J.A.; MARGARIDO, N.F.; MARTINEZ, C.A. Evaluation of the number of goblet cells in crypts of the colonic mucosa with and without fecal transit. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, n. 2, p. 139-145, 2012.
- MILLAR, A. D.; RAMPTON, D. S.; CHANDER, C. L.; CLAXSON, A. W.; BLADES, S.; COUMBE, A.; PANETTA, J.; MORRIS, C. J.; BLAKE, D. R. Evaluating the antioxidant

potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. **Gut**, v. 39, n. 407-415, 1996.

MORTENSEN, P. B.; CLAUSEN, M. R. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement**, v. 216, p. 132-148, 1996.

MURRAY, F.; O'BRIEN, M. J.; BIRKETT, D. H.; KENNEDY, S. M.; LAMONT, J. T. Diversion colitis: pathologic findings in a resected sigmoid colon and rectum. **Gastroenterology**, v. 93, n. 1404-1408, 1987.

NASRRI, C. G. G.; NASRRI, A. B.; FAVERO, E.; ROTTA, C. M.; MARTINEZ, C. A. R.; MARGARIDO, N. F. Influência da irrigação de soluções nutricionais no colo excluído de trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 28, n. 3, p. 306-314, 2008.

NEURATH, M. F.; PETTERSSON, S.; MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H.; STROBER, W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. **Nature Medicine**, v. 2, p. 998-1004, 1996.

NEUT, C; GUILLEMOT, F; GOWER-ROUSSEAU, C; BIRON, N.; CORTOT, A; COLOMBEL, J F. Treatment of diversion colitis with short-chain fatty acids. Bacteriological study. **Gastroenterologie Clinique Et Biologique**, v. 19, p. 871-875, 1995.

NONOSE, R.; SPADARI, A. P. P.; PRIOLLI, D. G.; MÁXIMO, F. R.; PEREIRA, J. A.; MARTINEZ, C. A. R. Tissue quantification of neutral and acid mucins in the mucosa of the colon with and without fecal stream in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 267-275, 2009.

OLIVEIRA-NETO, J. P.; AGUILAR-NASCIMENTO, J. E. Intraluminal irrigations with fibers improves inflammation and atrophy in diversion colitis. **Nutrition**, v. 20, p. 197-199, 2004.

OLIVEIRA, A. J.; PINTO JÚNIOR, F. E.; FORMIGA, M. C.; MELO, S. P.; BRANDAO-NETO, J.; RAMOS, A. M. Comparison of prophylactic and therapeutic use of short-chain fatty acid enemas in diversion colitis: a study in Wistar rats. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 65, n. 12, p. 1351-1356, 2010.

PACHECO, R. G.; ESPOSITO, C. C.; MÜLLER, L. C.; CASTELO-BRANCO, M. T.; QUINTELLA, L. P.; CHAGAS, V. L.; DE SOUZA, H. S.; SCHANAIDER, A. Use of butyrate or glutamine in enema solution reduces inflammation and fibrosis in experimental diversion colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 32, p. 4278-4287, 2012.

PAN, H. D.; PENG, Y. F.; WANG, L.; LI, M.; YAO, Y. F.; ZHAO, J.; ZHAN, T. C.; GU, J. Risk factors for nonclosure of a temporary defunctioning ileostomy following anterior resection of rectal cancer. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 59, n. 2, p. 94-100, 2016.

PRAVDA, J. Radical induction theory of ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, p. 2371-2384, 2005.

ROEDIGER, W. E. The starved colon – diminished mucosal nutrition, diminished absorption, and colitis. **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 33, p. 858-862, 1990.

SCHEPPACH, W.; CHRISTL, S. U.; BARTRAN, H. P.; RICHTER, F.; KASPER, H. Effects of short-chain fatty acids on the inflamed colonic mucosa. **Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement**, v. 222, p. 53-57, 1997.

SERIL, D. N.; LIAO, J.; YANG, G. Y.; YANG, C. S. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. **Carcinogenesis**, v. 24, p. 353-362, 2003.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 227-236, 2004.

SHEENAN, J.; BRYNJOLFSSON, G. Ulcerative colitis following hydrogen peroxide enema. **Laboratory Investigation**, v. 9, p. 150-167, 1960.

SHEN, C.; DE HERTOOGH, G.; BULLENS, D. M.; VAN ASSCHE, G.; GEBOES K, RUTGEERTS, P.; CEUPPENS, J. L. Remission-inducing effect of anti-TNF monoclonal antibody in TNBS colitis: mechanisms beyond neutralization? **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 13, n. 3, p. 308-316, 2007.

SHERIDAN, A. M.; FITZPATRICK, S.; WANG, C.; WHEELER, D. C.; LIEBERTHAL, W. Lipid peroxidation contributes to hydrogen peroxide induced cytotoxicity in renal epithelial cells. **Kidney International**, v. 49, p. 88-93, 1996.

SHERMAN, K. L.; WEXNER, S. D. Considerations in stoma reversal. **Clinics in Colon and Rectal Surgery**, v. 30, n. 3, p. 172-177, 2017.

SOUSA, M. V.; PRIOLLI, D. G.; PORTES, A. V.; CARDINALLI, I. A.; PEREIRA, J. A.; MARTINEZ, C. A. R. Evaluation by computerized morphometry of histopathological alterations of the colon wall in segments with and without intestinal transit in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 23, n. 5, p. 417-424, 2008.

STAWOWCZYK, E.; KAWALEC, P. Cost-effectiveness of biological treatment of ulcerative colitis - a systematic review. **Przegląd Gastroenterologiczny**, v. 12, n. 2, p. 90-97, 2017.

SZCZEPKOWSKI, M.; BANASIEWICZ, T.; KOBUS, A. Diversion colitis 25 years later: the phenomenon of the disease. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 32, n. 8, p. 1191-1196, 2017.

SZCZEPKOWSKI, M.; BANASIEWICZ, T.; KROKOWICZ, P. DZIKI, A.; WALLNER, G, DREWS, M.; HERMAN, R.; LORENC, Z.; RICHTER, P. BIELECKI. K.; TARNOWSKI, W.; KRUSZEWSKI, J.; KŁADNY, J.; GŁUSZEK, S.; ZEGARSKI, W.; KIELAN, W.; PAŚNIK, K. JACKOWSKI M, WYLEŻOŁ M, STOJCEV Z, PRZYWÓZKA A. Polish consensus statement on the protective stoma. **Polski Przegląd Chirurgiczny**, v. 86, n. 8, p. 391-404, 2014.

THAM, D. M.; WITHIN, J. C.; COHEN, H. J. Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. **Pediatric Research**, v. 51, p. 641-646, 2002.

TRIANAFILLIDIS, J. K.; NICOLAKIS, D.; MOUNTANEAS, G.; POMONIS, E. Treatment of diversion colitis with 5 aminosalicylic acid enemas: comparison with betamethasone enemas. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 86, p. 1552-1553, 1991.

_____; PAPALOIS, A. E., PARASI, A.; ANAGNOSTAKIS, E.; BURNAZOS, S.; GIKAS, A.; MERIKAS, E. G.; DOUZINAS, E.; KARAGIANNI, M.; SOTIRIOU, H. Favorable response to subcutaneous administration of infliximab in rats with experimental colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 43, 6843-6847, 2005.

TRIPODI, J.; GORCEY, S.; BURAKOFF, R. A case of diversion colitis treated with 5-aminosalicylic acid enemas. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 87, p. 645-647, 1992.

TSUCHIYA, A.; YASUNAGA, H.; TSUTSUMI, Y.; MATSUI, H.; FUSHIMI, K. Mortality and morbidity after Hartmann's procedure versus primary anastomosis without a diverting stoma for colorectal perforation: A nationwide observational study. **World Journal of Surgery**, doi: 10.1007/s00268-017-4193-2, 2017.

VELAZQUEZ, O. C., LEDERER, H. M.; ROMBEAU, J. L. Butyrate and colonocyte. Production, absorption, metabolism and therapeutic implications. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 427, p. 123-134, 1997.

WHELAN, R. L.; ABRAMSON, D.; KIM, D. S.; HASHMI, H. F. Diversion colitis: a prospective study. **Surgical Endoscopy**, v. 8, p. 19-24, 1994.

YEONG⁷, M. L.; BETHWAIT, P. B.; PRASAD, J.; ISBISTER, W. H.; Lymphoid follicular hyperplasia – a distinctive feature of diversion colitis. **Histopathology**, v. 19, p. 55-61, 1991.

ZACHARIAS, P.; DAMIÃO, A. O. M. C.; MORAES, A.C.; TEIXEIRA, F. V.; LUDVIG, J. C.; NONES, R. B.; SAAD-HOSSNE, R.; SASSAKI, L. Y.; SILVA, R. P. L. D.; FACCHIN, L.; OLANDOSKI, M.; KOTZE, P. G. Adalimumab for ulcerative colitis: results of a Brazilian multicenter observational study. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.54, n. 4, p. 321-327, 2007.

ANEXO I - Autorização Comitê de Ética no uso de animal em pesquisa



CEUA
Comitê de Ética na
Utilização de Animais



USF
UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Bragança Paulista, 29 de Setembro de 2016

Projeto de Pesquisa: "Avaliação dos efeitos da terapia biológica com ANTI_TNF- α na Colite de Exclusão: Estudo em Ratos".

Área de Conhecimento: Ciências da Saúde/Cirurgia Experimental: 4.01.02.14-9

Autor(es): Prof^o Dr. Carlos Augusto Real Martinez; Prof. Dr. José Aires Pereira; Prof^a. Dra. Manoela Marques Ortega;

Instituição: Universidade São Francisco

Protocolo: 001.08.2016 versão 2

IP. Ciuca: 200.225.122.34

CIAEP/CONCEA Nº 01.226.2014

Vigência do Projeto: 01/08/2016- 01/08/2017

Número e Animais: 22 ratos Machos

Espécie: Ratos heterogênicos

Linhagem Wistar

Peso: 200-300g

Total de Animais: 22 ratos heterogênicos

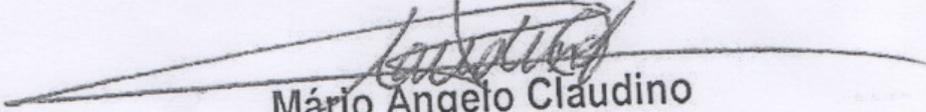
Procedência do Animal: Laboratório – ANILAB – Animais de Laboratório Criação e Comércio, Laboratórios Veterinários.

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa – CEUA, da Universidade São Francisco analisou em reunião ordinária no dia 29/09/2016 o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

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

Parecer: APROVADO



Mário Angelo Claudino
Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
Universidade São Francisco

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

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

ANEXO II – Bula do Infliximabe



IDENTIFICAÇÃO DO MEDICAMENTO

REMICADE®
infliximabe

APRESENTAÇÃO

Pó liofilizado para solução concentrada para infusão em embalagem com 1 frasco-ampola de **uso único** com 100 mg de infliximabe.

USO INTRAVENOSO

USO ADULTO E PEDIÁTRICO ACIMA DE 6 ANOS

COMPOSIÇÃO

REMICADE® 100 mg:

Cada frasco-ampola contém 100 mg de infliximabe para ser reconstituído com 10 mL de água para injetáveis e, posteriormente, diluído em cloreto de sódio 0,9% para infusão.

Excipientes: fosfato de sódio monobásico monohidratado, fosfato de sódio dibásico di-hidratado, polissorbato 80 e sacarose.

INFORMAÇÕES AO PACIENTE

PARA QUE ESTE MEDICAMENTO É INDICADO?

REMICADE® é um medicamento usado para tratar pacientes adultos e pediátricos com doença de Crohn, com colite ou retocolite ulcerativa, pacientes adultos com doença de Crohn fistulizante, artrite reumatoide, espondilite anquilosante, artrite psoriásica e psoríase em placa. Nessas doenças, o corpo produz uma quantidade maior de uma substância chamada fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa). Essa quantidade maior de substância faz com que o sistema imunológico do seu corpo ataque o tecido saudável causando uma inflamação. Bloquear o TNF-alfa com **REMICADE®** pode reduzir a inflamação, mas pode também diminuir a capacidade do seu sistema imunológico em combater infecções. O seu médico decidiu tratá-lo com **REMICADE®** porque sua doença ainda está ativa, mesmo que você tenha tentado outros tratamentos.

Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória das articulações. Se você tem artrite reumatoide de moderada a gravemente ativa, será tratado com **REMICADE®** associado ao metotrexato para:

- reduzir os sinais e sintomas da sua doença;
- prevenir as lesões nas articulações;
- melhorar a função física.

**Espondilite Anquilosante**

A espondilite anquilosante é uma doença inflamatória da coluna. Caso tenha espondilite anquilosante, e não responda ou tolere outros medicamentos, você receberá **REMICADE®** para:

- reduzir os sinais e sintomas de sua doença, incluindo amplitude de movimento;
- melhorar a função física.

Artrite Psoriásica

A artrite psoriásica é uma doença inflamatória das articulações, frequentemente acompanhada por psoríase. Caso tenha artrite psoriásica ativa que não responde a outros medicamentos, você receberá **REMICADE®** para:

- reduzir os sinais e sintomas da sua artrite, incluindo redução da dor e inchaço em torno das suas articulações;
- melhorar a psoríase;
- melhorar a função física.

Psoríase em placa

A psoríase em placa é uma doença inflamatória da pele. Se você tiver psoríase em placas de moderada a grave, e o tratamento sistêmico por fototerapia ou convencional tem sido inadequado ou inapropriado, você receberá **REMICADE®** para:

- reduzir os sinais e sintomas da sua psoríase;
- melhorar sua qualidade de vida.

Doença de Crohn

A doença de Crohn é uma doença inflamatória intestinal. Se você é adulto e tem a doença de Crohn moderada ou grave que está ativa e não responde a outros medicamentos, você receberá **REMICADE®** para:

- reduzir os sinais e sintomas de sua doença;
- induzir e manter a remissão (estágio sem sintomas) de sua doença;
- induzir a cicatrização do tecido intestinal;
- melhorar sua qualidade de vida, ajudando-o a se sentir melhor;
- reduzir o número de drenagens de fístulas (abertura anormal através da pele a partir do intestino).

Se você for criança com doença de Crohn, você receberá **REMICADE®** para:

- reduzir os sinais e sintomas de sua doença;
- induzir e manter a remissão (estágio sem sintomas) de sua doença;
- melhorar sua qualidade de vida, ajudando-o a se sentir melhor.

Colite ou Retocolite Ulcerativa

A colite ou retocolite ulcerativa é uma doença inflamatória do intestino. Caso tenha colite ou retocolite ulcerativa de moderada a grave que está ativa e não responde a outros medicamentos, você receberá **REMICADE®** para:

- reduzir os sinais e sintomas de sua doença;



- induzir e manter remissão de sua doença;
- induzir e manter a cicatrização da mucosa;
- reduzir ou eliminar o uso de corticosteroides;
- melhorar sua qualidade de vida em adultos, ajudando-o a se sentir melhor;
- reduzir a necessidade de remover o intestino grosso.

Se você for uma criança ou adolescente com colite ou retocolite ulcerativa, você receberá **REMICADE®** para:

- reduzir os sinais e sintomas de sua doença;
- induzir e manter a remissão de sua doença;
- induzir e manter a cicatrização da mucosa;
- reduzir ou eliminar o uso de corticosteroides.

COMO ESTE MEDICAMENTO FUNCIONA?

REMICADE® tem como objetivo reduzir a atividade inflamatória. O ingrediente ativo, infliximabe, é um anticorpo monoclonal quimérico humano-camundongo. Anticorpos monoclonais são proteínas que reconhecem e se ligam a outras proteínas específicas. O infliximabe se liga fortemente a uma proteína especial no corpo chamada Fator de Necrose Tumoral alfa ou TNF-alfa, envolvida com a inflamação. O aumento da quantidade de TNF-alfa é comum em doenças inflamatórias, como: artrite reumatoide, doença de Crohn, colite ou retocolite ulcerativa, espondilite anquilosante, artrite psoriásica e psoríase em placa.

QUANDO NÃO DEVO USAR ESTE MEDICAMENTO?

Este medicamento é contraindicado para uso por pessoas que tenham:

- alergia ao **REMICADE®** ou qualquer outro componente do produto (sacarose, fosfato de sódio e polissorbato 80);
- alergia a proteínas de camundongos (murinas);
- uma infecção que está sendo tratada. Se você tem ou pensa que pode ter uma infecção, pergunte ao seu médico se é um tipo de infecção que poderia levar ao aparecimento de eventos adversos graves de **REMICADE®**;
- insuficiência cardíaca, pois você pode não ser um candidato para o tratamento com **REMICADE®**. Seu médico irá decidir se você deve receber **REMICADE®**.

O QUE DEVO SABER ANTES DE USAR ESTE MEDICAMENTO?

Antes de receber o tratamento com **REMICADE®**, você deve informar ao seu médico se:

- tem uma infecção que não passa ou uma história de infecção recorrente.
- teve tuberculose (TB), ou se, recentemente, você esteve em contato com alguém que possa ter TB. O seu médico irá examiná-lo e realizar um teste de pele. Se o médico achar que você corre o risco de ter TB, ele poderá iniciar um tratamento para TB antes de iniciar o tratamento com **REMICADE®**.
- você viveu ou viajou para uma área onde as infecções chamadas histoplasmose, coccidioidomicose ou blastomicose são comuns. Essas infecções são causadas por fungos que podem afetar os pulmões ou outras



partes de seu corpo. Se você não sabe se essas infecções são comuns na área onde viveu ou viajou, pergunte ao seu médico.

- tem insuficiência cardíaca ou já teve ou atualmente tem alguma doença cardíaca. Se você apresentar novos ou agravamento dos sintomas de insuficiência cardíaca, tais como falta de ar ou inchaço dos pés, você deve informar ao seu médico.
- tem ou teve uma condição que afeta o sistema nervoso, como esclerose múltipla, síndrome de Guillain-Barré, ou convulsões, ou se tiver sido diagnosticado com neurite óptica. Você deve informar ao seu médico se sentir dormência, formigamento, distúrbios visuais ou convulsões.
- recebeu recentemente ou está programado para receber uma vacina.
- Se você tiver um bebê durante o tratamento com **REMICADE**[®], informe ao pediatra que você está usando **REMICADE**[®] antes do bebê receber qualquer vacina, incluindo vacinas de vírus vivos, como BCG (usada para a prevenção de tuberculose). Para maiores informações veja os itens relacionados à Gravidez e Amamentação.
- recebeu recentemente ou se estiver programado para receber tratamento com um agente terapêutico infeccioso (tal como instilação de BCG, usada para o tratamento de câncer).

Gravidez

Informe ao seu médico se você está grávida, planeja engravidar ou se está amamentando. Se você tiver um bebê durante o tratamento com **REMICADE**[®], é importante informar ao pediatra e a qualquer outro médico, que você está usando **REMICADE**[®], para que ele possa então decidir quando o seu bebê deverá receber vacinas.

Se você recebeu **REMICADE**[®] enquanto estava grávida, o seu bebê pode ter um risco aumentado de contrair uma infecção. Antes de seu bebê receber qualquer tipo de vacina é importante informar o pediatra e outros profissionais da saúde, que você faz uso de **REMICADE**[®]. A administração de vacina BCG dentro de 6 meses após o nascimento do bebê, de mães que receberam **REMICADE**[®] enquanto estavam grávidas, pode resultar em infecção em recém-nascidos com complicações graves, incluindo morte. Para outros tipos de vacina, discuta com seu médico.

Também foi relatada diminuição grave no número de células brancas do sangue em bebês de mulheres tratadas com **REMICADE**[®] durante a gravidez. Se seu bebê tiver febre ou infecções persistentes, contate o pediatra imediatamente.

Este medicamento não deve ser utilizado por mulheres grávidas sem orientação médica ou do cirurgião-dentista.

Amamentação

Não se sabe se **REMICADE**[®] é excretado no leite humano. Caso você esteja amamentando ou planejando amamentar, converse com seu médico sobre a descontinuação do tratamento com **REMICADE**[®] ou a interrupção da amamentação.

Uso em crianças



REMICADE® não foi estudado em crianças com doença de Crohn ou colite ou retocolite ulcerativa com menos de 6 anos de idade.

Uso em idosos

Não foram conduzidos estudos específicos de **REMICADE®** em pacientes idosos. Em estudos clínicos não foram observadas diferenças importantes na depuração ou no volume de distribuição relacionadas à idade. A incidência de infecções graves nos pacientes com idade \geq 65 anos tratados com **REMICADE®** foi maior do que nos pacientes com idade inferior a 65 anos. Além disso, existe maior incidência de infecções na população de idosos em geral, e por isso, recomenda-se cautela ao tratar pacientes idosos.

Efeitos sobre a capacidade de dirigir veículos e operar máquinas

REMICADE® tem pouca probabilidade de afetar a capacidade de dirigir veículos ou operar máquinas. No entanto, pacientes com fadiga devem ser alertados para evitar tais atividades.

Atenção diabéticos: contém açúcar.

Medicamentos imunossupressores podem ativar focos primários de tuberculose. Os médicos que acompanham pacientes sob imunossupressão devem estar alertas quanto à possibilidade de surgimento de doença ativa, tomando, assim, todos os cuidados para o diagnóstico precoce e tratamento.

Ingestão concomitante com outras substâncias

Em estudos com **REMICADE®**, os pacientes receberam outros medicamentos juntamente a **REMICADE®** para o tratamento de sua doença. Informe ao seu médico se estiver tomando ou tomou recentemente outros medicamentos antes e durante o tratamento com **REMICADE®**, incluindo qualquer outro medicamento para tratar doença de Crohn, colite ulcerativa, artrite reumatoide, espondilite anquilosante, artrite psoriásica ou psoríase em placa. Também informe ao seu médico se você pretende tomar outros medicamentos contendo, especialmente, anacinra ou abatacepte. **REMICADE®** não deve ser tomado com anacinra ou abatacepte.

Você não deve receber vacinas “vivas” enquanto estiver usando **REMICADE®**. Se você tiver um bebê enquanto estiver em tratamento com **REMICADE®**, antes do seu bebê receber qualquer vacina de vírus vivos, informe o pediatra que você usa **REMICADE®**.

Informe ao seu médico ou cirurgião-dentista se você está fazendo uso de algum outro medicamento.

Não use medicamento sem o conhecimento do seu médico. Pode ser perigoso para a sua saúde.

ONDE, COMO E POR QUANTO TEMPO POSSO GUARDAR ESTE MEDICAMENTO?

Conservar **REMICADE®** sob refrigeração (entre 2°C e 8°C). Não congelar.

Número de lote e datas de fabricação e validade: vide embalagem.

Não use medicamento com o prazo de validade vencido. Guarde-o em sua embalagem original.

**Aspecto físico**

REMICADE® é um pó liofilizado branco, sem nenhuma evidência de liquefação e livre de partículas estranhas. Após a reconstituição, a solução é de incolor a amarelada e opalescente. A solução pode desenvolver algumas partículas translúcidas finas, porque o infliximabe é uma proteína. Não use se houver partículas opacas, alteração de cor ou presença de outras partículas estranhas.

Antes de usar, observe o aspecto do medicamento. Caso ele esteja no prazo de validade e você observe alguma mudança no aspecto, consulte o farmacêutico para saber se poderá utilizá-lo.

Todo medicamento deve ser mantido fora do alcance das crianças.

COMO DEVO USAR ESTE MEDICAMENTO?

REMICADE® deve ser administrado na veia, geralmente no braço, por um período de 2 horas, em um centro médico. Se você estiver utilizando o medicamento para o tratamento de artrite reumatoide, após a terceira infusão seu médico poderá decidir administrar **REMICADE®** por um período de 1 hora. Enquanto estiver recebendo **REMICADE®** e por um período após a infusão, você será observado por seu médico ou assistente. Seu médico poderá pedir para você tomar outros medicamentos juntamente a **REMICADE®**.

Preparação e administração:

1. Calcule a dose e o número de frascos-ampola necessários de **REMICADE®**. Cada frasco-ampola contém 100 mg de infliximabe. Calcule o volume total necessário de solução de **REMICADE®** a ser reconstituída.
2. Reconstitua cada frasco-ampola de **REMICADE®** com 10 mL de água para injeção, usando uma seringa equipada com uma agulha de calibre 21 (0,8 mm) ou menor. Cada mL de solução reconstituída contém 10 mg de infliximabe. Retire o revestimento da tampa do frasco e limpe com álcool a 70%. Introduza a agulha da seringa no frasco-ampola através do centro da rolha de borracha e direcione o jato de água para a injeção para a parede de vidro do frasco-ampola. Não use o frasco-ampola se não houver vácuo. Mexa suavemente a solução, rodando o frasco para dissolver o pó liofilizado. Evite agitação forte ou prolongada. **NÃO AGITE**. É comum a formação de espuma na solução reconstituída. Deixe que a solução reconstituída permaneça em repouso por 5 minutos. Verifique se a solução é de incolor a amarelada e opalescente. A solução pode desenvolver algumas partículas translúcidas finas, porque o infliximabe é uma proteína. Não administre se houver partículas opacas, alteração de cor ou presença de outras partículas estranhas.
3. Dilua o volume total da dose da solução reconstituída de **REMICADE®** para 250 mL com solução de cloreto de sódio a 0,9% p/v para infusão. Não dilua a solução de **REMICADE®** reconstituído com qualquer outro diluente. Isso pode ser realizado se retirado da bolsa ou frasco um volume de cloreto de sódio a 0,9% p/v igual ao volume de **REMICADE®** reconstituído a ser introduzido. Introduza lentamente o volume total da solução de **REMICADE®** reconstituída no frasco ou na bolsa de 250 mL para a infusão. Misture suavemente.
4. Administre a solução para infusão em período não inferior ao tempo de infusão recomendado para a indicação específica. Use um equipo para infusão com filtro interno, estéril, não pirogênico, com baixa



ligação a proteínas (poro de tamanho 1,2 micrômetro ou menor). Como não há presença de conservantes, recomenda-se que a administração da solução para infusão seja iniciada assim que possível, em até 3 horas após a reconstituição e diluição. Se a reconstituição e a diluição forem realizadas em condições assépticas, a solução de infusão de **REMICADE®** poderá ser utilizada dentro de 24 horas, se armazenada entre 2 e 8° C. Não estoque a sobra da solução de infusão não utilizada para uso posterior.

5. Não foram conduzidos estudos de compatibilidade física ou bioquímica para avaliar a coadministração de **REMICADE®** com outros agentes. Não administre **REMICADE®** concomitantemente no mesmo equipo com outros agentes.
6. Verifique visualmente os produtos parenterais, procurando partículas ou alteração de cor antes da administração. Não use se houver partículas opacas, alteração de cor ou partículas estranhas visíveis.
7. Descarte a parte não utilizada da solução.

ATENÇÃO: O FRASCO-AMPOLA E OS MATERIAIS PARA INJEÇÃO DEVEM SER DESCARTADOS APÓS O USO. COLOQUE AS SERINGAS E AS AGULHAS DE MODO SEGURO EM UM RECIPIENTE ADEQUADO.

Posologia:

Doença de Crohn ou Doença de Crohn fistulizante

Adulto ou criança receberá a dose de **REMICADE®** seguida de doses adicionais nas semanas 2 e 6, após a primeira dose. Você irá receber uma dose a cada 8 semanas. Seu médico irá observar sua resposta a **REMICADE®** e poderá ajustar a dose.

Colite ou Retocolite Ulcerativa

Se você for um adulto, criança ou adolescente, receberá a dose de **REMICADE®** seguida de doses adicionais nas semanas 2 e 6, após a primeira dose. Você irá receber uma dose a cada 8 semanas. Seu médico irá observar sua resposta ao **REMICADE®** e, se você for um adulto, poderá ajustar a dose.

Artrite Reumatoide

Você inicialmente receberá três doses de **REMICADE®**. A primeira dose será seguida de doses adicionais nas semanas 2 e 6, após a primeira dose. Você irá receber uma dose a cada 8 semanas. Seu médico irá observar sua resposta ao **REMICADE®** e poderá ajustar a dose ou sua frequência (a cada 4 semanas). Seu médico também dará metotrexato ou você precisará continuar tomando-o.

Espondilite Anquilosante

Você inicialmente receberá três doses de **REMICADE®**. A primeira dose será seguida de doses na semana 2 e 6 após a primeira dose. Você vai então receber uma dose a cada 6 a 8 semanas.

Artrite Psoriásica



Você irá receber inicialmente três doses de **REMICADE®**. A primeira dose será seguida de doses na semana 2 e 6 após a primeira dose. Você vai então receber uma dose a cada 8 semanas.

Psoríase em placa

Você irá inicialmente receber três doses de **REMICADE®**. A primeira dose será seguida de doses na semana 2 e 6 após a primeira dose. Você vai então receber uma dose a cada 8 semanas.

Siga a orientação de seu médico, respeitando sempre os horários, as doses e a duração do tratamento. Não interrompa o tratamento sem o conhecimento do seu médico.

O QUE DEVO FAZER QUANDO EU ME ESQUECER DE USAR ESTE MEDICAMENTO?

Se você esquecer de comparecer ao centro médico para receber seu tratamento, entre em contato com o seu médico imediatamente.

Em caso de dúvidas, procure orientação do farmacêutico ou de seu médico, ou cirurgião-dentista.

QUAIS OS MALES QUE ESTE MEDICAMENTO PODE ME CAUSAR?

Os eventos adversos mais comuns de **REMICADE®** são infecções respiratórias (como bronquite, sinusite, resfriado), dor, febre, dor de cabeça, náusea, vômito, diarreia, tontura, tosse, erupção cutânea e cansaço.

Os motivos mais comuns para os pacientes pararem o tratamento com **REMICADE®** são porque estes apresentaram uma reação durante a administração, tal como falta de ar, erupções cutâneas e dor de cabeça.

Eventos adversos graves que podem exigir tratamento podem ocorrer durante o tratamento com **REMICADE®**.

Os possíveis eventos adversos graves de **REMICADE®** incluem:

Infecções graves

Alguns pacientes, especialmente aqueles com 65 anos ou mais, tiveram infecções graves ao receber **REMICADE®**, incluindo tuberculose e infecções sistêmicas bacterianas, fúngicas e virais. Alguns pacientes morreram devido a essas infecções. O uso de vacinas “vivas” pode resultar em uma infecção causada pelos vírus ou bactérias “vivas” contidas na vacina (quando você tem um sistema imunológico enfraquecido). Se você apresentar febre, cansaço, tosse ou sintomas de gripe durante ou após receber **REMICADE®**, informe ao seu médico imediatamente, pois estes podem ser sinais de que você está com infecção.

Insuficiência cardíaca congestiva

Se você tem insuficiência cardíaca e iniciou o tratamento com **REMICADE®**, o seu estado de insuficiência deve ser monitorado de perto por seu médico. Se você apresentar novos ou agravamento dos sintomas de insuficiência cardíaca, como falta de ar ou inchaço nos pés, deve contatar o seu médico imediatamente.

Outros problemas no coração



Alguns pacientes tiveram ataque do coração (alguns levando ao óbito), baixo fluxo de sangue para o coração ou ritmo anormal do coração dentro de 24 horas após o início da infusão com **REMICADE**[®]. Os sintomas podem incluir desconforto ou dor no peito, dor no braço, dor no estômago, encurtamento da respiração, ansiedade, desmaio, tontura, sudorese, náusea, vômito, ritmo alterado ou sensação de aperto no peito, batidas rápidas ou lentas do coração. Contate seu médico imediatamente se você apresentar estes sintomas.

Reações alérgicas

Alguns pacientes têm reações alérgicas graves ao **REMICADE**[®]. Essa reação pode ocorrer enquanto você estiver começando sua infusão ou pouco depois. Os sintomas de uma reação alérgica podem incluir urticária, dificuldade de respirar, dor no peito e pressão sanguínea alta ou baixa. O seu médico pode decidir diminuir a velocidade ou parar a administração de **REMICADE**[®] e administrar uma medicação para tratar a reação alérgica.

Algumas reações alérgicas são tardias e foram vistas 3 a 12 dias após o tratamento com **REMICADE**[®]. Os sintomas desse tipo de reação tardia incluem dor muscular ou nas articulações com febre ou erupção cutânea. Informe ao seu médico se você apresentar qualquer um desses sintomas após o tratamento com **REMICADE**[®].

Sintomas semelhantes aos do lúpus

Alguns pacientes tratados com **REMICADE**[®] apresentaram sintomas que podem assemelhar-se aos do lúpus. Estes sintomas podem incluir desconforto ou dor prolongada no peito, falta de ar, dor nas articulações, ou uma erupção sensível ao sol nas bochechas ou nos braços. Informe ao seu médico se você apresentar algum desses sintomas. O seu médico irá avaliá-lo(a) e pode decidir interromper o tratamento com **REMICADE**[®].

Câncer

Relatos de um tipo de câncer de sangue chamado linfoma em pacientes usando **REMICADE**[®] ou outros bloqueadores de TNF são raros, mas ocorrem mais frequentemente do que o esperado para as pessoas em geral. Pessoas com artrite reumatoide, doença de Crohn, espondilite anquilosante ou artrite psoriásica tratadas por um longo tempo, principalmente aquelas com doença altamente ativa, podem ser mais propensas a desenvolver linfoma. Cânceres, exceto linfoma, também têm sido relatados. Houve casos de câncer, incluindo os tipos incomuns, em pacientes crianças e adolescentes tomando agentes bloqueadores de TNF, que, por vezes, resultaram em morte. Alguns pacientes que receberam bloqueadores de TNF, incluindo **REMICADE**[®], desenvolveram um tipo raro de câncer chamado linfoma de célula-T hepatoesplênica. A maioria desses pacientes era de adolescentes ou adultos jovens do sexo masculino, dos quais a maioria tinha doença de Crohn ou colite ulcerativa ou retocolite ulcerativa. Esse tipo de câncer, geralmente, resulta em morte. Quase todos esses pacientes também receberam medicamentos conhecidos, como a azatioprina ou 6-mercaptopurina em adição aos bloqueadores de TNF. Pacientes com um tipo específico de doença pulmonar chamada Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) podem apresentar aumento do risco de câncer com o tratamento com **REMICADE**[®]. Se você tem DPOC, discuta com seu médico se **REMICADE**[®] é adequado para você.



Para crianças e adultos tomando medicamentos bloqueadores de TNF, a chance de ter linfoma ou outro câncer pode aumentar. Você deve informar ao seu médico se teve ou se desenvolver linfoma ou outros cânceres enquanto estiver em tratamento com **REMICADE**[®].

Alguns pacientes tratados com **REMICADE**[®] desenvolveram certos tipos de câncer de pele. Converse com seu médico se ocorrerem quaisquer mudanças no aspecto da pele ou crescimentos na pele, durante ou após a terapia.

Algumas mulheres com artrite reumatoide em tratamento com **REMICADE**[®] desenvolveram câncer de colo de útero. Para algumas mulheres recebendo **REMICADE**[®], incluindo aquelas com mais de 60 anos de idade, seu médico pode recomendar que você faça um acompanhamento regular e contínuo para câncer de colo de útero.

Lesão no fígado

Foram observados casos de pessoas que desenvolveram problemas hepáticos graves tomando **REMICADE**[®], alguns fatais. Os sinais de que você poderia ter um problema incluem: icterícia (pele e olhos amarelados), urina de cor marrom-escuro, dor no lado direito do abdome, febre e fadiga intensa (cansaço). Você deve contatar o seu médico imediatamente se apresentar qualquer um destes sintomas.

Hepatite B

O tratamento com agentes bloqueadores de TNF, como **REMICADE**[®], pode resultar em uma reativação do vírus da hepatite B em pessoas portadoras desse vírus. Se você tem ou teve hepatite B ou sabe ou suspeita que seja portador do vírus da hepatite B, não esqueça de informar o seu médico sobre isso, pois pode afetar a decisão de iniciar ou continuar o tratamento com **REMICADE**[®]. Seu médico deve solicitar um exame de sangue para o vírus da hepatite B antes de você iniciar o tratamento com **REMICADE**[®].

Problemas no sangue

Em alguns casos, os pacientes tratados com agentes bloqueadores do TNF podem apresentar baixa contagem dos elementos do sangue, incluindo uma diminuição grave do número de células brancas do sangue. Se você apresentar sintomas como febre ou infecções persistentes, sangramento ou hematoma, entre em contato com seu médico imediatamente.

Derrame

Alguns pacientes tiveram derrame dentro de aproximadamente 24 horas do momento da infusão de **REMICADE**[®]. Contate seu médico imediatamente se você tiver sintomas de derrame, que podem incluir: formigamento ou fraqueza na face, braço ou perna, especialmente quando afeta somente um lado do corpo; confusão repentina, problemas repentinos na fala ou compreensão, problema repentino na visão em um ou ambos os olhos, problemas repentinos para andar, tontura, perda de equilíbrio ou coordenação, ou uma dor de cabeça grave repentina.

Outras



Qualquer medicamento pode ter eventos adversos. Essa não é uma lista completa de eventos adversos. Por favor, informe ao seu médico se sentir qualquer sintoma anormal.

Informe ao seu médico, cirurgião-dentista ou farmacêutico o aparecimento de reações indesejáveis pelo uso do medicamento. Informe também à empresa através do seu serviço de atendimento.

O QUE FAZER SE ALGUÉM USAR UMA QUANTIDADE MAIOR DO QUE A INDICADA DESTE MEDICAMENTO?

Em caso de superdose, recomenda-se que os pacientes sejam acompanhados em relação a sinais e sintomas de reações ou efeitos adversos e que seja, imediatamente, instituído tratamento sintomático apropriado.

Em caso de uso de grande quantidade deste medicamento, procure rapidamente socorro médico e leve a embalagem ou bula do medicamento, se possível. Ligue para 0800 722 6001, se você precisar de mais orientações.



(FABRICANTE: SCHERING-PLOUGH (BRINNY) COMPANY / EMBALADOR: SCHERING-PLOUGH LABO N.V.)

DIZERES LEGAIS

MS- 1.1236.3403.

Farm. Resp.: Marcos R. Pereira– CRF/SP nº 12.304

Registrado por:

JANSSEN-CILAG FARMACÊUTICA LTDA.

Rua Gerivatiba, 207, São Paulo – SP

CNPJ 51.780.468/0001-87

Fabricado por:

Schering-Plough (Brinny) Company, County Cork – Irlanda.

Embalado por:

Schering-Plough Labo N.V., Heist-op-den-berg - Bélgica

Importado por:

Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda.

Rodovia Presidente Dutra, km 154

São José dos Campos - SP

CNPJ 51.780.468/0002-68

SAC 0800 7011851

www.janssen.com.br

® Marca Registrada.

Venda sob prescrição médica.

Esta bula foi aprovada pela ANVISA em 04/12/2015.

CCDS 1510

VP06





(FABRICANTE: SCHERING-PLOUGH (BRINNY) COMPANY / EMBALADOR: CILAG AG)

DIZERES LEGAIS

MS- 1.1236.3403.

Farm. Resp.: Marcos R. Pereira– CRF/SP nº 12.304

Registrado por:

JANSSEN-CILAG FARMACÊUTICA LTDA.

Rua Gerivatiba, 207, São Paulo – SP

CNPJ 51.780.468/0001-87

Fabricado por:

Schering-Plough (Brinny) Company, County Cork – Irlanda

Embalado por:

Cilag AG, Schaffhausen – Suíça

Importado por:

Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda.

Rodovia Presidente Dutra, km 154

São José dos Campos - SP

CNPJ 51.780.468/0002-68

SAC 0800 7011851

www.janssen.com.br

® Marca Registrada.

Venda sob prescrição médica.

Esta bula foi aprovada pela ANVISA em 04/12/2015.

CCDS 1510

VP06





(FABRICANTE: CILAG AG / EMBALADOR: SCHERING-PLOUGH LABO N.V.)

DIZERES LEGAIS

MS- 1.1236.3403.

Farm. Resp.: Marcos R. Pereira– CRF/SP nº 12.304

Registrado por:

JANSSEN-CILAG FARMACÊUTICA LTDA.

Rua Gerivatiba, 207, São Paulo – SP

CNPJ 51.780.468/0001-87

Fabricado por:

Cilag AG, Schaffhausen - Suíça

Embalado por:

Schering-Plough Labo N.V., Heist-op-den-berg - Bélgica

Importado por:

Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda.

Rodovia Presidente Dutra, km 154

São José dos Campos - SP

CNPJ 51.780.468/0002-68

SAC 0800 7011851

www.janssen.com.br

® Marca Registrada.

Venda sob prescrição médica.

Esta bula foi aprovada pela ANVISA em 04/12/2015.

CCDS 1510

VP06





(FABRICANTE: CILAG AG / EMBALADOR: CILAG AG)

DIZERES LEGAIS

MS- 1.1236.3403.

Farm. Resp.: Marcos R. Pereira– CRF/SP nº 12.304

Registrado por:

JANSSEN-CILAG FARMACÊUTICA LTDA.

Rua Gerivatiba, 207, São Paulo – SP

CNPJ 51.780.468/0001-87

Fabricado por:

Cilag AG., Schaffhausen - Suíça

Importado por:

Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda.

Rodovia Presidente Dutra, km 154

São José dos Campos - SP

CNPJ 51.780.468/0002-68

SAC 0800 7011851

www.janssen.com.br

® Marca Registrada.

Venda sob prescrição médica.

Esta bula foi aprovada pela ANVISA em 04/12/2015.

CCDS 1510

VP06

