

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

OSCAR ORLANDO ARAYA FERNANDEZ

**AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO TECIDUAL DA PROTEÍNA
MUCINA-2 (MUC-2) NA MUCOSA CÓLICA EXCLUSA DE
TRÂNSITO INTESTINAL SUBMETIDA À INTERVENÇÃO COM
SUCRALFATO**

Bragança Paulista
2017

OSCAR ORLANDO ARAYA FERNANDEZ – RA. 001201403478

**AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO TECIDUAL DA PROTEÍNA
MUCINA-2 (MUC-2) NA MUCOSA CÓLICA EXCLUSA DE
TRÂNSITO INTESTINAL SUBMETIDA À INTERVENÇÃO COM
SUCRALFATO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

Bragança Paulista

2017

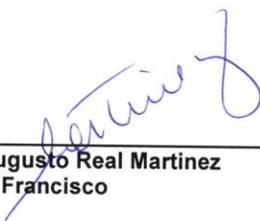
WI 522 Fernandez, Oscar Orlando Araya.
F413a Avaliação do conteúdo tecidual da proteína Mucina-2 (MUC-2)
na mucosa cólica exclusiva de trânsito intestinal submetida à
intervenção com sulcrafato / Oscar Orlando Araya Fernandez. --
Bragança Paulista, 2017.
64 p.

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

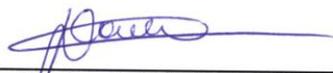
Orientação de: Carlos Augusto Real Martinez.

1. Cólon. 2. Colite. 3. Sucralfato. 4. Mucinas. 5. Mucina 2.
I. Martinez, Carlos Augusto Real. II. Título.

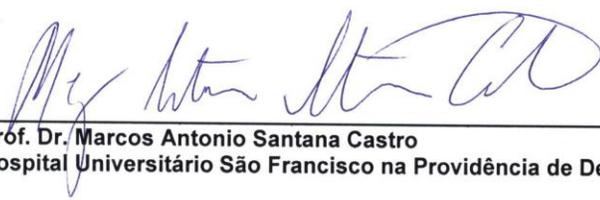
FERNANDEZ, O.A., Oscar, "Avaliação do conteúdo Tecidual da proteína mucina-2(MUC-2) na mucosa cólica exclusiva de trânsito intestinal submetida à intervenção com sucralfato". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 26 de Janeiro de 2017 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Patricia de Oliveira Carvalho
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Marcos Antonio Santana Castro
Hospital Universitário São Francisco na Providência de Deus (HSUF)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Livre Docente **CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ** por dispor toda sua sabedoria e empenho para a realização do meu trabalho.

Ao Professor Doutor **JOSÉ AIRES PEREIRA** pelo seu companheirismo e análises morfométricas e técnicas histológicas realizadas durante o estudo.

Aos Professores Doutores **CALED JOUDAT KADRI** e **MANOELA MARQUES ORTEGA** por ter participado na banca de exame de Qualificação de Mestrado.

Aos Professores Doutores **MARCOS ANTONIO SANTANA CASTRO** e **PATRÍCIA OLIVEIRA CARVALHO** por ter participado na banca de Defesa de Mestrado.

Aos acadêmicos: **CAROLINA MARDEGAN ARAYA, CELENE BENEDITE BRAGION, GABRIELE ESCOCIA MARINHO, RAFAELA DE SOUZA NOVO, THAIS SILVA DE OLIVEIRA, YARA TINOCO FRANCESCHI** e **DANIELA TIEMI SATO** pelo fundamental auxílio em diversas etapas desta pesquisa.

A Professora Doutora **DANIELA OLIVEIRA MAGRO** do Departamento de Cirurgia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP pelo estudo estatístico deste trabalho.

Aos **FUNCIÓNÁRIOS** do Biotério Central da Universidade São Francisco pela dedicação no cuidado com os animais de experimentação.

Aos **PROFESSORES** e **FUNCIÓNÁRIOS** do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, pelo embasamento teórico indispensável para o desenvolvimento científico.

A **UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO** por ceder sua infra-estrutura para o desenvolvimento do estudo.

A **FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP)** pelo apoio ao presente estudo.

Aos meus pais e irmão que mesmo longe sempre me acompanharam.

Ao Sr. **CAMILO MARDEGAN** e esposa que sem a sua confiança em mim, nada disso seria possível.

A minha querida esposa **VERA**, filhas **CAROLINA** e **CAMILA** pelo apoio sempre incondicional.

RESUMO

Estudos experimentais demonstraram que a mucosa cólica exclusiva de trânsito intestinal desenvolve processo inflamatório crônico e modificações no conteúdo e padrão de expressão tecidual dos diferentes tipos e subtipos de mucinas. O sucralfato (SCF) apresenta eficácia como agente protetor do epitélio intestinal em diferentes formas de colite, além de aumentar a produção de muco pelas células caliciformes. **Objetivo:** Mensurar o conteúdo de mucinas tipo MUC-2 na mucosa cólica sem trânsito intestinal submetida à intervenção com SCF. **Método:** Trinta e seis ratos foram submetidos à derivação do trânsito por colostomia proximal e fístula mucosa distal. Os animais foram divididos em três grupos que receberem enemas diários contendo solução fisiológica 0,9% (SF 0,9%), SCF 1,0 g/kg/dia e 2,0 g/kg/dia. Cada grupo experimental foi dividido em dois subgrupos, sendo a eutanásia ser realizada após duas ou quatro semanas. O diagnóstico de colite foi estabelecido por estudo histopatológico pela técnica da hematoxilina-eosina (HE). A intensidade inflamatória da mucosa cólica foi avaliada por escala previamente validada. As mucinas tipo MUC-2 na mucosa exclusiva de trânsito intestinal foram identificadas por imuno-histoquímica. O conteúdo tecidual da MUC-2 foi mensurado por análise de imagem assistida por computador (morfometria computadorizada). O valor final para o conteúdo desta em cada animal foi determinado pela média da leitura de três campos distintos, onde existiam pelo menos três glândulas cólicas íntegras e contíguas. Para análise dos resultados utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney e o teste ANOVA (análise de variância), adotando-se para ambos, nível de significância de 5% ($p < 0,05$). **Resultados:** A aplicação de enemas com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia reduziu o escore inflamatório dos segmentos desprovidos de trânsito fecal. O conteúdo de MUC-2 no cólon desprovido de trânsito fecal dos animais submetidos à intervenção com SCF, independente do tempo de intervenção e da concentração utilizada, foi significativamente maior quando comparado aos animais submetidos à aplicação de enemas contendo SF 0,9% ($p < 0,01$). O conteúdo tecidual de MUC-2 após a intervenção com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia foi significativamente maior quando comparado aos animais submetidos à aplicação de enemas contendo SCF na concentração de 1,0 g/kg/dia ($p < 0,01$). O conteúdo tecidual de MUC-2 atingiu os maiores valores após intervenção com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia por quatro semanas ($p < 0,01$). **Conclusão:** A aplicação preventiva de enemas contendo SCF, principalmente em concentrações mais elevadas e por maior tempo de intervenção, reduz o escore inflamatório e previne a redução do conteúdo tecidual de MUC-2. Esses resultados sugerem que a aplicação preventiva de enemas com SCF é uma estratégia válida para a preservação da camada de muco que recobre o epitélio intestinal.

Palavras-chave: Cólon, Colite, Sucralfato, Mucinas, Mucina 2.

ABSTRACT

Experimental studies demonstrated that the colonic mucosa without intestinal stream develops chronic inflammatory process and modifications in content and tissue expression of the different types and subtypes of mucins. The sucralfate (SCF) presents effectiveness as protective agent of the intestinal epithelium in different forms of colitis, beyond increasing the production of mucus by the caliciform cells. **Objective:** Measure the content of MUC-2-type mucins in the colonic mucosa diverted from fecal stream submitted to the intervention with SCF. **Method:** Thirty-six rats underwent derivation of intestinal transit through proximal colostomy and distal mucous fistula. The animals were divided into three groups which were submitted to daily application of enemas containing physiological saline, SCF 1.0 g/kg/day and SCF 2.0 g /kg /day. Each experimental group was then divided into two subgroups, according to euthanization to be carried through after two or four weeks. The colitis diagnosis was established by histopathological study through the hematoxylin and eosin (H&E) technique. The inflammatory intensity of the colonic mucosa was evaluated by previously validated scale. The MUC-2-type mucins in the mucosa diverted from fecal stream were identified as immune-histochemistry (IHC). The tissue content of the MUC-2-type was measured by analysis of computer assisted image (computerized morphometry). The final value for the content of this in each animal was determined by average of the reading in three distinct fields, where there were at least three intact and contiguous colonic glands. For the results analysis, the non-parametric Mann-Whitney test was used, as well as ANOVA test (analysis of variance), being adopted for both, significance level of 5% ($p < 0.05$). **Results:** The application of enemas with SCF in the concentration of 2.0 g/kg/day reduced inflammatory score of the segments that were diverted from fecal stream. The content of MUC-2-type in colon diverted from fecal stream of the animals submitted to the intervention with SCF, independently of intervention period and the used concentration, was significantly greater in comparison with the animals submitted to the application of enemas containing saline ($p < 0.01$). The tissue content of MUC-2-type after the intervention with SCF in the concentration of 2.0 g/kg/day was significantly higher when compared to the animals submitted to the application of enemas containing SCF in the concentration of 1.0 g/kg/day ($p < 0.01$). The tissue content of MUC-2-type reached the highest values after intervention with SCF in the concentration of 2.0 g/kg/day for four weeks ($p < 0.01$). **Conclusion:** The preventive application of enemas containing SCF, mainly in increased concentrations and for longer period of intervention, reduces inflammatory score and it prevents the reduction of tissue content of MUC-2. These results suggest that the preventive application of enemas with SCF is a valid strategy for the preservation of mucus layer that covers the intestinal epithelium.

Key words: Colon, Colitis, Sucralfate, Mucins, MUC-2-type Mucin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
CCR	Câncer colorretal
CCE	Colite do cólon exclusivo
COX	Ciclooxigenase
DAB	Diamino benzidina
DC	Doença de Crohn
DII	Doença inflamatória intestinal
DSS	Sulfato de dextrona
g	Gramas
g/kg/dia	Gramas por quilograma por dia
HE	Hematoxilina-Eosina
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MUC	Fração proteica da Mucina
PBS	Tampão Fosfato Alcalino
PEG-2	Prostaglandinas E-2
RCUI	Retrocolite ulcerativa inespecífica
RLO	Radicais livres de oxigênio
SCF	Sucralfato
TGI	Trato Gastrointestinal
µm	Milimicras
%	Por cento
°C	Graus centígrados

LISTA DE QUADROS e TABELAS

QUADRO 1- Escala de graduação do escore inflamatório.....	29
TABELA 1- Escore inflamatório no segmento cólico derivado dos animais dos grupos controle (SF 0,9%), SCF1 (SCF 1,0 g/kg/dia) e SCF2 (2,0 g/kg/dia) submetidos a intervenção por duas e quatro semanas.....	34
TABELA 2 - Variação no conteúdo tecidual médio de MUC-2 segundo o tempo de intervenção nos animais submetidos a intervenção com SF 0,9%, SCF 1,0 g/kg/dia e 2,0 g/kg/dia por duas e quatro semanas de intervenção.....	38

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Algoritmo da divisão dos grupos experimentais.....	22
FIGURA 2: Corte cirúrgico parede abdominal.....	23
FIGURA 3: Hemostasia de arterias e veias cólicas.....	24
FIGURA 4: Colostomia proximal.....	24
FIGURA 5: Lavagem com SF 0,9% do segmento cólico derivado.....	25
FIGURA 6: Colostoma proximal e fistula distal.....	25
FIGURA 7: Programa e equipamento de informática utilizado para mensuração do conteúdo tecidual das proteínas MUC-2.....	31
FIGURA 8: Corte histológico de mucosa do segmento cólico derivado após irrigação com SF 0,9% por quatro semanas (HE-100 x).....	33
FIGURA 9: Corte histológico da mucosa do segmento cólico derivado após irrigação com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia por quatro semanas. Observa-se fino revestimento de SCF recobrando a superfície da mucosa (HE-200 x).....	34
FIGURA 10: Secção histológica de segmento cólico derivado onde se observa a relevância de MUC-2 após irrigação com SF 0,9% por quatro semanas (100 x).....	35
FIGURA 11: Secção histológica de segmento cólico derivado onde se observa a relevância de MUC-2 após irrigação com SCF na concentração de 1,0 g/kg/dia por quatro semanas (100 x).....	36
FIGURA 12: Secção histológica de segmento cólico derivado onde se observa a relevância de MUC-2 após irrigação com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia por quatro semanas (100 x).....	36
FIGURA 13: Conteúdo tecidual de MUC-2 nos animais dos grupos controle, SCF1 e SCF2 submetidos a intervenção diária com SCF por duas e quatro semanas.....	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Principal.....	20
2.2 Objetivos Secundários.....	20
3. MATERIAL E MÉTODO	21
3.1 Animal de experimentação	21
3.2 Grupos experimentais.....	21
3.3 Período pré-operatório.....	22
3.4 Anestesia.....	22
3.5 Técnica operatória.....	23
3.6 Pós-operatório	26
3.7 Intervenção com as soluções propostas.....	26
3.7.1 Coleta do material	26
3.8 Técnica histológica	27
3.8.1 Fixação e processamento dos tecidos	27
3.8.2 Técnica de coloração hematoxilina-eosina	28
3.9 Avaliação histológica da presença de colite	28
3.10 Técnica imuno-histoquímica.....	29
3.11 Medida do conteúdo tecidual de MUC-2	31
3.12 Método estatístico	32
4. RESULTADOS.....	33
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
8. ANEXOS	65

1. INTRODUÇÃO

O epitélio do intestino grosso é uma estrutura anatômica fundamental para impedir a penetração de substâncias nocivas do interior do cólon para as camadas estéreis internas do intestino grosso (PEREIRA et al., 2013; CHAIM et al., 2014; BONASSA et al., 2015). Esta estrutura é formada por um único estrato de células justapostas que formam a superfície epitelial, um sistema de aderências intercelulares unindo uma célula a sua vizinha, pela membrana basal que sustenta todas as camadas celulares superiores e por um importante e complexo sistema de defesa imunológica (PRAVDA, 2005; GAUDIER e HOEBLER, 2006). Além de sua conhecida função na digestão e absorção de nutrientes, a mucosa do trato colônico, também assume papel relevante na resposta imunológica, definindo a barreira funcional entre o hospedeiro e o meio externo. Este sistema imunológico, considerado o mais eficiente do organismo humano, protege o hospedeiro da invasão da sua própria flora dificultando a disseminação de patógenos e toxinas luminares pelo organismo. Dessa forma, a proteção conferida pelo epitélio colônico é imprescindível a preservação da vida humana.

As células epiteliais são cobertas por uma camada de muco de aspecto gelatinoso que serve como primeira linha de proteção auxiliando a manter a permeabilidade seletiva do restante da parede colônica (SWIDSINSKI et al., 2007; GAUDIER, HOEBLER, 2006; GAUDIER et al., 2009). O muco que recobre a mucosa colônica é formado predominantemente por mucinas, uma classe de glicoproteínas responsáveis por sua constituição e, principalmente, pela função protetora (FINNIE et al., 1995; DEPLANCKE e GASKINS, 2001). O muco é produzido a partir de células caliciformes existentes em grande quantidade nas glândulas colônicas. A síntese das mucinas se dá a partir da fermentação das fibras e amidos ingeridos na dieta. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) representam o substrato mais importante para que as células caliciformes produzam continuamente quantidades adequadas de muco com objetivo de manter a integridade desta primeira linha de defesa mecânica (AUGENLICHT et al., 2003; WILLEMSSEN et al., 2003; GAUDIER et al., 2004, GAUDIER et al., 2009).

A molécula das mucinas apresenta em sua estrutura química uma porção glicídica e outra proteica. A porção glicídica, dependendo de seu pH, subdividem-se em mucinas neutras, mais abundantes no sistema digestório superior, e em ácidas, encontradas principalmente no intestino grosso (FILIPE, 1969; FILIPE, 1979, NONOSE et al., 2009). O método histoquímico de Alcian-blue (AB) em pH 2,5 identifica em azul as mucinas ácidas enquanto o Periódico Ácido de

Schiff às neutras. As mucinas ácidas, por sua vez, se subdividem em sulfomucinas quando há predomínio de radicais sulfato na sua estrutura molecular ou sialomucinas quando existe maior teor de ácido siálico (DEPLANCKE e GASKINS, 2001; NONOSE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010b). A diferenciação entre os dois subtipos de mucinas ácidas pode ser feita pelo método histoquímico da diamina de ferro alto-alcian blue (MARTINEZ et al., 2010a). Com a técnica sulfomucinas coram-se em marrom e as sialomucinas em azul.

Quanto a porção proteica, existem mais de 15 subtipos de mucinas descritas mas as glicoproteínas do subtipo MUC-2 são as mais abundantes no epitélio colônico. Os subtipos MUC-1, MUC-3, MUC-4 e MUC-5 também podem ser encontradas no muco colônico, porém em menor quantidade. Ao considerar a fração proteica das mucinas (MUC), estas se apresentam em dois tipos: aquelas que quando secretadas formam um gel que recobre a mucosa (MUC-2, MUC-5AC, MUC-5B e MUC-6) e as presentes nas membranas celulares (MUC-1, MUC-3 e MUC-4). Com o advento das técnicas imuno-histoquímicas tornou-se fácil identificar corretamente cada um desses subtipos nos tecidos.

Estudando a porção proteica das mucinas observou-se que haviam diferenças na ordenação dos aminoácidos ao longo da proteína e que transcrição destas poderiam ser realizadas por pelo menos 15 tipos diferentes de genes (GAUDIER et al., 2006; GAUDIER et al., 2009). Posteriormente, novas pesquisas estudando estes genes atestaram diferenças na ordem com que os nucleotídeos se alinham ao longo do gene codificador da proteína, podendo assim, identificar nove principais subtipos de porções proteicas denominadas: MUC-1, MUC-2, MUC-3, MUC-4, MUC-5A, MUC-5B, MUC-5AC, MUC-7 e MUC-8. No epitélio colônico as mucinas são transcritas principalmente pelo gene *MUC-2* e em uma menor intensidade pelos genes *MUC-1*, *MUC-3* e *MUC-4*. Entretanto, independente da porção glicídica achada, o *MUC-2* é o mais prevalente gene responsável pela transcrição das mucinas encontradas no epitélio colônico (OGATA et al., 1992; WILLIAMS al., 1999). Da mesma forma que acontece com as frações glicídicas, cabe frisar que os AGCC têm um papel importante na produção das frações proteicas das mucinas. Estudos mostraram que culturas celulares de colonócitos quando acrescidas de butirato, a expressão de *MUC-2* aumenta cerca de 20 vezes (GAUDIER et al., 2009). Esses achados mostram o papel fundamental do suprimento de AGCC para a adequada síntese proteica de *MUC-2* pelas células caliciformes do epitélio cólico (MELLO et al., 2012).

Estudos encontraram alterações no tipo e quantidade das mucinas que recobrem o epitélio colônico em diferentes situações clínicas. Já se descreveu importantes modificações na

espessura e constituição da camada de muco nas colites bacterianas, retrocolite ulcerativa inespecífica (RCUI), doença de Crohn (DC), colite do cólon excluído (CCE), pólipos adenomatosos e câncer colorretal (CCR) (KELI et al., 1997; DEPLANCKE e GASKINS, 2001; FINNIE et al., 1995; NONOSE, 2009, NONOSE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010b; CHAIM, 2014; CHAIM et al., 2014; BONASSA et al., 2015; BONASSA, 2015). Merece destaque o fato de que o estudo da expressão histoquímica ou imunoistoquímica das frações glicídicas e proteicas das mucinas é um importante indicador do risco de transformação maligna do epitélio colônico. Mostrou-se que nos portadores de CCR existe aumento expressivo das mucinas ácidas, principalmente das sialomucinas, enquanto as sulfatadas praticamente desaparecem (FILIPE, 1979). Vale a pena ressaltar que o epitélio do cólon cronicamente inflamado, como nos casos de RCUI, também existe maior expressão tecidual de sialomucinas. De modo intrigante, no epitélio colônico sem fluxo fecal que desenvolve CCE, identifica-se predomínio marcante das sulfomucinas. Essas diferenças só reforçam a importância do conhecimento preciso da distribuição das camadas de muco em diferentes enfermidades.

Em condições fisiológicas normais, as células caliciformes produzem mucinas, continuamente, com o objetivo de repor e manter o revestimento mucoso perdido durante a passagem do bolo fecal (MELLO et al., 2012). Além de fazer parte dessa camada estável, o muco serve ainda como agente lubrificante, retarda a difusão dos íons hidrogênio e de pepsina, inibe a ativação do pepsinogênio e exerce uma ação antibacteriana contra bactérias e vírus presentes do interior do intestino grosso. Um grupo de hormônios gastrointestinais, tais como a gastrina, secretina, prostaglandina E2 e os agentes colinérgicos são capazes de aumentarem a produção de muco. No entanto, a produção de muco pode estar comprometida por diversos fatores. Bactérias, vírus, antígenos, substâncias tóxicas, radicais livres de oxigênio (RLO) e outros elementos nocivos presentes no lúmen do intestino grosso podem destruir a camada de muco, modificar sua estrutura química e reduzir sua produção ou secreção comprometendo seu efeito protetor. Alterações nessa camada protetora permitem o desenvolvimento de diferentes enfermidades, particularmente representadas pelas doenças inflamatórias e infecciosas que frequentemente atingem o ser humano (CORNICK, TAWIAH e CHADEE, 2015).

Estudos clínicos e experimentais demonstraram que nos segmentos colônicos derivados, ou seja, em segmentos onde não existe a passagem de conteúdo fecal, desenvolvem um processo inflamatório que ficou conhecido como CCE (GLOTZER et al., 1981; NONOSE, 2009; NONOSE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010a). Na CCE mostrou-se

alterações histoquímicas significativas na camada de mucinas que recobre a mucosa colônica (GLOTZER et al., 1981; NONOSE, 2009; NONOSE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010a). Mostrou-se que as porções glicídicas das mucinas neutras e ácidas sofriam modificações tanto na sua quantidade quanto na sua forma de expressão nas glândulas intestinais. Esses estudos mostraram ainda que essas modificações se encontravam relacionadas ao tempo em que a derivação fecal se mantinha (KELI et al., 1997; NONOSE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010a). Acredita-se que as alterações no muco colônico encontrados na CCE possa ser resultado da deficiência de AGCC, ocasionado pelo desvio do fluxo fecal. Posteriormente, demonstrou-se que o desvio do fluxo fecal desencadeia no cólon derivado modificações nos mecanismos de respiração celular capazes de aumentarem a produção de radicais livres de oxigênio (RLO) pelos próprios colonócitos desnutridos. O estresse oxidativo resultante estaria diretamente relacionado ao dano das células caliciformes produtoras das mucinas (MARTINEZ, 2010; MARTINEZ et al., 2010a; MELLO et al., 2012). Com o progredir do tempo de desvio fecal, a destruição progressiva da camada mucinosa de proteção possibilitaria a infiltração de antígenos e bactérias, iniciando assim a reação inflamatória que caracteriza a CCE (NONOSE, 2009; NONOSE et al., 2009).

Com o objetivo de reduzir o estresse oxidativo identificado na CCE, uma sequência de estudos experimentais avaliaram o efeito de substâncias antioxidantes no tratamento da CCE (CALTABIANO, 2010; CALTABIANO et al., 2011; CUNHA et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012; BONASSA, 2015; BONASSA et al., 2015; CHAIM, 2015; CHAIM et al., 2015). Dentre esses estudos foi possível demonstrar experimentalmente que a aplicação tópica de enemas com sucralfato (SCF), substância com boa ação antioxidante, apresentava resultados promissores.

O SCF é uma molécula complexa composta por octassulfato de sacarose e hidróxido de polialumínio. Devido a sua composição poliônica, esta se liga fortemente com proteínas de cargas positivas do tecido exulcerado ou ulcerado, formando um complexo aderente que protege a mucosa da ação nociva das secreções digestivas e penetração de agentes externos. A ação terapêutica do SCF é exclusivamente tópica. A nomenclatura segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry): alumínio; 3,4,5-trissulfooxi-2- (sulfooximetil) -6-[3,4,5-trissulfooxi 2 (sulfooximetil) oxolan-2-il] oxi-oxano; icosahidrato. Tem massa molar 2086,74 g/mol (SWEETMAN et al., 2009). A molécula de SCF contém 19-20% de alumínio, principalmente na forma de hidróxido de alumínio.

O mecanismo de ação do SCF não está totalmente estudado. Sabe-se que forma um complexo aderente gelatinoso gerando uma verdadeira barreira contra a ação do ácido clorídrico, sais biliares e reduzindo a atividade da pepsina (CASPARY, 1980; MARKS et al., 1980; YOSHIDA et al., 1980; HARRINGTON et al., 1981; NAKAZAWA et al., 1981; MCHARDY, 1981; NAGASHIMA, 1981a b; MARTIN et al., 1982; GRAHAM et al., 1984; ELSBORG et al., 1984; SAMLOFF e O'DELL, 1985; SLOMIANY, HURTY et al., 1985; TARNAWSKI et al., 1986; JENSEN e JENSEN, 1992; VOLKIN et al., 1993; COPEMAN et al., 1994; ISHIMORI, 1995; PLETZ et al., 2003). A importante ação citoprotetora do SCF reside da sua ação estimulante na produção de muco pelas células caliciformes e de bicarbonato, em aumentar a síntese de prostaglandinas e diminuir a degradação do muco pelo ácido e a difusão deste, garantindo a renovação celular (NAKAZAWA et al., 1981; GUSLANDI et al., 1983; SLOMIANY, TAKAGI et al., 1985; GUSLANDI, 1985; KONTUREK et al., 1986; TARNAWSKI et al., 1986; SHEA-DONOHUE et al., 1986; CRAMPTON et al., 1987; CRAMPTON et al., 1988; NAGASHIMA et al., 1988; SLOMIANY et al., 1989; COPEMAN et al., 1994; BANERJEE et al., 1996). Tais efeitos ocorrem principalmente em meios ácidos, mas já tendo sido comprovada sua ação em pH próximos ao 7 (NAGASHIMA, 1981a b; GRAHAM et al., 1984; DANESH et al., 1988; NAGASHIMA e YOSHIDA 1979, NAGASHIMA et al., 1988). O SCF também apresenta atividade antioxidante, sendo capaz de reduzir a geração de RLO produzidos por neutrófilos presentes no tecido inflamado (LAUDANNO et al., 1990; WADA et al., 1997).

As primeiras pesquisas realizadas para a avaliação do efeito do SCF foram realizadas em ratos induzindo a uma colite por ácido acético (ZAHARI et al., 1989). Sem saber especificamente os mecanismos pelos quais a droga agia, observaram redução da atividade inflamatória e aumento do conteúdo de PGE-2 nos animais infundidos com enemas de SCF. Estudos em camundongos com lesões induzidas por álcool demonstraram que o SCF era capaz de aumentar a síntese e liberação de PG-E2 (HOLLANDER et al., 1984; KONTUREK et al., 1987), com potente ação sobre receptores EP3 e consequente aumento da secreção de muco (SCHEIMAN et al., 1992; DEVLIN, 1997), reduzindo microsangramento mucoso (KONTUREK et al., 1986). Este fato foi confirmado após o bloqueio da ação protetora do SCF com a administração prévia de indometacina, um potente inibidor da cicloxigenase (HOLLANDER et al., 1985). Outros estudos também demonstraram que o SCF era capaz de diminuir o grau de inflamação no cólon de ratos com colite ulcerativa induzida por Sulfato de Dextrona (DSS) (BJÖRCK et al., 1997; PEREIRA, 2016).

O SCF associado ou não a corticóides ou mesmo ao 5-ASA, já foi utilizado através de enemas como uma opção terapêutica no tratamento das DII (CARLING, KAGEVI, BORVALL, 1986; SINGAL, ANAND, 1998; PIENKOWSKI et al., 1989). Em estudo comparativo entre a utilização enemas de SCF e corticóide isolado em pacientes portadores de RCUI distal, os enemas de SCF obtiveram melhores benefícios terapêuticos, já que os pacientes tratados com enemas apresentaram diminuição tanto nas frequências das evacuações quanto nos episódios de sangramento retal (RILEY, GUPTA, MANI, 1989; PEREIRA, 2016).

Estudos em animais com retite induzida por radiação confirmaram que o SCF estimulava a produção de fator de crescimento tecidual e diminuía a apoptose celular, garantindo a proteção as células tronco no interior das criptas cólicas (MATSUU-MATSUYAMA et al., 2006). Outro estudo experimental com SCF utilizando animais com colites induzidas por Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), mostrou que esta substância evita o retardo da cicatrização do epitélio lesado, provavelmente ativando a expressão de COX-2 e inibindo a apoptose. Esses efeitos provavelmente encontram-se relacionados à ativação da via do fator de transcrição NF- κ B (SHINDO et al., 2006).

Já foi demonstrado o efeito antioxidante do SCF em lesões gástricas ou cólicas induzidas quimicamente, porém poucos estudos, todos eles realizados por um mesmo grupo, avaliaram o efeito desta droga em modelo experimental de CCE (PEREIRA et al., 2013; CHAIM, 2014; CHAIM et al., 2014; BONASSA, 2015; BONASSA et al., 2015; PEREIRA, 2016).

O estudo pioneiro realizado com modelo experimental de CEE constatou que a infusão de enemas diários com SCF era capaz de melhorar o processo inflamatório na mucosa desprovida de trânsito fecal (PEREIRA et al., 2013). Posteriormente, dando seguimento a essa linha de pesquisa, observou-se se que a melhora do processo inflamatório na CCE estava relacionada à sua ação antioxidante. Verificou-se que, nos animais tratados com SCF, os níveis de peroxidação lipídica e uma alteração de membranas sob estresse oxidativo eram menores e a mucosa exposta ao SCF apresentava acentuada redução do processo inflamatório (MARTINEZ et al., 2015b). Esses achados confirmaram que o SCF apresentava ação antioxidante no modelo experimental de CCE (MARTINEZ et al., 2015b). Subsequentemente, outros dois estudos foram realizados com o objetivo de apurar se o SCF era capaz de preservar o conteúdo da fração glicídica das mucinas da mucosa cólica (CHAIM et al., 2014; BONASSA et al., 2015). Os resultados mostraram que após aplicação preventiva e diária da substância, o conteúdo tecidual das mucinas neutras, ácidas e seus subtipos - sulfomucinas e sialomucinas -

mantinha-se preservado no tecido submetido a exposição à droga. De modo diferente, os animais submetidos a intervenção com solução salina apresentavam o mesmo comportamento encontrado em estudos anteriores (NONOSE, 2009; NONOSE et al., 2009). Havia acentuada regressão no conteúdo tecidual de todos os tipos e subtipos de mucinas (CHAIM et al., 2014; BONASSA et al., 2015).

Resumidamente, os resultados encontrados nesses estudos experimentais mostraram que o uso de clistéres com SCF, além de diminuir os níveis tissulares de RLO, melhoravam a inflamação da mucosa colônica e aumentavam o conteúdo das frações glicídicas das moléculas de mucina (mucinas neutras e ácidas), principalmente o de sialomucinas, justamente o subtipo de mucina ácida que sofre a maior redução no epitélio sem passagem de fezes que desenvolve CCE (NONOSE, 2009; NONOSE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010a; BONASSA, 2015; BONASSA et al., 2015; CHAIM, 2015; CHAIM et al., 2015; PEREIRA et al., 2013; PEREIRA, 2016).

A fácil disponibilidade do SCF, custo reduzido e pequena incidência de efeitos colaterais seriam aspectos interessantes para utilizá-lo no tratamento da CCE, assim como em outras doenças que cursam com lesões ulceradas no epitélio colônico (DENTON et al., 2002a; LEIPER e MORRIS, 2007; PEREIRA et al., 2013; CHAIM, 2014; CHAIM et al., 2014; BONASSA, 2015; BONASSA et al., 2015; PEREIRA, 2016).

A quantidade e o padrão de expressão das porções glicídicas das mucinas na mucosa colônica já foram avaliados em estudos anteriores em modelos de CCE. Porém, a expressão de moléculas constituintes da porção proteica destas mucinas ainda não foi avaliada quer em estudos experimentais, quer em portadores de CCE (NONOSE, 2009; NONOSE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010a; BONASSA, 2015; BONASSA et al., 2015; CHAIM, 2015; CHAIM et al., 2015). Sendo assim, apesar do SCF ser um potente estimulante da produção das frações glicídicas das mucinas no epitélio do trato colônico, sua capacidade em estimular a produção da fração proteica (em particular da MUC-2) é desconhecida, o que torna interessante a realização de um estudo experimental com este escopo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Mensurar o conteúdo tecidual da proteína MUC-2 na mucosa do intestino grosso sem trânsito fecal submetido a aplicação de enemas com SCF.

2.2 Objetivos Secundários

Verificar a influência da concentração de SCF no conteúdo tecidual de MUC-2 no epitélio do intestino grosso sem trânsito fecal;

Verificar a influência do tempo de intervenção com SCF no conteúdo tecidual de MUC-2 no epitélio colônico sem trânsito fecal;

Verificar se a intervenção com SCF está associada a melhora do processo inflamatório na mucosa do segmento colônico sem trânsito fecal.

3. MATERIAL E MÉTODO

Este estudo obedeceu à Lei Federal 11.794 (Lei Sérgio Arouca). Também está de acordo com às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O Projeto de Pesquisa que culminou com este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa (CEUA) da Universidade São Francisco, Bragança Paulista, São Paulo. O Projeto foi aprovado com o parecer Nº. 002.04.10 (ANEXO 1).

3.1 Animal de experimentação

Utilizou-se 36 *Rattus norvegicus albinus*, machos, da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério da Universidade São Francisco, Bragança Paulista. O peso dos animais variava entre 300 a 320g e tinham em média quatro meses de idade.

3.2 Grupos experimentais

Foram constituídos, aleatoriamente, três grupos de estudo com 12 animais cada, divididos segundo terem sido submetidos à aplicação diária de enemas contendo solução fisiológica, solução de SCF na concentração de 1,0 g/kg/dia (SCF-1) ou solução de SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia (SCF-2). Seis animais de cada um desses grupos de estudo foram eutanasiados em duas semanas enquanto os 18 remanescentes, seis de cada grupo experimental, em quatro semanas (Fig. 1).

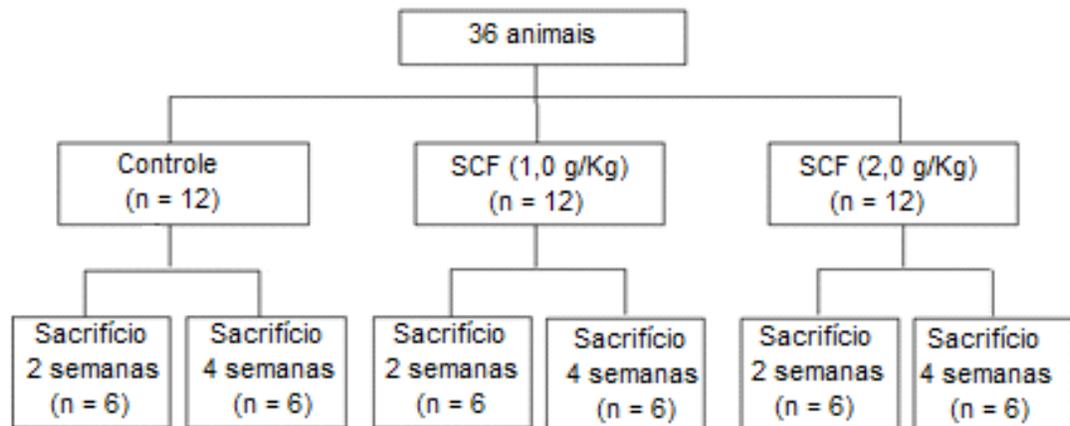


FIGURA 1. Algoritmo da divisão dos grupos experimentais. Fonte: PEREIRA, 2016.

3.3 Período pré-operatório

Durante o período pré-operatório (sete dias), os animais foram isolados em gaiolas individuais, mantidos em estantes climatizadas, com controle de temperatura, luminosidade, umidade e ruídos. Permaneceram em jejum por 24 horas, exceto para água, antes da intervenção cirúrgica. Cada gaiola foi marcada com o número do animal, grupo e subgrupo experimental a que pertencia. Esses mesmos dados foram tatuados com tinta nanquim na cauda de cada animal.

3.4 Anestesia

No dia da intervenção, os animais foram pesados para cálculo da dose anestésica a ser utilizada. A anestesia foi administrada utilizando-se o cloridrato de xilazina 2% (Anasedan[®]) e cloridrato de quetamina (Dopalen[®]) na dose de 0,1ml/100g, administrados por via intramuscular na pata traseira esquerda.

3.5 Técnica operatória

Depois de anestesiados, foram colocados na prancha cirúrgica em decúbito dorsal horizontal, sendo realizada tricotomia de toda a região abdominal. A degermação cutânea foi feita com aplicação de polivinilpirolidona-iodo sobre área depilada que posteriormente foi isolada por campo cirúrgico estéril. A celiotomia foi realizada por meio de incisão no plano sagital mediano com três centímetros de extensão. Após aberta a cavidade abdominal, o ceco foi identificado. Com o auxílio de um paquímetro se mediu no intestino grosso o local escolhido para a secção do cólon direito, situado a quatro centímetros após a papila ileocecal. Após ligadura dos vasos da arcada cólica marginal, seccionou-se o cólon no ponto pré-determinado e exteriorizou-se o intestino grosso proximal, como colostomia terminal, através de incisão circular, com três milímetros de diâmetro, na fossa ilíaca direita. A colostomia foi fixada à pele com pontos separados de fio absorvível monofilamentar 4-0 (Monocryl[®]) nos quatro pontos cardinais, e depois entre eles, amarrando com três nós.

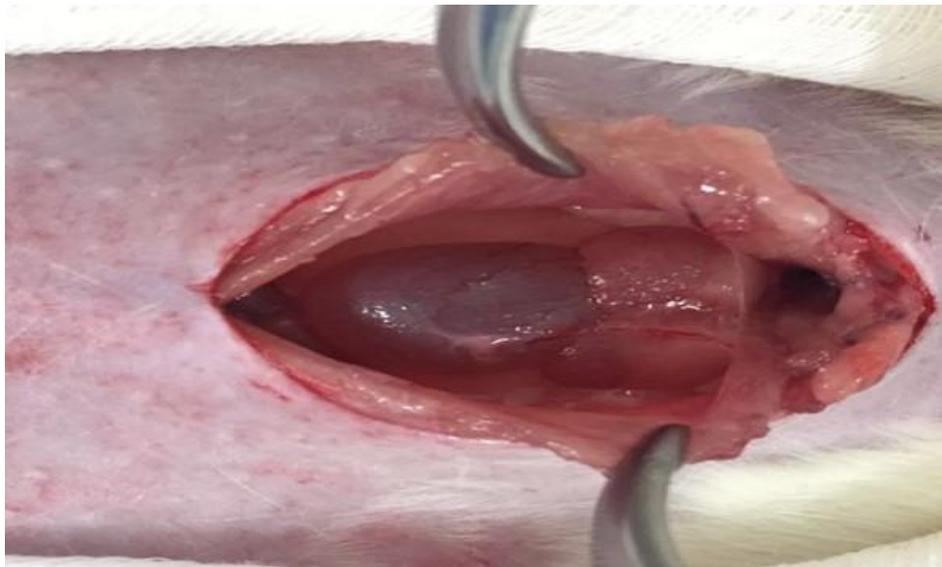


FIGURA 2. Corte cirúrgico parede abdominal.

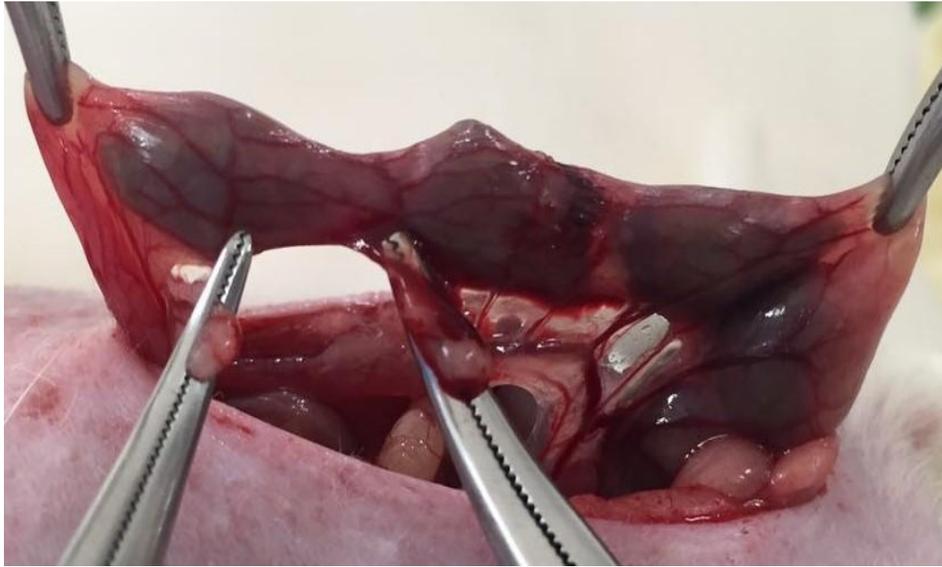


FIGURA 3. Hemostasia de arterias e veias cólicas.

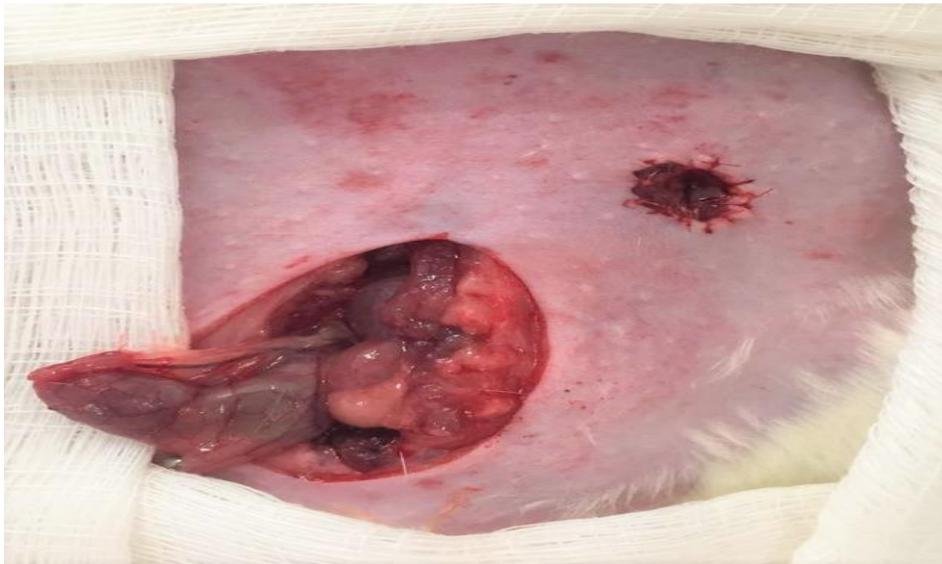


FIGURA 4. Colostomia proximal.

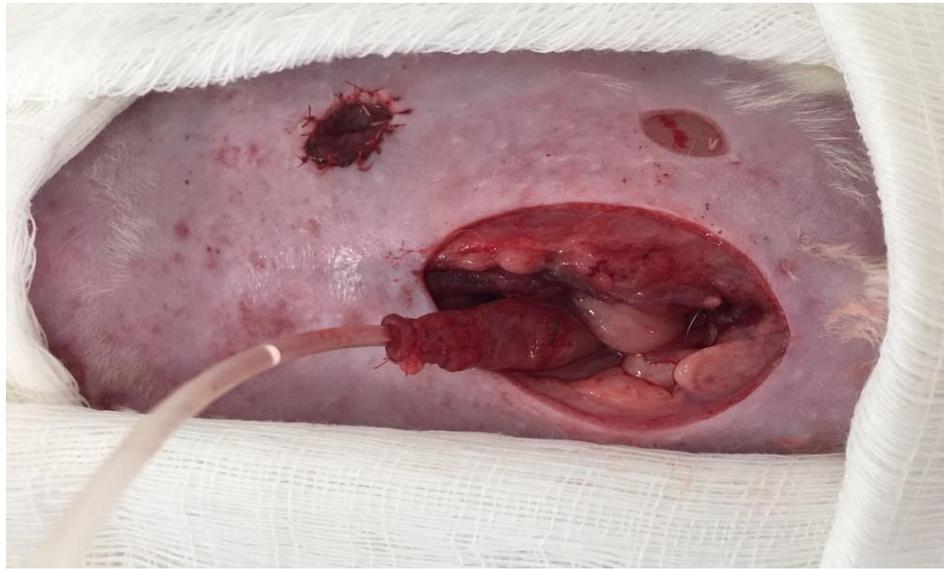


FIGURA 5. Lavagem com SF 0,9% do segmento cólico derivado.



FIGURA 6. Colostoma proximal e fistula distal.

Terminada a confecção do estoma proximal, canulou-se o segmento caudal do intestino grosso seccionado com sonda de polivinil medindo 12 F de diâmetro interno. Após isso, o cólon cateterizado foi irrigado com 80 ml de solução fisiológica aquecida a 37°C, até que o efluente drenado pelo ânus não apresentasse a saída de síbalos fecais. Terminada a limpeza do intestino grosso, o cateter foi removido e o cólon caudal foi exteriorizado como uma fistula mucosa distal, localizada na face lateral superior direita da parede abdominal. Fixou-se a

colostomia distal com a mesma técnica utilizada na colostomia proximal. A síntese da parede abdominal foi feita em dois planos de sutura: peritônio e aponeurose com pontos contínuos de fio de ácido poliglicólico 4-0 (Vicryl[®]) e a pele com pontos separados de nylon 4-0 (Mononylon[®]).

3.6 Pós-operatório

Concluída a operação, os animais foram mantidos por 10 minutos sob aquecimento por meio de lâmpada incandescente e, ao recobrem a vigília, alojados nas gaiolas individuais previamente identificadas, sendo liberada a ingestão de água e ração padronizada (Nuvilab CR1[®]).

Os animais permaneceram em gaiolas individuais até a data da eutanásia (duas ou quatro semanas) nas mesmas condições ambientais de umidade, luminosidade e temperatura do período de vigilância epidemiológica. Após a operação de desvio do fluxo fecal, não foi tomado qualquer cuidado adicional com relação à ferida operatória ou aos estomas, nem utilizados analgésicos ou antimicrobianos.

3.7 Intervenção com as soluções propostas

Os animais foram submetidos à aplicação de enemas diários com as soluções de intervenção padronizadas para o experimento. A aplicação das substâncias foi sempre realizada com o uso de cateter de polietileno graduado em centímetros, com diâmetro interno de 14 F. O cateter foi introduzido cuidadosamente pelo ânus do animal numa profundidade padronizada em 3 cm a partir da borda anal. A seguir, aplicava-se o clister contendo a solução de intervenção proposta para cada grupo experimental, à temperatura ambiente, até que a mesma drenasse pela fístula mucosa distal (colostomia exclusiva de trânsito fecal). As soluções de intervenção foram aplicadas com auxílio de uma bomba de infusão numa velocidade padronizada em 20 mL/min.

3.7.1 Coleta do material

Na véspera da eutanásia (sete ou 14 dias), os animais foram novamente pesados e mantidos em jejum por 24 horas, exceto para água. Todos receberam a aplicação do clister com a solução de intervenção na manhã da data programada para a eutanásia, sempre no período da tarde. Para a remoção dos fragmentos do intestino grosso a serem estudados, os animais foram anestesiados com a mesma técnica anteriormente descrita, realizando-se, laparotomia ampla. Após liberação das aderências, caso presentes, removeu-se todo o cólon, incluindo a colostomia, desprovida de trânsito fecal e o ânus. Os animais anestesiados foram sacrificados com dose letal de tiopental.

Depois de removidos, abriu-se longitudinalmente os segmentos colônicos, pela borda contra-mesentérica e lavou-se com soro fisiológico a 0,9 % aquecido a 37°C para remoção de resíduos fecais, muco ou tampão de SCF eventualmente formado. Foi retirado um fragmento, medindo 30 mm de comprimento, interessando toda a parede intestinal. O fragmento foi removido do segmento cólico derivado, submetido às soluções de intervenção. Desprezou-se um segmento de 10 mm do cólon a partir da fixação do estoma ao peritônio parietal, bem como um segmento de 4 cm acima do ânus, que incluía o canal anal. O fragmento colhido foi encaminhado para estudo histológico através da técnica de coloração hematoxilina-eosina (HE) e imuno-histoquímico.

3.8 Técnica histológica

3.8.1 Fixação e processamento dos tecidos

Para o estudo histopatológico, dispôs-se e fixou-se com alfinete o fragmento com 30 mm de extensão, retirado do cólon submetido à intervenção com as soluções propostas, em superfície plana de cortiça com a face mucosa voltada para cima. O material foi acondicionado em frasco contendo solução de formaldeído tamponado a 10%, com a superfície mucosa voltada para baixo. Os fragmentos de cólon permaneceram imersos totalmente em formaldeído por 72 horas. Em seguida os espécimes foram acondicionados e identificados individualmente em recipientes adequados e foram processados na seguinte ordem: lavados em água corrente e água destilada para, em seguida, serem desidratados em sucessivas concentrações

crescentes de álcool, diafanizados em xilol e impregnados em banhos de parafina líquida a uma temperatura prévia e constante de 60°C. Após, o material foi incluído em blocos parafina. Cada bloco foi submetido à microtomia onde foram realizados seis cortes longitudinais, com 5µm de espessura, para confecção das lâminas destinadas ao estudo histológico e imuno-histoquímico.

Para a avaliação histológica da presença de colite, as lâminas foram coradas com HE e montadas com lamínulas e resina.

3.8.2 Técnica de coloração hematoxilina-eosina

Para avaliação da atividade inflamatória utilizou-se a técnica de coloração HE. Os espécimes depois de coletados, processados, cortados e identificados foram colocados em lâminas de vidro específicas e expostos à temperatura de 60°C por doze horas. Concluído este período para desparafinização foram submersos em dois banhos de xilol, ali permanecendo por dez minutos em cada banho. Em seguida as lâminas foram submetidas a três banhos de álcool absoluto por passagem e hidratadas em água corrente por cinco minutos. Após a hidratação, todas as lâminas foram submersas em corante Hematoxilina de Harris por um minuto, realizando-se em seguida a lavagem das lâminas com água corrente para a remoção do excesso do corante. Terminada esta etapa, as lâminas foram expostas ao corante Eosina por dois minutos, novamente lavadas com água corrente e, logo a seguir, desidratadas através de três banhos de álcool absoluto, um banho com xilol/álcool e três banhos de xilol. Em seguida foram montadas utilizando-se lamínulas e resina para a avaliação do escore inflamatório.

3.9 Avaliação histológica da presença de colite

A análise das lâminas foi feita com microscópio óptico comum, Nikon Eclipse DS-50, com magnificação final de 200x, por patologista experiente em doenças colorretais que desconhecia a origem do material e os objetivos do estudo. As fotomicrografias foram feitas com câmera de vídeo-captura (DS-Fi-50), acoplada ao microscópio. As imagens capturadas foram posteriormente digitalizadas em computador que continha o programa de processamento de imagem.

Para confirmar o diagnóstico histopatológico de colite, consideraram-se os seguintes parâmetros histológicos: presença de ulcerações no epitélio e escore inflamatório, segundo escala anteriormente proposta (GUPTA et al., 2007), modificada (**Quadro 1**).

QUADRO 1. Escala de graduação do escore inflamatório.

Grau de inflamação	Escore	Características histopatológicas
Ausente	1	Sem infiltração neutrofílica tecidual
Leve	1-2	Infiltração neutrofílica ($\leq 50\%$ das criptas) ou Infiltração neutrofílica ($\leq 50\%$ dos campos) + Ausência de perda epitelial
Moderado	3-4	Infiltração neutrofílica ($> 50\%$ das criptas) ou Infiltração neutrofílica ($> 50\%$ dos campos) + Ausência de perda epitelial
Intenso	> 5	Perda epitelial + Infiltração neutrofílica

Fonte: Baseada em Gupta et al. (2007) - Mount Sinai Hospital – Modificada.

3.10 Técnica imuno-histoquímica

Para realização da técnica de imunoistoquímica para pesquisa da proteína MUC-2 nos blocos previamente confeccionados, foram realizados cortes histológicos com $5\mu\text{m}$ de espessura em todas as amostras colhidas dos animais dos diferentes grupos experimentais (segmentos submetidos às soluções de intervenção) nos dois períodos propostos. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro com extremidades foscas previamente silanizadas e

identificadas com o grupo experimental, subgrupo, número do animal e local de onde o fragmento tinha sido removido. Após esses procedimentos foram submersas em solução de Trilogy em uma diluição de 1:100 (Trilogy, Marca Cell Marque). A exposição das lâminas ao Trilogy teve como objetivo promover a desparafinização, hidratação e recuperação antigênica. Essa exposição foi realizada em uma temperatura de 95°C em banho-maria por 45 minutos. Em seguida as lâminas foram transferidas para uma segunda cuba também contendo a solução de Trilogy, previamente aquecida à mesma temperatura, permanecendo em incubação por 10 minutos. Posteriormente, retirou-se a cuba com a solução de Trilogy com as lâminas do banho-maria mantendo a solução em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas com dois banhos de água destilada por dois minutos cada e submetidos, posteriormente, a dois banhos com solução tampão fostato alcalino (PBS) com duração de dois minutos cada. O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado através da incubação das lâminas em uma solução de água oxigenada 10 volumes à 3% por dez minutos em temperatura ambiente. Terminada esta fase as lâminas foram novamente lavadas com dois banhos de água destilada por dois minutos e dois banhos com tampão PBS, também por dois minutos cada. Para pesquisa da proteína MUC-2 utilizou-se o anticorpo primário Anti-MUC2, (Dako do Brasil, São Paulo, Brasil; Clone: NCH-38) na diluição de 1:100. Foi realizada pela adição de 100 µL do anticorpo primário sobre os cortes em uma câmara úmida onde ficaram expostos por uma hora em temperatura ambiente. Posteriormente realizou-se a incubação com sistema de avidina-biotina (anticorpos secundários) do Kit LSAB+System-HRP (Dako do Brasil, São Paulo, Brasil) com um tempo de exposição das lâminas por um período de 35 minutos em cada reagente. Terminado este tempo, os cortes foram lavados com dois banhos em solução de tampão de PBS, e revelados através da utilização do Kit Líquid DAB + Substrate (Dako do Brasil, São Paulo, Brasil) na diluição de 1 gota de cromógeno em 1 mL de solução tampão, sendo adicionado 100 µL do cromógeno sobre os cortes, por um período de incubação entre três a cinco minutos a temperatura ambiente. Após a revelação, os cortes foram lavados em água corrente e realizada a contra-coloração com hematoxilina de Harris por 30 segundos. Depois, as lâminas foram lavadas novamente com água corrente até a remoção total do excesso de hematoxilina. Por fim, foram desidratadas em três banhos de álcool absoluto, um banho de xilol/álcool e dois banhos de xilol, para serem montadas com lamínulas e resina.

3.11 Medida do conteúdo tecidual de MUC-2

A expressão das proteínas foi avaliada segundo o local e o conteúdo da imunocoloração. O conteúdo tecidual total de MUC-2 foi mensurado por análise de imagem assistida por computador (morfometria computadorizada), quantificando-se o conteúdo de ambas em três criptas cólicas contíguas, em três campos aleatórios. A imagem selecionada, após adequadamente focada, foi capturada por videocâmera acoplada ao microscópio óptico. A seguir a imagem captada foi processada e analisada pelo programa NIS-Elements instalado em um computador com boa capacidade de processamento de imagens (**Fig. 7**).

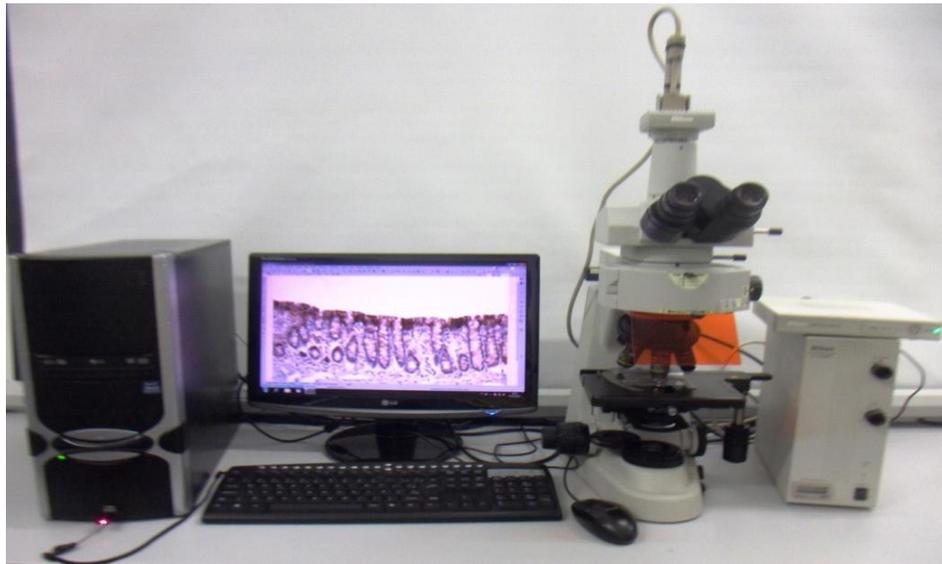


FIGURA 7. Programa e equipamento de informática utilizado para mensuração do conteúdo tecidual das proteínas MUC-2.

A quantificação da proteína foi sempre realizada após a calibração do programa para o aumento selecionado. A calibração era refeita após a leitura de cada lâmina. Para a quantificação da densidade de cor encontrada em cada campo selecionado, utilizou-se o filtro RGB adotando-se todo comprimento de onda que continha a cor parda-acastanhada (cor que identificava a imunoposição tecidual de ambas as proteínas). Com o programa, transformou-se a coloração parda-acastanhada, onde havia a imunoposição, na cor branca e o restante do campo de visão capturado, sem imunocoloração, em preto. Os valores encontrados para o conteúdo tecidual das proteínas estudadas foram sempre expressos em porcentagem das

proteínas por campo analisado (%/campo). O valor final adotado para os animais dos subgrupos controle e experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal) foi sempre representado pelo valor médio, com o respectivo desvio padrão. Todas as imagens selecionadas foram arquivadas para posterior documentação fotográfica.

3.12 Método estatístico

Os resultados foram sempre descritos pela média com respectivo erro padrão. Adotou-se sempre nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para analisar o escore de graduação inflamatória e o conteúdo tecidual das proteínas MUC-2, comparando os animais do grupo controle e experimental (sendo os segmentos irrigados com solução fisiológica e SCF nas concentrações de 1,0 g/Kg/dia e 2,0 g/Kg/dia). Empregou-se o teste ANOVA para análise de variância do conteúdo tecidual da proteína MUC-2 com relação ao tempo de intervenção. Para o estudo estatístico utilizou-se o programa SPSS (versão 13.0). Os valores significantes quando se comparou os segmentos irrigados com SF 0,9% e SCF (1,0 g/kg/dia ou 2 g/kg/dia) foram marcados com um asterisco (*) quando o nível de significância encontrado era menor que 5% e com dois (**) quando esse nível era menor que 1%. Da mesma forma, os valores significantes encontrados quando se comparou os animais submetidos à intervenção com SCF na concentração menor (1.0g/kg/dia) com os submetidos a irrigação com concentração maior (2.g/kg/dia) foram marcados com um boleteo (•) quando o nível de significância era menor que 5% ou dois boleteos (••) quando menor que 1%.

4. RESULTADOS

A **Figura 8** mostra segmento obtido do cólon irrigado com SF 0,9% por quatro semanas, enquanto a **Figura 9** mostra o cólon irrigado com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia pelo mesmo período de tempo. Verifica-se que nos animais do grupo controle existe nítida perda epitelial, desarranjo na arquitetura e no alinhamento das glândulas cólicas, enquanto nos animais submetidos à intervenção com SCF 2,0 g/kg/dia, a superfície epitelial encontra-se preservada, as criptas intestinais apresentam-se alinhadas, com padrão de distribuição normal e preservação da população de células caliciformes. É possível observar uma fina camada de SCF recobrendo a superfície epitelial da mucosa cólica traduzida histologicamente por um aumento na intensidade de coloração sobre a porção luminal das células epiteliais.

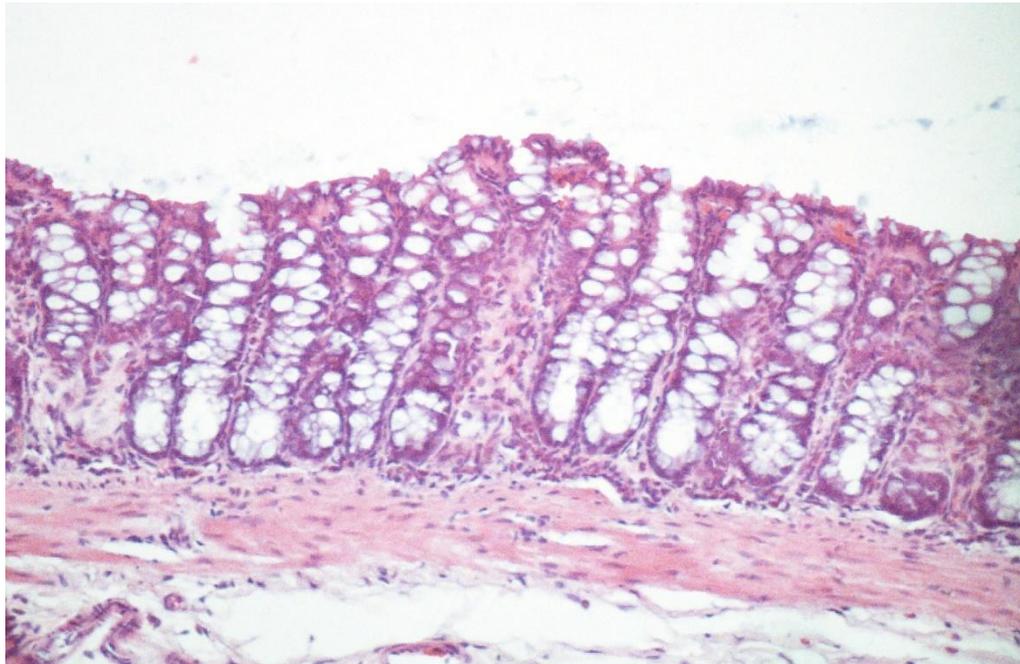


FIGURA 8. Corte histológico da mucosa do segmento cólico derivado após irrigação com SF 0,9% por quatro semanas (HE-100x).

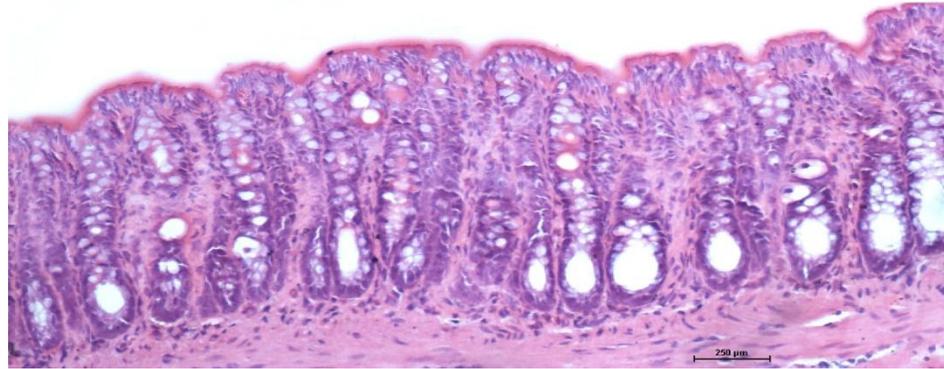


FIGURA 9. Corte histológico da mucosa do segmento cólico derivado após irrigação com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia por quatro semanas. Observa-se fino revestimento de SCF recobrando a superfície da mucosa (HE-200x)

A **Tabela 1** mostra os escores inflamatórios encontrados nos segmentos desprovidos de trânsito fecal após a intervenção com SF 0,9%, SCF 1,0 g/kg/dia e 2,0 g/kg/dia, por duas e quatro semanas. Os resultados mostram que a intervenção com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia no segmento cólico derivado reduz o escore inflamatório após quatro semanas de irrigação quando comparado aos animais do grupo controle ($p=0,03$).

Tabela 1- Escore inflamatório no segmento cólico derivado dos animais dos grupos controle (SF 0,9%), SCF1 (SCF 1,0 g/kg/dia) e SCF2 (2,0 g/kg/dia) submetidos a intervenção por duas e quatro semanas.

	Média ± EP			p
	SF 0,9%	SCF 1,0 g/kg/dia	SCF 2,0 g/kg/dia	
2 semanas	3,5±0,25	3,3±0,32	3,1±0,29	NS
4 semanas	3,1±0,20	2,8±0,25	2,4±0,31*	0,03

E.P = Erro padrão; * $p<0,05$ (SCF 2.0g/kg/dia x SF 0,9%), Teste de Mann-Whitney.

A **Figura 10** mostra a expressão tecidual de MUC-2 no cólon irrigado com SF 0,9% por quatro semanas, enquanto a **Figura 11** mostra o cólon irrigado com SCF na concentração de 1,0 g/kg/dia pelo mesmo período de tempo. A **Figura 12** mostra o cólon irrigado com SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia pelo mesmo período de tempo. Verifica-se que nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9% existe redução no conteúdo de MUC-2 nas células caliciformes, desarranjo na arquitetura e alinhamento das glândulas cólicas. Nos animais submetidos à intervenção com SCF com 1 e 2,0 g/kg/dia a superfície epitelial encontra-se preservada e as criptas intestinais apresentam-se alinhadas, com padrão de distribuição normal e a preservação do conteúdo de MUC-2 está mais evidente nas células caliciformes dos animais tratados com concentração de SCF de 2g/kg/dia

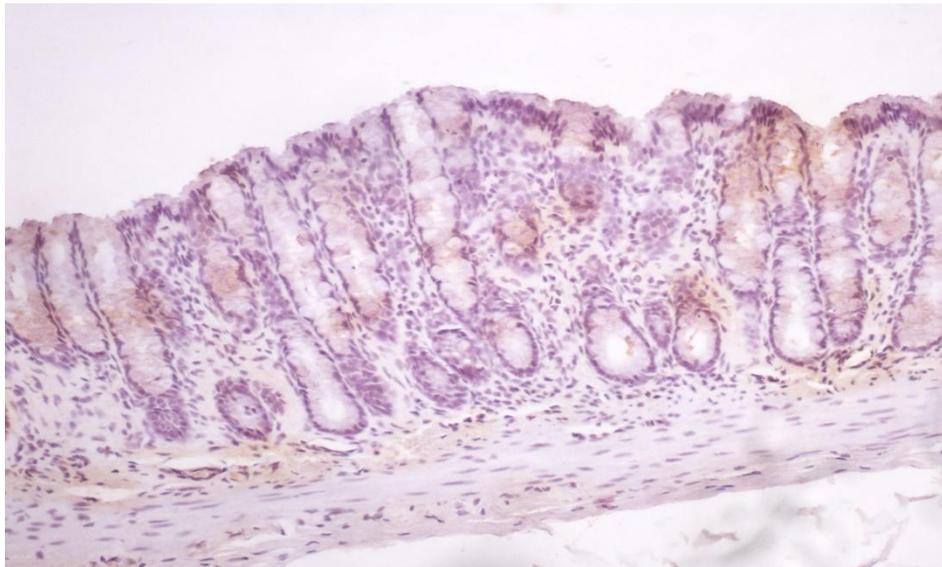


Figura 10. Secção histológica de segmento cólico derivado onde observa-se a relevância de MUC-2 após irrigação com SF 0,9% por quatro semanas (100x).

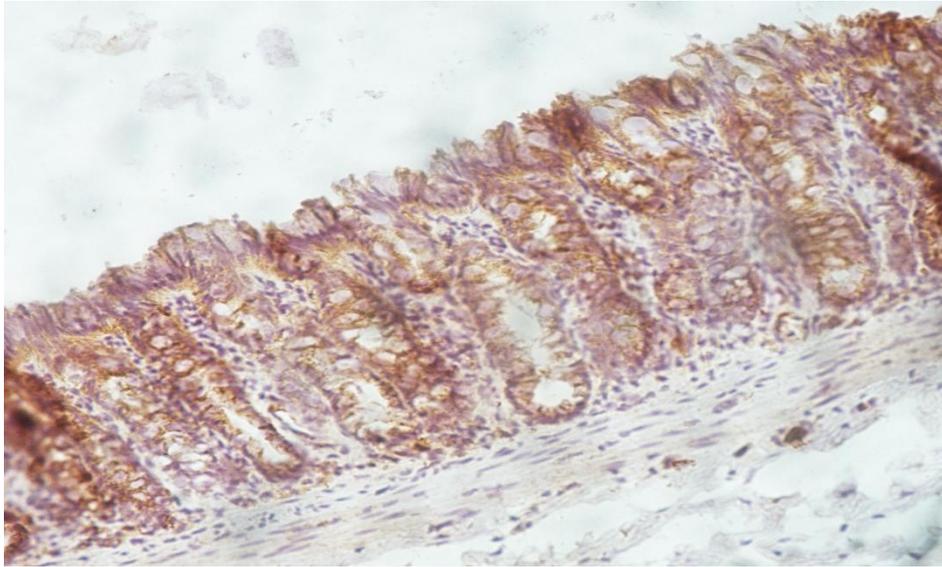


Figura 11. Secção histológica de segmento cólico derivado onde observa-se a relevância de MUC-2 após irrigação com SCF na concentração de 1,0 g/kg/dia por quatro semanas (100x)

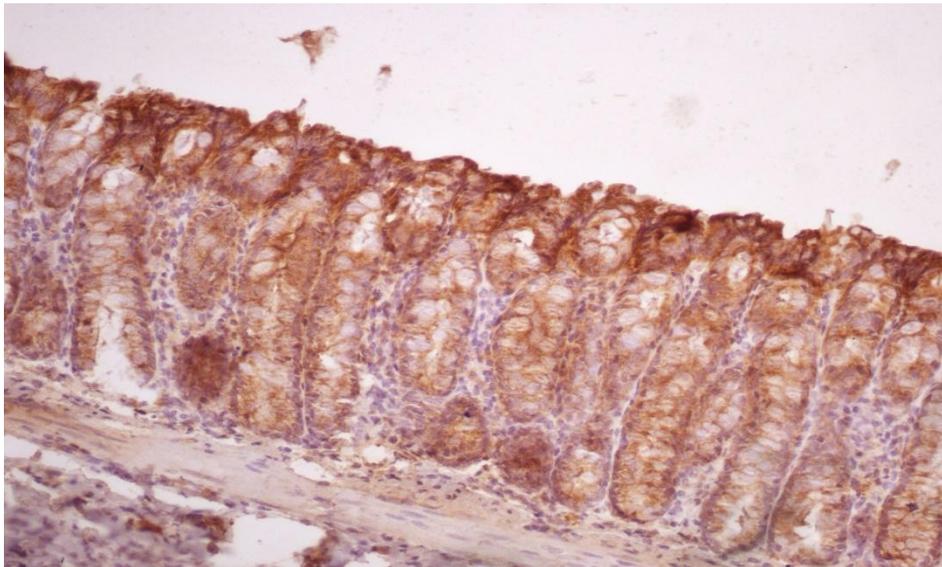


Figura 12: Secção histológica de segmento cólico derivado onde observa-se a relevância de MUC-2 após irrigação com SCF na concentração de 2,0 g/kg/ dia por quatro semanas (100x).

A **Figura 13** mostra o conteúdo de MUC-2 encontrado nos segmentos desprovidos de trânsito fecal após a intervenção com SF 0,9%, SCF 1,0 g/kg/dia e 2,0 g/kg/dia, por duas e quatro semanas. Os resultados mostram que a intervenção com SCF, na concentração de 1,0 g/kg/dia e 2,0 g/kg/dia no segmento cólico derivado, permitiu conteúdo significativamente maior de MUC-2 após duas e quatro semanas de irrigação quando comparado aos animais do grupo controle. O maior conteúdo das MUC-2 encontrado é diretamente proporcional à dose de SCF administrada ($p < 0,01$).

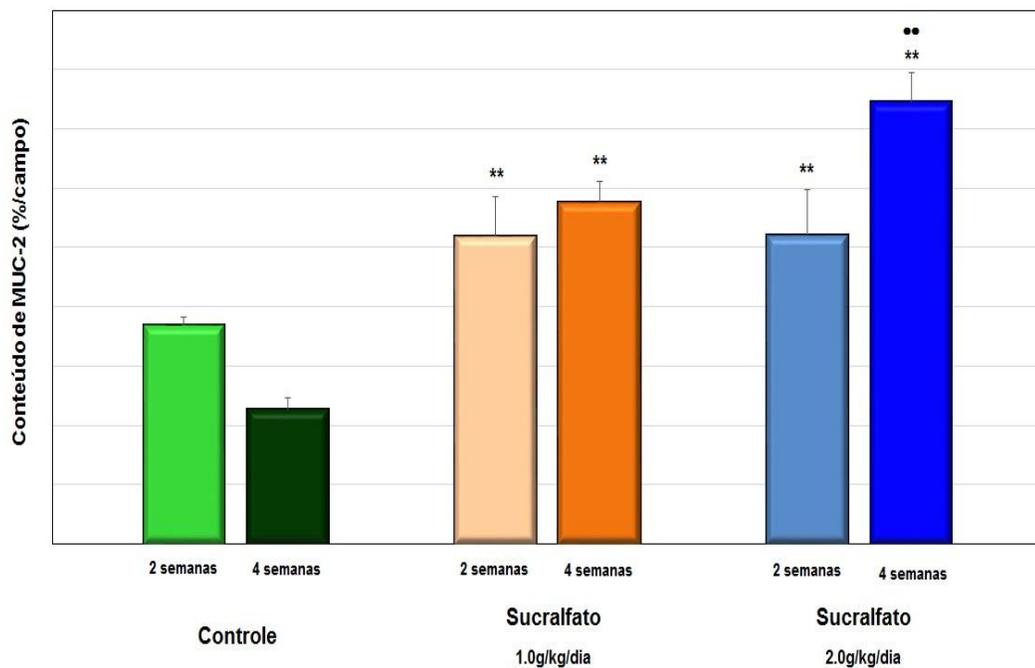


FIGURA 13. Conteúdo tecidual de MUC-2 nos animais dos grupos controle, SCF1 e SCF2 submetidos à intervenção diária com SCF por duas e quatro semanas. ** $p < 0,01$ (SCF1xControle; SCF2 x Controle); •• $p < 0,01$ (SCF1 x SCF2). Teste de Mann-Whitney.

A **Tabela 2** mostra a variação no conteúdo de MUC-2 segundo a concentração de SCF utilizada e ao tempo de uso do SCF, em relação ao grupo controle. O conteúdo das mucinas neutras e ácidas nos grupos experimentais mostrou-se superior ao grupo controle, nas concentrações de 1,0 g/kg/dia e 2,0 g/kg/dia de SCF e em ambos os períodos de intervenção avaliados ($p < 0,01$).

Tabela 2 – Variação no conteúdo tecidual médio de MUC-2 segundo o tempo de intervenção nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9%, SCF 1,0 g/kg/dia e 2,0 g/kg/dia por duas e quatro semanas.

SF 0,9%		SCF 1,0 g/kg/dia		SCF 2,0 g/kg/dia	
2 semanas	4 semanas	2 semanas	4 semanas	2 semanas	4 semanas
3,68±0,14	2,27±0,20	5,20±0,65	5,76±0,35	5,22±0,75	7,45±0,49**

** $p < 0,01$; Teste ANOVA.

5. DISCUSSÃO

A urgência da realização de um estoma de desvio intestinal (colostomia ou ileostomia) é uma das situações cirúrgicas mais frequentes na prática diária do cirurgião. As operações de desvio intestinal passaram a ser cada vez mais realizada após a II. Guerra Mundial, ao constatar-se que os soldados vítimas de ferimentos colorretais graves que foram abordados com desvios intestinais apresentavam menores índices de mortalidade e morbidade quando comparados a aqueles onde se realizava o reparo do ferimento por sutura primária sem desvio do trânsito fecal (CHO et al., 2010). Apesar dessas evidências atualmente serem motivo de muita controvérsia, desde então a realização de colostomias ou ileostomias para o desvio do trânsito intestinal ganhou grande popularidade entre os cirurgiões, especialmente entre aqueles que trabalham na cirurgia de urgência e emergência (CHO et al., 2010).

Após a década de 1930, as colostomias passaram a fazer parte do arsenal terapêutico rotineiro do cirurgião, sendo utilizadas para o tratamento dos ferimentos colorretais por arma branca ou arma de fogo, traumatismos contusos do cólon e reto, lacerações anoperineais, infecções graves da pelve e do períneo, tratamento cirúrgico da endometriose pélvica profunda, da diverticulite aguda complicada do cólon sigmoide, nas complicações das DII e tumores obstrutivos do cólon descendente (HABR-GAMA, 1997). A realização de estomas derivativos, particularmente as ileostomias, aumentou ainda mais quando se constatou que sua confecção sistemática, apesar de não evitar, reduzia significativamente a gravidade de fístulas oriundas de anastomoses colorretais após ressecções intestinais. Assim, a realização de colostomias ou ileostomias ditas de “proteção” passou a ser utilizada em todo o mundo como parte da estratégia cirúrgica adotada para o tratamento dos portadores de câncer do reto extra-peritoneal submetidos à radioquimioterapia pré-operatória (HERRLE et al., 2016; MRAK et al., 2016).

Levando-se em conta o aumento da população mundial, os maiores índices de violência urbana, a melhora da expectativa de vida aumentando a probabilidade do surgimento de afecções degenerativas colorretais como a diverticulite, colite isquêmica, volvo de sigmoide e considerando-se ainda o aumento significativo da incidência do CCR em todo o mundo, a realização de cirurgias de desvio intestinal vem apresentando um crescimento proporcional (HABR-GAMA, 1997; GOUDET, et al., 1998; DAVID et al., 2009).

A obrigação de convivência com um estoma, mesmo que temporário, representa um grande problema de saúde pública. Os portadores de estomas apresentam um significativo impacto negativo na qualidade de vida (HERRLE et al., 2016). Dentre os fatores que impactam na qualidade de vida desses doentes, merecem destaque a alteração da estética corporal, a interferência no relacionamento sexual, o temor do doente de que ocorram acidentes relacionados à adesão da bolsa coletora na pele, tais como o descolamento com consequente extravasamento dos dejetos coletados ou a necessidade da troca da mesma numa situação social desfavorável. Todos esses infortúnios fazem com que os portadores de estomias se afastem do convívio social, tornando-se reclusos e depressivos.

Além das dificuldades acima descritas, a presença de um estoma de derivação não é uma situação isenta de riscos. Uma série de complicações relacionadas a sua presença pode surgir merecendo destaque: o aparecimento de dermatites periestomais, traumatismo do segmento de intestino exteriorizado, infecções cutâneas periestomais, sangramento, estenoses do orifício externo, retração com invaginação para o interior da cavidade abdominal, prolapsos e o desenvolvimento de hérnias paraestomais que dificultam, ou até mesmo impedem, a adaptação da bolsa coletora. Cabe lembrar que a totalidade dos doentes submetidos a estomias derivativas que preservam um segmento de intestino grosso sem trânsito fecal desenvolvem CCE, a principal e mais frequente complicação identificada nesses doentes. Todas essas condições clínicas fazem da vida desses doentes um verdadeiro martírio.

Assim, não é surpresa constatar que um dos maiores desejos desses doentes é a restauração do trânsito intestinal no menor tempo possível. Todavia, o restabelecimento do trânsito só é possível apenas em parte desses doentes (HABR-GAMA et al., 1997; FLOODEEN; LINDGREN e MATTHIESSEN, 2013; HERRLE et al., 2016). As comorbidades clínicas associadas, a idade avançada do doente, as dificuldades técnicas e até mesmo a carência de estrutura hospitalar para atendê-los faz com que muitos desses enfermos sejam condenados a conviver com o estoma para o resto de suas vidas.

No Brasil, um estudo clínico demonstrou que o desvio intestinal só pode ser reconstituído em 57% dos pacientes submetidos a cirurgias temporárias do trânsito fecal, condenando o resto dos enfermos a conviverem para sempre não só com o estoma, mas com a CCE (HABR-GAMA et al., 1997). Naqueles onde desvio foi restaurado, a média de tempo para a restauração é de oito meses, tempo este mais do que razoável para desencadear a CCE (HABR-GAMA et al., 1997). Mesmo em países desenvolvidos estima-se que mais de 25% dos estomas realizados de forma temporária tornem-se permanentes e que 5% dos doentes

submetidos à tentativa de restauração intestinal necessitem realizar um novo estoma por insucesso cirúrgico durante a reconstrução intestinal (DAVID et al., 2009; SIER et al., 2015). Pesquisas demonstraram altos índices de morbidade e mortalidade relacionados à restauração do trânsito intestinal, particularmente após as cirurgias de derivação do cólon descendente e reto (CHIU et al., 2014; AQUINA et al., 2016). Estudo mostrou que a restauração do trânsito intestinal só foi possível de ser realizada em 35,2% dos casos às custas de índices de morbidade e mortalidade de 45,2% e 3,5%, respectivamente (ROIG et al., 2011). Recentemente, mostrou-se que apenas 63% dos doentes conseguiram restabelecer o trânsito intestinal um ano depois da derivação intestinal e que todos os doentes apresentavam CCE de intensidade variada (AQUINA et al., 2016). A média estimada para a restauração do trânsito intestinal varia segundo as condições do atendimento médico oferecidas nos diferentes países. Em locais mais desenvolvidos esse tempo varia de um a dois anos, enquanto nos países com maiores dificuldades sócio-econômicas esse tempo pode ultrapassar três anos (DAVID et al., 2009; ADAM; RAHBAR e SKINNER, 2015). Esses dados permitem estimar a quantidade de doentes que terão que conviver com a CCE.

Talvez, o problema mais comum e que mais afeta a qualidade de vida dos portadores de um estoma derivativo por longo período de tempo é o desenvolvimento da CCE. A quase totalidade dos doentes que sofreram um desvio do trânsito fecal vai desenvolver evidências endoscópicas ou histológicas da CCE (KABIR et al., 2014). A ação inflamatória na mucosa colônica ou retal sem fluxo fecal já pode ser identificada em mais da metade dos doentes, 90 dias depois a confecção da estomia, mostrando que a permanência do estoma, mesmo por um curto período de tempo, já determina o aparecimento da CCE. Estudo polonês confirma essas suspeitas ao identificar a CCE em 90% de um total de 145 pacientes, não encontrando relação com sexo, idade, tipo do estoma ou da via de acesso pela qual a cirurgia foi realizada, laparoscopia ou laparotomia (KABIR et al., 2014). Frequentemente esses pacientes queixam-se de sintomas moderados, tais como a eliminação constante de secreção mucosanguinolenta pelo reto, além de dor retal e tenesmo (HABR-GAMA et al., 1997; DAVID et al., 2009). Uma parte menor dos doentes evolui com as formas graves da doença, apresentando sangramento de maior monta, perda contínua de secreção mucoide anal, mal odor, dor pélvica, febre e, mais raramente, formação de microabscessos e fístulas perianais graves. Essas formas com evolução clínicas mais graves geralmente estão associadas a ação do desvio intestinal nos portadores de DII, indicando que a expressividade do processo inflamatório do cólon excluído de trânsito esteja relacionado ao quadro clínico da doença (FRISBIE e AHMED, 2000). A verdadeira incidência da CCE ainda não está bem estabelecida pela literatura. Estima-se que

sua prevalência esteja aumentando em todo mundo pela maior necessidade de se realizar cirurgias de desvio de trânsito intestinal, porém nenhum estudo epidemiológico com bom desenho metodológico avaliou esses dados.

Considerando-se a necessidade crescente de realizações de operação de desvio de trânsito fecal, assim como a alta prevalência da CCE, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a doença representa uma grande preocupação na Saúde Pública.

A CCE foi inicialmente descrita como o surgimento de processo inflamatório crônico nos segmentos desprovidos do trânsito intestinal (GLOTZER et al., 1981). Pesquisas procurando esclarecer a etiopatogenia da CCE mostraram que ela é uma síndrome de desnutrição das células constituintes da mucosa do provocada pelo desvio do intestino (AGARWAL e SCHIMMEL, 1989). Foi observado que os AGCC produzidos a partir da fermentação de fibras e amidos provenientes da dieta alimentar são responsáveis pelo maior conteúdo de substrato energético para que os colonócitos possam manter seu metabolismo oxidativo e produzir energia para os diferentes processos metabólicos (AGARWAL e SCHIMMEL, 1989). O processo inflamatório que se desenvolve na mucosa do cólon desprovido de trânsito intestinal vem sendo, portanto, atribuído à falta do suprimento frequente de AGCC, e particularmente do ácido butírico (GERAGHTY e TALBOT, 1991; AGARWAL e SCHIMMEL, 1989; EDWARDS, GEORGE e WARREN, 1999; BROMBERG et al., 1993; KIELY et al., 2001). Essas suspeitas ficaram ainda mais reforçadas a partir dos resultados de estudos mostrando que a utilização de clisteres contendo soluções abundantes em AGCC foi capaz de reduzir e até mesmo reverter à inflamação da mucosa do cólon derivado (NASRRI et al., 2008; LAMEIRO et al., 2011). Modelos experimentais mostraram de forma distinta do que se pensava inicialmente, que as modificações histológicas na CCE não estão restritas ao epitélio colônico e que os outros revestimentos da parede cólica apresentam alterações histológicas relacionadas à falta do suprimento nutricional adequado (SOUSA et al., 2008; SOUSA, 2009). Essas alterações também ocorrem nas camadas submucosa muscular própria do cólon excluído (SOUSA et al., 2008), portanto, a CCE compromete direta ou indiretamente toda a parede intestinal.

Diante dessas evidências, certamente a maior incidência de deiscências nas anastomoses realizadas após a restauração do trânsito intestinal em um doente com CCE provavelmente esteja relacionada tanto ao processo inflamatório existente na mucosa do cólon excluído, quanto às modificações estruturais que ocorrem nas demais camadas que compõem a parede intestinal (FLEMING e GILLEN, 2009). Estudos experimentais mostraram que a irrigação do segmento do cólon derivado com AGCC, foi capaz de diminuir a incidência de

deiscência de sutura possibilitando a constituição de uma linha de anastomose mais forte e resistente (ROLANDELLI et al., 1986; KRIPKE et al., 1989; AGUILAR-NASCIMENTO et al., 1997; MATHEW et al., 2010). Do mesmo modo, provou-se que o retardo para restauração do trânsito intestinal com a progressiva piora da inflamação no cólon derivado é uma das variáveis relacionadas à maior probabilidade de complicações da linha de sutura após a restauração intestinal (FLEMING e GILLEN, 2009). É provável que o processo inflamatório crônico determinado pela falta do fornecimento de AGCC e a atrofia da parede do cólon sem trânsito fecal possam ser responsabilizadas por esses maiores índices de complicação (SOUSA et al., 2008). Dessa forma, a probabilidade de se encontrar uma opção terapêutica que possa reduzir a inflamação da mucosa do cólon derivado e melhorar o trofismo das demais estruturas desse segmento é interessante, tanto para reduzir a sintomatologia dos doentes com CCE quanto às complicações após a reconstituição do trânsito intestinal.

Como a intenção de encontrarem-se estratégias terapêuticas eficazes para o tratamento da CCE, inicialmente seria interessante compreender melhor os mecanismos moleculares que fazem a carência dos AGCC ocasionarem a inflamação da mucosa do cólon sem trânsito fecal. Desde 2006, estudos experimentais mostram que os mecanismos moleculares que danificam a mucosa do cólon dos fragmentos derivados de trânsito intestinal, permitindo a passagem de antígenos e bactérias através da estrutura de defesa da mucosa colônica, possam estar associados ao maior nível de dano oxidativo tecidual à parede cólica, ocasionado pela mudança no metabolismo energético dos colonócitos privados do fornecimento regular de AGCC (MARTINEZ, 2010). Verificou-se que a maior produção de RLO pode deteriorar as diversas camadas da estrutura de defesa do epitélio, tais como a camada de muco que recobre o epitélio intestinal, as membranas citoplasmáticas e as junções intercelulares (MARTINEZ et al., 2008; NONOSE, 2008; NONOSE et al., 2009; MARQUES et al., 2010; MARTINEZ, C.A.R. 2010; MARTINEZ et al., 2010a; MARTINEZ et al., 2012; KADRI et al., 2013; MARTINEZ et al., 2015a). Além de provocar a ruptura da barreira morfofuncional representada pela camada de muco, o processo inflamatório decorrente do estresse oxidativo determina alterações nas demais estruturas da parede (SOUSA et al., 2009).

A relevância do papel com que o estresse oxidativo relaciona-se a etiopatogenia da CCE ficou ainda mais evidente quando se demonstrou experimentalmente que drogas com ação terapêutica antioxidante melhoram as alterações inflamatórias identificadas na mucosa sem trânsito fecal (CALTABIANO, 2010; CALTABIANO et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012; CHAIM, 2014; CHAIM et al., 2014; BONASSA, 2015; BONASSA et al., 2015; MARTINEZ et al., 2015b).

A aplicação dessas drogas, além de diminuir o processo inflamatório e os níveis de estresse oxidativo tecidual, preservou a produção de muco pelas células caliciformes do epitélio colônico e manteve a integridade das diferentes proteínas constituintes das junções de adesão e oclusão intercelular (CALTABIANO, 2010; CALTABIANO et al., 2011; CUNHA et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012; CHAIM, 2014; CHAIM et al., 2014; BONASSA, 2015; BONASSA et al., 2015; PEREIRA et al., 2013; KADRI, 2015; PEREIRA, 2016). Considerando esses resultados, a droga ideal para o tratamento da CCE, além de possuir atividade antioxidante, deveria proteger a estrutura de defesa da mucosa cólica contra a lesão epitelial melhorando a proteção proporcionada pelo revestimento mucoso, membranas celulares e sistemas de junção intercelular, com o objetivo de impedir a migração de antígenos e bactérias do lúmen intestinal para o interior da parede cólica e a consequente resposta inflamatória (MARTINEZ, 2010). Além disso, a droga deveria estimular o trofismo intestinal. Caso o uso de antioxidantes possa reduzir o processo inflamatório e, conseqüentemente, favorecer o processo de cicatrização, talvez possam ser úteis para reduzir os altos índices de fístulas quando se reconstitui o trânsito intestinal em doentes com CCE. Todavia, essa avaliação ainda não foi feita.

Várias substâncias foram testadas para o tratamento da CCE. Experimentalmente certificou-se que aquelas com atividade antioxidante, anti-inflamatória ou o uso de soluções nutricionais ricas em AGCC foram as que apresentaram melhor resultado (AGUILAR-NASCIMENTO et al., 1997; NASRRI et al., 2008; CALTABIANO, 2010; CALTABIANO et al., 2011; LAMEIRO et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012, KADRI, 2015). Há pouco mostrou-se que aplicação via retal de antioxidantes como a mesalazina (ácido 5-aminosalicílico) associado a administração sistêmica de corticoides e solutos ricos em AGCC são capazes de reverter os achados clínicos e endoscópicos nos portadores de CCE (PAL et al., 2015; MATSUMOTO e MASHIMA, 2016). Os efeitos dessas drogas mostram-se mais eficazes quando aplicadas de forma tópica sob a forma de clisteres e quanto permanecerem em contato com a mucosa do cólon derivada por um maior período de tempo (PEREIRA et al., 2013).

Esse aspecto torna-se fundamental quando há décadas se mostrou que a administração do SCF vem sendo empregada com êxito como opção terapêutica para o tratamento tópico de diferentes tipos de inflamações do aparelho digestório, que cursem com lesão epitelial em virtude da sua alta capacidade de adesão com superfície cruenta das mucosas (CARLING; KAGEBI e BORVALL, 1986; SINGAL e ANAND, 1988; PIENKOWSKI et al., 1989). Pelo destacado efeito citoprotetor, o SCF foi inicialmente utilizado no tratamento ou na prevenção de enfermidades do trato gastrointestinal superior, principalmente representadas pelas úlceras

péptica, úlceras agudas de estresse e lesões agudas da mucosa gástrica após a ingestão de irritantes gástricos (SZABO et al., 1991).

O mecanismo de ação do SCF ainda não está suficientemente esclarecido. É provável que um dos mecanismos mais importante se relaciona a grande capacidade que a substância possui de aderir-se firmemente a proteínas presentes na superfície cruenta das lesões epiteliais. Todavia, nos últimos anos, estudos vêm mostrando que a ação citoprotetora do SCF é mais complexa e está relacionada a outros mecanismos de ação (ROBERT, 1979; REES, 1991). Estudos mostraram que a administração oral do SCF aumenta a geração de prostaglandina E-2 (PGE-2) nas células, estimulando a produção de mucinas pelas células caliciformes (SLOMIANY et al., 1994). O SCF age estimulando a secreção de fatores de proteção da mucosa gástrica pois aumenta significativamente a produção de muco, fluxo sanguíneo à mucosa gastrointestinal e colaborando com a renovação de células epiteliais (HOLLANDER, 1984). Também verificou-se que o SCF induz a maior produção do fator do crescimento epitelial (EGF) favorecendo a cicatrização epitelial (MASUELLI et al., 2010). Além dessas propriedades, o SCF possui atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante atuando no processo inflamatório do epitélio da mucosa do TGI lesado (SLOMIANY et al., 1994; MASUELLI et al., 2010). Todas essas propriedades tornam o SCF uma droga potencial para o tratamento das DII e, em particular, da CCE.

A primeira referência ao uso do SCF nas doenças inflamatórias do aparelho digestivo inferior (intestino delgado, cólon e reto) foi publicada na década de 1980 (CARLING; KAGEVI e BORVALL, 1986). Desde então, uma série de autores publicaram os efeitos do uso do SCF para o tratamento de diferentes doenças do cólon que evoluem com inflamação, particularmente a RCU e a retite actínica (KOCHHAR et al., 1990; HIDALGO et al., 1990; KOCHHAR et al., 1991; VALLS et al., 1991; HENRIKSSON; FRANZÉN e LITTBRAND, 1992; ARDIZZONE et al., 1996; STOCKDALE e BISWAS, 1997; O'BRIEN et al., 1997; SASAI et al., 1998; ZIMMERMANN e FELDMANN, 1998; KOCHHAR et al., 1999; MELKO et al., 1999; KNEEBONE et al., 2001; DENTON et al., 2002a; GUL et al., 2002; SANGUINETI et al., 2003; MANOJLOVIC e BABIC, 2004; HOVDENAK; SØRBYE e DAHL, 2005; SEO, 2006; LEIPER e MORRIS, 2007; PARADES et al., 2008; HENSON, 2010; RUSTAGI e MASHIMO, 2011; NELAMANGALA RAMAKRISHNAIAH et al., 2012; HAWKINS; BILLINGHAM e BASTAWROUS, 2012; HANSON; MACDONALD e SHAUKAT, 2012; CHRUSCIELEWSKA-KILISZEK et al., 2013; SARIN e SAFAR, 2013; STACEY e GREEN, 2013; MC ELVANNA; WILSON e IRWIN, 2014; MENDENHALL et al., 2014). Os achados desses estudos ainda são conflitantes, pois

apesar da maioria mostrar que a infusão de clisteres com SCF melhora a sintomatologia e os achados endoscópicos em portadores de retite actínica, outros não demonstraram benefícios significantes.

A utilização do SCF para o tratamento da CCE foi proposta, de maneira inédita, a partir dos resultados de estudos experimentais realizados no Laboratório de Investigação Médica (LIM) da Universidade São Francisco (PEREIRA et al., 2013; CHAIM et al., 2014; BONASSA et al., 2015; PEREIRA, 2016). Durante o levantamento bibliográfico, notamos que nenhum outro grupo tinha avaliado os benefícios da utilização da droga na CCE. Os resultados iniciais confirmaram que a aplicação preventiva de enemas com SCF em ratos submetidos à derivação intestinal diminuiu a inflamação e a intensidade do estresse oxidativo no epitélio colônico derivado, avaliados pela dosagem tecidual de mieloperoxidase e malondialdeído, respectivamente (PEREIRA et al., 2013). Quando se sabe que o aumento dos RLO se encontra relacionada à lesão e ruptura da estrutura de defesa da mucosa colônica e o desencadeamento da CCE, a melhora desses parâmetros confirma a ação antioxidante do SCF previamente sugerida (LAUDANNO et al., 1990).

Pesquisas realizadas com modelos experimentais de CCE indicaram que ocorre uma diminuição significativa na produção da porção glicídica das mucinas no epitélio desviado de trânsito fecal (NONOSE, 2009; NONOSE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010a). A diminuição da quantidade desse importante mecanismo de defesa do epitélio intestinal estava relacionada à piora do grau de inflamação e a intensidade do estresse oxidativo no local. Quando se constata que o SCF apresenta ação estimulante para a síntese de mucinas, seria interessante verificar se a aplicação tópica da substância seria capaz de preservar essa importante camada protetora epitelial. Estudos aplicando um modelo de CCE em ratos confirmou que a aplicação tópica de SCF foi capaz de manter a quantidade das mucinas neutras e ácidas existentes no epitélio intestinal confirmando a propriedade da droga em estimular a geração de muco (CHAIM et al., 2014; BONASSA et al., 2015). De um modo ainda mais peculiar denotou-se que a aplicação preventiva de clisteres com SCF preservou o conteúdo tecidual dos dois subtipos de mucinas ácidas, sulfomucinas e sialomucinas, que apresentam diminuição importante na mucosa do cólon cronicamente inflamada. Vale a pena ressaltar que a utilização de enemas com SCF preserva o conteúdo de sialomucinas, o subtipo de mucina que apresenta maior redução no epitélio excluso de trânsito (MARTINEZ et al., 2010). Esses estudos, contudo, avaliaram apenas a porção glicídica da molécula das mucinas, não trazendo qualquer contribuição com relação a eficácia do SCF em manter o conteúdo da porção proteica da

molécula de mucina na mucosa do cólon com derivação fecal e que o SCF possa estimular a produção da proteína. No entanto, essa possibilidade ainda não tinha sido avaliada até a presente data.

No presente estudo observou-se redução significativa do conteúdo da fração proteica da MUC-2 no epitélio dos animais submetidos à intervenção com soro fisiológico e que esta redução era ainda mais evidente com o avanço do tempo de exclusão. Os animais submetidos à intervenção com SF 0,9% por quatro semanas apresentavam menor conteúdo tecidual de MUC-2. Diferentes explicações poderiam ser dadas para justificar a diminuição do conteúdo de MUC-2 nesses animais. É plausível que essa redução talvez pudesse estar relacionada à menor expressão do gene produtor da proteína MUC-2 em virtude do menor suprimento de substrato energético (AGCC) necessário para o correto metabolismo celular. Entretanto, quando consideramos que os animais submetidos à intervenção com SCF também possuíam seus cólons derivados de trânsito fecal e mesmo assim o conteúdo tecidual de MUC-2 ficou mantido, essa probabilidade torna-se menos provável. Em estudos anteriores, nesse mesmo grupo de ratos, certificou-se que os animais submetidos aplicação de enemas com SF 0,9% cursavam com maiores níveis estresse oxidativo celular e, paralelamente, menor expressão do conteúdo das frações glicídicas das mucinas (PEREIRA et al., 2013; PEREIRA, 2016).

Pode ser que esse maior nível de estresse oxidativo tecidual danificando e diminuindo a população das células do epitélio colônico possa estar associado ao menor conteúdo de MUC-2 no epitélio. É bom ressaltar que esses animais submetidos à intervenção com SF 0,9% apresentavam maior escore inflamatório quando confrontado aos animais irrigados com SCF na maior concentração (2g/kg/dia) por maior período de tempo (4 semanas). Ao ponderar esses resultados, fica evidente a ação anti-inflamatória da aplicação do SCF principalmente quando se utilizam concentrações mais elevadas e por tempo mais prolongado de intervenção. Esses mesmos achados já tinham sido encontrados em estudos anteriores (CHAIM, 2014; CHAIM et al., 2014; BONASSA, 2015; BONASSA et al., 2015; PEREIRA, 2016).

De modo diferente, os animais submetidos à intervenção com SCF apresentavam maior conteúdo tecidual de MUC-2 quando confrontado aos animais submetidos à intervenção com SF 0,9%, independente do tempo de intervenção assim como da concentração utilizada. Esses resultados indicam que a aplicação preventiva de clisteres com SCF pode preservar a integridade epitelial, por proteger mecanicamente o epitélio do cólon, sua atividade antioxidante ou por sua ação estimulante na geração de mucinas pelas células caliciformes. Sendo assim é possível levantar a possibilidade de que o SCF, de alguma maneira, favoreça a transcrição do

gene *MUC-2*, determinando a maior síntese da proteína análoga. Essa possibilidade ainda carece de confirmação. No momento o grupo do LIM estuda a expressão do gene *MUC-2* nesse mesmo grupo de animais para verificar se o SCF apresenta essa propriedade adicional.

Há muito tempo já se sabia da relevância da expressão aumentada do gene *MUC-2* para a preservação da integridade da mucosa do cólon cronicamente inflamado (WEISS et al., 1996). Foi demonstrado que nos tecidos inflamados de pacientes que sofrem de RCUI e DC o conteúdo de mRNA para *MUC-2* e *MUC-3* apresenta um valor normal independente da inflamação estar em atividade ou quiescente (WEISS et al., 1996). No entanto, diferentes trabalhos sugerem que em pacientes com RCUI, apesar do gene *MUC-2* apresentar expressão normal, a maior expressão tecidual da proteína homóloga sugere que possa estar ocorrendo um fenômeno pós-transcricional (HANSKI et al., 1999). Alterações na expressão tecidual da proteína MUC-2 também foram evidenciadas em estudos experimentais de colite causada por DSS (RENES, et al., 2002; DHARMANI, LEUNG e CHADEE, 2011). Os resultados desses estudos confirmam o valor das células caliciformes na geração de MUC-2 e na proteção do epitélio inflamado. Estudo com camundongos silenciados (knockout) para o gene *MUC-2* confirmou a relevância da presença da proteína MUC-2 na prevenção da inflamação da mucosa do cólon e que a sua ausência está relacionada à perpetuação do processo inflamatório (VAN DER SLUIS, et al., 2006). Esse mesmo grupo demonstrou que camundongos silenciados para o gene *MUC-2* e para o gene produtor da citocina anti-inflamatória IL-10 cursavam com altos índices de mortalidade por translocação bacteriana, confirmando o mérito da proteína MUC-2 na preservação da integridade da barreira epitelial (VAN DER SLUIS et al., 2008).

Outros autores confirmaram esses achados ao mostrar que animais silenciados para o gene *MUC-2* apresentam menor conteúdo tecidual de MUC-2, que leva a um aumento da permeabilidade epitelial da camada de muco, tornando esses animais mais suscetíveis ao desencadeamento de colite e, até mesmo, do CCR (AN et al., 2007; PETERSSON et al., 2011; LU et al., 2011; WENZEL et al., 2014). Foi apontado que a conservação do conteúdo tecidual da proteína MUC-2 apresenta outras funções na prevenção da colite. Estudo em humanos expôs que a preservação da camada de muco rica em MUC-2 sobre o epitélio colônico separa de maneira mais eficaz as bactérias da luz do cólon do contato com as células do epitélio, mostrando ainda que quando há diminuição do conteúdo da proteína pode aumentar a chance do desencadeamento de colite (JOHANSSON et al., 2008). Ao acreditar que na CCE exista perda do conteúdo das mucinas, possibilitando a infiltração bacteriana da mucosa colônica, qualquer substância que mantenha o conteúdo da MUC-2 é interessante também no tratamento

da CCE. As conclusões deste estudo mostrando que o SCF foi capaz de preservar o conteúdo tecidual de MUC-2, o que torna a droga uma substância interessante para o tratamento da CCE.

Apesar de estudos *in vitro* e em animais de experimentação terem sugerido que a administração de butirato é capaz de mudar a expressão tecidual do gene *MUC-2* e aumentar o conteúdo desta na mucosa, apenas um estudo mensurou por imuno-histoquímica a expressão tecidual da proteína MUC-2 na mucosa do cólon confrontando pacientes voluntários normais e doentes com RCUI em remissão clínica (HAMER et al., 2010). O estudo evidenciou que a utilização de enemas com AGCC não modificou os principais parâmetros considerados quanto à camada de muco. Entretanto, outros autores, de modo distinto, verificaram que os AGCC, particularmente o butirato e a enzima ácido graxo sintetase, tem a capacidade de complementar a proteção da camada de muco do epitélio intestinal por aumentar a expressão tecidual da proteína MUC-2 (HATAYAMA et al., 2007; GAUDIER et al., 2009; WEI et al., 2012).

Ao levar em conta que no modelo experimental escolhido para esta pesquisa o cólon desviado estava desprovido do fornecimento de AGCC, é provável que ocorra diminuição do conteúdo da proteína MUC-2. No entanto, observou-se que ela só ocorria nos animais infundidos com SF 0,9%. De modo contrário, notou-se que existia um aumento no conteúdo tecidual de MUC-2 nos animais irrigados com SCF, sobretudo em concentrações mais elevadas e por maior período de tempo. Esses achados sugerem que o SCF de alguma maneira aumenta, ou ao menos preserva, o conteúdo da MUC-2 na mucosa cólica, conferindo maior proteção contra a inflamação como mostrou a análise do escore inflamatório. Assim, é bom ressaltar que o processo inflamatório foi menos intenso no grupo tratado com SCF na maior concentração e após o maior tempo de intervenção, justamente no grupo de animais onde o conteúdo de MUC-2 atingia seus maiores valores. Esses desfechos indicam que o SCF deve ter uma ação própria independente da presença do suplemento de substrato energético. Estudos comparando o uso isolado ou associado do SCF com AGCC ainda são necessários para confirmar esta possibilidade.

Os efeitos antioxidantes do SCF no epitélio gastrointestinal já foram descritos anteriormente (LAUDANO et al., 1990; WADA et al., 1997). Outros projetos seguindo o mesmo modelo de CCE aplicado neste estudo destacaram que a utilização de enemas com SCF reduz os níveis de estresse oxidativo tecidual melhorando o processo inflamatório (MARTINEZ et al. 2015b; PEREIRA, 2016). Estudos anteriores também mostraram que há redução no conteúdo

das frações glicídicas das mucinas neutras e ácidas associadas aos maiores níveis teciduais de RLO (NONOSE, 2009; NONOSE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010a). Constatou-se posteriormente que a aplicação preventiva de enemas com SCF preservava o conteúdo tecidual dessas frações da molécula de mucina (CHAIM, 2014; CHAIM et al., 2014; BONASSA et al., 2015; BONASSA et al., 2015). Dessa forma, nos parece óbvio que a infusão de enemas com SCF possa preservar o conteúdo dessas mucinas também por uma ação antioxidante, preservando a integridade epitelial. Os achados deste estudo associados aos menores níveis de estresse oxidativo encontrados nesses mesmos animais (objeto de outra publicação) preconizam que a atividade antioxidante do SCF poderia também estar contribuindo para a preservação do conteúdo de MUC-2 no cólon submetido a intervenção com a droga (MARTINEZ et al., 2015b).

Resumidamente, os resultados obtidos neste estudo mostram que, possivelmente pelos diferentes mecanismos de ação, a aplicação preventiva de clisteres contendo SCF seja capaz de proteger o conteúdo MUC-2 e, conseqüentemente, o conteúdo das mucinas que revestem o epitélio intestinal. Essa possibilidade representa uma importante proteção contra o desenvolvimento das etapas iniciais do desenvolvimento da CCE. É lícito conjecturar que a infusão de enemas com SCF, conferindo redução da inflamação no cólon derivado, possa se tornar uma estratégia interessante para ser utilizada antes das cirurgias de restauração do trânsito intestinal, com a finalidade de reduzir as complicações relacionadas a cicatrização das anastomoses colorretais. É possível que pelos diferentes mecanismos de ação, a utilização do SCF em conjunto com drogas antioxidantes e solutos ricos em AGCC possam abrir novos caminhos para o tratamento da CCE. Esta possibilidade fica mais evidente ao considerarmos artigo recentemente publicado onde os autores utilizaram a associação do SCF com o ácido 5-ASA, um potente antioxidante, para o tratamento das DII (ISPAS-SZABO et al., 2016). Os resultados observados mostraram-se promissores com a associação das duas drogas, abrindo perspectivas para o uso de uma nova classe de substâncias para o tratamento das DII (ISPAS-SZABO et al., 2016). Com o objetivo de testar essa nova opção terapêutica no tratamento da CCE, pretendemos continuar com a presente linha de pesquisa em uma futura tese de doutorado.

6. CONCLUSÃO

A metodologia utilizada no presente estudo possibilitou a mensuração do conteúdo tecidual de MUC-2 no modelo de CCE proposto.

A aplicação de enemas com SCF foi associada a um aumento dos níveis de MUC-2 na mucosa do intestino grosso sem trânsito fecal, independente da concentração utilizada, porém com maior aumento nos animais submetidos a intervenção com concentração mais elevada.

A aplicação de enemas com SCF foi associada ao aumento dos níveis de MUC-2 na mucosa do cólon sem trânsito fecal, independente do tempo de intervenção proposto, porém com maior aumento nos animais submetidos à intervenção por período de tempo maior.

A aplicação de enemas de SCF na concentração de 2,0 g/kg/dia por quatro semanas reduziu o processo inflamatório na mucosa colônica sem trânsito intestinal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, N.; RAHBAR, S.; SKINNER, R. Outcomes of colostomy reversal in a public safety net hospital: the end or beginning of a new problem? **Am Surg**, v. 81, n. 10, p. 1084-1087, 2015.

AGARWAL, V. P., SCHIMMEL, E. M. Diversion colitis: a nutritional deficiency syndrome? **Nutr. Rev.**, v. 47, n. 9, p. 257-261, 1989.

AGUILAR-NASCIMENTO, J.E.; OLIVEIRA-NETO, J.P.; MATHIE, R.T.; WILLIAMSON, R.C. Effect of intraoperative nutritional solutions on perianastomotic colonic mucosa in experimental large bowel obstruction. **Dig. Dis. Sci.**, v. 42, n. 12, p. 2581-2584, 1997.

ALMEIDA, M. G.; PEREIRA, J. A.; SILVA, C. M. G.; CUNHA, F. L.; MARQUES, L. H. S.; LAMEIRO, T. M. M.; MARTINEZ, C. A. R. Evaluation of topical n-acetylcysteine in diversion colitis. **J. Coloproctol.**, v. 32, n. 3, p. 223-231, 2012.

AN, G.; WEI, B.; XIA, B.; MC DANIEL, J. M.; JU, T.; CUMMINGS, R. D.; BRAUN, J.; XIA, L. Increased susceptibility to colitis and colorectal tumors in mice lacking core 3-derived O-glycans. **J. Exp. Med.**, v. 204, n. 6, p. 1417-1429, 2007.

AQUINA, C.T.; PROBST, C.P.; BECERRA, A.Z.; HENSLEY, B.J.; IANUZZI, J.C.; NOYES, K.; MONSON, J.R.; FLEMING F.J. The impact of surgeon volume on colostomy reversal outcomes after Hartmann's procedure for diverticulitis. **Surgery**, v.160, n. 5, p. 1309-1317, 2016.

ARDIZZONE. S.; PETRILLO, M.; ANTONACCI, C. M.; BIANCHI, P. G. Sucralfate and hydrocortisone enemas in the treatment of active ulcerative proctitis--a randomized single-blind comparative study. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 10, n. 6, p. 957-960, 1996.

AUGENLICHT, L.; SHI, L.; MARIADASON, J.; LABOISSE, C.; VELCICH, A. Repression of MUC-2 gene expression by butyrate, a physiological regulator of intestinal cell maturation. **Oncogene**, v. 22, n. 32, p. 4983-4992, 2003.

BANERJEE, S.; EL-OMAR, E.; MOWAT, A.; ARDILL, J. E.; PARK, R. H.; WATSON, W.; BEATTIE, A. D.; MCCOLL, K. E. Sucralfate suppresses Helicobacter pylori infection and reduces gastric acid secretion by 50% in patients with duodenal ulcer. **Gastroenterology**, v. 110, p. 717-724, 1996.

BERRA, C. M.; MENK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim. Nova**, v. 29, p. 1340-1344, 2006.

BJÖRCK, S.; JENNISCHE, E.; DAHLSTRÖM, A.; AHLMAN, H. Influence of topical rectal application of drugs on dextran sulfate-induced colitis in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 42, n. 4, p. 824-832, 1997.

BONASSA, C. E. G. **Dosagem das mucinas neutras e ácidas nos cólons proximos e desprovidos de trânsito em humanos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2015.

_____.; PEREIRA, J. A.; CAMPOS, F. G. C. M.; RODRIGUES, M. R.; SATO, D. T.; CHAIM, F. D. M.; MARTINEZ, C. A. R. Tissue content of sulfomucins and sialomucins in the colonic mucosa, without fecal stream, undergoing daily intervention with sucralfate. **Acta Cir. Bras.**, v. 30, n. 5, p. 328-338, 2015.

BROMBERG, S. H.; ZAMPIERI, J. C.; BARRETO, E.; AMAR, E. C.; WAISBERG, J. & GODOY, A. C. Colite or eclusão intestinal. Relato de 3 casos. **Rev. Bras. Coloproct.**, v. 13, n. 3, p. 106-109, 1993.

CALTABIANO, C. **Avaliação dos efeitos do ácido 5-aminosalicílico contra o dano oxidativo ao DNA na colite de exclusão.** 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2010.

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

CARLING, I.; KAGEVI, I.; BORVALL, E. Sucralfate enema (SUC)--effective in IBD? **Endoscopy**, v. 18, n. 3, p. 115, 1986.

CASPARY, W. F. Effect of sucralfate on in vitro binding of bile acids and bile acid-induced changes of transmural potential differences in healthy subjects. **Hepatogastroenterology**, v. 27, p. 381, 1980.

CHAIM, F. D. M. **Avaliação do conteúdo tecidual de mucinas neutras e ácidas na mucosa cólica excluída de trânsito intestinal, submetida à aplicação de enemas com SCF. Estudo experimental em ratos.** 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2014.

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

CHIU, A.; CHAN, H.T.; BROWN, C.J.; RAVAL, M.J.; PHANG, P.T. **Am J Surg**, v. 207, n. 5, p. 708-711, 2014.

CHO, S.D.; KIRALY, L.N.; FLAHERTY, S.F.; HERZIG, D.O.; LU, K.C.; SCHREIBER, M.A. Management of colonic injuries in the combat theater. **Dis Colon Rectum**, v.53, n. 5, p. 728-734, 2010.

CHRUSCIELEWSKA-KILISZEK, M. R.; REGULA, J.; POLKOWSKI, M.; RUPINSKI, M.; KRASZEWSKA, E.; PACHLEWSKI, J.; CZACZKOWSKA-KUREK, E.; BUTRUK, E. Sucralfate or placebo following argon plasma coagulation for chronic radiation proctitis: a randomized double blind trial. **Colorectal. Dis.**, v. 15, n. 1, p. 48-55, 2013.

COPEMAN, M.; MATUZ, J.; LEONARD, A. J.; PEARSON, J. P.; DETTMAR, P. W.; ALLEN, A. The gastroduodenal mucus barrier and its role in protection against luminal pepsins: the effect of 16, 16 dimethyl prostaglandin E2, carbopol-polyacrylate, sucralfate and bismuth subsalicylate. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 9, n. 1, p. 55–59, 1994.

CORNICK, S.; TAWIAH, A.; CHADEE, K. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. **Tissue Barriers**, v. 3, n. 1-2, p. e982426, 2015.

CRAMPTON, J. R.; GIBBONS, L. C.; REES, W. D. Effects of sucralfate on gastroduodenal bicarbonate secretion and prostaglandin E2 metabolism. **Am. J. Med.**, v. 83, p. 14-18, 1987.

_____; GIBBONS, L. C.; REES, W. D. Stimulation of amphibian gastroduodenal bicarbonate secretion by sucralfate and aluminium: role of local prostaglandin metabolism. **Gut**, v. 29, p. 903-908, 1988.

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

DANESH, B. J. Z.; DUNCAN, A.; RUSSEL, R. I.; MITCHELL, G. Effect of intragastric pH on mucosal protective action of SCF. **Gut**, v. 29, p. 1379-1385, 1988.

DAVID, G. G.; AL-SARIRA, A. A.; WILLMOTT, S.; CADE, D.; CORLESS, D. J.; SLAVIN, J. P. Use of Hartmann's procedure in England. **Colorectal Dis.**, v. 11, n. 3, p. 308-312, 2009.

DENTON, A. S.; ANDREYEV, H. J. N.; FORBES, A.; MAHER, E. J. Non-surgical interventions for late radiation proctitis in patients who have received radical radiotherapy to the pelvis. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 1, CD003455, 2002a.

_____. Systematic review for nonsurgical interventions for the management of late radiation proctitis. **Br. J. Cancer**, v. 87, p. 134-143, 2002b.

DEPLANCKE, B.; GASKINS, H. R. Microbial modulation of innate defense: goblet-cells and the intestinal mucus layer. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 1131-1141, 2001.

DEVLIN, T. **Textbook of Biochemistry with clinical correlations**. Ed Wiley-Liss, 4th, 1997.

DHARMANI, P.; LEUNG, P.; CHADEE, K. Tumor necrosis factor- α and Muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis. **PLoS One**, v. 6, n. 9, e25058, 2011.

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

ELSBORG, L.; BOYSEN, K.; BRUUSGAARD, A.; REINICKE, V. Sukralfat versus placebo ved ulcus duodeni. **Dan. Med. Bull.**, v. 19, p. 1440-1442, 1984.

FILIFE, M. I. Value of histochemical reactions for muco substances in the diagnosis of certain pathological conditions of the colon and rectum. **Gut**, v. 10, n. 7, p. 577-586, 1969.

_____. Mucins in the human gastrointestinal epithelium: a review. **Invest. Cell. Pathol.**, v. 2, n. 3, p. 195-216, 1979.

FINNIE, I. A.; DWARAKANATH, A. S.; TAYLOR, B. A.; RHODES, J. M. Colonic mucins synthesis is increased by sodium butyrate. **Gut**, v. 36, p. 93-99, 1995.

FLEMING, F.J.; GILLEN, P. Reversal of Hartmann's procedure following acute diverticulitis: is timing everything? **Int J Colorectal Dis**, v. 24, n. 10, p. 1219-1225, 2009.

FLOODEEN, H.; LINDGREN, R.; MATHIESSEN, P. When are defunctioning stomas in rectal cancer surgery really reversed? Results from a population-based single center experience. **Scand J Surg**, v. 102, n. 4, p. 246-250, 2013.

FRISBIE, J.H.; AHMED, N. Diversion colitis in patients with myelopathy: clinical, endoscopic and histopathological findings. **J. Spinal Cord. Med.**, v. 23, n. 2, p. 142-149, 2000.

GAUDIER, E.; HOEBLER, C. Physiological role of mucins in the colonic barrier integrity. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, v. 30, n. 8-9, p. 965-974, 2006.

_____.; JARRY, A.; BLOTTIÈRE, H. M.; DE COPPET, P.; BUISINE, M. P.; AUBERT, J. P.; LABOISSE, C.; CHERBUT, C.; HOEBLER, C. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v. 287, n. 6, p. 1168-1174, 2004.

_____.; RIVAL, M.; BUISINE, M. P.; ROBINEAU, I.; HOEBLER, C. Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. **Physiol. Res.**, v. 58, n. 1, p. 111-119, 2009.

GERAGHTY, J. M.; TALBOT, I. C. Diversion colitis: histological features in the colon and rectum after defunctioning colostomy. **Gut**, v. 32, n. 9, p. 1020-1023, 1991.

GLOTZER, D. J.; GLICK, M. E.; GOLDMAN, H. Proctitis and colitis following diversion of fecal stream. **Gastroenterology**, v. 80, n. 3, p. 438-441, 1981.

GOUDET, P.; BENOIT, L.; COUGARD, P.; FAVRE, J.P.; FAIVRE, J.; MONIN, S. Incidence and prevalence of colostomies. The future of stoma societies. Results of a Côte-d'Or survey. Federation of Stoma Patients in France. **Ann Chir**, v.52, n.1, p.24-28, 1998.

GRAHAM, D.Y.; SACKMAN, J. W.; GIESING, D. H.; RUNSER, D. J. In vitro adsorption of bile salts and aspirin to sucralfate. **Dig. Dis. Sci.**, v. 29, p. 402-406, 1984.

GUL, Y. A.; PRASANNAN, S.; JABAR, F. M.; SHAKER, A. R.; MOISSINAC, K. Pharmacotherapy for chronic hemorrhagic radiation proctitis. **World. J. Surg.**, v. 26, n. 12, p. 1499-1502, 2002.

GUPTA, R. B.; HARPAZ, N.; ITZKOWITZ, S.; HOSSAIN, S.; MATULA, S.; KORNBLUTH, A. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. **Gastroenterology**, v. 133, n. 4, p. 1099-105, 2007.

GUSLANDI, M. Sucralfate and gastric bicarbonate. **Pharmacology**, v. 31, p. 298-300, 1985.

_____.; BALLARIN, E.; CAMBIELLI, M.; TITTOBELLO, A. Stimulation of mucus output: A further mode of action of SCF. **Gastroenterology**, v. 84, p. 1177, 1983.

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

HAMER, H. M.; JONKERS, D. M.; VANHOUTVIN, S. A.; TROOST, F. J.; RIJKERS, G.; DE BRUÏNE, A.; BAST, A.; VENEMA, K.; BRUMMER, R. J. Effect of butyrate enemas on inflammation and antioxidant status in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis in remission. **Clin. Nutr.**, v. 29, n. 6, p. 738-744, 2010.

HANSKI, C.; BORN, M.; FOSS, H. D.; MAROWSKI, B.; MANSMANN, U.; ARASTÉH, K.; BACHLER, B.; PAPENFUSS, M.; NIEDOBITEK, F. Defective post-transcriptional processing of MUC2 mucin in ulcerative colitis and in Crohn's disease increases detectability of the MUC2 protein core. **J. Pathol.**, v. 188, n. 3, p. 304-311, 1999.

HANSON, B.; MACDONALD, R.; SHAUKAT, A. Endoscopic and medical therapy for chronic radiation proctopathy: a systematic review. **Dis. Colon. Rectum.**, v. 55, n. 10, p. 1081-1095, 2012.

HARRINGTON, S. J.; SCHLEGEL, J. F.; CODE, C. F. The protective effect of sucralfate on the gastric mucosa of rats. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 3, n. 2, p. 129-134, 1981.

HATAYAMA, H.; IWASHITA, J.; KUWAJIMA, A.; ABE, T. The short chain fatty acid, butyrate, stimulates MUC2 mucin production in the human colon cancer cell line, LS174T **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 356, n. 3, p. 599-603, 2007.

HAWKINS, M.; BILLINGHAM, R.; BASTAWROUS, A. Hemorrhoid management in patients with radiation proctitis. **Int. J. Colorectal. Dis.**, v. 27, n. 12, p. 1673-1677, 2012.

HENRIKSSON, R.; FRANZÉN, L.; LITTBAND, B. Effects of sucralfate on acute and late bowel discomfort following radiotherapy of pelvic cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 10, n. 6, p. 969-975, 1992.

HENSON, C. Chronic radiation proctitis: issues surrounding delayed bowel dysfunction post-pelvic radiotherapy and an update on medical treatment. **Therap. Adv. Gastroenterol.**, 3(6):359-65. 2010.

HERRLE, F.; SANDRA-PETRESCU, F.; WEISS, C.; POST, S.; RUNKEL, N.; KIENLE, P. Quality of life and timing of stoma closure in patients with rectal cancer undergoing low anterior resection with diverting stoma: a multicenter longitudinal observational study. **Dis. Colon. Rectum**, v. 59, n. 4, p. 281-190, 2016.

HIDALGO, V. P.; HURTADO, M. J.; PUCHE, L. N.; YÉBENES, D. G. Rectal sucralfate in post-irradiation hemorrhagic proctitis. **Med. Clin. (Barc)**, v. 95, n. 2, p. 77-78, 1990.

HOLLANDER, D.; TARNAWSKI, A.; GERGELY, H.; ZIPSER, R. D. Sucralfate protection of the gastric mucosa against ethanol-induced injury: a prostaglandin-mediated process? **Scand. J. Gastroenterol**, v. 19, n. 10 (1), p. 97-102, 1984.

_____.; KRAUSE, W. J.; GCERGEOLY, H. Protective effect of sucralfate against alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. Macroscopic, histologic, ultrastructural, and functional time sequence analysis. **Gastroenterology**, v. 88, p. 366-374, 1985.

HOVDENAK, N.; SØRBYE, H.; DAHL, O. Sucralfate does not ameliorate acute radiation proctitis: randomised study and meta-analysis. **Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol)**, v. 17, n. 6, p. 485-491, 2005.

ISHIMORI, A. History of the development of sucralfate. In: HOLLANDER, D.; TYTGAT, J. N. J. **Sucralfate, from Basic Science to the Bedside**. New York: Plenum Medical Book Company, 1995, p. 35-45.

ISPAS-SZABO, P.; FRICIU, M. M.; NGUYEN, P.; DUMOULIN, Y.; MATEESCU, M. A. Novel self-assembled mesalamine-sucralfate complexes: preparation, characterization, and formulation aspects. **Drug. Dev. Ind. Pharm.**, v. 42, n. 7, p. 1183-1193, 2016.

JENSEN, S. L.; JENSEN, P. F. Role of sucralfate in peptic disease. **Dig. Dis. Sci.**, v. 10, p. 153-161, 1992.

JOHANSSON, M. E.; PHILLIPSON, M.; PETERSSON, J.; VELCICH, A.; HOLM, L.; HANSSON, G. C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 105, n. 39, p. 15064-15069, 2008.

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

KADRI, C.J. **Avaliação dos efeitos tópicos do extrato oleoso de *Curcuma longa* L. (curcumina) no conteúdo tecidual das proteínas claudina-3, ocludina, e-caderina e β -catenina e mieloperoxidase nas glândulas da mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal**. 2015. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2015.

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

KELI, E.; BOUCHOUCHA, M.; DEVROEDE, G.; CARNOT, F.; OHRANT, T.; CUGNENC, P.H. Diversionrelated experimental colitis in rats. **Dis. Colon. Rectum.**, v. 40, p. 222-228, 1997.

KNEEBONE A, MAMEGHAN H, BOLIN T, BERRY M, TURNER S, KEARSLEY J, GRAHAM P, FISHER R, DELANEY G. The effect of oral sucralfate on the acute proctitis associated with prostate radiotherapy: a double-blind, randomized trial. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 51, n. 3, p. 628-635, 2001.

KIELY, E. M.; AJAYI, N. A.; WHEELER, R. A.; MALONE, M. Diversion procto-colitis: response to treatment with short-chain fatty acids. **J. Pediatr. Surg.**, v. 36, n. 10, p. 1514-1517, 2001.

KOCHHAR, R.; MEHTA, S. K.; AGGARWAL, R.; DHAR, A.; PATEL, F. Sucralfate enema in ulcerative rectosigmoid lesions. **Dis. Colon. Rectum.**, v. 33, n. 1, p. 49-51, 1990.

_____.; PATEL, F.; DHAR, A.; SHARMA, S. C.; AYYAGARI, S.; AGGARWAL, R.; GOENKA, M. K.; GUPTA, B. D.; MEHTA, S. K. Radiation-induced proctosigmoiditis. Prospective, randomized, double-blind controlled trial of oral sulfasalazine plus rectal steroids versus rectal sucralfate. **Dig. Dis. Sci.**, v. 36, n. 1, p. 103-107, 1991.

_____.; SRIRAM, P. V.; SHARMA, S. C.; GOEL, R. C.; PATEL, F. Natural history of late radiation proctosigmoiditis treated with topical sucralfate suspension. **Dig. Dis. Sci.**, v. 44, n. 5, p. 973-978, 1999.

KONTUREK, S. J.; KWIECIEN, N.; OBTULOWICZ, W.; KOPP, B.; OLEKSY, J. Double blind controlled study on the effect of sucralfate on gastric prostaglandin formation and microbleeding in normal and aspirin treated man. **Gut**, v. 27, p. 1450-1456, 1986.

_____.; RADECKI, T.; PIASTUCKI, I.; BRZOZOWSKI, T.; DROZDOWICZ, D. Gastrocytoprotection by colloidal bismuth subcitrate (De-nol) and sucralfate. Role of endogenous prostaglandins. **Gut**, v. 28 p. 201-205, 1987.

KRIPKE, S.A.; FOX, A.D.; BERMAN, J.M.; SETTLE, R.G.; ROMBEAU, J.L. Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short-chain fatty acids . **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v.13, n. 2, p. 109-116, 1989 .

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

LAUDANNO, O. M.; BEDINI, O. A.; CESOLARI, J. A.; SAN MIGUEL, P. Evidence of anti-oxidant role of sucralfate in gastric mucosal protection. **Ital. J. Gastroenterol.**, v. 22, p. 19-21, 1990.

LEIPER, K.; MORRIS, A. I. Treatment of Radiation Proctitis. **Clin. Oncol.**, v. 19, p. 724-729, 2007.

LU, P.; BURGER-VAN.; PAASSEN, N.; VAN DER SLUIS, M.; WITTE-BOUMA, J.; KERCKAERT, J. P.; VAN GOUDOEVER, J. B.; VAN SEUNINGEN, I.; RENES, I. B. Colonic gene expression patterns of mucin Muc2 knockout mice reveal various phases in colitis development. **Inflamm. Bowel. Dis.**, v. 17, n. 10, p. 2047-2057, 2011.

MANOJLOVIC, N.; BABIC, D. Radiation-induced rectal ulcer--prognostic factors and medical treatment. **Hepatogastroenterology**, v. 51, n. 56, p. 447-450, 2004.

MARKS, I. N.; WRIGHT, J. P.; DENYER, M.; GARISH, J. A. M.; LUCKE, W. Comparison of sucralfate and cimetidine in the short-term treatment of chronic peptic ulcers. **S. Afr. Med. J.**, v. 57, p. 567-573, 1980.

MARQUES, L. H. S.; SILVA, C. M. G.; LAMEIRO, T. M.; ALMEIDA, M. G.; CUNHA, F. L.; PEREIRA, J. A.; MARTINEZ, C. A. R. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica em células da mucosa cólica após aplicação de enemas com peróxido de hidrogênio: estudo experimental em ratos. **Rev. Bras. Colo-proctol.**, v. 30, n. 3, p. 272-280, 2010.

MARTIN, F.; FARLEY, A.; GAGNON, M.; BENSEMAN, D. Comparison of the healing capacities of sucralfate and cimetidine in the short-term treatment of duodenal ulcer: A double blind randomized trial. **Gastroenterology**, v. 82, n. 3, p. 401-405, 1982.

MARTINEZ, C. A. R. **Avaliação dos níveis de estresse oxidativo e modificações no conteúdo e padrão de expressão das proteínas e-caderina e β -catenina na colite de exclusão. Estudo experimental em ratos.** 2010. 149 f. Tese (Livre-Docência em Cirurgia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

_____.; BARTOCCI, P. C. M.; CARMO, C. V.; PEREIRA, J. A.; MIRANDA, D. D. C.; RIBEIRO, M. L. The effects of oxidative DNA damage and mutations in the p53 protein on cells of the

colonic mucosa with and without the fecal stream: an experimental study in rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 45, p. 714-724, 2010b.

_____.; FABRIS, F. M.; SILVA, C. M. G.; RODRIGUES, M.R.; SATO, D.T.; RIBEIRO, M.L.; PEREIRA, J.A. Oxidative stress and changes in the content and pattern of tissue expression of β -catenin protein in diversion colitis. **J. Coloproctol. (Rio J.)**, v. 32, n. 4, p. 343-358, 2012.

_____.; NONOSE, R; MARGARIDO, N. F; SPADARI, A. P. P; PEREIRA, J. A; PRIOLLI, D. G; MÁXIMO, F. R. Quantificação da expressão de mucinas na mucosa cólica de segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos. **Rev. Bras. Coloproct.**, v. 28, n. 1, p. 47-48, 2008.

_____.; NONOSE, R.; SPADARI, A. P. P.; MÁXIMO, F. R.; PRIOLLI, D. G.; PEREIRA, J. A.; MARGARIDO, N. F. Quantification by computerized morphometry of tissue levels of sulfomucins and sialomucins in diversion colitis in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 25, p. 231-240, 2010a.

_____.; RODRIGUES, M. R.; SATO, D. T.; SILVA, C. G.; KANNO, D. T.; MENDONÇA, R. L. S.; PEREIRA, J. A. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant effects of the sucralfate in diversion colitis. **J. Coloproctol.**, v. 35, n. 2, p. 90-99, 2015b.

_____.; CAMPOS, F. G.; CARVALHO, V. R.; FERREIRA, C. C.; RODRIGUES, M. R.; SATO, D. T.; PEREIRA, J. A. Claudin-3 and occludin tissue content in the glands of colonic mucosa with and without a fecal stream. **J. Mol. Histol.**, v. 46, n. 2, p. 183-194, 2015a.

MASUELLI, L.; TUMINO, G.; TURRIZIANI, M.; MODESTI, A.; BEI, R. Topical use of sucralfate in epithelial wound healing: clinical evidences and molecular mechanisms of action. **Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.**, v. 4, n. 1, p. 25-36, 2010.

MATHEW, A.J.; WANN, V.C.; ABRAHAM, D.T.; JACOB, P.M.; SELVAN, B.S.; RAMAKRISHNA, B.S.; NAIR, A.N. The effect of butyrate on the healing of colonic anastomoses in rats. **J Invest Surg**, v.23, n. 2, p. 101-104, 2010.

MATSUMOTO, S.; MASHIMA, H. Efficacy of Combined Mesalazine Plus Corticosteroid Enemas for Diversion Colitis after Subtotal Colectomy for Ulcerative Colitis. **Case Rep Gastroenterol**, v. 10, n. 1, p. 157-160, 2016.

MATSUU-MATSUYAMA, M.; SHICHIJO, K.; ISHII, K.; WEN, C. Y.; FUKUDA, E.; NAKAYAMA, T.; NAKASHIMA, M.; OKUMURA, Y.; SEKINE, I. Sucralfate protects intestinal epithelial cells from radiation-induced apoptosis in rats. **Res.**, v. 47, n. 1, p. 1-8, 2006.

MC ELVANNA, K.; WILSON, A.; IRWIN, T. Sucralfate paste enema: a new method of topical treatment for haemorrhagic radiation proctitis. **Colorectal. Dis.**, v. 16, n. 4, p. 281-284, 2014.

MCHARDY, G. G. A multicenter, double-blind trial of sucralfate and placebo in duodenal ulcer. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 3, n. 2, p. 147-152, 1981.

MELKO, G. P.; TURCO, T. F.; PHELAN, T. F.; SAUERS, N. M. Treatment of radiation-induced proctitis with sucralfate enemas. **Ann. Pharmacother.**, v. 33, n. 12, p. 1274-1276, 1999.

MELLO, R.O.; SILVA, C.M.; FONTE, F.P.; SILVA, D.L.; PEREIRA, J.A.; MARGARIDO, N.F.; MARTINEZ, C.A. Evaluation of the number of goblet cells in crypts of the colonic mucosa with and without fecal transit. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 39, n. 2, p.139-145, 2012.

MENDENHALL, W. M.; MCKIBBEN, B. T.; HOPPE, B. S.; NICHOLS, R. C.; HENDERSON, R. H.; MENDENHALL, N. P. Management of radiation proctitis. **Am. J. Clin. Oncol.**, v. 37, n. 5, p. 517-523, 2014.

MRAK, K.; URANITSCH, S.; PEDROSS, F.; HEUBERGER, A.; KLINGLER, A.; JAGODITSCH, M.; WEIHS, D.; EBERL, T.; TSCHMELITSCH, J. Diverting ileostomy versus no diversion after low anterior resection for rectal cancer: A prospective, randomized, multicenter trial. **Surgery**, v. 159, n. 4, p.1129-1139, 2016.

NAGASHIMA, R. Mechanisms of action of sucralfate. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 3, p. 117-127, 1981a.

_____. Development and characteristics of sucralfate. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 3, n. 2, p. 103-110, 1981b.

_____.; YOSHIDA, N. Sucralfate, a basic aluminum salt of sucrose sulfate. Behaviour in gastroduodenal pH. **Arzneimittelforschung**, v. 29, p.1668-1676, 1979.

_____.; HOSHINO, E.; HINOHARA, Y.; SAKAI, K.; LAA, S.; NAKANO, H. Effect of sucralfate on ethanol-induced gastric mucosal damage in the rat. **Scand. J. Gastroenterol**, v. 18, n. 83, p. 17-20, 1988.

NAKAZAWA, S.; NAGASHIMA, R.; SAMLOFF, I. M. Selective binding of sucralfate to gastric ulcer in man. **Dig. Dis. Sci.**, v. 26, p. 297-300, 1981.

NASSRI, C. G. G.; NASSRI, A. B.; FAVERO, E.; ROTTA, C, M.; MARTINEZ, C. A. R.; MARGARIDO, N. F. Influência da irrigação de soluções nutricionais no colo excluído de trânsito intestinal: estudo experimental em ratos. **Rev. Bras. Coloproctol.**, v. 28, n. 3, p. 306-314, 2008.

NELAMANGALA, R. V. P.; JAVALI, T. D.; DHARANIPRAGADA, K.; REDDY, K. S.; KRISHNAMACHARI, S. Formalin dab, the effective way of treating haemorrhagic radiation proctitis: a randomized trial from a tertiary care hospital in South India. **Colorectal. Dis.**, v. 14, n. 7, p. 876-882, 2012.

NONOSE, R. **Avaliação do padrão de expressão e do conteúdo de mucinas na mucosa cólica em modelo experimental de colite de exclusão: Estudo em ratos.** 2009. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2009.

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

O'BRIEN, P. C.; FRANKLIN, C. I.; DEAR, K. B.; HAMILTON, C. C.; POULSEN, M.; JOSEPH, D. J.; SPRY, N.; DENHAM, J. W. A phase III double-blind randomised study of rectal sucralfate suspension in the prevention of acute radiation proctitis. **Radiother. Oncol.**, v. 45, n. 2, p. 117-123, 1997.

OGATA, S.; UEHARA, H.; CHEN, A.; ITZKOWITZ, S. H. Mucin gene expression in colonic tissues and cell lines. **Cancer Res.**, v. 52, n. 21, p. 5971-5978, 1992.

PAL, K.; TINALAL, S.; AL BUAINAIN, H.; SINGH, V.P. Diversion proctocolitis and response to treatment with short-chain fatty acids--a clinicopathological study in children. **Indian J Gastroenterol**, v. 34, n. 4, p. 292-299, 2015.

PARADES, V.; BAUER, P.; MARTEAU, P.; CHAUVEINC, L.; BOUILLET, T.; ATIENZA, P. Nonsurgical treatment of chronic radiation-induced hemorrhagic proctitis. **Presse Med.**, v. 37, n. 7-8, p. 1113-1120, 2008.

PEREIRA, J. A. **Avaliação dos efeitos tópicos do SCF no conteúdo tecidual das proteínas e-caderina, catenina, claudina-3, ocludina, mieloperoxidase e malondialdeído na mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal.** 2016. 60 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2016.

_____.; RODRIGUES, M. R.; SATO, D. T.; SILVEIRA JÚNIOR, P. P.; DIAS, A. M.; SILVA, C. G.; MARTINEZ, C. A. R. Evaluation of sucralfate enema in experimental diversion colitis. **J. Coloproctol.**, v. 33, n. 4, p. 182-190, 2013.

PETERSSON, J.; SCHREIBER, O.; HANSSON, G. C.; GENDLER, S. J.; VELCICH, A.; LUNDBERG, J. O.; ROOS, S.; HOLM, L.; PHILLIPSON, M. Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v. 300, n. 2, p. 327-333, 2011.

PIENKOWSKI, P.; FIORAMONTI, J.; SKALLI, F.; FREXINOS, J. Effects of corticoids, 5-aminosalicylic acid and sucralfate on the potential difference of the rectum in inflammatory colitis in man. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, v. 13, n. 2, p. 202-207, 1989.

PLETZ, M. W.; PREECHACHATCHAVAL, V.; BULITTA, J.; ALLEWELT, M.; BURKHARDT, O.; LODE, H. ABT-Pharmacokinetics and Interactions with Ranitidine and Sucralfate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 3, p. 1129-1131, 2003.

PRAVDA, J. Radical induction theory of ulcerative colitis. **World J. Gastroenterology**, v. 11, n. 16, p. 2371-2384, 2005.

REES, W. D. Mechanisms of gastroduodenal protection by sucralfate. **Am. J. Med.**, v. 91, n. 2A, p. 58-63, 1991.

RENES, I. B.; BOSHUIZEN, J. A.; VAN NISPEN, D. J.; BULSING, N. P.; BÜLLER, H. A.; DEKKER, J.; EINERHAND, A. W. Alterations in Muc2 biosynthesis and secretion during dextran sulfate sodium-induced colitis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v. 282, n. 2, p. 382-389, 2002.

RILEY, S.A.; GUPTA, I.; MANI, V. A comparison of sucralfate and prednisolone enemas in the treatment of active distal ulcerative colitis. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 24, n. 8, p. 1014-1018, 1989.

ROBERT, A. Cytoprotection by prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 77, n. 4 (Pt 1), p. 761-767,

ROIG, J.V.; CANTOS, M.; BALCISCUETA, Z.; URIBE, N.; ESPINOSA, J.; ROSELLÓ, V.; GARCÍA-CALVO, R.; HERNANDIS, J.; LANDETE, F.; SOCIEDAD VALENCIANA DE CIRUGÍA COOPERATIVE GROUP. Hartmann's operation: how often is it reversed and at what cost? A multicentre study. **Colorectal Dis**, v.13, n. 12, p. e396-402, 2011.

ROLANDELLI, R.H.; KORUDA, M.J.; SETTLE, R.G.; ROMBEAU, J.L. Effects of intraluminal infusion of short-chain fatty acids on the healing of colonic anastomosis in the rat. **Surgery**, v.100, n. 2, p. 198-204, 1986.

RUSTAGI, T. ; MASHIMO, H. Endoscopic management of chronic radiation proctitis. **World J. Gastroenterol.**, v. 17, n. 41, p. 4554-4562, 2011.

SAMLOFF, I. M.; O'DELL, C. Inhibition of peptic activity by sucralfate. **Am. J. Med.**, v. 79, n. 2, p. 15-18, 1985.

SANGUINETI, G.; FRANZONE, P.; MARCENARO, M.; FOPPIANO, F.; VITALE, V. Sucralfate versus mesalazine versus hydrocortisone in the prevention of acute radiation proctitis during conformal radiotherapy for prostate carcinoma. A randomized study. **Strahlenther Onkol.**, v. 179, n. 7, 464-470, 2003.

SARIN, A.; SAFAR, B. Management of radiation proctitis. **Gastroenterol. Clin. North. Am.**, v. 42, n. 4, p. 913-925, 2013.

SASAI, T.; HIRAISHI, H.; SUZUKI, Y.; MASUYAMA, H.; ISHIDA, M.; TERANO, A. Treatment of chronic post-radiation proctitis with oral administration of sucralfate. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 93, n. 9, p. 1593-1595, 1998.

SCHEIMAN, J. M.; KRAUS, E. R.; YOSHIMURA, K.; BOLAND, C. R. Effect of sucralfate on components of mucosal barrier produced by cultured canine epithelial cells in vitro. **Dig. Dis. Sci.**, v. 37, p. 1853-1859, 1992.

SEO, G. S. Chronic hemorrhagic radiation proctitis treated by sucralfate enema. **J. Gastroenterol.**, v. 47, n. 5, p. 335-336, 2006.

SHEA-DONOHUE, T.; STEEL, L.; MONTCALM, E.; DUBOIS, A. Gastric protection by sucralfate. Role of mucus and prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 91, p. 660-666, 1986.

SHINDO, K.; IIZUKA, M.; SASAKI, K.; KONNO, S.; ITOU, H.; HORIE, Y.; WATANABE, S. Sucralfate prevents the delay of wound repair in intestinal epithelial cells by hydrogen peroxide through NF-kappaB pathway. **J. Gastroenterol**, v. 41, n. 5, p. 450-461, 2006.

SIER, M.F.; VAN GELDER, L.; UBBINK, D.T.; BEMELMAN, W.A.; Oostenbroek, R.J. Factors affecting timing of closure and non-reversal of temporary ileostomies. **Int J Colorectal Dis**, v. 30, n. 9, p. 1185-1192, 2015.

SINGAL, A. K.; ANAND, B. S. Sucralfate in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 95, n. 5, p. 1160, 1998.

SLOMIANY, B. L.; MURTY, V. L. N.; LASZEWICZ, W.; PIASEK, A.; SLOMIANY, A. Effect of sucralfate on the viscosity and retardation of hydrogen ion diffusion by gastric mucus. **Gastroenterology**, v. 88, p. 1591, 1985.

_____.; MURTY, V. L.; PIOTROWSKI, E.; MORITA, M.; PIOTROWSKI, J.; SLOMIANY, A. Activation of arachidonoyl phospholipase A2 in prostaglandin-mediated action of sucralfate. **Gen. Pharmacol.**, v. 25, n. 2, p. 261-266, 1994.

_____.; PIOTROWSKI, J.; OKAZAKI, K.; GRZELINSKA, E.; SLOMIANY, A. Nature of the enhancement of the protective qualities of gastric mucus by sucralfate. **Digestion**, v. 44, p. 222-231, 1989.

_____.; TAKAGI, A.; LASZEWICZ, W.; SLOMIANY, A. In vitro inhibition of peptic degradation of gastric mucus by sucralfate [Abstract]. **Gastroenterology**, v. 88, p. 1590, 1985.

SOUSA, M. V. **Avaliação das alterações histopatológicas da parede cólica na colite de exclusão: estudo experimental em ratos**. 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2009.

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

STACEY, R.; GREEN, J. T. Nonendoscopic therapies for the management of radiation-induced rectal bleeding. **Curr. Opin. Support. Palliat. Care.**, v. 7, n. 2, p. 175-182, 2013.

STOCKDALE, A. D.; BISWAS, A. Long-term control of radiation proctitis following treatment with sucralfate enemas. **Br. J. Surg.**, v. 84, n. 3, p. 379, 1997.

SURAWICZ, C. M.; HAGGITT, R. C.; HUSSEMAN, M.; MC FARLAND, L. V. Mucosal biopsy diagnosis of colitis: acute self-limited colitis and idiopathic inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 107, n. 3, p. 755-763, 1994.

SWEETMAN, S. C. Martindale-The complete drug reference. **Pharmaceutical Press.**, n. 36, 2009.

SZABO, S.; VATTAY, P.; SCARBROUGH, E.; FOLKMAN, J. Role of vascular factors, including angiogenesis, in the mechanisms of action of sucralfate. **Am. J. Med.**, v. 91, n. 2A, p.158-160, 1991.

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**, v. 56, n. 3, p. 343-350, 2007.

TARNAWSKI, A.; HOLLANDER, D.; KRAUSE, W. J.; ZIPSER, R. D.; STACHURA, J. GERGELY, H. Does sucralfate affect the normal gastric mucosa? Histologic, ultrastructural, and functional assessment in the rat. **Gastroenterology**, v. 90, p. 893-905, 1986.

VAN DER SLUIS, M.; DE KONING, B. A.; DE BRUIJN, A. C.; VELCICH, A.; MEIJERINK, J. P.; VAN GOUDOEVER, J. B.; BÜLLER, H. A.; DEKKER, J.; VAN SEUNINGEN, I.; RENES, I. B.; EINERHAND, A. W. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. **Gastroenterology**, v. 131, n. 1, p. 117-129, 2006.

_____.; BOUMA, J.; VINCENT, A.; VELCICH, A.; CARRAWAY, K. L.; BÜLLER, H. A.; EINERHAND, A. W.; VAN GOUDOEVER, J. B.; VAN SEUNINGEN, I.; RENES, I. B. Combined defects in epithelial and immunoregulatory factors exacerbate the pathogenesis of inflammation: mucin 2-interleukin 10-deficient mice. **Lab. Invest.**, v. 88, n. 6, p. 634-642, 2008.

VALLS, A.; ALGARA, M.; DOMÈNECH, M.; LLADÓ, A.; FERRER, E.; MARÍN, S.; Efficacy of sucralfate in the prophylaxis of diarrhea secondary to acute radiation-induced enteritis. Preliminary results of a double-blind randomized trial. **Med. Clin. (Barc)**, v. 96, n. 12, p. 449-452, 1991.

VOLKIN, D. B.; VERTICELLI, A. M.; MARFIA, K. E.; BURKE, C. J.; MACH, H.; MIDDAUGH, C. R. Sucralfate and soluble sucrose octasulfate bind and stabilize acidic fibroblast growth factor. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1203, p. 18-26, 1993.

WADA, K.; KAMISAKI, Y.; KITANO, M.; KISHIMOTO, Y.; NAKAMOTO, K.; ITOH, T. Effects of sucralfate on acute gastric mucosal injury and gastric ulcer induced by ischemiareperfusion in rats. **Pharmacology**, v. 54, p. 57-63, 1997.

WEI, X.; YANG, Z.; REY, F. E.; RIDAURA, V. K.; DAVIDSON, N. O.; GORDON, J. I.; SEMENKOVICH, C. F. Fatty acid synthase modulates intestinal barrier function through palmitoylation of mucin 2. **Cell Host Microbe**, v. 11, n. 2, p. 140-152, 2012.

WEISS, A. A.; BABYATSKY, M. W.; OGATA, S.; CHEN, A.; ITZKOWITZ, S. H. In ulcerative colitis and Crohn's colitis tissues, MUC2 and MUC3 mRNA expression displayed a normal pattern regardless of whether the mucosa manifested active or quiescent inflammation. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 44, n. 10, p. 1161-1166, 1996.

WENZEL, U. A.; MAGNUSSON, M. K.; RYDSTRÖM, A.; JONSTRAND, C.; HENGST, J.; JOHANSSON, M. E.; VELCICH, A.; ÖHMAN, L.; STRID, H.; SJÖVALL, H.; HANSSON, G. C.; WICK, M. J. Spontaneous colitis in Muc2-deficient mice reflects clinical and cellular features of active ulcerative colitis. **PLoS One**, v. 9, n. 6, e100217, 2014.

WILLEMSSEN, L. E.; KOETSIER, M. A.; VAN DEVENTER, S. J.; VAN TOL, E. A. Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E1 and E2 production by intestinal myofibroblasts. **Gut**, v. 52, n. 10, p. 1442-1447, 2003.

WILLIAMS, S. J.; MUNSTER, D. J.; QUIN, R. J.; GOTLEY, D. C.; MCGUCKIN, M. A. The MUC3 gene encodes a transmembrane mucin and is alternatively spliced. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 261, n. 1, p. 83-89, 1999.

YOSHIDA, N.; TERAOKA, N.; NAGASHIMA, R. Sucralfate, a basic aluminum salt of sucrose sulfate. IIV Interaction with enzyme pepsin. **Arzneim-Forsch**, v. 30, p. 79-80, 1980.

ZAHARI, I.; AVIDOR, I.; MARCUS, H.; ROSENBAUM, Y.; WAISMAN, Y. Effect of sucralfate on experimental colitis in the rat. **Dis. Colon. Rectum**, v. 32, n. 2, p. 95-98, 1989.

ZIMMERMANN, F. B.; FELDMANN, H. J. Radiation proctitis. Clinical and pathological manifestations, therapy and prophylaxis of acute and late injurious effects of radiation on the rectal mucosa. **Strahlenther Onkol.**, v. 174, n. 3, p. 85-89, 1998.

8. ANEXOS

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



Bragança Paulista, 22 de Novembro 2007.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

Autor(es): Dr. Carlos Augusto Real Martínez; Dr. Marcelo Lima Ribeiro; Ms. Denise G. 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) 4034-1625

CÂMPUS DE CAMPINAS: Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Árs 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