

CARLOS VIEIRA DO CARMO

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO AO DNA E EXPRESSÃO
TECIDUAL DA PROTEÍNA *p53* NA MUCOSA CÓLICA DE SEGMENTOS PROVIDOS
E DESPROVIDOS DE TRÂNSITO FECAL.
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

BRAGANÇA PAULISTA

2010

CARLOS VIEIRA DO CARMO

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO AO DNA E EXPRESSÃO
TECIDUAL DA PROTEÍNA P53 NA MUCOSA CÓLICA DE SEGMENTOS PROVIDOS
E DESPROVIDOS DE TRÂNSITO FECAL.
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

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

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

BRAGANÇA PAULISTA

2010

WI 522 Carmo, Carlos Vieira do.
C285a Avaliação dos níveis de estresse oxidativo ao DNA e expressão tecidual da proteína p53 na mucosa cólica de segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal: estudo experimental em ratos / Carlos Vieira do Carmo. -- Bragança Paulista, 2010. 75 p.

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

Orientação de: Carlos Augusto Real Martinez.

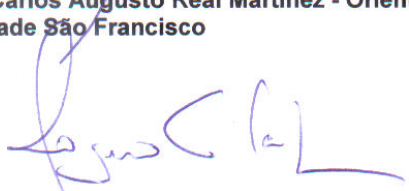
1. Colite. 2. Cólon. 3. Estresse oxidativo. 4. Dano ao DNA. 5. Ácidos graxos voláteis. 6. Ensaio em cometa. 7. Proteína supressora de tumor p53. I. Martinez, Carlos Augusto Real. II. Título.



CARMO, Carlos Vieira do. “Avaliação dos níveis de estresse oxidativo ao DNA e expressão tecidual da proteína P53 na mucosa cólica de segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal. Estudo experimental em ratos”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em um de Julho de 2010 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez - Orientador e Presidente
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Rogério Tadeu Palma
Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo



Prof. Dr. Alessandra Gambero
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA	Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS	Rod. Gen. Milton Tavares de Lima, 1572 - CEP 13083-680 - Distrito de Barão Geraldo - Fone: (19)3754-3300
CÂMPUS DE ITATIBA	Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO	Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos estudantes.

Espero assim, agradecer aos meus pais por terem me ensinado a importância de ser um deles. E por terem proporcionado a chance de continuar sendo um estudante, até os dias de hoje.

Espero poder ser um exemplo para os meus filhos, pequenos estudantes, para que percebam que, embora muito longa e infinita, é uma estrada valiosa. E que também é um caminho sem volta, sendo que isto é muito bom. Faz crescer.

Também quero lembrar e lamentar por aqueles que não puderam ou não quiseram estudar, por questões pessoais ou por não entenderem a importância de se manter um estudante.

Gostaria que os meus estudantes soubessem que também por eles continuo a estudar e gostaria que lembrassem que fiz parte, em algum momento, da sua formação de estudante. Com muito orgulho.

Ao meu atual professor e orientador, eterno estudante, por não ter desistido deste aluno que aqui escreve, pois somente ele sabe o quanto foi difícil estudar uma forma para não desistir.

Obrigado Professor Martinez.

E por fim, obrigado a Deus, o nosso grande mestre.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Doutores **MARCELO LIMA RIBEIRO e DEMETRIUS PAIVA ARÇARI**, pelo inestimável auxílio na quantificação dos níveis danos ao DNA, realizado no **LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR da UNIDADE DE FARMACOLOGIA E GASTROENTEROLOGIA (UNIFAG)** da Universidade São Francisco;

Ao Professor Mestre **JOSÉ AIRES PEREIRA**, pela imprescindível dedicação na realização das avaliações histológicas e imunoistoquímicas, realizadas durante o estudo;

A Professora Doutora **IZILDA APARECIDA CARDINALLI** pela interpretação do estudo histológico e imunoistoquímico realizados durante o estudo;

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

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

A Professora Doutora **HELGA GEREMIAS GOUVEIA** pela orientação e auxílio nas correções e manuseio dos recursos da informática;

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

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

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

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

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

A **MANTENEDORA CASA NOSSA SENHORA DA PAZ** que me proporcionou como
bolsista da instituição o complemento do curso de Mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADRO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	06
2.1. Colite de exclusão.....	06
2.2. Radicais livres de oxigênio.....	16
2.3. Colite experimental e estresse oxidativo.....	18
2.4. Proteína p53, colite e câncer colorretal.....	22
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4. MÉTODO.....	30
4.1. Animal de experimentação.....	30
4.2. Grupos experimentais.....	30
4.3. Período pré-operatório.....	30
4.4. Técnica anestésica.....	31
4.5. Técnica cirúrgica.....	31
4.6. Pós-operatório.....	35
4.7. Sacrifício dos animais.....	35
4.8. Técnica histológica.....	36
4.9. Confecção dos blocos de parafina e laminas.....	37
4.10. Técnica imunoistoquímica.....	38
4.11. Eletroforese em gel de célula isolada (ensaio do cometa).....	40
4.12. Método estatístico.....	42
5. RESULTADOS.....	44
6. DISCUSSÃO.....	50
7. CONCLUSÕES.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
9. FONTES CONSULTADAS.....	73
10. ANEXO.....	74

11. APÊNDICE..... 75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto da placa de Peyer como reparo anatômico.....	32
Figura 2 – Foto da ligadura da artéria marginal.....	33
Figura 3 – Foto da limpeza mecânica anterógrada do cólon excluído de trânsito fecal.....	34
Figura 4 – Foto do aspecto final da parede abdominal após confecção dos estomas.....	34
Figura 5 - Foto mostrando a avaliação dos níveis de estresse oxidativo (<i>Tail Moment</i>), pelo ensaio do cometa. A – Célula normal; B – Célula com dano oxidativo moderado; C – Célula com dano oxidativo intenso.....	42
Figura 6 – Fotomicrografia da parede do cólon provido de trânsito fecal após 18 semanas. HE 100x.....	44
Figura 7 – Fotomicrografia da parede do cólon desprovido de trânsito de por 18 semanas. Ulceração epitelial (seta amarela). Infiltrado neutrofílico (seta azul). HE 100x.....	45
Figura 8 – Escore inflamatório comparando os subgrupos controle e experimento (cólores com e sem trânsito) nos diferentes períodos de exclusão. **significante (sem trânsito x controle e com trânsito). Teste de Mann-Whitney.....	46
Figura 9 – Níveis de estresse oxidativo ao DNA comparando os subgrupos controle e experimento (cólores com e sem trânsito) nos diferentes tempos de exclusão. **significante (sem trânsito x controle e com trânsito). Teste t de Student.....	47
Figura 10 – Variação dos valores médios mensurados para número de úlceras epiteliais, escore de graduação inflamatória e níveis de estresse oxidativo no cólon desprovido de trânsito fecal em relação aos diferentes tempos de exclusão..	48
Figura 11 – A - Controle positivo para proteína p53; B – controle negativo para proteína p53; C – Cólon com trânsito fecal após 18 semanas de exclusão intestinal (proteína p53 negativa); D – Cólon sem trânsito fecal após 18 semanas de exclusão intestinal (proteína p53 negativa). (IH. p53 200x).....	49

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Escala de graduação do escore inflamatório (Gupta et al., 2007).....	37
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

5-ASA	Ácido 5-aminosalicílico
8-OHdG	8-hidroxideoxiguanosina
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
C	Citosina
CAT	Catalase
CCR	Câncer Colorretal
CE	Colite de exclusão
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DII	Doença inflamatória intestinal
DP	Desvio padrão
DSS	Sulfato Sódico Dextran
EDTA	Etileno diamino tetracético
EtBr	Brometo de etídio
F	French
FDA	Diacetato de fluoresceína
G	Guanina
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida

GSH-rd	Glutathiona redutase
HE	Hematoxilina-eosina
$\text{HO}_2^\bullet$	Hidroperoxila
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IC	Intervalo de confiança
iNOS	Óxido nítrico sintase
μl	Microlitros
M	Molar
mA	Miliampér
mc	Muco
MM	Muscular da mucosa
mM	Milimolar
MP	Muscular própria
<i>MUC-2</i>	Gene <i>MUC-2</i>
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzida
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Óxido de sódio
NF- $\kappa\beta$	Fator nuclear kappa-beta
$\text{O}_2^\bullet$	Superóxido
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlet

OH ⁻	Hidroxila
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PGE-2	Prostaglandina E-2
PBS	Tampão fosfato
RCUI	Retocolite ulcerativa inespecífica
RLO	Radicais livres de oxigênio
SM	Submucosa
SOD	Superóxido dismutase
<i>SPF</i>	<i>Specific free parasitis</i>
<i>TM</i>	<i>Tail moment</i>
TNBS	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
UNIFAG	Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia
V	Volts

RESUMO

INTRODUÇÃO: Estudos vêm demonstrando que a maior possibilidade do desenvolvimento de câncer colorretal em portadores de colite ulcerativa encontra-se relacionada à maior incidência de mutações do gene *p53* ocasionadas por dano oxidativo ao DNA nuclear. A semelhança do que ocorre na colite ulcerativa, os radicais livres de oxigênio também se encontram relacionados ao desenvolvimento da colite de exclusão. Enquanto a possibilidade do desenvolvimento de câncer colorretal em portadores de colite ulcerativa é uma possibilidade comum, em doentes submetidos à derivação intestinal por moléstias não relacionadas às doenças inflamatórias intestinais que desenvolveram colite de exclusão, é extremamente raro. Até o momento não foi estudada a presença de mutações no gene *p53* em modelos experimentais de colite de derivação. **OBJETIVO:** Verificar a relação entre dano oxidativo do DNA e mutações na proteína *p53* em modelo experimental de colite de exclusão. **MÉTODOS:** Quarenta e cinco ratos Wistar foram divididos em três grupos com 15 animais segundo o sacrifício ter sido realizado seis, 12 e 18 semanas após o procedimento cirúrgico. Para cada grupo, 10 animais foram submetidos à derivação do trânsito intestinal por meio de colostomia proximal no cólon esquerdo e fístula mucosa distal (grupo experimento) e cinco exclusivamente a laparotomia sem derivação do trânsito intestinal (grupo controle). Avaliou-se histologicamente a presença de colite com escala de graduação inflamatória. A pesquisa de mutações na proteína *p53* foi avaliada por imunoistoquímica com anticorpo primário específico para ratos. A medida do estresse oxidativo foi feita pela técnica do ensaio do cometa. Foram utilizados testes *t* de Student, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, estabelecendo-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). **RESULTADOS:** Nos segmentos desprovidos de trânsito fecal existe maior grau de inflamação quando comparado aos tecidos com trânsito fecal preservado ($p = 0,001$). Os níveis de estresse oxidativo foram significativamente maiores nos segmentos desprovidos de trânsito ($p < 0,0001$) quando comparados aos segmentos providos de trânsito e aumentavam com o progredir do tempo de exclusão ($p = 0,007$). Os níveis de estresse oxidativo encontram-se diretamente relacionados ao maior grau de inflamação tecidual. Não houve mutações na proteína *p53* nos segmentos excluídos de trânsito fecal, independente do tempo de exclusão considerado. **CONCLUSÃO:** Os resultados encontrados nas condições do presente estudo mostram que, apesar de ocorrer maior dano oxidativo ao DNA em segmentos desprovidos de trânsito fecal não foi possível encontrar mutações na proteína *p53*.

Palavras chave: Colite. Cólon. Estresse oxidativo. Dano ao DNA. Ácidos graxos voláteis. Ensaio em cometa. Proteína Supressora de Tumor *p53*.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Studies have shown that the increased possibility of developing colorectal cancer in patients with ulcerative colitis is related to a higher incidence of p53 mutations caused by oxidative damage to nuclear DNA. Similarity to what occurs in ulcerative colitis the oxygen free radicals are also related to the development of diversion colitis. While the possibility of developing colorectal cancer in patients with UC is a common possibility, in patients undergoing to the diversion of the fecal stream for diseases not related to inflammatory bowel disease that developed diversion colitis is exceptional. So far not been studied for mutations in the p53 gene in experimental models of colitis derivation. **OBJECTIVE:** The aim of this study was investigated the levels of oxidative DNA damage and mutations in the p53 protein in an experimental model of diversion colitis. **METHODS:** Forty-five rats were divided into three groups with 15 animals in accordance with the sacrifice was carried out six, 12 and 18 weeks after surgery. For each group, 10 animals were subjected to diversion of the fecal stream through colostomy in the left proximal colon and distal mucous fistula (experimental group), and five submitted only to a laparotomy without deviation of the fecal stream (control group). We evaluated histologically the presence of colitis with inflammatory grading scale. The search for mutations in the p53 protein was evaluated by immunohistochemistry with primary monoclonal antibody specific for rats. The measure of oxidative DNA damage was detected using the comet assay. To analyze of variables were used the Student's t, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis, test establishing a significance level of 5% ($p < 0.05$). **RESULTS:** In segments without fecal stream we found greater degree of inflammation when compared to animals with preserved fecal stream ($p = 0.001$). The levels of oxidative stress were significantly higher in segments without fecal stream ($p < 0.0001$) compared to segments with fecal transit and increased with the time ($p = 0.007$). The levels of oxidative stress are directly related to the greater degree of tissue inflammation. There were no mutations in the p53 protein in the segments deprived of fecal stream, regardless of time of exclusion considered. **CONCLUSION:** The results indicate that in conditions of this study that occur, despite higher levels of oxidative damage to nuclear DNA segments without fecal stream that developed colitis we could not find mutations in the p53 protein.

Key words: Colitis. Colon. Oxidative stress. DNA damage. Fatty acids, Volatile. Comet assay. Tumor Suppressor Protein p53.

1. INTRODUÇÃO

Os radicais livres de oxigênio (RLO), vem sendo responsabilizados pela etiopatogenia de diversas formas de colites. Merece destaque a retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) e colite de exclusão (CE) (Ferreira e Matsubara, 1997; Shami e Moreira, 2004; Pravda, 2005; Berra e Menck, 2006; Martinez et al., 2008). Atualmente um número cada vez maior de pesquisas vem avaliando a ação dos RLO na agressão inicial e na manutenção da inflamação à mucosa cólica encontrada em ambas as enfermidades (Sheehan e Brynjolfsson, 1960; Billota e Wayne, 1989; Bondy e Le Bel, 1993; Cadenas e Davies, 2000; Keher, 2000; Cetinkaya et al., 2005; Pravda, 2005; Martinez et al., 2008).

Potencialmente, todas as células vivas produzem RLO durante os processos metabólicos para obtenção de energia (Ferreira e Matsubara, 1997). Quando produzidos em excesso tornam-se nocivos às células lesando diferentes estruturas e organelas celulares. Para neutralizá-los as células possuem sistemas de defesas antioxidantes, que neutralizam a toxicidade dos RLO. Esses sistemas são responsáveis pela homeostase entre produção e neutralização destes compostos (Bondy e Le Bel, 1993; Cadenas e Davies, 2000). Quando existe desequilíbrio entre formação e capacidade de neutralização surge fenômeno conhecido como estresse oxidativo (Ferreira e Matsubara, 1997; Bondy e Le Bel, 1993; Cadenas e Davies, 2000; Fillmann et al., 2007). Como são moléculas eletrofílicas com intensa atividade reativa, atacam e danificam substâncias com alta densidade de elétrons, tais como as bases nitrogenadas que formam o DNA (Battacharya e Barton, 2001; Seril et al., 2003). Dentre os mecanismos mais bem estudados de dano ao DNA provocado por RLO, encontra-se a oxidação da base guanina onde ocorre à incorporação de um radical hidroxil ($\text{OH}^\cdot$) no

carbono oito da molécula, formando a 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG). Durante o processo de duplicação do DNA, a molécula de guanina normal pareia-se com a citosina (G-C). Contudo, caso ocorra a formação da 8-OHdG, por um fenômeno conhecido como transversão de bases, a guanina oxidada pareia-se, de forma errônea, com a molécula de timina (G-C→G-T) (Ribeiro et al., 2008). Caso este erro de pareamento não seja reconhecido pela proteína p53 e prontamente corrigido pelas proteínas de reparo do DNA, haverá transcrição de um RNA mensageiro alterado que, conseqüentemente, traduzirá uma proteína defeituosa. Caso esta proteína mutante esteja relacionada aos mecanismos de controle do ciclo celular (proliferação/apoptose), a célula poderá desenvolver autonomia proliferativa ou imortalidade, características inerentes às células neoplásicas (Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2008).

Estudos têm demonstrado que nos doentes com RCUI que desenvolvem CCR, o gene *p53*, importante gene supressor de tumor, apresenta freqüentemente transversões de bases, e que o estresse oxidativo é o principal mecanismo responsável por esses erros de pareamento (Takesue et al., 2001; Seril et al., 2003). Como consequência a mutação no gene *p53* determina a tradução de uma proteína p53 defeituosa. Essa evidência foi confirmada experimentalmente, quando se demonstrou, em modelos de colite quimicamente induzida por sulfato sódico de dextran (DSS), que a exposição da mucosa cólica a altas concentrações da substância e por tempo prolongado, também ocasiona transversões de bases nitrogenadas no gene *p53* levando ao aparecimento de uma proteína mutante (Takesue et al., 2001; Vetuchi et al., 2002; Fuji et al., 2004). Reforçam ainda mais essa possibilidade, resultados de estudos demonstrando que camundongos deficientes para o gene *p53*, tanto homozigotos (*p53^{-/-}*) quanto

heterozigotos ($p53^{+/-}$), quando expostos ao DSS apresentam maior incidência de mutações na proteína p53 e CCR (Vetuchi et al., 2002; Fuji et al., 2004). Todas essas evidências demonstram a importância da preservação do gene *p53* para o reconhecimento de mutações relacionadas ao CCR, bem como a capacidade dos RLO ocasionarem dano oxidativo a esse gene (Vetuchi et al., 2002; Fuji et al., 2004).

Nos doentes com RCUI, quanto mais intensa, contínua e duradoura for à agressão inflamatória a mucosa cólica maior será o ritmo de renovação celular (*turnover*) (Seril et al., 2003). Com a maior renovação celular, maiores são as chances de que eventuais erros de pareamento de bases possam não ser reconhecidos pela proteína p53 selvagem e corrigidos pelas proteínas de reparo, sendo transmitidos a gerações de células subseqüentes (Seril et al., 2003; Pravda, 2005). Ao considerar-se que o desenvolvimento do CCR em portadores de RCUI surge a partir do processo inflamatório crônico a mucosa cólica, e que a produção excessiva de RLO no epitélio inflamado danifica as bases nitrogenadas do DNA, é possível que o estresse oxidativo possa estar implicado nas diferentes etapas da carcinogênese em doentes com diferentes formas de colite. Talvez, essa seja uma das explicações para o maior risco do desenvolvimento do CCR nos portadores de RCUI com longo tempo de evolução, extenso comprometimento mucoso e maior atividade inflamatória (Seril et al., 2003).

Portadores de CE apresentam aspectos clínicos, endoscópicos, macroscópicos e microscópicos semelhantes aos encontrados na RCUI. Muitas vezes a semelhança entre as duas enfermidades torna difícil o diagnóstico diferencial (Glotzer et al., 1981; Hass e Hass, 1988). A semelhança do que ocorre na RCUI, a mucosa cólica nos doentes com CE também é exposta a agressão inflamatória contínua que, em alguns casos, pode perdurar por longos períodos. Essa possibilidade é confirmada quando se constata que o

restabelecimento do trânsito fecal somente é realizado em 57% dos doentes submetidos a estomas temporários, condenando os demais a conviverem com a inflamação crônica pelo resto de suas vidas (Habr-Gama et al., 1997; Curi et al., 2002). Naqueles cujo trânsito intestinal é restabelecido, o período médio para reconstituição varia de seis a oito meses, podendo chegar até 60 meses, tempo este mais do que suficiente para instalação da doença (Habr-Gama et al., 1997; Curi et al., 2002). Como ocorre na RCUI, a CE também pode acometer grande extensão mucosa, dependendo do local onde foi confeccionado o estoma derivativo e do tamanho do remanescente cólico excluído de trânsito.

Recentes estudos utilizando modelos experimentais de CE demonstraram, de modo similar ao que ocorre em modelos de RCUI, que a mucosa cólica desprovida de trânsito fecal sofre estresse oxidativo (Martinez et al., 2008; Martinez, 2009). Esses estudos mostraram que células epiteliais do cólon excluído estão submetidas à maior estresse oxidativo de seu DNA quando comparadas as do cólon com trânsito preservado e que estes maiores níveis encontram-se relacionados à gravidade da inflamação e ao tempo de exclusão. Todavia, apesar das semelhanças clínicas, histológicas e, até mesmo terapêuticas entre as duas enfermidades, o desenvolvimento de CCR em segmentos excluídos de trânsito, de doentes submetidos à derivação intestinal por moléstias diferentes das doenças inflamatórias intestinais, o CCR ainda não foi descrito, mesmo naqueles enfermos submetidos à exclusão intestinal por longos períodos.

Nenhum estudo avaliou, em modelos experimentais de CE, a possibilidade de que o estresse oxidativo possa ocasionar mutações no gene *p53* e, conseqüentemente na proteína *p53* por ele transcrita, tal como ocorre nos modelos de colite quimicamente induzida e em seres humanos com RCUI. Caso seja possível confirmar que mutações na

proteína *p53*, ocorrem com menor frequência nos modelos de CE, talvez a manutenção funcional da proteína selvagem possa ser uma das possíveis explicações para a menor ocorrência de CCR nesses doentes. Todavia, essa possibilidade ainda não foi avaliada.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Colite de Exclusão

A exclusão do trânsito fecal é capaz de deflagrar processo inflamatório na mucosa cólica, situação conhecida como CE (Glutzer et al.,1981). Pelas semelhanças com a RCUI muitos autores vêm chamando a atenção para a importância do diagnóstico correto, principalmente nos doentes submetidos à derivação intestinal, por complicações decorrentes da RCUI (Bosshardt e Abel, 1984; Geraghty e Talbot, 1991; Lavoine et al.,1996).

A enfermidade ocorre em sujeitos submetidos derivação fecal por diferentes entidades clínicas, representadas, principalmente, pelas neoplasias obstrutivas do cólon, moléstia diverticular complicada, trauma ano-reto-cólico, afecções neurológicas, malformações congênitas anorretais ou para diminuir a gravidade das fístulas surgidas nas anastomoses confeccionadas à jusante do estoma derivativo (Korelitz et al., 1985; Haas e Haas, 1988; Ordein et al., 1992; Keli et al., 1997; Edwards et al.,1999a; Edwards et al., 1999b; Frisbie et al., 2000; Bax e McNevin, 2007; Koutroubakis, 2008). O processo inflamatório pode se desenvolver, a semelhança do que ocorre no cólon excluído em segmentos intestinais desprovidos de trânsito fecal utilizados para reconstituição da bexiga, ureteres ou confecção de neo-vaginas (Toolenaar et al., 1993; Solomon et al., 1998; Syed et al., 2001; Desrayaud et al., 2003; Abbasakoor et al., 2004). A frequência da CE parece estar aumentando proporcionalmente à realização de estomas para derivação intestinal (Habr-Gama et al.,1997; Curi et al., 2002).

Geralmente a CE surge cerca de três meses após confecção do estoma derivativo, sendo leve ou moderada em 96% dos casos e grave em 4% deles (Haas et al., 1990; Whelan et al., 1994). É provável que a sua incidência seja ainda maior, quando se analisa resultados de estudos demonstrando que o trânsito intestinal é apenas restabelecido em 57% dos colostomizados temporariamente. Os demais enfermos convivem pelo resto de suas vidas, com a doença (Haas e Haas, 1988; Habr-Gama et al., 1997). Naqueles cujo trânsito fecal é restabelecido, o tempo para reconstrução pode chegar até 60 meses, tempo mais do que suficiente para instalação da CE (Habr-Gama et al., 1997; Curi et al., 2002).

A sintomatologia encontra-se diretamente relacionada à extensão do segmento desprovido de trânsito e ao tempo de exclusão (Glotzer et al., 1981). Pode ser assintomática quando a inflamação da mucosa cólica compromete uma menor extensão do órgão (Lu et al., 1995). Quando o comprometimento é mais extenso, a sintomatologia torna-se mais exuberante e, a maioria dos enfermos queixa-se de dor abdominal, disenteria e, nos casos onde ocorre maior extensão de cólon excluído e por um período mais longo, pode haver a formação de ulcerações do ânus e do canal anal (Ona e Boger, 1985; Habr-Gama et al., 1997). Doentes submetidos à derivação urinária ou reconstrução de neovaginas cólon, onde foi interposto um segmento cólico excluído de trânsito, curiosamente, apresentam sintomatologia semelhante (Syed et al., 2001; Desrayaud et al., 2003; Abbasakoor et al., 2004).

A CE geralmente é diagnosticada a partir de fragmentos de mucosa cólica coletados durante o exame colonoscópico. O exame encontra-se alterado na totalidade dos doentes submetidos à exclusão fecal por mais de 36 meses (Lechner et al., 1990;

Ferguson e Siegel, 1991). O estudo histopatológico mostra que a mucosa encontra-se hiperemiada, congesta, edemaciada e friável ao toque do aparelho. Um aspecto bem evidente ao exame é o apagamento dos vasos sangüíneos da submucosa devido ao edema submucoso. (Haas et al., 1990; Lechner et al., 1990). Pode haver o desenvolvimento de úlceras de formato longitudinal, serpiginosas, que tornam-se indistinguíveis daquelas encontradas na RCUI. Tais aspectos dificultam o diagnóstico diferencial (Lusk et al., 1984; Geraghty e Charles, 1994). O exame contrastado co cólon excluso, quando realizado com a técnica do duplo contraste, demonstra irregularidades nodulares na mucosa (aspecto mamelonado), que são característicos da hiperplasia linfóide folicular, a alteração histológica mais frequentemente descrita (Lechner et al., 1990). A avaliação manométrica anorretal mostra redução da complascência retal sem haver, contudo, alteração do reflexo evacuatório ou dos mecanismos esfinterianos de continência (Roe et al., 1993).

Estudos mostraram que a exclusão do trânsito fecal ocasiona atrofia das criptas cólicas, com acentuada alteração da espessura das demais camadas que formam a parede cólica (Geraghty e Talbot, 1991; Biondo-Simões et al., 2000; Lopes-Paulo, 2002; Sousa et al., 2008; Nonose et al., 2009). Existem dúvidas se ocorre depleção das células caliciformes e das glicoproteínas mucinóides por elas sintetizadas (Geraghty e Talbot, 1991; Biondo-Simões et al., 2000; Lopes-Paulo, 2002; Sousa et al., 2008; Nonose et al., 2009). Doentes que cursam com tempo mais prolongado de exclusão fecal podem desenvolver perda do alinhamento basal dos núcleos celulares, com diversos graus de intensidade (Keli et al., 1997). O infiltrado inflamatório, geralmente é misto, composto por polimorfonucleares, linfócitos, macrófagos e plasmócitos (Roediger

e Nance, 1986; Ma et al., 1990; Geraghty e Talbot, 1991). Nos quadros mais graves identifica-se a formação de abscessos nas criptas (Murray et al., 1987; Komorowski, 1990; Yeong et al., 1991; Drut e Drut, 1992). Nas áreas onde ocorre a formação de hiperplasia nodular linfóide, a alteração histopatológica mais encontrada na CE, existe predomínio dos linfócitos B, em relação aos T, mostrando que a resposta inflamatória da mucosa seja mais do tipo humoral. (Grant et al., 1997; Chetty et al., 2009). Em uma única oportunidade encontrou-se microcarcinóides em um enfermo submetido a exclusão fecal por um longo período de tempo (18 anos). Cabe destacar que, o aparecimento das neoplasias de origem epitelial (carcinomas) em portadores de CE por moléstias não relacionadas às DII, ainda não foi descrito (Griffiths e Dixon, 1992).

Estudos mostraram que modificações na população de células caliciformes, assim como no conteúdo e padrão de expressão de mucinas ácidas, neutras, sulfomucinas e sialomucinas são achados úteis para o diagnóstico da CE, podendo ser utilizada como marcador histoquímico da CE. (Hague et al., 1993; Keli et al., 1997, Martinez et al., 2008; Martinez et al., 2009; Nonose et al., 2009). A quantificação das mucinas no epitélio cólico mostra redução de todos os subtipos de mucinas, particularmente das mucinas ácidas ricas em ácido siálico (Keli et al., 1997; Martinez et al., 2008; Martinez et al., 2009; Nonose et al., 2009). Essas modificações na capacidade de síntese das sialomucinas, em um aspecto diametralmente oposto ao que ocorre em doentes com RCUI e CCR, refletindo as peculiaridades da modificação na síntese das proteínas observada na CE (Filipe, 1969; Swidsinski et al., 2007). É possível que estes aspectos histoquímicos distintos entre CE, RCUI e CCR, possam ser

relacionados a uma menor possibilidade de mutações genéticas nos doentes com CE, conseqüentes a manutenção de uma proteína p53 selvagem.

A etiopatogenia da CE ainda causa polêmica. Várias teorias foram propostas para explicar o desenvolvimento da doença e entre elas merecem destaque: a teoria isquêmica, a que relaciona à doença a redução da flora bacteriana cólica e aumento das bactérias redutoras de nitrato (Neut et al., 1989; Neut et al., 1997; Villanacci et al., 2007). Entretanto, a maioria dos autores acredita que a CE desenvolva-se pela deficiência de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) ocasionada pelo estoma derivativo (Roediger e Truelove, 1979; Roediger e Rae, 1982; Harig et al., 1989; Neut et al., 1995; Christl et al., 1996; Mortensen e Clausen, 1996; Scheppach et al., 1997; Velazquez et al., 1997; Cook e Sellin, 1998; Kiely et al., 2001; Oliveira-Neto e Aguilar-Nascimento, 2004; Scheppach e Weiler, 2004; Wong et al., 2006). Reforçam essa possibilidade estudos demonstrando que o restabelecimento do trânsito intestinal regride as alterações clínicas e histopatológicas da colite experimental e da CE (Scheppach, 1998; Kaya et al., 1999; Wong et al., 2006). A administração de soluções ricas em AGCC ou glutamina, principais nutrientes dos colonócitos também melhoram as alterações inflamatórias em doentes e modelos experimentais de CE (Filmann, 2007; Nassri et al., 2008; Szczepkowski et al., 2008).

O butirato, acetato e propionato, são AGCC formados a partir da fermentação das fibras dietéticas e carboidratos por bactérias anaeróbicas da luz intestinal (*Clostridium sp*, *Eubacterium sp* e *Fusobacterium sp*). Noventa por cento do substrato energético dos colonócitos advém do metabolismo dos AGCC (Roediger, 1982; Jørgensen et al., 1997; Velazquez et al., 1997). Quando processados são absorvidos

por difusão passiva e ativa para que as células epiteliais, por meio de oxidação, sintetizem a energia necessária para seu funcionamento normal (Roediger, 1982; Velazquez et al., 1997; Sousa et al., 2008).

Os AGCC, particularmente o ácido butírico, regula a expressão de genes relacionados à síntese protéica, adesão celular, responsáveis pelos mecanismos de sinalização e, principalmente, do equilíbrio entre proliferação e apoptose celular (Butzner et al., 1996; Scheppach e Weiler, 2004). Pesquisas utilizando técnicas de *microarray* que analisaram a expressão de 19.400 genes, nas células epiteliais da mucosa cólica, mostraram que o butirato influenciar a expressão de 221 genes, associados à proliferação, diferenciação e apoptose celular (Daly e Shirazi-Beechey, 2006). A capacidade de síntese de mucinas, e em particular das sialomucinas são modificadas pela ausência dos AGCC (Shimotoyodome et al., 2000). Pesquisas utilizando técnicas de imunoistoquímica mostraram que a presença do butirato aumenta mais de vinte vezes a expressão do gene *MUC-2*, principal responsável pela transcrição de mucinas pelas células caliciformes da mucosa do cólon (Finnie et al., 1995; Shimotoyodome et al., 2000; Ohata et al., 2005; Gaudier et al., 2009). Camundongos modificados geneticamente para o *MUC-2* evoluem com quadros de colite semelhante a CE, mostrando o papel relevante representado pelos AGCC na síntese protéica de glicoproteínas (Van der Sluis et al., 2006). Demonstrou-se que a falta do fornecimento de AGCC quebra as firmes junções intercelulares, por reduzir a síntese da β -catenina, proteína importante nos mecanismos de adesão intercelular. Ruptura das junções entre as proteínas β -catenina e E-caderina possibilitam a translocação bacteriana para a submucosa estéril (Ohata et al., 2005; Turecková, 2006).

Células epiteliais cólicas desprovidas dos AGCC liberam enzimas lisossomiais, que degradam as proteínas que compõem a membrana basal e a matriz extracelular (Hayman et al., 1982). Estudos mostraram que a mucosa cólica desprovida de AGCC aumenta a produção de RLO tanto pelas células da mucosa cólica quanto por neutrófilos ativados nos doentes com RCUI (Liu et al., 2001; Roediger e Babidge, 2000; Pravda, 2005). Modelos experimentais de CE confirmaram que a deficiência no fornecimento de AGCC aumenta a produção de RLO com a conseqüente quebra da função da barreira funcional representada pelas diferentes linhas de defesa que compõe a mucosa cólica (Martinez, 2009). A ocorrência de estresse oxidativo, pela maior produção de RLO, possibilita o surgimento de diferentes formas de colite (Pravda, 2005).

Dentre todos os substratos existentes na luz intestinal o butirato é o mais usado (Roediger e Rae, 1982; Scheppach e Weiler, 2004). Células epiteliais obtidas da mucosa cólica são capazes de aumentar a respiração celular se acrescenta ao meio de cultura os AGCC, confirmando que essas substâncias representam o principal combustível utilizado por essas células para formação de ATP (Roediger e Truelove, 1979; Guillemot et al., 1991; Velazquez et al., 1997; Nieto et al., 2002). Quando os colonócitos dispõem apenas do butirato ocorre aumento do consumo de O_2 , confirmando seu papel como substrato energético essencial (Roediger e Truelove, 1979; Roediger, 1982; Roediger, 1990; Velazquez et al., 1997). Os AGCC protegem as células contra o dano tecidual provocado pelos RLO, por reduzirem os níveis teciduais de O_2 (Liu et al., 2001; Rosignoli et al., 2001). Os efeitos lesivos dos RLO podem ser melhor avaliados pelos resultados de estudos experimentais mostrando que a

administração intrarretal de glutamina e em altas concentrações, por sua ação antioxidante, diminui a geração de RLO (Matés et al., 2002; Fillmann, 2007; Fillmann et al., 2007).

Não obstante a deficiência de butirato, acetato e propionato vir sendo responsabilizada pelo desenvolvimento da CE, os mecanismos moleculares da agressão celular não se encontram totalmente esclarecidos (Scheppach e Weiler, 2004; Martinez, 2009). Teorias relacionando a etiopatogenia da CE a diferentes possibilidades foram levantadas, porém, nenhuma esclarece a modificação do metabolismo celular que lesa o epitélio mucoso, bem como não eram capazes de explicar aspectos histopatológicos e bioquímicos que caracterizam a CE (Farrell e Peppercorn, 2002; Hendrickson et al., 2002; Pravda, 2005; Martinez, 2009). A inflamação intestinal da mucosa de doentes com CE é tardia e mediada por diferentes leucócitos encontrados no organismo. Não se encontra totalmente estabelecido os mecanismos iniciais que provocam o dano ao epitélio mucoso cólico que possibilita a migração das bactérias para o interior da submucosa, desencadeando a migração de células inflamatórias.

A teoria por Indução de Radicais (*Radical Induction Theory*) foi uma das tentativas propostas para explicar os fenômenos que precedem e desencadeiam a infiltração inflamatória em doentes com colite (Pravda, 2005). O autor que levanta essa possibilidade, por meio de um primoroso estudo de revisão da literatura sugere que a agressão inicial à mucosa intestinal seja provocada pelos RLO formados pela própria célula epitelial intestinal modificada na sua respiração celular. A produção exagerada de RLO destrói a barreira funcional do epitélio intestinal. A destruição das defesas funcionais possibilita a translocação de bactérias para o meio interno (Riedle e

Kerjaschki, 1997; Pravda, 2005). Para combater essa infecção ocorre a migração de leucócitos para a parede intestinal, deflagrando o processo inflamatório que caracteriza a enfermidade (Millar et al., 1996; Sheridan et al., 1996; Pravda, 2005).

Os RLO danificam o epitélio mucoso cólico, pois há vários anos demonstrou-se a possibilidade de ocorrência de colite induzida pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Sheeham e Brynjolfsson, 1960; Chen e Schopfer, 1999; Thibaud et al., 2001; Cammarota et al., 2007; Almalouf et al., 2008). A colite por H_2O_2 é semelhante no que concerne a sintomatologia, alterações macroscópicas e microscópicas semelhantes às encontradas na RCUI (Sheeham e Brynjolfsson, 1960; Almalouf et al., 2008). Existem casos publicados de colite, até mesmo fatais, após a aplicação de clisteres contendo H_2O_2 na luz do cólon com os mais diferentes propósitos (Sheeham e Brynjolfsson, 1960; Meyer et al., 1981; Gan e Price, 2003; Lapeyre, 2005; Cammarota et al., 2007). Demonstrou-se também de maneira inequívoca o uso de antioxidantes melhora a colite quimicamente induzida, RCUI e CE (Roediger e Millard, 1995; Zingarelli et al., 1999; Nosál'ova et al., 2000; Cetinkaya et al., 2005; Pravda, 2005; Jiang et al., 2006; Damiani et al., 2007; Fillmann, 2007; Reis et al., 2008; Hanai e Sugimoto, 2009; Caltabiano, 2010; Caltabiano et al., 2010).

Um dos mecanismos principais de destruição bacteriana é a capacidade de dos neutrófilos produzirem altos níveis dos RLO, poderosos agentes bactericidas (Yamada e Grisham, 1991; Vasina et al., 2009). Entretanto, quando ocorre à produção aumentada de RLO pelos neutrófilos também existe aumento do dano ao epitélio intestinal (Fillmann, 2007). Assim sendo, a produção aumentada de RLO na CE pode

decorrer da alteração metabólica celular, num primeiro momento e, após a infiltração bacteriana, por neutrófilos ativados.

Nosso grupo demonstrou, experimentalmente, que na CE, a semelhança do que ocorre nos portadores de RCUI, a mucosa cólica sem trânsito fecal aumenta a produção de RLO, provavelmente pela deficiência de AGCC (Martinez et al., 2008; Martinez, 2009). Verificamos que a maior formação de RLO relacionava-se a progressão do tempo de exclusão do trânsito fecal e, que esses níveis aumentados também se encontravam relacionados às alterações histológicas e bioquímicas descritas na CE (Martinez et al., 2008; Martinez, 2009). Pela primeira vez na literatura, demonstrou-se que o estresse oxidativo decorrente da deficiência de AGCC possui importância na etiopatogenia da CE. Quando se considera que os RLO podem também danificar o DNA possibilitando o aparecimento de mutações, tornou-se interessante estudar tal possibilidade. Na RCUI já se demonstrou que as mutações ocasionadas por estresse oxidativo podem ocorrer em genes controladores do ciclo celular (genes supressores de tumor, oncogenes) ocasionando a formação de um clone celular com autonomia proliferativa e resistência a apoptose, características inerentes às células neoplásicas.

Já se sabe da importância do butirato, na prevenção e melhora de portadores de RCUI. Da mesma forma demonstrou-se que o butirato tem efeito protetor contra o desenvolvimento do CCR (Roediger e Nance, 1986; Hague et al., 1993; McIntyre et al., 1993; Grisham, 1994; Butzner et al., 1996; Christl et al., 1996; Mortensen e Clausen, 1996; Cook e Selin, 1998; Avivi-Green et al., 2000; Liu et al., 2001; Rosignoli et al., 2001; Turecková et al., 2006). Apesar de estudos clínicos e experimentais terem encontrado mutações em genes supressores de tumor, tais como o gene *p53*, em

doentes com RCUI, assim como em roedores com colite quimicamente induzida, até a presente data, do melhor do nosso conhecimento essa possibilidade ainda não foi avaliada na CE (Takesue et al., 2001; Vetuschi et al., 2002; Seril et al., 2003; Fujii et al., 2004).

2.2 - Radicais Livres de Oxigênio

Estudos mostraram a importância dos RLO na etiopatogenia da aterosclerose, câncer, doenças inflamatórias, reumatológicas, intestinais que acometem o homem (Halliwell e Gutteridge, 1990, 1997, 2000; Grishan et al., 1994; Ferreira e Matsubara, 1997). Esses estudos muitas vezes causam desinteresse no leitor não especializado porque envolvem aspectos bioquímicos de compreensão árdua (Ferreira e Matsubara, 1997). Muitas vezes é difícil até mesmo compreender a definição de um radical livre.

Resumidamente, o termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula que contenha número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (Halliwell e Gutteridge, 1990). Este desemparelhamento eletrônico pode ocorrer pela perda ou aquisição de um elétron tornando a molécula altamente reativa. Como exemplo, no metabolismo celular normal durante a fosforilação oxidativa no interior das mitocôndrias, quando ocorre redução do O_2 molecular, existe ganho de um elétron, formando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), considerado um RLO por possuir número ímpar de elétrons na sua última camada de elétrons. Os radicais livres, podem ser formados durante as reações metabólicas que ocorrem nas células em um cenário de reações óxido-redução. O termo RLO é empregado pelo fato da maioria desses radicais serem derivados do O_2 . Cabe destacar que é possível a formação de outros radicais livres,

pelos mesmos mecanismos acima descritos, a partir da molécula do óxido nítrico (Ferreira e Matsubara, 1997).

Durante a respiração celular mitocondrial o O_2 sofre redução em etapas. Esta redução é tetravalente (aquisição seqüencial de quatro elétrons), resultando na formação de água (H_2O) e ATP (Ferreira e Matsubara, 1997). Quando ocorre a redução em etapas formam-se radicais reativos, tais como: $O_2^{\cdot-}$ hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$), hidroxila ($OH^{\cdot}$) e H_2O_2 . A alta reatividade dos radicais intermediários formados é neutralizada pela aquisição progressiva de quatro elétrons formando H_2O e energia.

Nos organismos aeróbios, o O_2 é reduzido à H_2O na fosforilação oxidativa. O O_2 mantém-se unido ao complexo citocromo-oxidase até que ocorra sua redução total em H_2O . No processo, por receber apenas um elétron de cada vez, a redução é parcial formando como produto intermediário inicial o ânion $O_2^{\cdot-}$. Com o ganho de mais um átomo de hidrogênio este se reduz ao segundo produto intermediário, representado pelo H_2O_2 . Quando um terceiro elétron é acrescentado, forma-se o radical $OH^{\cdot}$. Portanto, a formação de RLO decorre da redução do O_2 se dar de forma tetravalente, formando radicais reativos durante o seu processo de redução (Tannickal e Fanburg, 2000).

Para que não oxide constituintes celulares o ânion $O_2^{\cdot-}$, é removido pela reação entre dois ânions de $O_2^{\cdot-}$ catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O produto formado sob ação da SOD é o H_2O_2 . Os sistemas enzimáticos são capazes de formar e degradar o H_2O_2 rapidamente em virtude de sua alta toxicidade celular. Dos sistemas enzimáticos que neutralizam o H_2O_2 merecem destaque a catalase (CAT), β -oxidase dos AGCC e glutathione peroxidase (GPX). O H_2O_2 pode reagir com outro ânion $O_2^{\cdot-}$ ou com o íon ferro, pelas reações de Fenton e Haber-Weiss, e formar o radical $OH^{\cdot}$

(Halliwell e Gutteridge, 1997; Tannickal e Fanburg, 2000). O radical $\text{OH}^\cdot$ é tóxico para a célula danificando além das membranas e organelas, bases nitrogenadas que compõem o DNA (Ribeiro et al., 2007; Bajka et al., 2008; Ribeiro et al., 2008).

Alterações no suprimento de substrato energético, tal como ocorre na interrupção do fornecimento de AGCC provocada pela derivação do trânsito intestinal, podem interferir na respiração celular aumentando a produção de RLO e, conseqüentemente a possibilidade de estresse oxidativo.

2.3 - Colite experimental e estresse oxidativo

Uma série de modelos experimentais foram idealizados para o estudo das diferentes formas de colite. Todavia nenhum deles é capaz de estudar a Teoria de Indução da colite por RLO (Hoffmann et al., 2003). Os modelos experimentais propostos que utilizam a infusão retal de agentes químicos tóxicos, tais como o ácido acético, ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) ou sulfato sódico de dextram (DSS), são limitados na sua capacidade de demonstrar as alterações celulares que precedem a colite propriamente dita (Farrel e Peppercorn, 2002). Nestes modelos, o dano à barreira funcional da mucosa é gerado, artificialmente, pela absurda agressão química ao epitélio cólico (Martinez, 2009; Nonose et al., 2009). A colite no homem ocorre por alterações do próprio epitélio intestinal e não, como querem alguns autores, pela infusão retal de substâncias tóxicas. Não se tem notícias que indivíduos portadores de RCUI tenham previamente infundido em seu próprio intestino, ou ingerido por via oral qualquer uma dessas substâncias utilizadas nos modelos de colite hapteno-induzida. Assim sendo, esses modelos experimentais de colite hapteno-induzidos, apesar de continuarem sendo adotados, não reproduzem, fielmente, o que ocorre na colite ulcerativa. Na realidade

esses modelos pretendem romper a integridade da barreira epitelial da mucosa para, de forma irreal permitir a penetração de antígenos bacterianos e a conseqüente resposta imune à invasão bacteriana tecidual (Martinez, 2009). Há muito já se demonstrou que os mecanismos celulares envolvidos na manutenção da integridade da barreira mucosa epitelial do cólon encontram-se comprometidos antes da infiltração neutrofílica (Pravda, 2005). Portanto, a violação desta importante função deve ser considerada como uma etapa inicial e necessária que precede a série de eventos que determinam a penetração antigênica, bacteriana e toda a resposta inflamatória subseqüente.

Portadores de RCUI apresentam alterações significativas na lâmina própria sem que exista ainda lesão epitelial (Schmehl et al., 2000). Como explicá-las com modelos de colite hapteno induzida, onde o epitélio é lesado em primeiro lugar? Estudos encontraram áreas de lesão epitelial na mucosa cólica em locais, onde a membrana basal ainda apresentava-se intacta. Também se identificou segmentos cólicos, onde a membrana basal encontrava-se totalmente destruída, sem que existisse, ao mesmo tempo, infiltração inflamatória (Schmehl et al., 2000). Todos esses achados demonstram que as próprias células epiteliais da mucosa cólica são responsáveis pela agressão à membrana basal. Atualmente vem sendo proposto que o fator desencadeador da RCUI ocorre na interface entre as células epiteliais e a membrana basal pela produção exagerada de RLO (Kruidenier e Verspaget, 2002; Pravda, 2005; Rezaie et al., 2007). Os modelos de colite quimicamente induzida não permitem identificar a molécula responsável pelo início do processo inflamatório, pois não levam em conta que produção dessas moléculas possa estar relacionada às alterações do metabolismo energético da própria célula epitelial.

Em 1960 reproduziram-se quadros agudos e crônicos de colite pela aplicação intrarretal de clisteres com H_2O_2 (Sheehan e Brynjolfsson, 1960). Este foi o primeiro modelo experimental capaz de reproduzir as alterações histológicas e sintomatologia encontrada nos doentes com colite. O estudo histológico demonstrou ulcerações da mucosa cólica e infiltração neutrofílica que se alternavam com segmentos de mucosa normal. Nos animais que sobreviveram à exposição ao H_2O_2 as úlceras cicatrizaram em 70 dias, exceto algumas situadas no reto distal. Cabe lembrar que estes três achados: áreas de inflamação mucosa alternando-se com áreas normais, inflamação predominantemente localizada no cólon esquerdo e a possibilidade de cicatrização, são características comumente descritas nos portadores de RCUI e CE. Assim sendo a aplicação de H_2O_2 , substância capaz de formar altas concentrações de RLO quando em contato com a mucosa cólica, ocasionam quadro histológico semelhante ao encontrado na CE.

A colite induzida por H_2O_2 também, pode ocorrer no homem. Publicações demonstraram a possibilidade do surgimento de colite após a irrigação do cólon com H_2O_2 com diferentes objetivos (Sheehan e Brynjolfsson, 1960; Bilotta e Waye, 1989). No passado, enemas cotendo H_2O_2 foram utilizados para exoneração de fezes impactadas no reto. O desenvolvimento de formas graves de colite, até mesmo fatais, subseqüentes ao uso do H_2O_2 fez com que tal prática fosse abandonada. Verdadeiras epidemias de colite, em Serviços de Endoscopia, também foram atribuídas à exposição do cólon às pequenas quantidades da substância, utilizadas para a higienização dos colonoscópios (Bilotta e Waye, 1989).

Contudo ainda não tinha sido demonstrada a capacidade das células normais da mucosa cólica em aumentar a produção de RLO. No século passado, estudos

experimentais mostraram que células da mucosa cólica habitualmente formam H_2O_2 como um produto do seu metabolismo celular aeróbico (Chance et al., 1979). Em condições fisiológicas apenas 10% do H_2O_2 não é formado pela cadeia respiratória mitocondrial de transporte de elétrons (Eaton e Qian, 2002). Quando se demonstra que clisteres com H_2O_2 provocam dano à mucosa cólica, somado ao fato de que os colonócitos são capazes de produzir H_2O_2 é razoável especular que existe a possibilidade de que o estresse oxidativo resultante possa causar colite (Pravda, 2005; Fillmann, 2007). Pesquisas experimentais mostraram que os sistemas de defesa antioxidantes na mucosa cólica são menos eficientes quando comparados ao de outras células tornando o epitélio intestinal mais vulnerável ao estresse oxidativo (Fillmann, 2007).

É possível que o estresse oxidativo possa representar o mecanismo responsável pela agressão inicial à mucosa cólica na CE. Para se provar tal suposição torna-se necessário demonstrar, experimentalmente, se as células da mucosa cólica desprovidas de AGCC, são capazes, de aumentar a síntese de RLO e gerar estresse oxidativo tecidual. Em estudo recentemente concluído demonstrou-se que células da mucosa cólica desprovida do suprimento de AGCC que desenvolvem CE, sofrem estresse oxidativo (Martinez et al., 2008; Martinez, 2009).

O emprego de substâncias antioxidantes, como a n-acetilcisteína, deferoxamina, quercitrina, rofecoxibe e curcumina diminuem, em animais de experimentação, o estresse oxidativo na colite quimicamente induzida por DSS (Blau et al., 2000; Nosál'ová et al., 2000; Camuesco et al., 2004; Cetinkaya et al., 2005; Dryden et al., 2005; Martin et al., 2005; Jiang et al., 2006; Damiani et al., 2007; Aoi et al., 2008).

Nosso grupo, confirmando resultados de estudos anteriores realizados em doentes portadores de RCUI, recentemente demonstrou que o ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), um potente antioxidante mostrou-se eficaz no tratamento da CE (Triantafillidis et al., 1991; Tripodi et al., 1992; Song et al., 2006; Moshkovska e Mayberry, 2007; Ancha et al., 2008; Szczepkowski et al., 2008; Ancha et al., 2009; Arafa et al., 2009; Hayashi et al., 2009; Caltabiano, 2010; Caltabiano et al., 2010).

Já se sabe que o uso de substâncias antioxidantes apresenta efeitos protetores contra o desenvolvimento do CCR, sobretudo em portadores de RCUI, quando se comparam doentes que utilizam ou não a substância. Talvez, a menor ocorrência de CCR em doentes com RCUI que utilizam substâncias antioxidantes possa ser atribuída à proteção contra o dano oxidativo ao DNA. Estudo experimental demonstrou que clisteres com ácido 5-ASA reduziram, significativamente, os níveis de dano ao DNA em células da mucosa cólica com interrupção do suprimento de AGCC, referendando o papel que essas substâncias apresentam na prevenção da colite bem como na redução do estresse oxidativo às bases nitrogenadas que compõem o DNA nuclear (Caltabiano, 2010; Caltabiano et al., 2010)

2.4 – Proteína *p53*, colite e câncer colorretal

O recente reconhecimento da biologia molecular como instrumento de fundamental importância para o melhor conhecimento da carcinogênese, trouxe como um de seus principais elementos, a proteína *p53*, à qual foi atribuído papel significativo, principalmente, no desenvolvimento do CCR (Pinho, 2000). A proteína *p53*, identificada em 1978, é codificada por um gene situado no braço longo do cromossomo de número

17, o qual leva o mesmo nome (gene *p53*), em consequência de seu peso molecular de 53.000 daltons. A proteína codificada possui 393 aminoácidos em sua molécula e tem como principal função preservar a integridade do código genético em cada célula, ou seja, a manutenção da mesma sequência de nucleotídeos ao longo de toda a molécula de DNA igualmente presente em cada célula do nosso corpo (Pinho, 2000).

Com relação a seu mecanismo de ação, a proteína *p53*, durante a fase G_1 da divisão celular, faz uma verificação quanto à eventual ocorrência de mutações na sequência do código genético decorrente de um eventual erro de replicação. Caso seja encontrado um erro de pareamento de bases, é função da proteína *p53*, através do desdobramento de uma cascata de reações químicas no interior da célula, impedir que ocorra a mitose e se complete a divisão de uma célula mutante. Para isto, dois caminhos poderão ser seguidos: a correção da mutação através das proteínas de reparo do DNA ou, na impossibilidade de correção, a indução da apoptose celular. Por exercer esta função de detecção de alterações no DNA e consequente correção ou indução da morte celular, a proteína *p53* é considerada um elemento chave na prevenção do desenvolvimento de tumores, sendo seu gene codificador classificado como gene supressor de tumor. Mutações no gene *p53*, levando a tradução de uma proteína anômala, é um fenômeno comum na carcinogênese humana sendo encontrada em 60 a 80% dos doentes com CCR (Martinez et al., 2008a).

A base para melhor compreensão da importância da proteína *p53* no controle do ciclo celular originou-se de dois achados significativos: 1) a introdução da proteína *p53* em células tumorais incapazes de produzi-la logrou bloquear o crescimento neoplásico e induzir a morte celular; 2) enquanto os níveis celulares de *p53* em células normais são baixos, a exposição desta célula a agentes lesivos ao DNA resultou em importante

elevação da produção desta proteína. Desta forma torna-se fácil à compreensão do porque da proteína p53 ser denominada a “guardiã do genoma”, uma vez que embora não seja imprescindível para o processo de divisão celular, seu funcionamento inadequado irá expor o tecido celular em questão a um elevado risco de proliferação de anormalidades genéticas que poderão fugir ao controle e manifestar-se sobre a forma de uma doença neoplásica (Pinho e Rossi, 1998).

Vários estudos vêm investigando o status do gene supressor de tumor *p53* e da expressão tecidual da proteína homônima na progressão para câncer da mucosa cólica cronicamente inflamada, como ocorre nos doentes com RCUI (Chaubert et al., 1994; Harpaz et al., 1994; Fogt et al., 1998; Seril et al., 2003). O gene *p53* encontra-se freqüentemente alterado no CCR e tem importância fundamental na resposta celular ao dano do DNA provocado por fatores endógenos e exógenos, merecendo destaque o estresse oxidativo (Harpaz et al., 1994). O aumento da quantidade tecidual da proteína p53 mutante é considerado achado freqüente nas áreas displásicas da mucosa cólica de doentes com RCUI e, principalmente nas áreas de tecido onde houve transformação neoplásica (Chaubert et al., 1994; Harpaz et al., 1994; Fogt et al., 1998; Seril et al., 2003). Mutações na proteína p53 também podem ser encontradas no epitélio não displásico em portadores de RCUI e acredita-se que possam preceder o desenvolvimento do CCR (Lashner et al., 1999).

A perda da heterozigotidade do gene *p53* é um evento comum nos casos de CCR em portadores de RCUI. A perda de um alelo do gene *p53* pode ser encontrada em cerca de 70% dos casos de CCR e em 45% dos tecidos cronicamente inflamados com displasia de alto grau (Brentnall et al., 1994). Cerca de 70% dos tecidos provenientes de doentes com CCR associado à RCUI e 20% dos tecidos displásicos,

quando analisados por técnica imunoistoquímica, apresentam mutações na proteína p53. A análise imunoistoquímica dos tecidos não displásicos nesses mesmos doentes mostra mutações na proteína em até 29% dos doentes (Brentnall et al., 1994). Cabe destacar que a porcentagem de mutações da p53 aumenta à medida que ocorre a progressão para carcinoma e, geralmente, esse percentil também se encontra relacionado ao grau de displasia tecidual (Seril et al., 2003).

De modo muito interessante, o espectro de mutações do gene *p53* em doentes com CCR associado à RCUI, é dominado por mutações do tipo transversões de bases, que respondem por cerca de 80% de todas as mutações já identificadas (Chaubert et al., 1994; Harpaz et al., 1994; Seril et al., 2003). Mutações do tipo transversões de bases são essencialmente causadas por dano oxidativo do DNA, principalmente do tipo G→A. Transversões do tipo C→T, também encontradas, podem ser atribuídas ao estresse nitrosativo (Seril et al., 2003).

Estudos demonstraram que portadores de RCUI, em atividade têm risco de desenvolvimento de neoplasias 10 vezes maior do que a população geral (Lashner et al., 1999; Seril et al., 2003). O risco do desenvolvimento de CCR ou de sua lesão precursora, a displasia, aumenta exponencialmente com a duração da doença, com a extensão e intensidade do processo inflamatório na mucosa intestinal, tornando o seguimento endoscópico dos doentes com mais de 10 anos de enfermidade condição indispensável para a prevenção da neoplasia (Lashner et al., 1999; Seril et al., 2003).

O processo de carcinogênese nos doentes com RCUI parece envolver uma seqüência de eventos, onde o epitélio cronicamente inflamado e hiperplásico progride inicialmente para focos de displasia plana, adenoma e finalmente para o carcinoma. É

provável que as células da mucosa cólica, persistentemente submetidas a agentes oxidantes oriundos da luz cólica, sofram dano oxidativo progressivo em seu DNA, que determinam mutações em genes supressores de tumor, tais como o *p53* (Seril et al., 2003). Metabólitos intestinais tais como aminas, compostos nitrosos, sulfetos e metanotiol formados na luz do cólon desprovido de trânsito intestinal, inibem o metabolismo energético do colonócito, danificam o DNA celular podendo promover o câncer. Estas observações sugerem que o estresse oxidativo que acompanha o processo inflamatório da mucosa intestinal possui papel de destaque no desenvolvimento de neoplasias nos portadores de enfermidades que produzam processo inflamatório crônico da mucosa cólica (Seril et al., 2003).

A colite experimental, induzida por ácido acético, ácido sulfônico trinitrobenzeno (TNBS) e dinitroclorobenzeno (DNCB) em ratos, apresenta semelhanças com a colite das DII e vem sendo utilizada freqüentemente como modelo experimental para a compreensão dos mecanismos de indução do processo inflamatório e da carcinogênese colorretal. Contudo, o mecanismo exato do desenvolvimento de tumores nestes modelos experimentais não se encontra completamente esclarecido, apesar de evidências mostrarem que a colite induzida por TNBC encontra-se relacionada ao desenvolvimento de neoplasias. Apesar de possuírem mecanismos etiopatogênicos distintos, a CE e as DII apresentam vários aspectos semelhantes e, o denominador comum de ambas, é o intenso processo inflamatório crônico existente na mucosa cólica que se agrava com o passar do tempo podendo acometer toda a superfície mucosa do segmento excluso. Todavia, na literatura não existem relatos de CCR em segmentos exclusos de trânsito que desenvolveram CE mesmo após longos períodos de derivação e atividade inflamatória intensa. Talvez, nos portadores de CE, a ausência dos AGCC

na luz intestinal, apesar de ocasionar estresse oxidativo ao DNA das células do epitélio cólico, isoladamente não seja capaz de ocasionar mutações em genes controladores do ciclo celular. Tais evidências sugerem que, apesar das semelhanças clínicas, etiopatogenicas e terapêuticas entre a RCUI e a CE, os mecanismos carcinogênicos envolvidos da RCUI possam não ser encontrados na CE.

Assim sendo, surge um questionamento. O processo inflamatório crônico na mucosa cólica dos enfermos portadores de CE poderia provocar a semelhança do que ocorre na RCUI, dano oxidativo ao DNA celular aumentando a possibilidade de mutações no gene *p53* e, conseqüentemente, o desenvolvimento de neoplasias?

Estudos experimentais ou em seres humanos portadores de CE geralmente limitam-se à análise qualitativa e quantitativa das alterações histológicas encontradas no segmento excluído do trânsito intestinal, não sendo avaliada a possibilidade de que tais alterações possam ocasionar dano ao DNA das células da mucosa cólica com conseqüentes implicações no desenvolvimento de neoplasias (Rubio e Nylander, 1981; Rainey et al., 1983; Augenlicht et al., 2002).

Apesar de alguns autores chamarem atenção para o importante papel que a integridade do trânsito intestinal desempenha na modulação da carcinogênese, poucos estudos avaliaram os níveis de dano oxidativo ao DNA de células da mucosa cólica em modelos experimentais de colite induzida ou de exclusão (Rainey et al., 1983; Velazquez et al., 1997b; Augenlicht et al., 2002; Reis et al., 2008; Longatti et al., 2010). Revisando a literatura não se encontram estudos relacionando os níveis de dano oxidativo no DNA da mucosa cólica a presença de mutações na proteína *p53* em modelos experimentais de CE. O conhecimento da relação entre o estresse oxidativo e as alterações na expressão de proteínas envolvidas na carcinogênese colorretal

permitiria a melhor compreensão de estratégias terapêuticas e medicamentosas capazes de diminuir o dano ao DNA, e conseqüentemente, o risco de desenvolvimento de neoplasias (Augenlicht et al., 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar em ratos os níveis de estresse oxidativo ao DNA e expressão tecidual da proteína p53 na mucosa cólica de segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar os níveis de dano oxidativo ao DNA de células da mucosa cólica comparando segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal;

Avaliar se existe relação entre o tempo de exclusão intestinal e os níveis de dano oxidativo ao DNA de células obtidas da mucosa cólica desprovida de trânsito fecal;

Avaliar a presença de mutações da proteína p53 em células da mucosa cólica comparando segmentos providos e desprovidos de trânsito;

Verificar se o tempo de exclusão intestinal aumenta a possibilidade de mutações da proteína p53 em células obtidas da mucosa cólica desprovida de trânsito fecal;

4. MÉTODO

A realização deste estudo obedeceu à Lei Federal 11.794 de 08/10/2008 (Lei Sérgio Arouca) e às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade São Francisco, Bragança Paulista (APÊNDICE 1).

4.1 - Animal de experimentação:

Foram utilizados 45 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, SPF, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP), com peso variando entre 250 a 300g e média de idade de quatro meses.

4.2 - Grupos experimentais:

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais constituídos de 15 animais, divididos segundo a data do sacrifício ser realizado em seis semanas, 12 semanas e 18 semanas. Cada grupo experimental composto por 15 animais foi dividido em dois subgrupos. No primeiro subgrupo, com 10 animais, realizou-se a derivação do trânsito intestinal (subgrupo experimento) e no segundo, composto de cinco animais, realizou-se apenas laparotomia sem derivação de trânsito (subgrupo controle).

4.3 - Período pré-operatório

Durante o período de vigilância epidemiológica (sete dias) mantivemos os animais em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, com controle de temperatura,

luminosidade, umidade e ruídos. Todos permaneceram em jejum durante 12h, exceto para água, antes da intervenção cirúrgica. Identificamos cada gaiola com o número do animal, o grupo e o subgrupo experimental a que pertencia. Esses mesmos dados foram tatuados com tinta da China (tinta nanquim) na cauda de cada animal.

4.4 – Técnica anestésica

No dia da intervenção, após serem convenientemente identificados, os ratos foram pesados e anestesiados com o emprego de cloridrato de xilazina 2%¹ + cloridrato de quetamina² na dose de 0,1mL/100g, administradas por via intramuscular na pata traseira esquerda.

4.5 - Técnica cirúrgica

Depois de anestesiados, os animais foram restringidos em mesa cirúrgica, em decúbito dorsal horizontal, realizando-se tricotomia abdominal e anti-sepsia com polivinil pirrolidona-iodo. A cavidade abdominal foi acessada por incisão longitudinal mediana com três centímetros de extensão, sendo identificada a placa de Peyer (Fig.1).

¹ Dopaser™ AgribRANDS do Brasil Ltda. Brasil

² Dopalen™ AgribRANDS do Brasil Ltda. Brasil



FIGURA 1 – Identificação da placa de Peyer (seta) como reparo anatômico.

Com o auxílio de paquímetro e, após ligadura dos vasos da arcada cólica marginal (Fig. 2), seccionou-se o cólon três centímetros acima da placa e Peyer. Após remoção do conteúdo fecal eventualmente presente, o segmento proximal do cólon seccionado foi exteriorizado, como colostomia terminal, através de incisão circular, com três milímetros de diâmetro, realizada no hipocôndrio esquerdo. A fixação da colostomia foi realizada com o emprego de pontos separados de fio absorvível monofilamentar 4-0 (Monocryl[®])³ nos quatro pontos cardinais e entre eles, sempre amarrados com três nós.

Terminada a confecção da colostomia proximal, o segmento distal do intestino grosso seccionado foi cateterizado com sonda de polivinil 12 F, fixada por ligadura frouxa, e irrigado com 40 ml de soro fisiológico 0,9% (Fig.3), até que o efluente drenado

³ Ethicon, Inc. Somerville, NJ, USA.

pelo ânus do animal não apresentasse mais saída de material fecal. Concluída a irrigação, o cateter foi removido e o cólon distal exteriorizado como colostomia (fístula mucosa distal) na face lateral inferior esquerda da parede abdominal (Fig.4). A fixação da colostomia distal foi realizada com a mesma técnica utilizada para a colostomia proximal. A parede abdominal foi fechada em dois planos de sutura: peritônio e aponeurose com pontos contínuos de fio de ácido poliglicólico 4-0 (Vicryl®)⁴ e a pele com pontos separados de nylon 4-0 (Mononylon®)³ (Fig.5)

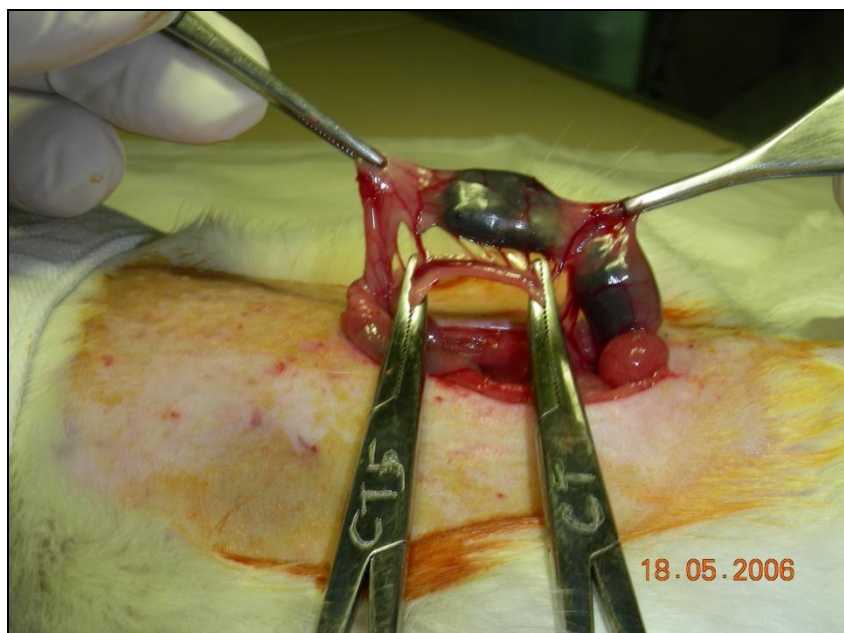


FIGURA 2 – Ligadura da artéria marginal na altura da secção do cólon.

⁴ Ethicon, Inc. Somerville, NJ, USA



FIGURA 3 – Limpeza mecânica anterógrada do cólon excluído de trânsito fecal.



FIGURA 4 – Aspecto final da parede abdominal após confecção dos estomas.

4.6 - Pós-operatório

Concluída a operação, os animais foram mantidos por 10 minutos sob lâmpada aquecida, e após recuperação anestésica, alojados em gaiolas individuais, sendo liberados para ingestão de água e ração padronizada (Nuvilab CR1[®])⁵, após terem recuperado completamente o estado de vigília. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais até a data do sacrifício, permanecendo nas mesmas condições ambientais do período de vigilância epidemiológica, não tendo sido tomado nenhum cuidado adicional em relação à ferida operatória e ao estoma confeccionado. Todos os dados de acompanhamento pós-operatório (aceitação da dieta, aspecto da ferida cirúrgica, aspecto da colostomia, peso, características das evacuações) foram anotados em planilhas previamente elaboradas

4.7 - Sacrifício dos animais

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

⁵ Nuvital Nutrientes SA, São Paulo, Brasil

Os segmentos de cólon removidos foram abertos longitudinalmente pela borda anti-mesocólica e lavados com soro fisiológico a 0,9% para remoção de detritos fecais presentes. Foram removidos dois fragmentos da parede cólica, medindo cada um deles 30 mm de extensão, e interessando toda a circunferência da parede cólica, sendo um fragmento do cólon provido e outro do cólon desprovido de trânsito intestinal. Os fragmentos de cólon extirpados destinados à quantificação das mucinas foram sempre colhidos em local padronizado para todos os animais dos dois grupos experimentais. No segmento provido de trânsito foram colhidos dois centímetros a partir da face interna do estoma. Nos segmentos sem trânsito foram colhidos, um centímetro abaixo da face interna do estoma e um centímetro acima do ânus. No grupo controle os fragmentos foram colhidos quatro centímetros acima da placa de Peyer.

4.8 - Técnica histológica

Todos os fragmentos cólicos retirados durante o sacrifício foram seccionados no sentido longitudinal pelas bordas anti-mesocólica e mesocólica. Os fragmentos seccionados longitudinalmente foram lavados com solução fisiológica a 0,9% e dispostos e presos sob superfície plana de cortiça com a superfície mucosa voltada para cima e submersos em solução de formaldeído a 10%, tamponado, para estudo histopatológico.

Para avaliar a gravidade da colite, consideramos os seguintes parâmetros histológicos: presença de ulcerações epitélio (ausente, ≤ 2 ou > 2) no e infiltrado neutrofílico (ausente; $<50\%$ ou $\geq 51\%$ das criptas; $<50\%$ ou $\geq 51\%$ dos campos estudados) segundo escala anteriormente proposta por Gupta et al. (2007) (Quadro 1).

QUADRO 1 – Escala de graduação do escore inflamatório		
Grau de inflamação	Escore	Características histopatológicas
Ausente	0	Sem infiltração neutrofílica tecidual
Leve	1-3	Infiltração neutrofílica (<50% das criptas) + Infiltração neutrofílica (<50% dos campos) + Ausência de erosões ou úlceras
Moderado	4-6	Infiltração neutrofílica (≥ 51% das criptas) + Infiltração neutrofílica (≥ 51% dos campos) + Ausência de erosões ou úlceras
Intenso	7-8	Presença de erosões ou úlceras
Baseado em Gupta et al., 2007.		

4.9 - Confecção dos blocos de parafina e lâminas

Dispusemos para a realização do estudo histopatológico e fixamos com alfinetes fragmentos com 20 mm de extensão, retirados dos cólons com e sem trânsito, em superfície plana de cortiça com a face mucosa voltada para cima. Após identificação o material foi acondicionado em frascos contendo solução de 20 ml de solução de formaldeído tamponado a 10%. Colocamos os espécimes nos frascos com os fragmentos de cólon totalmente imersos na solução onde permaneciam por 72 h. Depois deste período foram retirados e lavados em água corrente e água destilada para, em seguida, serem desidratados em sucessivas concentrações crescentes de álcool e clarificados em xilol. Após essa etapa o material foi incluído em parafina. Cada bloco foi submetido a dois cortes longitudinais, com 5 µ de espessura, para confecção

das lâminas destinadas ao estudo histológico. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e montadas em lâminas com resina. Todas as lâminas foram confeccionadas por um mesmo técnico e analisadas em microscópio óptico comum⁶ com magnificação final de imagem de 200 vezes.

Para o diagnóstico da doença considerou-se a presença de atrofia das criptas cólicas, ulcerações epiteliais, infiltrado inflamatório, edema da camada mucosa e submucosa, congestão vascular e hiperplasia linfóide nodular quando presente. O diagnóstico de colite foi firmado por patologista experiente em afecções colorretais, que desconhecia os objetivos do estudo, bem com a origem do material (ANEXO 1).

4.10 – Técnica imunoistoquímica

Para o estudo imunoistoquímico todos os espécimes, fixados em formalina e emblocados em parafina, foram submetidos a cortes adicionais de 4 µm, retirados dos animais do subgrupo controle e experimento (segmentos com e sem trânsito fecal) e dos depositados em lâminas previamente identificadas. Inicialmente as lâminas foram desparafinadas por três banhos sucessivos de cinco minutos em xilol. Realizou-se a reidratação, submergindo as lâminas em álcool absoluto, 95%, 80% e 50% seguida de lavagem por cinco minutos em água corrente e posteriormente em água destilada. As lâminas foram então, acondicionadas em recipiente próprio e submersas em solução tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 7,2 (PBS) por 10 minutos e depois secas com papel filtro. Foi realizado bloqueio das peroxidases endógenas pelo gotejamento de peróxido de hidrogênio 30 volumes a 3%, em câmara úmida, à temperatura ambiente, durante 10 minutos, seguido de mais uma lavagem com PBS por 10 minutos.

⁶ Nikon Eclipse DS-50. Nikon Inc., Toquio, Japão

Terminadas esta etapa, foi realizada a recuperação antigênica na qual as lâminas foram acondicionadas em cuba com solução de citrato 10 mM, pH 6,0 em banho maria durante 45 minutos à 95°C. Ao fim desse processo, as lâminas foram deixadas esfriar em temperatura ambiente por 20 minutos, seguindo-se nova lavagem com PBS por cinco minutos. O anticorpo primário monoclonal anti-p53 com reatividade para ratos⁷ foi diluído na proporção de 1:800 em soro albumina bovina. Todas as lâminas foram cobertas com cerca de 100 µL dessa solução, mantidas à refrigeração a 4°C por 24 horas. Após esse período de incubação, as lâminas foram novamente lavadas com PBS por cinco minutos, gotejadas com o anticorpo secundário⁸, e a seguir, aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase⁹ (preparado no momento de sua utilização, na diluição de 1:100 em PBS, por 45 minutos. As lâminas foram reveladas, após nova lavagem com PBS por cinco minutos, usando-se cromógeno (tetrahidrocloridrato de diaminobenzidina DAB 10mg em 10 ml de PBS + 3 mL de água oxigenada), preparado cinco minutos antes de terminar o tempo de exposição ao complexo ABC, gotejado e permanecendo sobre elas por três minutos. Completado este tempo, as lâminas foram lavadas em água corrente destilada por cinco minutos, contra-coradas com verde de metila por 1 minuto, e novamente lavadas em água corrente e destilada por cinco minutos para em seguida serem desidratadas, por submersão em etanol 50%, 80%, 95% e absoluto e em xilol, duas vezes por um minuto cada. Finalmente as lâminas foram montadas, rotuladas e mantidas em posição horizontal por 24 horas. O controle negativo da imunocoloração foi realizado com lâminas confeccionadas, com a mesma

⁷ FL-393; Lote: B2107. Santa Cruz, Chicago, USA

⁸ Lote B-1307; Santa Cruz, Chicago, USA;

⁹ ABC Staining System SC-2018; Santa Cruz, Chicago, USA

técnica, sem adição do anticorpo primário, e o positivo em tecido de neoplasia de cólon humano sabidamente positivo para proteína p53 mutante.

Para análise microscópica da imunocoloração foi utilizado microscópio óptico comum, com magnificação final de 200 vezes. Foi considerado como reação positiva à imunocoloração que ocorria de modo difuso, com pontos de intensidade variáveis e distribuição homogênea. Todas as lâminas foram lidas por patologista experiente sem conhecimento prévio das demais variáveis histológicas. Classificou-se a expressão tecidual da proteína *p53* segundo a presença ou ausência de imunorreação. Considerou-se imunocoloração positiva quando mais de 10 por cento dos núcleos celulares de cinco criptas integras apresentavam coloração. Adotou-se como valor individual final à moda entre a leitura de três campos diferentes.

4.11 – Eletroforese alcalina em gel de célula isolada (ensaio do cometa)

O ensaio do cometa foi realizado na Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia da Universidade São Francisco, Bragança Paulista (UNIFAG). Realizamos a quantificação dos níveis de estresse oxidativo pela eletroforese em gel de células isoladas (ensaio cometa) segundo padronização técnica anteriormente utilizada (Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2008). Resumidamente, para a detecção dos níveis de estresse oxidativo utilizamos amostras provenientes dos animais do grupo controle e experimento da região cólica provida e desprovida de trânsito intestinal. Todas as amostras foram colhidas e analisadas em triplicata. Os espécimes foram incubados em 3 ml de solução tampão de Hank's contendo 5,5 mg de proteinase K e 3 mg de collagenase por 45 minutos a 37°C para a o isolamento das células da mucosa cólica. Alíquotas foram retiradas e a viabilidade celular avaliada.

Avaliamos a viabilidade celular usando o método do diacetato de fluoresceína (FDA)/brometo de etídio. Resumidamente, a solução de coloração celular foi preparada imediatamente antes da sua utilização e continha 30 ml de FDA em acetona (5mg/ml), 200 ml de EtBr em tampão fosfato (PBS; 200 mg/ml), e 4,8 ml de PBS. A suspensão contendo células isoladas foi então misturada com 25 ml da solução corante, colocada sobre lâmina e recoberta com lamínula. As lâminas foram lidas em microscópio de imunofluorescência. Ao núcleo das células viáveis coravam-se em verde, enquanto das células inviáveis em vermelho. Após análise das lâminas, selecionamos amostras dos tecidos que apresentassem mais de 75% das células viáveis.

A versão alcalina do ensaio do cometa foi realizada de acordo com protocolo anteriormente publicado (Ladeira et al., 2004). Em resumo, 15 µl da suspensão celular previamente obtida foram misturados à agarose *low melting point* 0.5%⁹, postos sobre uma lâmina e cobertos com lamínula. Essas foram imersas em solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% SDS, pH 10 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) e permaneceram a 4°C por 12 horas. Subseqüentemente, foram expostas a um tampão alcalino (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH=13,4) por 40 min a 4°C. A eletroforese foi realizada nesse tampão, no interior da geladeira a 4°C, por 30 minutos a 25V e 300 mA. Após a corrida da eletroforese as lâminas foram então neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5), coradas com *Sybr Safe*¹⁰, e analisadas ao microscópio de fluorescência. Todo material foi processado e analisado simultaneamente para evitar variações da técnica empregada. Duzentas células foram aleatoriamente selecionadas

¹⁰ Invitrogen Corporation. USA.

(100 de cada segmento intestinal, provido e desprovido de trânsito) e analisadas usando o programa Komet 5.5¹¹. Com o auxílio do programa, foi obtido o valor da extensão da cauda do cometa (*olive tail moment*) sendo seus valores médios determinados. Segundo o manual do fabricante, o *Tail moment (TM)* é definido como o produto entre os fragmentos de DNA da cauda e a distância média da migração da cauda do cometa, e reflete a extensão das rupturas das hélices de DNA (estresse oxidativo). A intensidade de quebra das fitas do DNA pode ser quantificada por métodos de intensificação de imagem e análise computacional (Ribeiro et al., 2007). Para cada animal, utilizou-se a média dos valores obtidos com a leitura de 100 células de cada segmento cólico realizada pelo mesmo técnico, que desconhecia a origem do material e os objetivos do estudo (Fig.5).

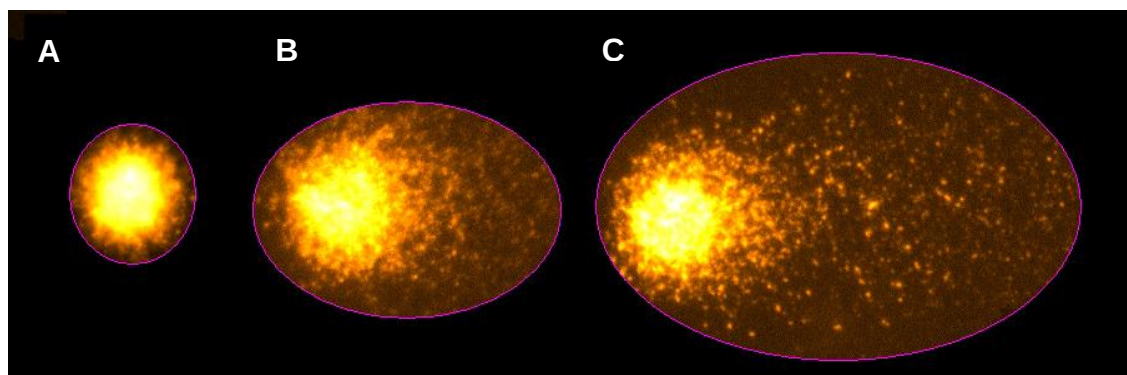


FIGURA 5 – Avaliação dos níveis de estresse oxidativo (*Tail Moment*), pelo ensaio do cometa. **A** – Célula normal; **B** – Célula com dano oxidativo moderado; **C** – Célula com dano oxidativo intenso.

4.12 – Método estatístico

Os resultados encontrados foram sempre descritos pelo valor médio e respectivo desvio padrão. Adotamos nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para todos os testes. Utilizamos o teste t de Student pareado para comparar os resultados encontrados na

¹¹ Komet 5.5. Andor Technology Bio-imaging Division. Belfast, Northern Ireland.

mensuração dos níveis teciduais de estresse oxidativo entre os segmentos providos e desprovidos de trânsito no grupo experimento. Adotamos o teste t de Student para as mesmas variáveis comparando animais do grupo controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal). Empregamos o teste de Mann-Whitney para comparar os resultados encontrados quanto à presença de úlceras e escore inflamatório, entre os grupos controle e experimento, nos segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito, nos três períodos de exclusão fecal. Empregamos o teste de Kruskal-Wallis para análise de variância dos parâmetros estudados com relação ao tempo de exclusão do trânsito.

5. RESULTADOS

A Figura 6 mostra corte histológico da parede cólica de segmento provido de trânsito fecal após 18 semanas da realização da operação. Verifica-se que as criptas cólicas encontram-se preservadas sem formação de úlceras epiteliais ou infiltrado inflamatório na base das criptas.

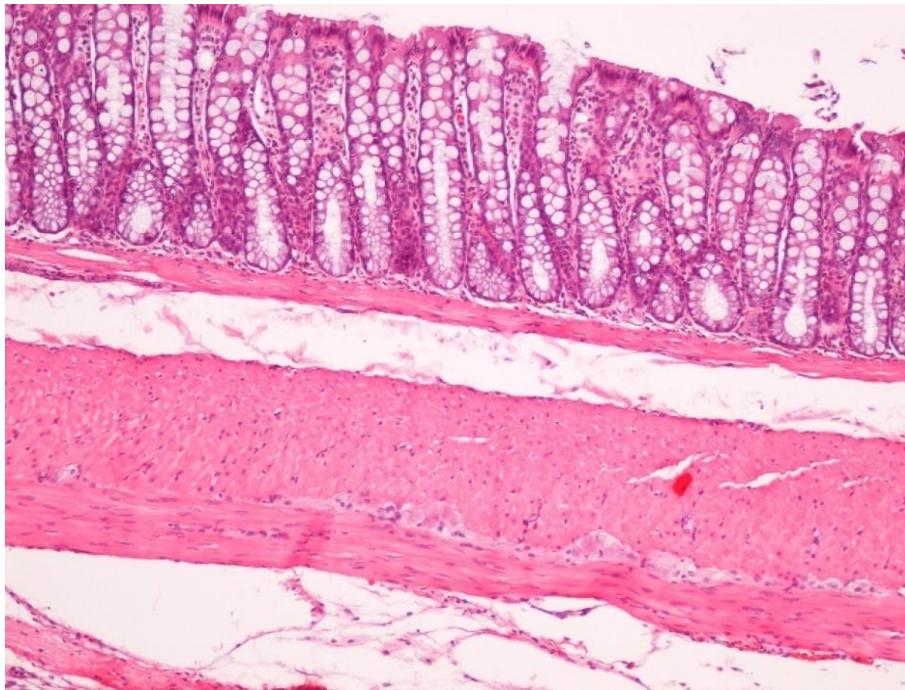


FIGURA 6 – Fotomicrografia da parede do cólon provido de trânsito fecal após 18 semanas. HE 100x.

A Figura 7 mostra corte histológico da parede cólica de segmento desprovido de trânsito fecal após 18 semanas da realização da operação. Verifica-se presença de atrofia de criptas cólicas presença de ulcerações epiteliais e infiltrado neutrofílico na base das criptas.

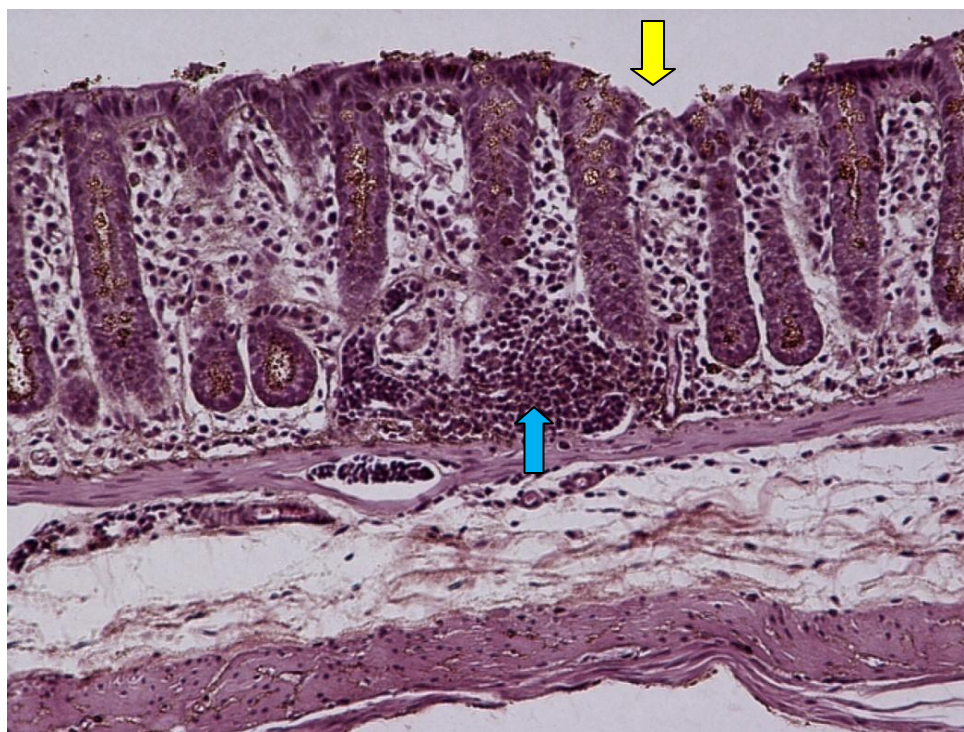


FIGURA 7 - Fotomicrografia da parede do cólon desprovido de trânsito fecal por 18 semanas. Ulceração epitelial (seta amarela). Infiltrado neutrofílico (seta azul). HE 100x

A Figura 8 mostra, em mediana com o respectivo desvio padrão, os valores encontrados para o escore inflamatório, comparando animais dos subgrupos controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal) nos diferentes períodos de exclusão propostos. Encontramos maior escore inflamatório nos segmentos desprovidos de trânsito independente do tempo de exclusão considerado. O valor do escore inflamatório no cólon desprovido de trânsito por seis semanas era de $3 \pm 0,40$. Verificamos que nos segmentos cólicos desprovidos de trânsito após 12 e 18 semanas de exclusão intestinal esses valores eram de $8,0 \pm 0,37$, apresentando

significância estatística quando comparado ao cólon com trânsito preservado e aos animais do grupo controle ($p<0,05$).

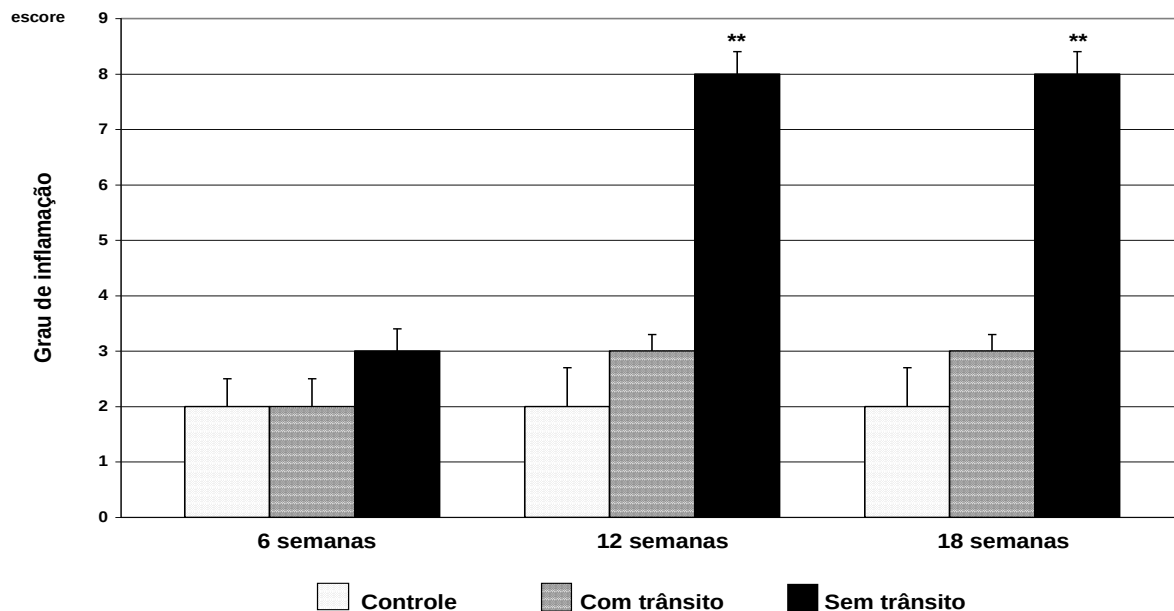


FIGURA 8 – Escore inflamatório de graduação inflamatória comparando os subgrupos controle e experimento (cólon com e sem trânsito) nos diferentes períodos de exclusão.

** significante (Sem trânsito x Controle e Com trânsito). Teste de Mann-Whitney.

A Figura 9 mostra a média, com o respectivo desvio padrão, os valores encontrados para os níveis de estresse oxidativo tecidual, comparando animais dos subgrupos controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal) nos diferentes tempos de exclusão do trânsito. Os níveis de estresse oxidativo ao DNA foram semelhantes no subgrupo controle e nos segmentos com trânsito, independentemente do tempo de exclusão considerado. Encontramos níveis teciduais de estresse oxidativo significativamente maiores nos segmentos desprovidos de trânsito quando comparados aos segmentos com trânsito e ao subgrupo controle, independente do tempo de exclusão considerado ($p<0,05$). No cólon excluído de trânsito por seis semanas, esses

valores eram de $3,24 \pm 0,44$ TM, enquanto após 12 e 18 semanas de exclusão os valores foram de $3,74 \pm 0,40$ TM e $4,37 \pm 0,32$ TM, respectivamente.

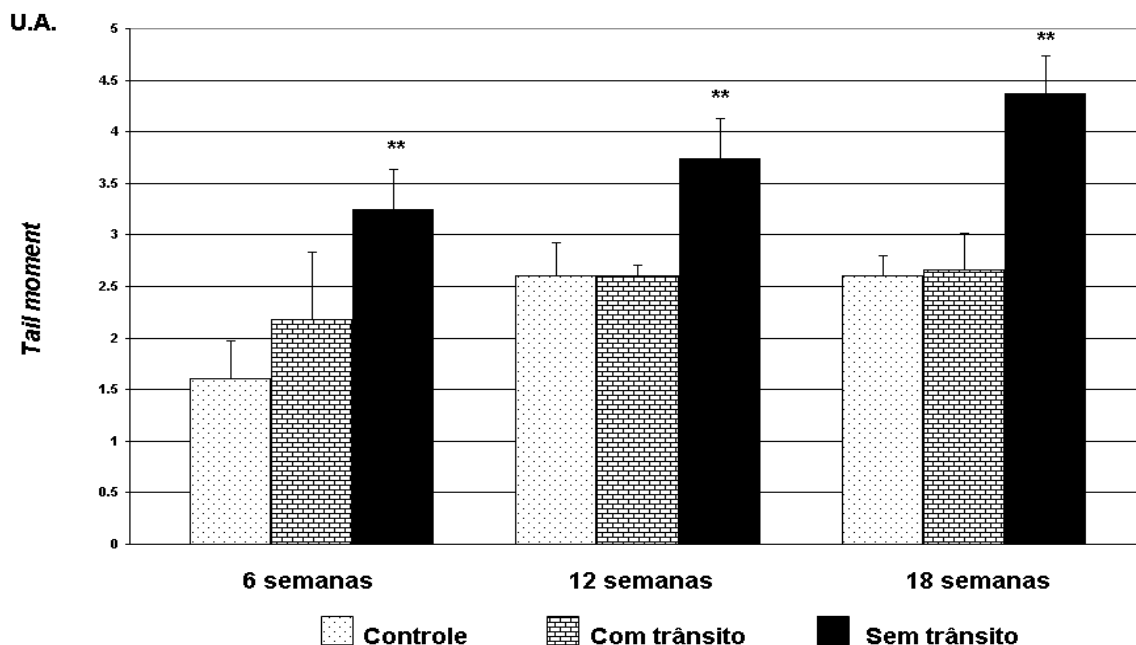


FIGURA 9 – Níveis de dano oxidativo ao DNA (*Tail Moment*) comparando os subgrupos controle e experimento (cólon com e sem trânsito) nos diferentes tempos de exclusão. ** significante (Sem trânsito x Controle e Com trânsito). Teste t de Student.

A Figura 10 mostra a variação do escore de graduação inflamatória e níveis de estresse oxidativo no cólon sem trânsito fecal, em relação aos tempos de exclusão propostos. Verificamos que nesses segmentos o escore inflamatório e os níveis teciduais de estresse oxidativo nos segmentos desprovidos de trânsito aumentavam com o decorrer do tempo de exclusão intestinal ($p=0,0007$).

Figura 10 - Variação dos valores médios em úlceras epiteliais segundo o escore de graduação inflamatória e níveis de estresse oxidativo no cólon desprovido de trânsito fecal em relação aos diferentes tempos de exclusão.

Cólon sem trânsito				
	M ± D.P.			
	6 semanas	12 semanas	18 semanas	p
<i>Escore inflamatório</i>	3,00 ± 0,40	8,00 ± 0,37	8,00 ± 0,37	0,001*
<i>Estresse oxidativo (TM)</i>	3,24 ± 0,44	3,74 ± 0,40	4,37 ± 0,32	0,0007*

M = Média; D.P. = Desvio padrão; TM = Tail moment; * = significante; Teste de Kruskal-Wallis.

A Figura 11-A mostra a expressão tecidual da proteína p53 mutante no tecido neoplásico obtido de doente câncer colorretal, sabidamente positivo para proteína p53 (controle positivo). A Figura 11-B mostra a pesquisa da proteína p53 mutante onde não foi adicionado o anticorpo primário (controle negativo). As Figuras 11-C e 11-D mostram, respectivamente, a pesquisa da proteína p53 em segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal de animais submetidos a 18 semanas de derivação intestinal. Não houve expressão da proteína p53 mutante em nenhum animal do subgrupo controle, bem como nos segmentos com e sem trânsito fecal dos animais do subgrupo experimento, independente do tempo de exclusão considerado.

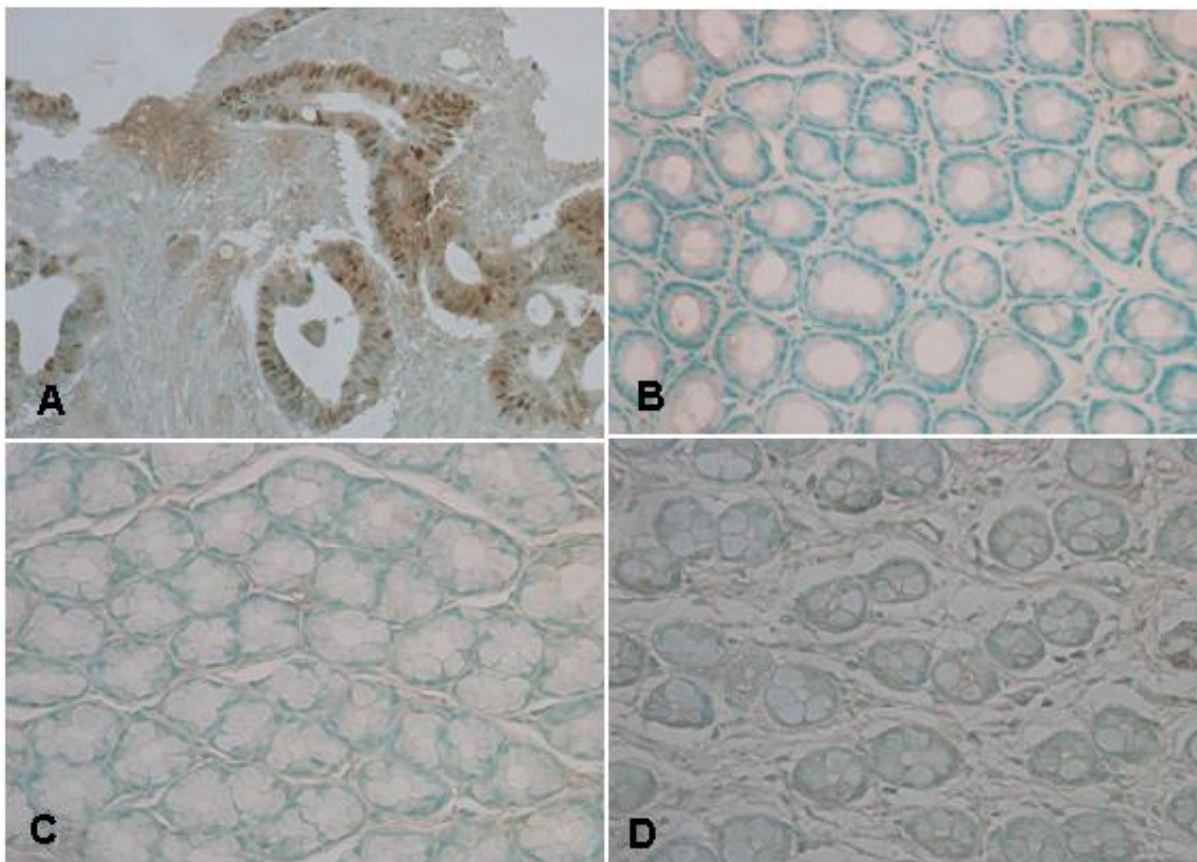


Figura 11 – **A** – Controle positivo para proteína p53; **B** – Controle negativo para proteína p53; **C** – Cólon com trânsito fecal após 18 semanas de exclusão intestinal (proteína p53 negativa); **D** - Cólon sem trânsito fecal após 18 semanas de exclusão intestinal (proteína p53 negativa). (IH. p53 200x)

6. DISCUSSÃO

Estudos vêm demonstrando que o estresse oxidativo desempenha papel importante na etiopatogenia da RCUI e da CE (Seril et al., 2003; Pravda, 2005). A teoria da indução da RCUI por radicais livres propõem que os RLO são responsáveis pela agressão inicial ao epitélio cólico que precede a infiltração inflamatória (Pravda, 2005). De modo semelhante, recentemente demonstramos, em modelo experimental de CE, que células da mucosa cólica desprovidas do suprimento de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são capazes de formar altos níveis de RLO levando ao aparecimento da colite (Martinez, 2009). Esses achados sugerem que em ambas as enfermidades a agressão inicial à mucosa cólica é desencadeada pela formação aumentada de RLO pela própria célula epitelial com modificações no seu metabolismo energético (Pravda, 2005; Martinez et al., 2008). Como são moléculas tóxicas, com grande capacidade de difusão tecidual, a produção aumentada de RLO provoca quebra das diferentes linhas de defesa que compõem a barreira epitelial mucosa, permitindo a translocação de bactérias do interior da luz intestinal para o interior da camada submucosa estéril (Pravda, 2005). Na tentativa de combater a infiltração bacteriana, leucócitos migram para parede intestinal, dando origem ao processo inflamatório característico das doenças (Millar et al., 1996; Sheridam et al., 1996; Shami e Moreira, 2004; Pravda, 2005).

De todos os AGCC existentes na luz intestinal, capazes de serem utilizados como combustível energético pelas células epiteliais, o butirato é o mais metabolizado, seguido pelo propionato e acetato (Roediger e Rae, 1982; Scheppach e Weiler, 2004). Células isoladas da mucosa cólica aumentam, intensamente, seu metabolismo oxidativo quando o butirato é acrescido ao meio, confirmando ser o substrato energético

preferencialmente utilizado por essas células (Roediger e Truelove, 1979; Velazquez et al, 1997). Quando é o único combustível disponível, o butirato aumenta significativamente a taxa celular de consumo de oxigênio, confirmando sua importância não só como fonte de energia, mas como regulador dos níveis celulares de RLO (Roediger e Truelove, 1979; Velazquez et al, 1997; Liu et al., 2001). Os AGCC possuem efeitos protetores contra o dano oxidativo tecidual pela capacidade de diminuir a produção de RLO pelas células (Rosignoli et al., 2001). De modo distinto, substâncias que inibem a oxidação dos AGCC, como o 2-bromo-octanoato sódico, impedindo seu metabolismo energético, desencadeiam inflamação do epitélio cólico, sugerindo que a deficiência nutricional seja um evento inicial na etiopatogenia das colites (Agarwal e Schimel, 1989; Roediger, 1990).

O desvio do trânsito fecal interrompe a o fornecimento de AGCC para o segmento excluso, fazendo com que as células epiteliais não possam dispor de seu principal substrato nutritivo, passando a utilizar, como fonte energética alternativa, a glutamina, oferecida pela circulação sistêmica (Lopes-Paulo, 2002). Todavia, o suprimento sangüíneo de glutamina parece ser incapaz de fornecer todo suprimento necessário modificando, substancialmente, os mecanismos celulares para obtenção de energia e levando a maior produção de RLO (Martinez, 2009). Confirmam essas evidências, resultados de estudos demonstrando que a administração intrarretal de AGCC ou glutamina, em modelos experimentais de colite, é capaz de reduzir a formação de RLO (Matés et al., 2002; Fillmann et al., 2007). Em síntese, todas essas evidências sugerem que a interrupção do fornecimento de AGCC à mucosa cólica, tal como ocorre nas operações de derivação intestinal, pode aumentar a formação de RLO levando ao aparecimento da CE.

Os resultados encontrados no presente estudo confirmam essa possibilidade quando encontramos maiores níveis de dano oxidativo ao DNA nas células isoladas dos segmentos desprovidos de trânsito fecal (Fig.9). Os maiores níveis de estresse oxidativo no cólon excluído aumentavam com o decorrer do tempo de exclusão e estavam relacionados à piora do escore de graduação inflamatória (Fig. 10). De modo contrário, nos segmentos providos de trânsito, apesar de existir algum grau de dano oxidativo, esses níveis eram menores que os encontrados nos segmentos sem trânsito, mantendo-se praticamente estáveis ao longo do tempo (Fig.9). Esses achados ratificam a importância do fornecimento de AGCC para manutenção da homeostase energética celular.

Os AGCC são fundamentais para a manutenção da integridade da barreira funcional do epitélio cólico e na prevenção do CCR (Pravda, 2005).³ A falta de AGCC na luz intestinal diminui a espessura das criptas cólicas, reduz a expressão mucinas que constituem as primeiras linhas de defesa da mucosa contra a infiltração bacteriana, e danifica o DNA nuclear (Martinez et al., 2008a; Sousa et al., 2008; Nonose et al., 2009). Estudos utilizando modelos experimentais de CCR em ratos demonstraram correlação inversa entre a velocidade do desenvolvimento tumoral e níveis de butirato na luz do cólon, reforçando o papel dos AGCC no equilíbrio do ciclo celular (Hague et al., 1993; McIntry et al., 1993; Avivi-Green et al., 2000). A administração oral de butirato aumenta significativamente o índice de apoptose celular em modelos experimentais de CCR, confirmando seu potencial efeito anti-neoplásico (McIntry et al., 1993).

A manutenção de um suprimento adequado de AGCC é capaz de inibir eventos precoces e tardios da carcinogênese colorretal por controlar a transcrição, e a expressão de vários genes reguladores da divisão celular (McIntry et al., 1993). Os

AGCC modificam a expressão de genes supressores de tumor, tais como o *p53*, apresentando papel fundamental nos sistemas de reconhecimento e correção dos erros de pareamento de bases do DNA (*p53-p53R2*) (Yoshida et al., 2006). O controle funcional da expressão desses genes é constitutivamente estimulado pelo butirato e, dificuldades no reconhecimento e reparo dos erros de pareamento aumentam a possibilidade de mutações e, conseqüentemente, neoplasias (Yoshida et al., 2006). Diante de todas essas evidências é lícito supor que a deficiência prolongada no suprimento de AGCC às células da mucosa cólica possa, pela maior produção de RLO, danificar o gene *p53*, traduzir uma proteína *p53* mutante e, do ponto de vista teórico, aumentar possibilidade do aparecimento do CCR em segmentos excluídos de trânsito. Todavia, o desenvolvimento de tumores em segmentos cólicos excluídos de trânsito por moléstias diferentes das doenças inflamatórias intestinais e CCR é extremamente raro, mesmo após longos períodos de exclusão.

De modo diferente, nos doentes com RCUI a progressão para CCR é possibilidade freqüentemente descrita. Estima-se que o risco relativo do desenvolvimento de CCR em portadores de RCUI seja 10 vezes maior que na população normal e que após 30 anos de evolução o risco acumulado seja de 20% (Seril et al., 2003). Mesmo nos segmentos retais excluídos de trânsito fecal por complicações das doenças inflamatórias o desenvolvimento de CCR vem sendo descrito (Oakley et al., 1985; Petersen e Raahave, 2008). Já se demonstrou que o estresse oxidativo ao DNA celular causado por RLO tanto em doentes com RCUI, quanto em modelos de colite quimicamente induzida encontra-se relacionado ao aparecimento de CCR (Cooper et al., 2000; Okayasu et al, 2002; Seril et al., 2003). O estresse oxidativo, oxidando bases, leva a erros de pareamento com deleções ou

inserções de nucleotídeos em genes controladores do ciclo celular. Quando o reparo dessas bases oxidadas não é adequado podem surgir mutações e em última análise progressão do tecido normal para neoplásico (Seril et al., 2003).

Pesquisas demonstraram que nos doentes com RCUI um dos genes mais susceptíveis ao estresse oxidativo é o *p53* (Brentall et al., 1994; Levine, 1997; Fogt et al., 1998). Mutações no gene *p53* aumentam de frequência quando se comparam tecidos inflamados, com graus crescentes de displasia e neoplásicos, respectivamente (Okayasu et al., 2002). Apesar de se encontrar maiores níveis de mutações do gene *p53* nos tecidos neoplásicos, é possível encontrar-se algum grau mutação nos tecidos cronicamente inflamados sem câncer. Estima-se que mutações no gene *p53* ocorram em 70% dos tecidos neoplásicos e em 20% dos tecidos inflamados com displasia (Okayasu et al., 2002). No espectro de mutações do gene *p53* no CCR associado a RCUI, as transições de bases respondem por cerca de 80% de todas as mutações encontradas (Seril et al., 2003). Cabe lembrar que a transição de bases do tipo guanina-adenina ou guanina-timina são causadas, principalmente, por estresse oxidativo provocado por RLO ou por agentes alquilantes (Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2008).

Estudos que avaliaram a expressão da proteína *p53* mutante em modelos experimentais de RCUI criados pela administração de DSS encontraram maiores níveis de expressão no tecido neoplásico, mostrando que a agressão inflamatória crônica por essas substâncias químicas determinam mutações no gene *p53* (Okamoto et al., 1995). Esses mesmos estudos ao analisarem a expressão tecidual da proteína *p53* selvagem, nos tecidos tumorais e inflamados, encontraram pequena expressão tecidual, sugerindo que o gene *p53* talvez pudesse estar menos expresso (Brentnall et al., 1994). Como

resultado, a menor função do gene *p53* poderia eliminar um importante mecanismo de defesa contra ação de moléculas oncogênicas, tais como os RLO, formadas pelo processo inflamatório (Brentnall et al, 1994).

No presente estudo, não encontramos diferenças na expressão tecidual da proteína *p53* mutante ao compararmos células epiteliais obtidas da mucosa cólica comparando segmentos cólicos com e sem trânsito preservado, apesar de termos encontrado maiores níveis de estresse oxidativo ao DNA no segmento excluído. Apesar dos níveis de dano oxidativo ao DNA aumentarem com o decorrer do experimento não foram acompanhados por maiores níveis de mutações da proteína *p53*. Os níveis progressivamente aumentados de estresse oxidativo nesses segmentos relacionados ao tempo de exclusão sugerem a manutenção da agressão inflamatória nesses tecidos ao longo de todo experimento. Cabe lembrar que encontramos maior escore de graduação inflamatória nos segmentos desprovidos de trânsito quando comparado aos com trânsito preservado e que o maior grau de inflamação mantinha-se elevado ao longo de todo o experimento.

A ausência de mutações na proteína *p53*, na mucosa cólica cronicamente inflamada pode estar relacionada a várias causas. Diferente do que ocorre na RCUI a exclusão de trânsito fecal reduz a população bacteriana e o conteúdo intraluminal de substâncias carcinogênicas em contato com as células da mucosa cólica. É possível que a menor exposição do epitélio cólico a esses agentes carcinogênicos químicos ou biológicos diminua o dano ao DNA dessas células. Recentes estudos em camundongos demonstraram que toxinas produzidas pelo *Bacteroides fragilis* podem não só determinar o quadro de inflamação da mucosa cólica semelhante a que ocorre na RCUI, bem como levar à formação do CCR (Rhee et al., 2009; Wu et al., 2009).

Reforçam essas evidências estudos experimentais demonstrando que o aparecimento de CCR após a exposição da mucosa cólica somente ao DSS não é muito freqüente, todavia, ao se associar substâncias com potencial carcinógeno, tais como o azoximetano (AZM), ocorre aumento significativo do desenvolvimento de CCR (Fujii et al., 2004). Para testar essa possibilidade, atualmente estamos administrando AZM em animais com CE e em animais submetidos à colite quimicamente induzida por TNBS.

É possível especular que o tempo de exclusão adotado no presente estudo não tenha sido suficiente para determinar mutações no gene *p53*. Entretanto, essa possibilidade nos parece pouco provável ao considerarmos que uma expectativa média de vida de 70 anos no homem, faixa etária onde o CCR é mais prevalente, corresponde a aproximadamente dois anos nos ratos Wistar (Araújo, 2007). Assim sendo acreditamos que com tal período de exclusão eventuais mutações na proteína por agentes externos no cólon com trânsito ou pelo processo inflamatório no cólon sem trânsito, teriam sido detectadas.

A possibilidade de que o anticorpo primário utilizado não tenha apresentado reatividade cruzada para tecido cólico de ratos também poderia ser aventada como possibilidade para a ausência de imunoreação. Entretanto, essa possibilidade é difícil de ser aceita uma vez que além da recomendação do fabricante, estudos anteriores utilizando o mesmo clone mostrou positividade para a expressão tecidual em câncer associado a colite quimicamente induzido por DSS (Bretnall et al., 1994; Okamoto et al., 1995).

Outra possibilidade para explicar a ausência de mutações da proteína *p53* nos segmentos sem trânsito é que talvez, a quantidade de dano oxidativo ao DNA não tenha sido suficiente para ocasionar mutações no gene *p53*, ou caso elas tenham

ocorrido, foram identificadas pela proteína *p53* selvagem e corrigidas pelas proteínas de reparo. É possível que a ausência dos AGCC nos segmentos desprovidos de trânsito reduzindo a expressão do gene *p53* tenha apenas diminuído a quantidade da proteína *p53* selvagem traduzida, mas que esta menor quantidade ainda permaneceria eficaz na identificação de eventuais erros de pareamento ocasionados pelo dano oxidativo. Para avaliar tal possibilidade, atualmente, estamos analisando por reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) os níveis de expressão do gene *p53* e relacionando-o com os níveis teciduais da proteína *p53* quantificada por morfometria computadorizada no mesmo modelo experimental.

Apesar dos modelos de RCUI e CE apresentarem como denominador comum o intenso processo inflamatório crônico à mucosa cólica que se agrava com o decorrer do tempo mutações na proteína *p53*, encontradas no tecido cólico de portadores de RCUI e no tecido de animais submetidos à colite quimicamente induzida não foram encontradas no modelo de CE proposto (McIntyre et al., 1993; Avivi-Green et al., 2000). É possível que esses menores índices de mutação na proteína *p53*, justifiquem a menor incidência de CCR nos segmentos desprovidos de trânsito fecal de doentes submetidos à derivação por enfermidades distintas da RCUI. Não obstante os resultados encontrados no modelo experimental proposto, estudos avaliando a mucosa cólica exclusiva de trânsito fecal de seres humanos, que desenvolveram CE devem ser realizados para confirmar esta possibilidade.

7. CONCLUSÕES

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

1. As células epiteliais da mucosa cólica desprovida de trânsito fecal apresentam maiores níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear, quando comparadas às obtidas da mucosa cólica com trânsito preservado.
2. Os níveis de dano oxidativo ao DNA nuclear de células epiteliais isoladas da mucosa cólica desprovida de trânsito fecal aumentam com o transcorrer do tempo de exclusão fecal;
3. A exclusão do trânsito fecal não se encontra relacionada à maior incidência de mutações na proteína p53;
4. O tempo de exclusão fecal não se encontra relacionado à maior incidência de mutações na proteína p53.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

Almalouf P, Shehab TM, Daniel AM, Robinson EA, Barnett JL. Therapeutic hydrogen peroxide enema causing severe acute colitis. *Int J Colorectal Dis.* 2008;23(11):1139-40.

Ancha HR, Kurella RR, McKimmey CC, Lightfoot S, Harty RF. Luminal antioxidants enhance the effects of mesalamine in the treatment of chemically induced colitis in rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008;233(10):1301-8.

Ancha HR, Kurella RR, McKimmey CC, Lightfoot S, Harty RF. Effects of N-acetylcysteine plus mesalamine on prostaglandin synthesis and nitric oxide generation in TNBS-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci.* 2009;54(4):758-66.

Aoi Y, Terashima S, Ogura M, Nishio H, Kato S, Takeuchi K. Roles of nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of dextran sulfate sodium-induced rat colitis. *Physiol Pharmacol.* 2008;59(2):315-36.

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

Augenlicht LH, Mariadason JM, Wilson A, Arango D, Yang W, Heerdt BG, Velcich A. Short chain fatty acids and colon cancer. *J Nutr.* 2002;132:3804-8.

Avivi-Green C, Polak-Charcon S, Madar Z, Schwartz, B. Apoptosis cascade proteins are regulated in vivo by high intracolonic butyrate concentration: correlation with colon cancer inhibition. *Onco. Res.* 2000; 12:83-95.

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

Battacharya PK, Barton JK. Influence of intervening mismatches on long range guanine oxidation in DNA duplexes. *J Am Chem Soc.* 2001;123:8649-56.

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

Berra CM, Menk CFM. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Quim Nova.* 2006;29:1340-4.

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

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

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

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

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

Brentnall TA, Crispin DA, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Rubin CE, Stevens AC, Burner GC. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 1994; 107;369-78.

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

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

Caltabiano C. Avaliação dos efeitos antioxidantes do ácido 5-aminosalicílico em células da mucosa cólica provida e desprovida de trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos. Tese (Mestrado). São Paulo: Universidade São Francisco, Bragança Paulista, São Paulo; 2010.

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

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

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

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

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

Chaubert P, Benhattar J, Saraga E, Costa J. K-ras mutations and p53 alterations in neoplastic and nonneoplastic lesions associated with longstanding ulcerative colitis. *Am. J. Pathol.* 1994;144:767-75.

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

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

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

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

Cooper HS, Murthy S, Kido K, et al. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation, Carcinogenesis. 2000;21:757–68.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fillmann HS. O efeito protetor da glutamina na colite experimental induzida por ácido acético. Tese (Doutorado). Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.

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

Filipe MI. Value of histochemical reactions for mucosubstances in the diagnosis of certain pathological conditions of the colon and rectum. *Gut*. 1969;10(7):577-86

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

Fogt F, Zhuang Z, Poremba C, Dockhorn-Dworniczak B, Vortmeyer A. Comparison of p53 immunoexpression with allelic loss of p53 in ulcerative colitis-associated dysplasia and carcinoma. *Oncol Rep*. 1998;5: 477-80.

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

Fujii S, Fujimori T, Kawamata H, Takeda J, Kitajima K, Omotehara F, Kaihara T, Kusaka T, Ichikawa K, Ohkura Y, Ono Y, Imura J, Yamaoka S, Sakamoto C, Ueda Y, Chiba T. Development of colonic neoplasia in p53 deficient mice with experimental colitis induced by dextran sulphate sodium. *Gut*. 2004;53(5):710-6.

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

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

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

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

Glotzer DJ, Glick ME, Goldman H. Proctitis and colitis following diversion of fecal stream. *Gastroenterology*. 1981;80(3):438-41.

Grant NJ, Van Kruiningen HJ, Haque S, West AB. Mucosal inflammation in pediatric diversion colitis: a quantitative analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1997;25(3):273-80.

Griffiths AP, Dixon MF. Microcarcinoids and diversion colitis in a colon defunctioned for 18 years. Report of a case. *Dis Colon Rectum*. 1992;35(7):685-8.

Grisham MB. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet*. 1994;344: 859-61.

Guillemot F, Colombel JF, Neut C, Verplanck N, Lecomte M, Romond C, Paris JC, Cortot A. Treatment of diversion colitis by short-chain fatty acids. Prospective and double-blind study. *Dis Colon Rectum*. 1991;34(10):861-4.

Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;899:136-47.

Haas PA, Fox TA Jr, Szilagy EJ. Endoscopic examination of the colon and rectum distal to a colostomy. *Am J Gastroenterol*. 1990;85(7):850-4.

Haas PA, Haas GP. A critical evaluation of the Hartmann's procedure. *Am Sur*. 1988;54(6):380-5.

Habr-Gama A, Teixeira MG, Vieira MJF, Miléu LF, Laurino Neto R, Pinotti HW. Operação de Hartmann e suas conseqüências. *Rev bras Coloproctol*. 1997;17(1):5-10.

Hague A, Manning AM, Hanlon KA, Huschtscha LI, Hart D, Paraskeva C. Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumor cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fiber in the prevention of large-bowel cancer. *Int J Cancer*. 1993; 55:498-505.

Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 1990;280(1):1-8.

Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem.* 1997;69(3):1330-1.

Hanai H, Sugimoto K. Curcumin has bright prospects for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des.* 2009;15(18):2087-94.

Haque S, Eisen RN, West AB. The morphologic features of diversion colitis: studies of a pediatric population with no other disease of the intestinal mucosa. *Hum Pathol.* 1993;24(2):211-9.

Harig JM, Soergel KH, Komorowski RA, Wood CM. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. *N Engl J Med.* 1989;320(1):23-8.

Harpaz N, Peck AL, Yin J, Fiel I, Hontanosas M, Tong TR, Laurin JN, Abraham JM, Greenwald BD, Meltzer SJ. p53 protein expression in ulcerative colitis-associated colorectal dysplasia and carcinoma. *Hum Pathol.* 1994;25:1069-74.

Hayashi Y, Aoyagi K, Morita I, Yamamoto C, Sakisaka S. Oral administration of mesalazine protect against mucosa injury and permeation in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(11):1323-31.

Hayman EG, Oldberg A, Martin GR, Ruoslahti E. Codistribution of heparan sulfate proteoglycan, laminin, and fibronectin in the extracellular matrix of normal rat kidney cells and their coordinate absence in transformed cells. *J Cell Biol.* 1982;94(1):28-35.

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

Hoffmann JC, Pawlowski NN, Kühl AA, Höhne W, Zeitz M. Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. *Pathobiology.* 2002-2003;70(3):121-30.

Jiang H, Deng CS, Zhang M, Xia J. Curcumin-attenuated trinitrobenzene sulphonic acid induces chronic colitis by inhibiting expression of cyclooxygenase-2. *World J Gastroenterol.* 2006;12(24):3848-53.

Jørgensen JR, Clausen MR, Mortensen PB. Oxidation of short and medium chain C2-C8 fatty acids in Sprague-Dawley rat colonocytes. *Gut.* 1997;40(3):400-5.

Kaya E, Gür ES, Ozqüç H, Bayer A, Tokyay R. L-glutamine enemas attenuate mucosal injury in experimental colitis. *Dis Colon Rectum.* 1999;42(9):1209-15.

Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 2000;149:43-50.

Keli E, Bouchoucha M, Devroede G, Carnot F, Ohrant T, Cugnenc PH. Diversion-related experimental colitis in rats. *Dis Colon Rectum.* 1997;40(2):222-8.

Kiely EM, Ajayi NA, Wheeler RA, Malone M. Diversion procto-colitis: response to treatment with short-chain fatty acids. *J Pediatr Surg*. 2001;36(10):1514-7.

Komorowski RA. Histologic spectrum of diversion colitis. *Am J Sur Pathol*. 1990;14(6):548-54.

Korelitz BI, Cheskin LJ, Sohn N, Sommers SC. The fate of the rectal segment after diversion of the fecal stream in Crohn's disease: its implications for surgical management. *J Clin Gastroenterol*. 1985;7(1):37-43.

Koutroubakis IE. Spectrum of non-inflammatory bowel disease and non-infectious colitis. *World J Gastroenterol*. 2008;14(48):7277-9.

Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease: radicals or ridiculous. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16(12):1997-2015.

Lapeyre B. The "frost sign" and the "snow white sign": intramucosal air injection or peroxide colitis? *Endoscopy*. 2005;37(7):679.

Lashner BA, Silverstein MD, Hanauer SB. Hazard rates for dysplasia and surveillance in patients with ulcerative colitis. Results from a surveillance program. *Dig Dis Sci*. 1989;34:1536-41.

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

Lechner GL, Frank W, Jantsch H, Pichler W, Hall DA, Waneck R, Wunderlich M. Lymphoid follicular hyperplasia in excluded colonic segments: a radiologic sign of diversion colitis. *Radiology*. 1990;176(1):135-6.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997; 88: 323–331.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Martinez CAR, Priolli DG, Cardinalli IA, Pereira JÁ, Valim AP, Margarido NF. Influência da localização do tumor na expressão tecidual da proteína p53 em doentes com câncer colorretal. Estudo de 100 casos. *Rev Col Bras Cir*. 2008;35(4):235-43 a.

Martinez CAR, Ribeiro ML, Priolli DG, Alfredo CH, Miranda DDC. Quantificação dos níveis de estresse oxidativo ao DNA de células da mucosa cólica na colite de exclusão. Estudo experimental em ratos. *Revista Brasileira de Coloproctologia*. 2008;28(Supl.1):47b.

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

McIntyre A., Gibson PR, Young GP. Butyrate production from dietary fiber and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut*. 1993;34:386-391.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Oakley JR, Lavery IC, Fazio VW, Jagelman DG, Weakley FL, Easley K. The fate of the rectal stump after subtotal colectomy for ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum*. 1985;28(6):394-6.

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

Okamoto M, Ohtsu H, Kominami R, et al. Mutational and LOH analyses of p53 alleles in colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in F1 hybrid mice. *Carcinogenesis* 1995;16:2659–66.

Okayasu I, Yamada M, Mikami T, et al. Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17:1078–83.

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

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

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

Petersen CN, Raahave D. Adenocarcinoma in a closed rectal stump in inflammatory bowel disease. *Ugeskr Laeger*. 2008;170(41):3251.

Pinho MSL. Proteína p53: Algum valor clínico ou apenas pesquisa? Uma revisão da literatura. *Rev bras Coloproct*. 2000;20(4):258-60.

Pinho MSL, Rossi BM. As proteínas envolvidas na carcinogênese colorretal (IV). *Rev bras Coloproct*. 1998;18(4):278-82.

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

Rainey JB, Davies PW, Bristol JB, Williamson RC. Adaptation and carcinogenesis in defunctioned rat colon: divergent effect of faeces and bile acids. *Br J Cancer*. 1983;48:477-84.

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

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

Rhee KJ, Wu S, Wu X, Huso DL, Karim B, Franco AA, Rabizadeh S, Golub JE, Mathews LE, Shin J, Sartor RB, Golembok D, Hamad AR, Gam CM, Housseau F, Sears CL. Induction of persistent colitis by a human commensal, enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in wild-type C57BL/6 mice. *Infect Immun*. 2009; 77(4):1708-18.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Rubio CA, Nylander G. Further studies on the carcinogenesis of the colon of the rat with special reference to the absent of intestinal contents. *Cancer*. 1981;48:951-3.

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

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

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

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

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

Shami NJIE, Moreira, EAM. Licopeno como agente antioxidante. *Nutr*. 2004;17: 227-36.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Takesue F, Korenaga D, Yao T, Kabashima A, Sugimachi K. Development of colonic neoplasms and expressions of p53 and p21 proteins in experimental colitis of mice induced by dextran sulfate sodium. *J Exp Clin Cancer Res.* 2001; 20(3):413-8.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Velazquez OC, Seto RW, Choi J, Zhou D, Breen F, Fisher JD, Rombeau JL. Butyrate inhibits deoxycolate-induced increase in colonic mucosal DNA and protein synthesis in vivo. *DisColonRectum.*1997;40:1368-75 (b).

Vetuschi A, Latella G, Sferra R, Caprilli R, Gaudio E. Increased proliferation and apoptosis of colonic epithelial cells in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci.* 2002; 47(7):1447-57.

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

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

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

Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, Huso DL, Brancati FL, Wick E, McAllister F, Housseau F, Pardoll DM, Sears CL. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nature.* 2009;15(9):1016-22.

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

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

Yoshida T, Haga S, Numata Y, Yamashita K, Mikami T, Ogawa T, Ohkusa T, Okayasu I. Disruption of the p53-p53r2 DNA repair system in ulcerative colitis contributes to colon tumorigenesis. *Int J Cancer*. 2006;118(6):1395-403

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

9. FONTES CONSULTADAS

1. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR-6023: Informação e documentação, referências-elaboração. Rio de Janeiro; 2000.
2. Cunha AC. Estrutura e Apresentação de Dissertações e Teses. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1991. 48p.
3. Guedes MLS, Guedes JS. Descrição da Amostra: Tabelas e Gráficos. In: Guedes MLS, Guedes JS. Bioestatística para profissionais da saúde. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico; 1988. p.43-58.
4. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. N Eng J Med. 1997;336(4):309-16.
5. International Committee of Medical Journal Editors. Requisitos uniformes para manuscritos apresentados a periódicos biomédicos. Ver Saúde Pública. 1999;33:6-15
6. Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. São Paulo, 2001. 85p.
7. Walker JR MLA. Style citations of eletronic sources. [online]. Available from: <http://www.cas.usf.edu/english/walker/mla.html>. (25 jan. 2009)
8. Guimarães CA. Normas para manuscritos submetidos às revistas biomédicas: Escrita e edição da publicação biomédica (tradução integral do texto). Rev Col Bras Cir. 2008;35(6):425-41.
9. Ayres M, Ayres Júnior M, dos Santos AS. In: Ayres M, Ayres Júnior M, dos Santos AS. Bioestat 2.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; 2000. 227p.
10. CIOMS Council for International Organization of Medical Sciences. Ethical code for animal experimentation. WHO Chronicle. 1985;39(2):51-6.
11. Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Princípios éticos para o uso de animais de laboratório. [online]. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20eticos>. (25 jan. 2009)
12. Brasil. Presidência da República. Lei Federal n. 11.794 de 8 de outubro de 2008. [online]. Estabelece critérios para a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo território nacional. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm (02 jul. 2009)
13. Spector, N. Manual para a redação de teses, projetos de pesquisa e artigos científicos. 2º ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

10. ANEXO: Valores de *Tail moment* e de Grau de inflamação

Rato	6 SEMANAS						12 SEMANAS						18 SEMANAS					
	TM - C	TM - P	TM - D	GI- C	GI- P	GI- D	TM - C	TM - P	TM - D	GI- C	GI- P	GI- D	TM - C	TM - P	TM - D	GI- C	GI- P	GI- D
1	1,66	1,62	3,09	2	3	3	2,13	2,52	4,69	1	3	8	2,56	2,84	3,95	2	3	8
2	2,22	1,98	3,72	2	1	3	3,01	3,42	4,42	2	3	8	2,39	2,16	3,45	2	3	8
3	1,52	2,5	5,46	2	2	3	2,75	2,73	3,89	2	3	8	2,93	2,32	3,53	2	3	8
4	1,34	2,13	3,49	2	2	3	2,7	2,07	3,75	2	2	8	2,63	2,61	3,08	2	3	8
5	1,28	2,49	2,57	2	3	3	2,43	2,74	4,24	3	3	7	2,51	2,71	3,62	2	3	7
6		3,2	4,51		1	3		2,97	4,05		3	8		2,74	4,21		3	8
7		1,68	3,77		2	3		2,56	3,97		3	8		3,56	4,02		3	8
8		3,5	4,46		2	3		2,41	3,86		3	8		2,67	3,25		3	8
9		2,13	2,93		2	3		2,53	3,2		3	8		2,34	3,97		3	8
10		2,09	3,4		2	3		2,3	3,3		3	8		2,38	3,56		3	8
11		1,48	3,11		2	2		2,63	4,23		3	8		2,63	4,07		3	7
12		1,64	3,51		2	3		2,75	3,53		2	7		2,98	4,22		3	8
13		1,54	3,5		2	4		2,94	3,98		3	8		2,6	3,9		3	8
14		1,38	4,7		2	3		2,39	4,04		3	8		2,62	3,51		3	8
15		1,8	2,64		2	3		2,17	3,97		3	8		2,58	3,8		3	8
Média	1,6	2,2	3,65	2	2	3	2,6	2,6	3,94	2	2,9	7,96	2,6	2,6	3,74	2	2,9	7,96
D.P.	0,37	0,62	0,88	0,53	0,53	0,37	0,3	0,34	0,39	0,7	0,25	0,37	0,18	0,36	0,37	0,7	0,25	0,37

T.M = Tail moment - TM

GI = Grau de inflamação (escore)

C = Controle

P = Proximal

D = Distal

11. APÊNDICE

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



Bragança Paulista, 22 de Novembro 2007.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

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

Instituição: Universidade São Francisco

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

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

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

Parecer: Aprovado

Atenciosamente,


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

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825

CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Arz CEP 13045-270 (19) 3779-3300

CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933