# UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde

### **BRUNA ZINI DE PAULA FREITAS**

# AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA COM INFLIXIMAB NO CONTEÚDO DE COLÁGENO NA MUCOSA CÓLICA DESPROVIDA DE TRÂNSITO INTESTINAL

### BRUNA ZINI DE PAULA FREITAS - R.A. 001201914943

## AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA COM INFLIXIMAB NO CONTEÚDO DE COLÁGENO NA MUCOSA CÓLICA DESPROVIDA DE TRÂNSITO INTESTINAL

Dissertação apresentada ao Programa 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 2021 WI 522 F936a Freitas, Bruna Zini de Paula

Avaliação dos efeitos da terapia com Inflixmab no conteúdo de colágeno na mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal / Bruna Zini de Paula Freitas. -- Bragança Paulista, 2021. 74 p.

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

Orientação de: Carlos Augusto Real Martinez.

1. Reto. 2. Retite. 3. Terapia. 4. Ácidos graxos de cadeia curta. 5. Colágeno tipo I. 6. Colágeno tipo III. 7. Infliximabe. 8. Fator de negrose tumoral alfa. 9. Imuno-Histoquímica. 9. Modelos animais. 10. Ratos. I. Martinez. Carlos Augusto

9. Modelos animais. 10. Ratos. I. Martinez, Carlos Augusto Real. II. Título.

Sistema de Bibliotecas da Universidade São Francisco – USF Ficha catalográfica elaborada por: Denise Isabel Arten / CRB-8/5823



FREITAS, Bruna Zini de Paula. "Avaliação dos efeitos da terapia com infliximab no conteúdo de colágeno na mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 30 de agosto de 2021 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

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

Prof. Dr. Fábio Guilherme Caserta Maryssael de Campos Universidade de São Paulo

> Prof. Dr. José Aires Pereira Universidade São Francisco

Profa. Dra. Manoela Marques Ortega Universidade São Francisco



### **DEDICATÓRIA**

Dedico primeiramente a oportunidade de realizar esta tese de mestrado a Deus.

À minha família, a meus pais Adriana e Luiz Fernando e a minha irmã Julia, que desde a infância incentivaram-me aos estudos.

Ao Marcos Almeida e à minha filha Luísa que me deram apoio e auxílio para que essa tese fosse concluída.

Ao meu professor e orientador Dr. Martinez que de suma importância participou da minha formação acadêmica e cirúrgica e atualmente na orientação desta tese.

### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço também a Universidade São Francisco (USF), através do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde, por possibilitar a realização e conclusão deste projeto de mestrado.

Agradeço o Prof. Dr. José Aires Pereira pelo auxílio e orientação durante a confecção das lâminas histológicas e histoquímicas.

Agradeço a equipe do biotério no cuidado com os animais.

Agradeço a Daniela Tiemi Sato pelo auxílio na leitura das lâminas histoquímicas e quantificação dos conteúdos de colágeno.

#### **RESUMO**

A cirurgia de Hartmann (CH) é uma derivação intestinal temporária utilizada para tratar enfermidades colorretais. Contudo, a reconstrução posterior do trânsito intestinal é um procedimento de difícil execução associado a altos índices de complicações pós-operatórias. principalmente a deiscência de anastomose, que possui alta morbimortalidade. Um dos mecanismos relacionados é o déficit nutricional decorrente ausência de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC) no cólon sem trânsito fecal. Os AGCC são a principal fonte para síntese de proteínas, particularmente, o colágeno. A síndrome de deficiência nutricional ocasiona inflamação no cólon distal denominado retite de exclusão (RE). Com a inflamação mucosa existe aumento da produção de enzimas proteolíticas, que degradam o colágeno produzido impactando a cicatrização tecidual. O infliximabe (anticorpo neutralizante do fator de necrose tumoral alfa), vem sendo utilizado com sucesso para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais (DII). O infliximabe reduz o infiltrado inflamatório e diminui a produção de enzimas degradadoras de colágeno, favorecendo a cicatrização tecidual. Poucos estudos avaliaram os efeitos da terapia com infliximabe no conteúdo tecidual de colágeno na mucosa cólica sem trânsito intestinal em doentes submetidos após a CH. Nenhum deles, mensurou o conteúdo dos subtipos de colágeno do tipo I e III em modelos de RE após o tratamento com infliximabe. Avaliar os efeitos da terapia com infliximabe na cicatrização mucosa retal e no conteúdo de colágeno dos subtipos I e III em ratos submetidos a CH e que desenvolveram RE. Vinte e dois ratos machos, foram submetidos a CH. Após foram mantidos em gailoas individuais por 12 semanas para desenvolverem RE. A seguir foram divididos em três grupos segundo aplicação subcutânea semanal, na prega cutânea cervical, das seguintes substâncias; A: soro fisiológico (SF) 0,9%, (n=6); B: infliximabe na dose de 5mg/kg/sem (n=8) e, C: infliximabe, na dose de 10mg/kg/dia (n=8). Todos ratos receberam as soluções de intervenção por 5 semanas consecutivas. Foram eutanasiados para remoção de segmentos colorretais para estudo histológico. A cicatrização mucosa e o processo inflamatório foi analisada pela hematoxilina-eosina, utilizando-se escala validada. A expressão tecidual de colágeno total foi identificada utilizando-se o tricrômio de Masson, enquanto a expressão dos colágenos do tipo I e III, por técnica imuno-histoquímica, com anticorpos primários específicos para cada subtipo. O conteúdo de colágeno total e de ambos os subtipos foi quantificado por morfometria computadorizada. A intervenção com infliximabe, principalmente em doses maiores, reduziu a inflamação, melhorou da reparação mucosa e aumentou o conteúdo de colágeno total no cólon sem trânsito em relação ao SF 0.9%. O conteúdo de colágeno total foi sempre menor no cólon excluso, quando comparado aos segmentos com trânsito preservado, independente da solução utilizada. O conteudo dos colágenos dos tipo I e III, aumentou nos segmentos retais sem trânsito nos animais tratados com infliximabe, independente da dose utilizada. O infliximabe melhorou a reparação tecidual e aumentou o conteúdo de colágeno total e dos subtipos tipo I e III, sugerindo que possa se tornar uma estratégia promissora a ser avaliada em doentes previamente submetidos a CH.

**Descritores:** Retite. Ácidos Graxos de Cadeia Curta. Colágeno. Fator de Necrose Tumoral alfa. Infliximabe.

#### **ABSTRACT**

Hartmann surgery (HC) is a temporary intestinal derivation used to treat different colorectal diseases. However, posterior reconstruction of the intestinal transit is a difficult procedure to perform and is associated with high rates of postoperative complications, mainly represented by anastomotic dehiscence, which have high rates of morbidity. One of the mechanisms related to the appearance of these fistulas is the nutritional deficit resulting from the lack of supply of shortchain fatty acids (SCFA) in the segments deprived of fecal transit. SCFA represent the main substrate needed for protein synthesis, particularly collagen. The nutritional deficiency syndrome, causing a form of inflammation of the distal colon called diversion proctitis (DP). The resulting inflammation of the mucosa elicits an increase in the production of proteolytic enzymes, which degrade the collagen that is produced during the surgical recovery, impairing tissue healing. Infliximabe, a neutralizing antibody of tumor necrosis factor alpha, has been successfully used for the treatment of inflammatory bowel disease (IBD), as it causes reduction of the inflammatory infiltrate and decrease of the production of collagen degrading enzymes, benefitting tissue healing as a result. Few studies have evaluated the effects of infliximabe therapy on tissue collagen content in the colonic mucosa without intestinal transit in patients that underwent HC. None of them measured the contents collagen's subtypes I and III in DP models after infliximabe treatment. To evaluate the effects of infliximabe therapy on rectal mucosal healing and on the content of total collagen and of its subtypes I and III in rats undergoing HC which developed DP. Twenty-two male rats were submitted to HC. Subsequently, they were kept in individual cages for 12 weeks until they developed DP. Next, they were divided into three groups according to weekly subcutaneous application, in the cervical skin fold, of the following substances, A: 0.9% saline solution (SS) (n=6); B: infliximabe at a dose of 5mg/kg/wk; C: infliximabe at a dose of 10mg/kg/wk. All rats received the intervention solutions for 5 consecutive weeks. They were euthanized to remove colorrectal segments for histological study. The mucosal healing and inflammatory process were analyzed by the hematoxylin-eosin method, using a validated scale. Tissue expression of total collagen was identified using Masson's trichrome staining method, while expression of type I and III collagen was detected by an immunohistochemical technique that employs specific primary antibodies for each subtype. The content of total collagen and of its both subtypes was quantified by computerized morphometry. Intervention with infliximabe, predominantly at the higher doses, reduced inflammation, improved the mucosal repair ability, and increased total collagen content in the colon without transit compared to the 0.9% SS subjects. The total collagen content was always lower in the diverted colon segments when compared to the segments with preserved transit, regardless of the solution used. The content of total collagen and of its subtypes I and III increased in the rectal segments without transit in animals treated with infliximabe, regardless of the dose used. Infliximabe improved tissue repair and increased the content of total collagen and of its subtypes I and III, suggesting that it may become a promising strategy to be evaluated and employed in patients previously submitted to HC.

**Descriptors**: Proctitis. Short Chain Fatty Acids. Collagen. Tumor Necrosis Factor Alpha. Infliximab.

### LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AGCC Ácidos Graxos de Cadeia Curta

**CCR** Câncer colorretal

**CEMIB** Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica

CH Cirurgia de Hartmann

COBEA Colégio Brasileiro de Experimentação AnimalCEUA Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa

DC Doença de Crohn

**DII** Doenças inflamatórias intestinais

**TNF-** $\alpha$  Fator de necrose tumoral  $\alpha$ 

**g** grama

°C Grau Celsius

HE Hematoxilina eosina IH Imunohistoquímica

IOA International Ostomy Association

MMP-9 Metaloproteinase 9

μL Microlitros
 μm Micrometros
 mg Miligrama
 mm Milímetro
 mL Mililitro

% Porcentagem **Kg** Quilograma

**RCU** Retocolite ulcerativa

RLO Radicais livres de oxigênio

RE Retite de Exclusão

sem Semana

PBS Solução tampão fosfato de sódio

SF Soro fisiológico

TM Tricrômio de Masson

V Volume

### LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Colostomia temporaria em alça para tratamento do cancer colorretal.	16
FIGURA 2 – Cirurgia de Hartmann, A: segmento do cólon sigmoide ressecado. B:  Coto do reto fechado e excluído do trânsito intestinal. C: Colostomia proximal terminal.  Figura disponível em: <a href="https://en.wikipedia.org/wiki/Hartmann%27s_operation">https://en.wikipedia.org/wiki/Hartmann%27s_operation</a>	21
FIGURA 3 – Henri Albert Hartmann (1860-1952). Figura disponível em: <a href="https://www.wikiwand.com/en/Henri_Albert_Hartmann">https://www.wikiwand.com/en/Henri_Albert_Hartmann</a>	21
<b>FIGURA 4</b> – A- Visão endoscópica do reto excluso de trânsito intestinal em doente com forma moderada da retite de desuso em doente submetido a sigmoidostomia em alça. B- Visão endoscópica do reto excluso de trânsito fecal em doente com a forma grave da retite de desuso após a CH.	25
FIGURA 5 – Fotomicrografia da parede do reto excluso de trânsito intestinal em doente com retite de exclusão. É possível observar a anfractuosidade da superfície epitelial (borda em escova, seta preta), depressão no número de células caliciformes nas glândulas cólicas, processo inflamatório na base das criptas cólicas (asterisco) e congestão e edema da camada submucosa (seta peta) (TM-200x).	26
FIGURA 6 – Laparotomia mediana para acesso a cavidade abdominal.	38
FIGURA 7 – Identificação e ligadura da artéria marginal justa cólica.	39
FIGURA 8 – Secção do cólon esquerdo acima da placa de Peyer.	39
<b>FIGURA 9</b> – Cateterização do cólon distal e aplicação de solução salina para remoção de resíduos fecais.	40
FIGURA 10 – Fechamento do cólon distal (cirurgia de Hartmann).	40
FIGURA 11 – Colostomia terminal proximal (cirurgia de Hartmann).	41
<b>FIGURA 12</b> – A- Segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com SF 0.9% onde é possível identificar-se a presença de úlcera epitelial (H.E 100x). B- Segmento de parede cólica sem trânsito fecal de	46

animal submetido a intervenção com infliximabe na dose de 5mg/kg/sem, onde observa-se a integridade da superfície epitelial (HE 100x). C- Segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com infliximabe na dose de 5mg/kg/sem, onde observa-se a integridade da superfície epitelial e maior população de células caliciformes.

FIGURA 13 – A- Expressão tecidual de colágeno (cor azul) em segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com SF 0.9% (T.M 100x). B- Expressão tecidual de colágeno total em segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com infliximabe na dose de 5mg/kg/sem (TM 100x). C- Expressão tecidual de colágeno total na parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com infliximabe na dose de 10mg/kg/sem (TM 100x).

FIGURA 14 – A- Expressão tecidual de colágeno do tipo I em segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com SF 0.9% (IH 100x). B- Expressão tecidual de colágeno tipo I em segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com infliximabe na dose de 50 5mg/kg/sem (IH 100x). C- Expressão tecidual de colágeno do tipo I na parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com infliximabe na dose de 10mg/kg/sem (IH 100x).

FIGURA 15 – A- Expressão tecidual de colágeno do tipo III em segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com SF 0.9% (IH 100x). B- Expressão tecidual de colágeno tipo III em segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com infliximabe na dose de 53 5mg/kg/sem (IH 100x). C- Expressão tecidual de colágeno do tipo III na parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com infliximabe na dose de 10mg/kg/sem (IH 100x).

### LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

<b>GRÁFICO 1</b> – Escore inflamatório comparando-se os cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal), nos animais submetidos à intervenão com SF 0,9% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10/mg/kg/sem. **= p<0,01. Teste de Mann-Whitney.	47
<b>GRÁFICO 2</b> – Conteúdo de colágeno total comparando-se os cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal), nos animais submetidos à intervenão com SF 0,9% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10/mg/kg/sem.  **= p<0,01. Teste de Mann-Whitney.	49
<b>GRÁFICO 3</b> – Variação no conteúdo de colágeno total nos cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal), nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10/mg/kg/sem.  **= p<0,01. Teste de Kruskal-Wallis.	50
<b>GRÁFICO 4</b> – Conteúdo de colágeno do tipo I comparando-se os cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal), nos animais submetidos à intervenão com SF 0,9% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10/mg/kg/sem.  **= p<0,01. Teste de Mann-Whitney.	51
<b>GRÁFICO 5</b> – Variação no conteúdo de colágeno do tipo I nos cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal), nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10/mg/kg/sem. *= p<0,05. Teste de Kruskal-Wallis.	52
<b>GRÁFICO 6</b> – Conteúdo de colágeno do tipo III comparando-se os cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal), nos animais submetidos à intervenão com SF 0,9% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10/mg/kg/sem. **= p<0,01. Teste de Mann-Whitney.	54
GRÁFICO 7 – Variação no conteúdo de colágeno do tipo III nos cólons com trânsito	55

intestinal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal), nos animais submetidos

à intervenção com SF 0,9% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10/mg/kg/sem. \*= p<0,05. Teste de Kruskal-Wallis.

**GRÁFICO 8** – Grau de dificuldade dos 12 procedimentos colorretais mais frequentemente realizados por acesso minimamente invasivo (Figura original: JAMALI et al., 2008). Disponível em: <a href="http://archsurg.jamanetwork.com">http://archsurg.jamanetwork.com</a>

56

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15.
1.1 Derivação do trânsito intestinal (ostomias)	15.
1.2. A cirurgia de Hartmann	20.
1.3. A retite de exclusão	23.
1.4. A síntese proteica no cólon excluso	29.
1.5. Colágeno	31.
1.6. Produção e degradação do colágeno no cólon sem trânsito intestinal	33.
1.7. Infliximabe	34.
2. OBJETIVOS	36.
2.1. Objetivo Geral	36.
2.2. Objetivos Específicos	36.
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37.
3.1. Ética	37.
3.2. Animal de experimentação	37.
3.3. Técnica cirúrgica	37.
3.4. Pós-operatório	41.
3.5. Grupos experimentais	41.
3.6. Eutanásia dos animais	42.
3.7. Histologia	42.
3.8. Tricrômio de Masson	43.
3.9. Imuno-histoquímica	43.
3.10. Quantificação	45.

3.11. Análise Estatística	45.
4. RESULTADOS	46.
4.1. Avaliação Histológica	46.
4.2. Escore de inflamação tecidual	47.
4.3. Expressão Tecidual de Colágeno Total	48.
4.4. Conteúdo Tecidual de Colágeno Total	48.
4.5. Variação Tecidual de Colágeno Total	49.
4.6. Expressão Tecidual de Colágeno tipo I	50.
4.7. Conteúdo Tecidual de Colágeno tipo I	51.
4.8. Variação Tecidual de Colágeno tipo I	51.
4.9. Expressão Tecidual de Colágeno tipo III	52.
4.10. Conteúdo Tecidual de Colágeno tipo III	53.
4.11. Variação Tecidual de Colágeno tipo III	54.
5. DISCUSSÃO	55.
6. CONCLUSÃO	65.
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67.
8. ANEXOS	86.
8.1. Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais	86.
0 ADÊNDICE	07

### 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Derivação do trânsito intestinal (ostomias)

O radical "stoma", deriva da palavra grega stóma e, do ponto de vista anatômico, é utilizado para denominar qualquer abertura natural do corpo humano (boca, nariz, ânus). Como sufixo também é empregado para descrever um procedimento técnico no qual o cirurgião comunica, intencionalmente, através da superfície cutânea, o interior de uma víscera oca ao meio externo (SALOMÉ et al., 2017). Assim, os termos esofagostomia, gastrostomia, duodenostomia, colecistostomia, jejunostomia, ileostomia e colostomia, são os mais empregados em cirurgia digestiva, para denominar a comunicação do esôfago, estômago, duodeno, vesícula biliar, jejuno, íleo e cólon, respectivamente, com o meio externo. O radical também pode ser utilizado para definir diferentes tipos de derivação do trato urinário, como nefrostomia, cistostomia e ureterostomia, quando o cirurgião comunica a pelve renal, a bexiga e os ureteres, respectivamente, à superfície cutânea (MOTA; GOMES; PETUCO, 2016). Quando usado como prefixo, pode denominar arte de cuidar de pessoas com um estoma (estomaterapia) ou os profissionais que cuidam dos doentes ostomizados (estomaterapeutas).

Dependendo da doença que requereu sua indicação, os estomas cirúrgicos podem ser divididos em dois grupos: permanentes ou temporários (SALOMÉ; ALMEIDA, 2014; MOTA; GOMES; PETUCO, 2016). São considerados temporários, quando existe a possibilidade de restabelecer, no futuro, a continuidade do trânsito fecal. Os estomas são considerados definitivos, quando não existe indicação ou possibilidade de restaurar-se o trânsito intestinal, condenando esses doentes a conviver com a derivação pelo resto de suas vidas (MOTA; GOMES PETUCO, 2016).

Embora existam relatos descrevendo que as operações de desvio do trânsito intestinal já eram conhecidas na idade antiga, acredita-se que a primeira colostomia cirúrgica (Figura 1) indicada de forma intencional, tenha sido realizada em 1710, pelo médico e anatomista Alexis de Littré, para o tratamento de um recém-nascido portador de ânus imperfurado (GUINDIC, 2006). Por sua vez, a primeira ileostomia, foi realizada pelo cirurgião alemão Wilhelm Baum, em 1879, para desviar o trânsito intestinal de um enfermo com carcinoma de cólon obstrutivo (MARTIN; VOGEL, 2012). Desde então, as operações de derivação intestinal tornaram-se um dos procedimentos cirúrgicos mais comumente utilizados na prática cirúrgica.



**Figura 1** - Colostomia temporária em alça para tratamento do câncer obstrutivo do reto.

Gentilmente cedida pelo grupo de coloproctologia da FCM Unicamp

O número de doentes que convivem com um estoma temporário ou permanente, é difícil de ser estimado. A International Ostomy Association (IOA) projeta que em todo o mundo exista uma pessoa com algum tipo de ostomia para cada 1.000 habitantes (SIRIMARCO et al., 2021). Levantamento realizado nos Estados Unidos da América estimou que mais de 450.000 pessoas viviam com algum tipo de estoma na última década e que 120.000 novas cirurgias de derivação são realizadas a cada ano (TURNBULL, 2003). O mesmo autor refere que uma pesquisa de mercado realizada Estados Unidos estimou que 800.000 cidadãos americanos conviviam com um estoma o início da década de 2000 e que esse número aumentaria numa taxa anual de 3% (TURNBULL, 2003). No Brasil, estima-se que nos últimos cinco anos mais de 100 mil pessoas foram submetidas à uma operação de derivação intestinal ao longo da vida. O Ministério da Saúde estima que atualmente existem no Brasil 400.000 pessoas convivendo com um estoma (intestinal ou urinário) e que a cada ano, 10.000 pessoas necessitam ser submetidas à uma operação de derivação fecal ou urinária (VENTURA, 2020). A Associação Brasileira dos Ostomizados (ABRASO, 2021), mostrou que, apenas no Estado de São Paulo, existem 33.864 portadores dos vários tipos de estoma e que 9.200 pessoas são atendidas, mensalmente, pelos programas Estaduais e Municipais de apoio ao doente ostomizado (ABRASO, 2021).

As colostomias e as ileostomias representam as derivações mais utilizadas para o tratamento de diferentes enfermidades que acometem os intestinos delgado e grosso. Nos dois

últimos séculos, com o aumento da expectativa de vida, a globalização e os efeitos da urbanização, também houve aumento proporcional do número de pessoas expostas a diferentes enfermidades que potencialmente venham a requerer a indicação de um estoma. As colostomias e as ileostomias são procedimentos cirúrgicos frequentemente utilizados pelo cirurgião para o tratamento de diferentes afecções do aparelho digestivo, principalmente representadas pelas complicações da diverticulite aguda do cólon sigmoide, do câncer colorretal (CCR) e doenças inflamatórias intestinais (DII). Cabe lembrar que em situações de urgência e emergência como os traumas pélvicos complexos, ferimentos penetrantes que atingem os diferentes segmentos do cólon, reto e ânus, as perfurações decorrentes de exames endoscópicos, empalamento e as infecções graves da região anoperineal, também podem ser condições em que a indicação de uma operação de derivação intestinal pode ser necessária (MELOTTI et al., 2013).

As colostomias e, particularmente, as ileostomias também são procedimentos técnicos muito utilizados em cirurgia colorretal como opção tática para desviar o fluxo fecal com o objetivo de "proteger" anastomoses colorretais confeccionadas a jusante. Condições clínicas desfavoráveis como no choque, infecção abdominal grave (peritonites purulentas ou fecais), no reto submetido a radioterapia prévia ou quando o cirurgião identifica durante o procedimento cirúrgico, falhas técnicas na confecção das anastomoses são as principais situações em que os estomas ditos de "proteção" são indicados (FAUNO et al., 2012). Por exemplo, demonstrou-se que a confecção preventiva de um estoma de "proteção" nos doentes submetidos à retossigmoidectomia anterior com excisão total do mesorreto e que antes receberam protocolos de radioquimioterapia antes da cirurgia, reduziu os índices e a gravidade de fístulas das anastomoses a jusante em um terço e a necessidade de reoperação em um quarto dos doentes (GARG et al., 2019). Na última década, com o importante aumento do número de doentes com que procuram os serviços especializados com câncer de reto avançado, a indicação de radioquimioterapia neoadjuvante tornou-se mais comum, pois está associada a melhora dos desfechos oncológicos (BOLAND; FAKIH, 2014). Assim, quando se consideram os efeitos deletérios da quimiorradioterapia pré-operatória à parede retal, dificultando a cicatrização de anastomoses colorretais confeccionadas no reto irradiado, a confecção de um estoma de "proteção" tornou-se um procedimento rotineiro (RASANEN et al., 2015). Nesses doentes, o racional para indicar-se uma operação de derivação do trânsito intestinal, decorre de evidências mostrando que o desvio do fluxo fecal da anastomose recém confeccionada, além de reduzir a gravidade de fístulas diminui a necessidade de reoperações para o tratamento das graves

infecções pélvicas decorrentes das deiscências anastomóticas graves (RASANEN et al., 2015; MATTHIESSEN et al., 2007). Quando ocorre uma fístula ou a formação de um pequeno "sinus" no local da anastomose, a derivação intestinal preventiva diminui a gravidade da infecção pélvica diminuindo a possibilidade de que esses doentes necessitem desfazer a anastomose e tenham que permanecer com um estoma, até mesmo pelo resto de suas vidas (RASANEN et al., 2015; SHERMAN; WEXNER, 2017).

Apesar das operações de derivação intestinal terem salvado milhares de vida nos últimos séculos, não são considerados procedimentos isentos de risco (SHABBIR, BRITTON, 2010). Estudos, mostraram que as operações de derivação do trânsito intestinal cursam com índices de complicação que variam entre 21% e 70% (ARUMUGAM et al., 2003; ROBERTSON et al., 2005; SHABBIR; BRITTON, 2010). Quando o cirurgião toma a decisão de indicar um estoma, deve levar em conta uma série de fatores. Variáveis clínicas como gênero do doente (homens com pelve estreita), idade avançada, obesidade, desnutrição, diabetes, choque, comorbidades desfavoráveis, doença arteriosclerótica, condições de imunossupressão, terapia com corticoides e presença de infecção abdominal grave aumentam a morbidade do procedimento (WONG; EU, 2005; BAX; MCNEVIN, 2007; SHIM et al., 2010; GESSLER; HAGLIND; ANGETE, 2012; LIM et al., 2013; SEO et al., 2013). Condições cirúrgicas como as anastomoses colorretais baixas (confeccionadas a menos de 5 cm da margem anal), doentes submetidos a protocolos de radioquimioterapia neoadjuvante, excisão total do mesorreto, deficiências no suprimento sanguíneo no sítio da anastomose, falhas técnicas (anéis de grampeamento incompletos, manobra do borracheiro positiva), dificuldade técnicas e a experiência do cirurgião, também são variáveis que precisam ser consideradas ao indicar-se o procedimento (WONG; EU, 2005; BAX; MCNEVIN, 2007; TAN et al., 2009; KUMAR et al., 2011; SHIOMI et al., 2011; GESSLER; HAGLIND; ANGETE, 2012).

As complicações relacionadas aos estomas são comuns e estão associadas ao aumento dos índices de morbidade e mortalidade, além de impactarem, consideravelmente, os custos para os sistemas de saúde (KRISHNAMURTY; BLATNIK; MUTCH, 2017). Complicações precoces como a necrose do estoma, infecção do sítio cirúrgico, deiscência da sua fixação cutânea, retração (desabamento), abscessos paraestomais, sangramento e, principalmente, o desenvolvimento dermatites periestomais, com graus variados de intensidade, que impedem a adequada adaptação das bolsas coletoras, são as complicações mais comumente descritas (SALVADALENA, 2013; CARLSSON et. al., 2016). Dentre as complicações tardias, merecem

destaque a estenose, o prolapso e as hérnias paraestomais (HUSAIN; CATALDO, 2008; DE ANDRADE et al., 2018; MURKEN; BLEIER, 2019). Revisão sistemática da literatura realizada na Inglaterra mostrou que os índices de complicações tardias, após a confecção de um estoma, variam entre 10% e 82% (STELTON; ZULKOWSKI; AYELLO, 2015). Todas essas complicações impactam negativamente à qualidade de vida dos doentes e, em muitos casos, requerem reoperações complexas para sua correção que aumentam, ainda mais, os já elevados índices de morbidade e mortalidade (MALIK; LEE; HARIKRISHNAN, 2018).

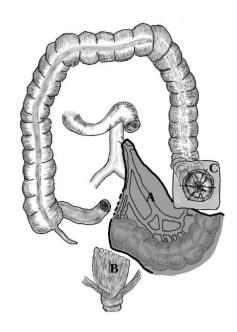
Outro aspecto que merece ser considerado é o fato de que boa parte dos doentes são submetidos as operações de derivação do trânsito intestinal com propósito temporário possibilitando, posteriormente, o restabelecimento da continuidade intestinal num momento mais propício (SHERMAN; WEXNER, 2017). Contudo, apesar do caráter temporário, nem sempre o restabelecimento da continuidade de trânsito intestinal é possível de ser realizado (BAASTRUP et al., 2019). A impossibilidade de se reconstruir o trânsito intestinal em um doente portador de um estoma temporário é relacionada a diferentes motivos. Inicialmente, a maioria dos cirurgiões sabe que reversão de um estoma não é um procedimento fácil de ser executado e isento de riscos independente da via de acesso proposta para reconstruí-lo (cirurgia convencional, laparoscópica ou robótica) (ONDER et al., 2016; GIULIANI et al., 2020; PANACCIO et al., 2021). Essas dificuldades estão associadas aos maiores índices de desfechos negativos, principalmente representadas pelo íleo pós-operatório prolongado, obstrução intestinal, estenoses, infecção do sítio cirúrgico e, sobretudo pelas temidas fístulas e deiscências das anastomoses (SHERMAN; WEXNER, 2017). Estudo multicêntrico que incluiu 6.859 doentes mostrou que a incidência percentual acumulada de reversão dos estomas construídos com intensão temporária em um e três anos foi de 70,3% e 74,3%, respectivamente (JORGENSEN et al., 2020). Esses resultados mostram que em um quarto dos doentes submetidos à estomas temporários o restabelecimento do trânsito intestinal não pode ser restabelecido, condenando esses doentes a permanecerem com o estoma e com um segmento de intestino distal desprovido do trânsito fecal pelo resto de suas vidas (JORGENSEN et al., 2020).

A convivência com um estoma definitivo e com um segmento retal excluso de trânsito, causa grande impacto emocional nos doentes, provocando mudanças na estética corporal, no estilo de vida, no aspecto físico, emocional e psicossocial da pessoa e disfunções evacuatórias. (COELHO; SANTOS; DAL POGGETTO, 2013). O procedimento impõe uma sofrida mutilação da estética corporal, causando impacto negativo na autoimagem e autoestima desses doentes

(KIMURA et al., 2013). O processo inflamatório que se desenvolve no segmento cólico desprovido de trânsito fecal causa urgência evacuatória, tenesmo, puxo e hematoquezia constante impactando ainda mais a qualidade de vida desses doentes. Assim, esses indivíduos não passam apenas por uma transformação física e funcional, mas, também, emocional, tornando-os depressivos e isolados do convívio familiar e social. Esses doentes precisam de conquistar uma enorme resiliência para que possam enfrentar à difícil realidade de suas vidas (CAMPOS et al., 2017).

### 1.2 A cirurgia de Hartmann

As operações de derivação do trânsito fecal podem ser realizadas com o emprego de diferentes técnicas cirúrgicas. Com mais frequência, as colostomias e ileostomias em alça, terminais, e em dupla boca (cano de espingarda) são as mais utilizadas. Entretanto, nas cirurgias realizadas sobre o cólon distal e reto uma das técnicas mais utilizadas para a derivação do trânsito intestinal é a cirurgia de Hartmann (CH). O procedimento inicialmente inicia-se pela ressecção de um segmento do sigmoide e reto. A seguir o segmento caudal do reto é fechado (sepultado) utilizando-se sutura manual ou mecânica, tornando este segmento excluso de trânsito fecal. A seguir, realiza-se a confecção de uma colostomia proximal terminal com o segmento cólico cranial remanescente por onde o trânsito fecal será exteriorizado para o meio externo e coletado por uma bolsa apropriada (Figura 2). O procedimento foi idealizado e executado, pela primeira vez, pelo cirurgião francês Henri Albert Hartmann (Figura 3) em 1921, sendo proposto como uma nova estratégia com o objetivo de reduzir os altos índices de deiscência e mortalidade que ocorriam quando se realizava a ressecção do intestino grosso, com anastomose primária para o tratamento de tumores obstrutivos localizados no cólon sigmoide e reto (HARTMANN, 1921). Com o tempo, as indicações da CH se expandiram para incluir uma gama de doenças que evoluíam com obstrução ou perfuração do cólon esquerdo, incluindo a diverticulite aguda do sigmoide complicada, isquemia, volvo, os traumatismos dos segmentos distais do cólon e reto e as graves infecções e gangrenas perineais. Apesar da CH ser uma alternativa técnica que causa grande polêmica na literatura, até a presente data, a operação é um dos procedimentos mais realizados pelo cirurgião, sendo recomendada, ainda em nossos dias, por diferentes diretrizes internacionais como uma alternativa segura para tratamento dessas enfermidades (PISANO et al., 2018; HALL et al., 2020).



**FIGURA 2** - Cirurgia de Hartmann, A: segmento do cólon sigmoide ressecado. B: Coto do reto fechado e excluído do trânsito intestinal. C: Colostomia proximal terminal. Figura disponível em: <a href="https://en.wikipedia.org/wiki/Hartmann%27s\_operation">https://en.wikipedia.org/wiki/Hartmann%27s\_operation</a>

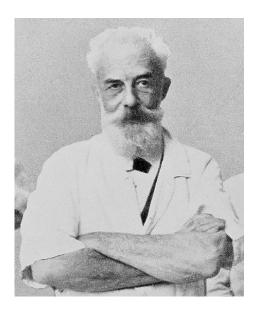


FIGURA 3 - Henri Albert Hartmann (1860-1952).

Figura disponível em: <a href="https://www.wikiwand.com/en/Henri">https://www.wikiwand.com/en/Henri</a> Albert Hartmann

De forma ideal, quando CH é utilizada com intuito temporário, a restauração da continuidade do trânsito intestinal, o mais breve possível, é desejo do doente e do cirurgião. O restabelecimento precoce do trânsito intestinal, restabelece o fluxo fecal ao segmento excluso, dificultando o surgimento de processo inflamatório crônico nesses segmentos, conhecido como retite de exclusão (RE), retite de desuso ou retite de derivação. No entanto, a operação necessária para restabelecer a continuidade do trânsito intestinal após a CH nem sempre é possível de ser realizada com brevidade (SHERMAN, WEXNER, 2017). A presença de comorbidades associadas, idade avançada, obesidade, presença se sinos, fístulas e estenoses das anastomoses, assim como a própria recusa do doente em realizar uma nova cirurgia, são dificuldades que podem impedir o restabelecimento da continuidade definitiva do trânsito intestinal (ZEMAN et al., 2020). Questões sociais, como a dificuldade de agendamento desses procedimentos, pela constante sobrecarga nos sistemas de saúde, dificuldade de acesso aos serviços especializados pelos menos favorecidos, são outras variáveis também relacionadas a manutenção definitiva de um estoma temporário.

O próprio procedimento cirúrgico necessário para restauração do trânsito intestinal nos doentes submetidos a CH é considerado uma intervenção complexa e associada a taxas de complicação e mortalidade de 58% e 3,6%, respectivamente (HABR-GAMA et al., 1997; AYDIN et al., 2005; BANERJEE et al., 2005). A reversão da CH representa um grande desafio técnico para o cirurgião, sendo considerado um procedimento de alta complexidade e uma das intervenções mais difíceis de ser realizada pelo cirurgião colorretal (HABR-GAMA et al. 1997; HOLMGREN et al., 2017). Entre todas as complicações relacionadas a reconstrução do trânsito intestinal após a CH, a deiscência da anastomose com o consequente desenvolvimento de fístulas complexas e sepses pélvica é a complicação mais temida. Estima-se que as fístulas anastomóticas após a tentativas de reconstrução de trânsito fecal após a CH possam surgir entre 5% e 8% dos doentes, com taxas de mortalidade de 8,3% (NAGELL; PEDERSEN; GYRTRUP, 2005; KARTAL et al., 2019). Nas fistulas graves, que evoluem com peritonite fecal ou formação de abscessos pélvicos complexos, a necessidade de reoperação se impõe e, quando isso acontece, uma nova derivação intestinal é necessária para salvar a vida desses doentes. Estudo mostrou que de 51 pacientes (32,9%) de um total de 155 não puderam ter seu estoma revertido após uma mediana de 53 (variação de 7-104) meses de acompanhamento (VAN OMMEREN-OLIJVE et al., 2020). Como consequência, a maioria desses doentes, originariamente submetidos

a uma derivação intestinal temporária são condenados a conviver pelo resto de suas vidas, com um estoma definitivo e um segmento retal desprovido de trânsito fecal.

A manutenção de um coto de cólon ou reto excluso do trânsito fecal não é uma condição isenta de problemas (GLOTZER et al., 1981). Com passar do tempo de exclusão demonstrou-se que nesses segmentos desenvolve-se um processo inflamatório crônico semelhante ao encontrado nas DII. Essa possibilidade foi descrita há mais de quatro décadas sendo conhecida como retite de exclusão (RE) (SLOAN et al. 2013). Com o progredir do tempo de exclusão o processo inflamatório se agrava e, a maioria dos doentes que inicialmente evoluía de forma pouco sintomática passam a queixar-se de dor abdominal pélvica, tenesmo e graus variados de eliminação de sangue (hematoquezia) e muco pelo ânus. Nos doentes onde o processo inflamatório é mais intenso pode surgir hemorragia retal de maior porte, febre, calafrios e formação de úlceras mucosas e fístulas perianais, praticamente indistinguíveis daquelas encontradas nas DII. Existem relatos na literatura sugerindo que a manutenção desse processo inflamatório crônico no reto excluso possa, até mesmo, tornar-se um gatilho para o surgimento de quadros graves de DII, particularmente a colite ulcerativa, inclusive com manifestações extra intestinais (LIM et al., 1999; KAKIZAWA et al., 2018; ZHU; JIANG; JIANG, 2019).

Quando se consideram as limitações físicas, sociais e emocionais já impostas pela vida com um estoma, o desenvolvimento da RE, torna-se mais um percalço na vida desses doentes (SON et al., 2013). Assim, o desenvolvimento de estratégias clínicas que possibilitem o controle clínico da RE, devem ser estudadas com o objetivo de melhorar a qualidade de vida desses pacientes.

#### 1.3 A retite de exclusão (RE)

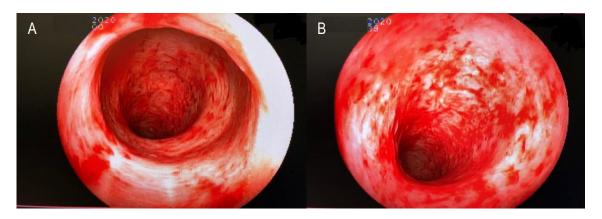
Morson e Dawson, em 1974, foram os primeiros autores a chamar a atenção, para a possibilidade do desenvolvimento de um processo inflamatório crônico não-específico, na mucosa de segmentos do cólon ou reto desprovidos do trânsito intestinal (SLOAN et al., 2013). Essa descrição inicial ficou esquecida por quase uma década quando Glotzer et.al., em 1981, publicaram o relato de uma série de 10 doentes, sem antecedentes de DII que, após terem sido submetidos a operações de desvio do trânsito fecal por diferentes situações clínicas, desenvolviam um processo inflamatório na mucosa exclusa de trânsito fecal, semelhante ao encontrado nos doentes com quadros moderados de colite ulcerativa (GLOTZER et al., 1981). Os autores mostraram que a inflamação persistiu em cinco pacientes onde não puderam restaurar

a continuidade do trânsito intestinal, mas, reverteu-se, completamente, nos cinco pacientes onde o trânsito intestinal pôde ser restabelecido (GLOTZER et al., 1981). Concluíram que, a evolução clínica desses pacientes em conjunto com as características histológicas inespecíficas do processo inflamatório, sugeria que a inflamação podia ser ocasionada pela derivação do trânsito fecal e não, por uma forma de colite específica ou idiopática previamente não diagnosticada (GLOTZER et al., 1981). Denominaram essa nova enfermidade de colite relacionada a derivação intestinal. Naquela mesma década, a partir desta publicação inicial, outros casos da doença foram publicados com diferentes sinonímias: colite de exclusão, colite de derivação, colite de desuso (BOSSHARDT; ABEL, 1984; KORELITZ, et al., 1985). Quando acomete, exclusivamente o reto excluso de trânsito fecal, como ocorre após a CH a doente ficou conhecida como retite de exclusão (RE) (WINSLET et al., 1993).

A RE é identificada em mais 90% dos doentes que realizam exame endoscópico no reto excluso de trânsito, após a confecção do estoma. Geralmente cursa com intensidade leve ou moderada em 85% dos casos e grave em 15% dos doentes (HAAS; FOX; SZILAGY, 1990; WHELAN et al., 1994). É provável que no Brasil, o desenvolvimento da RE seja ainda maior, quando se demonstrou que o trânsito intestinal só é restaurado em 57% dos doentes submetidos a CH e a maioria deles não é submetido a endoscopia antes da reconstrução (HABR-GAMA et al., 1997). Cabe frisar ainda que, nos doentes onde o trânsito intestinal é restaurado, o tempo médio para a realização do procedimento varia entre seis a oito meses, podendo chegar até 60 meses, tempo mais do que suficiente para instalação da RE (HABR-GAMA et al., 1997; CURI et al., 2002). Outro aspecto importante a impactar negativamente o diagnóstico endoscópico da RE é a dificuldade de acesso aos sistemas públicos de saúde para confirmação diagnóstica (GUIMARÃES et al., 2020).

A sintomatologia nos portadores de RE tem um espectro variado e está relacionada à extensão do reto excluso de trânsito e ao tempo decorrido desde a derivação intestinal (GLOTZER et al., 1981). No início, quando o processo inflamatório mucoso é menor, a doença pode evoluir de forma assintomática (LU et al., 1995). Nos pacientes sintomáticos, as queixas mais comuns são: dor abdominal, sensação constante da necessidade de evacuar (tenesmo), eliminação de sangue e muco pelo segmento excluso e, nos casos graves, a formação de fissuras e fístulas perianais de difícil distinção da que ocorrem nos doentes com DII (ONA; BOGER, 1985; HABR-GAMA et al., 1997; KAKIZAWA et al., 2018).

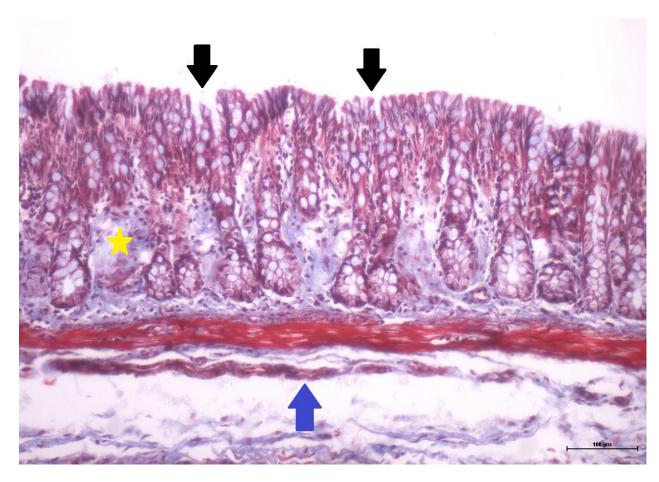
O diagnóstico da RE na maioria dos casos é feito pela colonoscopia seguida de estudo histopatológico da mucosa do reto sem trânsito fecal. O exame está alterado em 100% dos pacientes derivados por mais de 36 meses (LECHNER et al., 1990; MARTINEZ et al., 2010b). A mucosa do reto excluso de trânsito fecal mostra-se hiperemiada, congesta, edemaciada, friável, com apagamento dos vasos sanguíneos submucosos e sangramento espontâneo ao mínimo toque do colonoscópio à mucosa retal (Figura 4A) (LECHNER et al., 1990). Nos doentes que evoluem com os casos graves da doença, é possível encontrar-se úlceras mucosas semelhantes às encontradas nas DII, o que dificulta diagnóstico diferencial (Figura 4B).



**FIGURA 4 - A-** Visão endoscópica do reto excluso de trânsito intestinal em doente com forma moderada da proctite de desuso em doente submetido a CH. **B-** Visão endoscópica do reto excluso de trânsito fecal em doente com a forma grave da proctite de desuso após a CH.

Acervo do serviço de coloproctologia do Hospital Universitário São Francisco

A exclusão do trânsito fecal é acompanhada de uma série de alterações ao exame histopatológico (KISSMEYER-NIELSEN, CHRISTENSEN, LAURBERG, 1994; SOUSA et al., 2009). Estudos mostraram que existe redução da altura das glândulas cólicas, com importante atrofia da mucosa cólica, depleção da população de células caliciformes (SOUZA et al, 2008; MELLO et al., 2012). A superfície epitelial é anfractuosa (semelhante a uma borda em escova) com segmentos onde identifica-se perda epitelial e, formação de úlceras com profundidade variada. Ocorre ainda, depleção da população das células caliciformes com grande quantidade de muco no lúmen das criptas cólicas e na superfície epitelial (MELLO et al., 2012). A camada submucosa apresenta-se espessada, com edema, e congestão vascular (Figura 5) (GERAGHTY; TALBOT, 1991; BIONDO-SIMÕES et al., 2000; SOUZA et al., 2008).



**FIGURA 5 -** Fotomicrografia da parede do reto excluso de trânsito intestinal em doente com retite de exclusão. É possível observar a anfractuosidade da superfície epitelial (borda em escova, seta preta), depressão no número de células caliciformes nas glândulas cólicas, processo inflamatório na base das criptas cólicas (asterisco) e congestão e edema da camada submucosa (seta peta) (TM-200x).

Acervo Pessoal - Professor Carlos Augusto Real Martinez

Nos doentes que evoluem com RE mais prolongada pode haver a formação de áreas focais de displasias, geralmente de baixo grau. Na lâmina basal identifica-se graus variados de infiltrado inflamatório composto, principalmente por linfócitos, macrófagos, plasmócitos e eosinófilos, (ROEDIGER; NANCE, 1986; MA; GOTTLIEB; HAAS, 1990; GERAGHTY; TALBOT, 1991). Nos casos graves pode haver a formação de abscessos na base das criptas e áreas de hiperplasia linfóide nodular, alteração histológica característica da doença (MURRAY et al., 1987; KOMOROWSKI, 1990; YEONG et al., 1991; SOUZA et al., 2008). Nas áreas com hiperplasia linfoide nodular existe predominância dos linfócitos B, em relação aos do tipo T. O que sugere que a resposta inflamatória nos doentes com RE seja mais do tipo humoral do que celular,

provavelmente devido a menor população bacteriana (CHETTY; HAFEZI; MONTGOMERY, 2009).

A patogenia da RE ainda não é totalmente compreendida. Várias hipóteses foram aventadas para explicar os mecanismos relacionados ao desenvolvimento da doença (MARTINEZ et al., 2010). Já se propôs que a enfermidade pudesse ter origem isquêmica ocasionada pela derivação fecal ou devido mudanças na quantidade e características da flora bacteriana do cólon excluso, onde existe redução da população bacteriana anaeróbica e predomínio de bactérias redutoras de nitrato (NEUT et al.,1989; NEUT et al., 1995; VILLANACCI et al., 2007). Entretanto, a maioria dos estudos, sugere que o desenvolvimento do processo inflamatório mucoso em portadores da RE decorra da falta do suprimento regular de AGCC imposta pela derivação do trânsito fecal (ROEDIGER; RAE, 1982; ROEDIGER, 1990; GIARDIELLO et al., 1995; MORTENSEN; CLAUSEN, 1996; CHRISTL et al., 1996; SCHEPPACH et al.,1997; COOK; SELIN, 1998; KIELY et al.,2001; OLIVEIRA-NETO; AGUILAR-NASCIMENTO, 2004, MARTINEZ et al., 2010; KABIR et al., 2014).

Os AGCC são produzidos a partir da fermentação de fibras dietéticas não digeridas ao passarem pelo intestino delgado. Os AGCC são substâncias altamente voláteis e, depois de produzidos, são rapidamente absorvidos pelas células do epitélio do cólon para sofrerem βoxidação, com o intuito de fornecer energia para as diferentes etapas do ciclo celular dos colonócitos (VELAZQUEZ; LEDERER; ROMBEAU, 1997). Os principais AGCC produzidos a partir da fermentação das fibras dietéticas não-digeridas são os ácidos acético, propiônico e butírico. O butírico, apesar de não ser o mais abundante, representa o subtipo mais utilizado pelos colonócitos como substrato energético, respondendo por 70% a 80% de todo contingente utilizado pelas células epiteliais do cólon para produção de energia (ROEDIGER, 1982). Mostrouse que o ácido butírico inibe a oxidação dos ácidos acético e do propiônico, sugerindo que as células da mucosa cólica o utilizem, preferencialmente, como principal substrato de energia, mesmo quando os demais subtipos estão disponíveis (JORGENSEN; CLAUSEN; MORTENSEN, 1997). Demonstrou-se que as células da mucosa cólica aumentam seu metabolismo energético quando o ácido butírico é suplementado na dieta, sugerindo que seja o substrato metabolizado em maior quantidade (ROEDIGER; TRUELOVE, 1979). Quando é o único AGCC disponível, o ácido butírico aumenta o consumo de oxigênio em mais de 80%, mostrando sua importância como substrato energético (ROEDIGER, 1982). Em ordem cronológica, após o ácido butírico as células epiteliais cólicas metabolizam como substrato energético os ácidos propiônico e acético,

respectivamente. Outras substâncias como glicose, cetonas, proteínas e aminoácidos, particularmente a glutamina, também podem ser metabolizados como fonte de energia secundária pelas células epiteliais cólicas (ROEDIGER, RAE, 1982). Todavia, é importante destacar que as células epiteliais não conseguem suprir toda a sua necessidade energética para síntese proteica utilizando com substrato apenas essas substâncias alternativas (MARTINEZ, et al., 2010b).

Estudos mostraram que quando existe deficiência de AGCC às células epiteliais cólicas, ocorre importante modificação nos mecanismos de β-oxidação para produção da energia necessária para prover as diferentes funções vitais das células (PRAVDA, 2005; HAMER et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010). Quando existe privação no fornecimento de AGCC, como acontece nas operações de desvio do trânsito intestinal, as células epiteliais cólicas passam a produzir grande quantidade de radicais livres de oxigênio (RLO) por alterações na cadeia respiratória mitocondrial para obtenção de energia (PRAVDA, 2005). Essa produção aumentada, aliada as deficiências dos sistemas antioxidantes na mucosa cólica, leva a uma condição de estresse oxidativo (LIH-BRODY, et al., 1996). O estresse oxidativo é um dos mecanismos iniciais relacionados a quebra da barreira funcional do epitélio cólico (PRAVDA, 2005, MARTINEZ et al., 2010b). A quebra dessa barreira epitelial possibilita a invasão de antígenos e bactérias presentes no lúmen intestinal para o interior da camada submucosa estéril, com a consequente instalação do processo inflamatório que caracteriza a RE (MARTINEZ et al., 2020). A infiltração bacteriana induz ao maior recrutamento de células de defesa para mucosa cólica o que aumenta, ainda mais, a produção de RLO com maior dano os sistemas de defesa barreira mucosa cólica (MILLAR et al., 1996; LIU et al., 2001; PRAVDA, 2005; NAITO; TAKAGI; YOSHIKAWA, 2007). A possibilidade de que RLO sejam os responsáveis pelos mecanismos iniciais que determinam a lesão da barreira mucosa, ficou conhecida como teoria de indução da colite por radicais livres, uma das mais recentes proposições para explicar os mecanismos moleculares iniciais que desencadeiam a colite ulcerativa (PRAVDA, 2005). Estudos experimentais mostraram que essa mesma proposta eitiopatogênica pode estar relacionada a patogenia da RE (NONOSE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010; FERNANDEZ et al., 2017; BUANAIM et al., 2019; DELBEN et al., 2021).

A importância do suprimento regular de AGCC para evitar o surgimento da RE, é mais bem avaliada pela intensa redução do processo inflamatório quando soluções ricas em AGCC, particularmente o ácido butírico, são aplicadas por clisteres nos segmentos desprovidos de trânsito fecal em modelos experimentais ou em portadores de RE (HARIG et al., 1989; GUILLEMOT et al., 1991; BUTZNER et al., 1996; KIELY et al., 2001; NASSRI et al., 2008). Todos esses achados sugerem que a deficiência no suprimento da AGCC ocasionada pela derivação intestinal, modificando o metabolismo oxidativo dos colonócitos, aumentando a produção de RLO geram determinandoum estado de estresse oxidativo responsável pela dano agressão a barreira epitelial.

### 1.4 A síntese proteica no cólon excluso

O epitélio do intestino grosso separa o interior do lúmen intestinal, que concentra grande população bacteriana, do meio interno estéril, sendo uma das mais perfeitas barreiras funcionais do ser vivo (PEREIRA et al., 2013; CHAIM et al., 2014; BONASSA et al., 2015). Essa barreira epitelial é formada por uma série de estruturas celulares que conferem proteção mecânica e por células de defesa do sistema imune que constituem uma barreira imunológica. Esses dois sistemas atuando em conjunto, são responsáveis pela separação entre os meios interno e externo do corpo humano impedindo que agentes bacterianos e outras toxinas presentes no lúmen intestinal migrem para o meio interno (COSKUN, 2014). Hoje em dia admite-se que o processo inflamatório que ocorre na parede intestinal em portadores de DII surge a partir da quebra desse sistema de defesa epitelial (KRUIDENIER, VERSPAGET, 2002).

A barreira de proteção mecânica é formada por diversas linhas de defesa, principalmente representadas pela camada de muco que recobre o epitélio cólico, membranas citoplasmáticas das células epiteliais da mucosa cólica, o complexo sistema de junções intercelulares formados pelas junções de oclusão, adesão e comunicação, hemidesmossomos e, finalmente, pela membrana basal (MARTINEZ, 2010; MARTINEZ et al., 2010b). Por outro lado, a proteção funcional é conferida por células do sistema imune representadas por neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e macrófagos, bem como, por citocinas anti-inflamatórias e imunoglobulinas abundantes na parede cólica. Esse exuberante sistema imunológico de defesa faz com que o cólon seja considerado o maior órgão linfoide do ser humano (TORRES et al., 2009).

Já se encontra bem estabelecido RE é uma síndrome de deficiência energética relacionada a falta do suprimento dos AGCC (AGARWAL; SCHIMMEL, 1989; HARTY, 2013). Assim, a deficiência do suprimento dos AGCC leva a inflamação da mucosa desencadeada pelo maior estresse oxidativo tecidual. Estudos mostraram que a produção aumentada de RLO pode danificar as diversas defesas que formam a barreira epitelial da mucosa do cólon. Demonstrou-

se experimentalmente que os RLO alteram o conteúdo e os subtipos das mucinas que formam a camada de muco que recobre o epitélio cólico (NONOSE et al. 2009; MARTINEZ et al., 2010a; FERNANDEZ et al., 2017). Também se demonstrou que a produção aumentada de RLO no epitélio do reto excluso de trânsito fecal reduz o conteúdo tecidual das proteínas E-caderina, βcatenina, claudina-3 e ocludina, principais componentes das junções de adesão e oclusão intercelulares, respectivamente e que fazem parte de outro importante sistema de defesa epitelial (MARTINEZ, et al., 2012; KADRI et al., 2013; MARTINEZ et al., 2015). Mais recentemente, demonstrou-se que os maiores níveis de estresse oxidativo, também diminui o conteúdo total de colágeno presente na matriz extracelular do reto excluso de trânsito e que essa redução, está relacionada a maior produção tecidual de metaloproteínas, principal enzima envolvida na degradação de colágeno na parede intestinal (ALVES JÚNIOR et al., 2021). Cabe lembrar que a membrana basal é um dos constituintes mais importantes do sistema de defesa da mucosa cólica (ALVES JÚNIOR et al., 2021). Os maiores níveis de estresse oxidativo também pode ocasionar dano do DNA dos colonócitos em segmentos desprovidos de trânsito que desenvolvem a RE. A maior possibilidade do desenvolvimento de mutações, talvez possa ser um dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de displasias teciduais na mucosa exclusa e inflamada e, até mesmo, o câncer (GRIFFITHS; DIXON, 1992; MARTINEZ et al., 2010c).

A importância do processo inflamatório tecidual decorrente do estresse oxidativo na quebra dos sistemas de defesa do epitélio cólico fica mais evidente quando se consideram os resultados de estudos experimentais mostrando que a aplicação de agentes anti-inflamatórios, antioxidantes ou soluções nutricionais ricas em AGCC na mucosa do reto excluso, além de reduzir os níveis de estresse oxidativo tecidual e diminuir o processo inflamatório mucoso, restabelece o conteúdo das principais proteínas constituintes das diferentes linhas de defesa da barreira epitelial cólica (NASSRI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; CUNHA et al., 2011; LAMEIRO et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012; MARTINEZ et al., 2013; PEREIRA et al., 2013; CHAIM et al., 2014; BONASSA et al., 2015; MARTINEZ et al., 2015; ALVES JÚNIOR et al., 2017; FERNANDEZ et al., 2017; KADRI et al., 2017; MARTINEZ et al., 2017a; MARTINEZ et al., 2017b; BUANAIM et al., 2019; MARTINEZ et al., 2019).

Quando se considera que o estresse oxidativo danifica as diferentes proteínas constituintes da barreira epitelial cólica, e que os AGCC são o mais importante substrato para síntese dessas proteínas, é lícito supor que a redução no fornecimento dos AGCC no reto excluso de trânsito, também diminua a síntese dessas proteínas. Dessa forma, ter-se-ia dois mecanismos

responsáveis pela redução das proteínas da barreira mucosa: o estresse oxidativo destruindo esses mecanismos e a deficiência de AGCC reduzindo a síntese proteica. Quando se considera que o colágeno é a principal proteína responsável pela cicatrização nas anastomoses colorretais, é possível que sua destruição pelos RLO e sua menor síntese pela deficiência nutricional, possa interferir e dificultar o processo de cicatrização de anastomoses confeccionadas em segmentos retais desprovidos de trânsito fecal. Talvez, esse mecanismo possa ser uma das explicações plausíveis para a maior ocorrência de deiscências e fístulas nas anastomoses realizadas nos doentes previamente submetidos a CH que desenvolvem RE. Entretanto, essa possibilidade ainda foi pouco estudada.

### 1.5 Colágeno

Diferentes mecanismos de adesão encontram-se evolvidos não apenas na fixação entre as células epiteliais, como também na fixação dessas células com a matriz extracelular. A camada de células que forma o epitélio do intestino grosso e reto, estão intimamente aderidas em sua base a uma matriz extracelular, principalmente composta por colágeno, fibras, proteinoglicanos e de várias proteínas com propriedades adesivas existentes no local. A matriz extracelular apresenta múltiplas propriedades como organizar a disposição das diferentes células que compõe as glândulas cólicas como participar, ativamente, do sistema de barreira seletiva epitelial (LODISH et al., 2002). Várias proteínas, conhecidas como moléculas de adesão celular comunicam o citoesqueleto das células epiteliais à matriz extracelular. As principais proteínas formadoras desses mecanismos são as integrinas, selectinas e os proteinoglicanos. Em situações em que existe a necessidade de mobilidade dessas células enzimas das classes das proteases, como o particularmente o fibrinogênio e as metaloproteínas, podem degradar os componentes da matriz extracelular, possibilitando a migração celular.

Estima-se que existam mais de 28 tipos diferentes de colágeno nos seres humanos, numerados, segundo o tipo, em algarismos romanos, desde a descrição inicial do colágeno do tipo II em 1969 (MILLER; MATUKAS, 1969). O colágeno representa a principal proteína fibrosa e indissolúvel constituinte da matriz extracelular dos tecidos conjuntivos (LODISH et al., 2002). O colágeno é a principal proteína responsável pelo processo de cicatrização dos tecidos humanos correspondendo a aproximadamente 25% da proteína corporal total (BRASKEN, 1991). Estimase que entre 80 e 90% de todo o colágeno corporal são representados pelos tipos I, II e III (LODISH et al., 2002). No passado acreditava-se que os colágenos eram proteínas produzidas exclusivamente a partir dos fibroblastos presentes nos tecidos conjuntivos da matriz extracelular,

todavia, mais recentemente, mostrou-se que diferentes células epiteliais tem a propriedade de produzir tipos específicos de colágeno.

Existem indícios fisiológicos, no que se refere ao processo cicatricial, que diferenciam os tecidos gastrointestinais dos demais. As fibras musculares lisas da parede intestinal produzem colágeno, sendo que seus mecanismos regulatórios são diferentes daqueles da pele (TRUBIAN, 2004; SAVASSI-ROCHA; LOPES, 1994). As camadas mucosa e particularmente a submucosa responde por boa parte da produção de colágeno na parede cólica. A produção de colágeno nos tecidos lesados, como acontece durante a realização de uma anastomose colorretal, está relacionada a diferentes vários aspectos. A falta no suprimento de AGCC ou glutamina, principais substratos energéticos para a síntese de diferentes proteínas produzidas pelas células do epitélio cólico reduzem sua produção. Essa evidência foi demonstrada por estudos mostrando que o fornecimento dessas substâncias aumenta a produção de colágeno tecidual e favorece o processo de cicatrização, particularmente quando o AGCC é aplicado por enemas (BLOEMEN et al., 2010; PACHECO et al., 2012; BOSMANS et al., 2017; AKBULUT et al., 2019). Outro aspecto que merece destaque é que em segmentos desprovidos de trânsito fecal, a RE consequente à falta do suprimento de AGCC aliada a modificação da flora bacteriana produtora dos ácidos acético, butírico e propiônico, desencadeia o processo inflamatório que caracteriza a RE. O aumento do infiltrado inflamatório aumenta a produção de enzimas que degradam o já pequeno conteúdo de colágeno produzido pela deficiência nutricional, tornando o cólon excluso carente da produção da proteína.

A síntese do colágeno está diretamente ligada ao agravamento do processo inflamatório. A proteína é uma molécula vital em qualquer situação de reparo, sendo um dos fatores que mais contribuem na cicatrização e na preservação da resistência das anastomoses colorretais. Quando existem modificações nos componentes da matriz extracelular, particularmente do conteúdo de colágeno tecidual, pode haver um importante mecanismo etiopatogenia das deiscências de anastomoses confeccionadas entre o cólon normal e o reto excluso (SAKALLIOGLU et al., 1994). O maior conteúdo de colágeno na parede do intestino grosso está localizado principalmente na camada submucosa. Para que se mantenha a resistência mecânica da parede intestinal é necessário que ocorra um equilíbrio no processo de produção por um fornecimento energético adequado e diminuição da sua proteólise pela redução da inflamação local.

Poucos estudos avaliaram o conteúdo e o padrão de expressão dos subtipos de colágeno em segmentos do cólon ou reto desprovidos de trânsito fecal (ROLANDELLI et al., 1986;

BIONDO-SIMÕES et al., 2000; GRECA et al., 2000). Esses estudos analisaram, principalmente os colágenos dos subtipos tipo I e III, com o objetivo de avaliar, não apenas o conteúdo propriamente dito, mas a qualidade da proteína presente parede intestinal que também poderia correlacionar-se aos índices mais elevados de deiscência. No entanto, esses estudos utilizaram métodos histoquímicos para detectar os subtipos de colágeno maduro (tipo I) e imaturo (tipo III), sem, contudo, avaliar a interferência do controle da inflamação no conteúdo tecidual dos dois subtipos estudados (ROLANDELLI et al., 1986; BIONDO-SIMÕES et al., 2000; GRECA et al., 2000).

### 1.6 Produção e degradação do colágeno no cólon desprovido de trânsito intestinal

Poucos estudos experimentais, avaliaram o conteúdo de colágeno nos segmentos desprovidos de trânsito fecal (ROLANDELLI et al., 1986; BIONDO-SIMÕES et al., 2000; GRECA et al., 2000). Rolandelli e colaboradores estudando a anastomose de ratos submetidos a aplicação de clisteres com solução salina ou AGCC, constataram que a ocorrência de deiscência espontânea da anastomose foi significativamente menor nos animais que receberam clisteres com AGCC em comparação aos que receberam solução salina. Verificaram que a ruptura da linha de sutura foi significativamente menor nos animais que receberam AGCC. A pressão de ruptura e a tensão sobre a linha de sutura foram significativamente maiores para o grupo tratado com AGCC. Os autores concluíram que aplicação de clisteres com AGCC resultou em anastomoses significativamente mais resistentes.

Terzi e colaboradores, avaliaram os efeitos da aplicação de clisteres com AGCC no colón de ratos com retite actínica. Constataram que os parâmetros histológicos relacionados a cicatrização da anastomose, como regeneração epitelial e formação de tecido de granulação, foram significativamente melhores nos animais que receberam irrigação retal pré-operatória com AGCC. Verificaram ainda, que a quantidade de colágeno total aumentou significativamente no nos animais tratados com a aplicação prévia de AGCC. Concluíram que a retite actínica pode afetar a cicatrização de anastomoses, mas a irrigação retal com AGCC é capaz de melhorar a cicatrização da anastomose. (TERZI et al., 2004).

Pacheco e colaboradores avaliaram os efeitos da aplicação de enemas contendo glutamina e AGCC em ratos submetidos a CH. Constataram que o tratamento com glutamina ou AGCC (ácido butírico) nos segmentos exclusos de trânsito, melhorou o processo inflamatório mucoso, restaurou a densidade das fibras de colágeno nos tecidos e reduziu a taxa de apoptose

células para a valores semelhantes ao cólon com trânsito preservado. Constataram ainda que houve redução significativa dos níveis de citocinas no cólon excluso após o tratamento com butirato ou glutamina (PACHECO et al., 2012)

Biondo-Simões e colaboradores, utilizando modelo de RE mostraram que existem modificações no conteúdo e no tipo de colágeno identificado nos segmentos sem trânsito intestinal (BIONDO-SIMÕES et al., 2000). Os autores constataram que a exclusão do trânsito intestinal, por até oito semanas, ocasionava atrofia do cólon com diminuição da espessura da parede intestinal e modificação no conteúdo de colágeno tecidual. Verificaram que havia redução no conteúdo de colágeno maduro e aumento no conteúdo de colágeno imaturo (BIONDO-SIMÕES et al., 2000). Quando se sabe que o colágeno imaturo apresenta fibras irregulares e menor resistência, é possível que essas modificações possam ser uma explicação plausível para a maior ocorrência de fístulas nas anastomoses realizadas nos segmentos sem trânsito fecal, como ocorre na CH. Essa possibilidade fica mais evidente ao demonstrar-se que o fornecimento de AGCC ao cólon excluso de trânsito intestinal aumentou a concentração de colágeno maduro nas anastomoses realizadas entre os segmentos com e sem colite induzida (GRECA et al., 2000; PACHECO et al., 2012).

Diferentes teorias foram propostas para explicar a maior incidência de fístulas nos doentes submetidos a reconstrução de trânsito após a CH. É importante lembrar que manutenção de um segmento retal desprovido do trânsito intestinal não é uma condição isenta de complicações. Demonstrou-se que os segmentos colorretais exclusos do trânsito intestinal, desenvolvem alterações tróficas nas diferentes camadas que formam a parede retal (KISSMEYER-NIELSEN; CHRISTENSEN; LAURBERG; 1994; SOUZA et al., 2008). Os segmentos colorretais desprovidos de trânsito intestinal tornam-se atrofiados e inflamados. Cabe lembrar que existe importante modificação da microbiota nesses segmentos com redução das bactérias responsáveis pela formação dos AGCC (BAEK et al., 2014). A derivação fecal e a presença de inflamação tecidual, interfere na síntese de colágeno tecidual, principal proteína envolvida nos mecanismos de cicatrização das anastomoses, com maior produção de colágeno imaturo (colágeno do tipo III) e menor de colágeno maduro (colágeno do tipo I) (GRECA et al., 2000).

#### 1.7 Infliximabe

O infliximabe foi aprovado em 1998 nos Estados Unidos para o tratamento de quadros graves e moderados de doença de Crohn (DC). Originalmente, é um anticorpo produzido por

camundongos, contudo, os domínios comuns da molécula do medicamento foram trocados por humanos, pois algumas proteínas presentes na molécula apresentam intensa atividade antigênica no ser humano, o que reduz as reações anafiláticas desencadeadas pela molécula original. Assim, trata-se de um anticorpo monoclonal quimérico IgG1, 75% humano e 25% murino, que se liga com alta afinidade ao fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), neutralizando sua atividade biológica. O TNF-α é uma citocina pró-inflamatória secretada por linfócitos T e macrófagos e age ativando e recrutando células do sistema imune, fibroblastos e células endoteliais, exercendo uma atividade pró-inflamatória. O TNF-α induz citocinas pró-inflamatórias como interleucinas (IL) 1 e 6, aumenta a migração de leucócitos pela maior permeabilidade da camada endotelial e expressão das moléculas de adesão por células endoteliais e leucócitos e causa ativação de neutrófilos e eosinófilos (TORRES et al., 2009; RUTGEERTS et al., 2005).

A terapia com infliximabe é eficaz na indução e manutenção da remissão clínica; fechamento de fístulas enterocutâneas, perianais e retovaginais; manutenção do tratamento em pacientes com DII, como a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa (RCU). Sua ação se dá pelo bloqueio da ação do TNF-α, transmembrânica ou solúvel, ao se ligar a citocina impedindo sua ligação com seu receptor. Além disso, age também na recuperação da barreira epitelial, indução de apoptose de linfócitos T e da motilidade dos fibroblastos intestinais, facilitando cicatrização de lesões (SUENAERT et al., 2002; DI SABATINO et al., 2007).

Atualmente, no tratamento de DC, utilizamos o chamado "top down" no qual iniciamos o tratamento com a terapia biológica (sendo o infliximabe um dos mais usados) desde o início do diagnóstico da doença, principalmente para formas moderadas e graves. Esse tratamento tem se mostrado altamente eficaz com melhora dos sintomas mais rápida e manutenção da doença mais eficaz. Em dois anos de acompanhamento, a taxa de remissão endoscópica da doença foi de aproximadamente 70% no grupo "top down" versus 20% no grupo que utilizava terapia convencional (D'HAENS et al., 2008; HOSSNE; COY, 2019).

Quando se considera que a redução o processo inflamatório nos segmentos de colón ou reto exclusos de trânsito fecal pode reduzir a degradação do colágeno tecidual, estratégias que possam diminuir a inflamação podem ser úteis na melhora do processo de cicatrização nesses segmentos. De todas as alternativas terapêuticas mais utilizadas para a redução do processo inflamatório mucoso em portadores de DII, a terapia biológica com infliximabe é a mais promissora. O tratamento desses doentes com infliximabe reduz a atividade inflamatória e está associado a maior cicatrização mucosa. Estudos recentes mostraram que a aplicação de infliximabe em modelos experimentais de RE mostraram melhora do processo inflamatório,

diminuição do infiltrado neutrofílico mucoso, com consequente redução da produção de metaloproteínas (BUANAIN et al., 2019; DELBEN et al., 2021; ALVES JÚNIOR et al. 2021). Esses resultados seriam uma evidência indireta que a redução da degradação de colágeno também poderia favorecer a cicatrização de anastomoses confeccionadas no reto excluso (ALVES JÚNIOR et al., 2021). Todavia, do melhor do nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou por método imuno-histoquímico o conteúdo dos colágenos dos tipos I e III e animais com RE tratados com infliximabe.

Caso a terapia biológica com infliximabe, utilizada antes da restauração do trânsito fecal em doentes submetidos a CH possa reduzir o processo inflamatório e aumentar a produção de colágeno e, consequentemente, o processo de cicatrização, ter-se-ia uma alternativa interessante para evitar a gravidade das complicações de anastomoses realizadas no reto excluso que desenvolve RE. Assim, esta é a justificativa de se propor o presente estudo.

#### 2. OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos da terapia biológica com infliximabe sobre o conteúdo de colágeno total e dos subtipos I e III na mucosa cólica desprovida de trânsito intestinal.

## 2.2 Objetivos Específicos:

- Verificar se a terapia com infliximabe melhora o processo inflamatório em segmentos cólicos desprovidos de trânsito intestinal analisando histologicamente as lâminas coradas pelas técnicas da hematoxilina-eosina;
- Mensurar o conteúdo tecidual de colágeno tipo I e III em segmentos cólicos desprovidos de trânsito fecal comparando animais tratados e não tratados com infliximabe utilizando os métodos tricômio de Masson e imunohistoquímica;
- Verificar se o emprego de diferentes doses de infliximabe modifica o conteúdo tecidual de colágeno tipo I e III em segmentos cólicos sem trânsito fecal e realizar análise estatística.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Ética

A realização deste estudo obedeceu à Lei Federal 6.638 e às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa da Universidade São Francisco e recebeu o parecer de número (Parecer CEUA/USF: 01.226.2014 - ANEXO 1).

## 3.2 Animal de experimentação

Foram utilizados 22 ratos Wistar (Rattus norvegicus albinus), machos, da linhagem Wistar, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas, com peso variando entre 250 e 300 g e média de idade de quatro meses.

# 3.3 Técnica cirúrgica

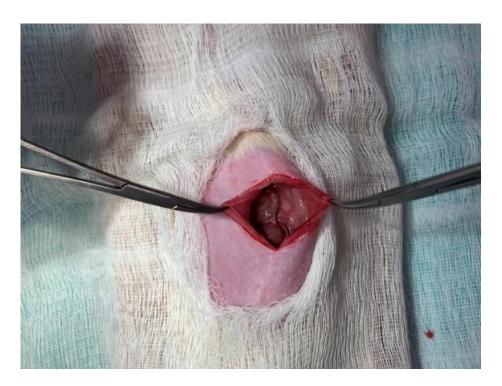
Nos sete dias antecedentes a operação, os animais foram confinados em gaiolas individuais recebendo ração específica para roedores e água a vontade. A partir do dia anterior a operação os animais foram mantidos em jejum, exceto água, por 12 horas.

No dia da intervenção cirúrgica os ratos foram anestesiados com o emprego de cloridrato de xilazina 2% (Anasedan™ Agribrands do Brasil Ltda. Brasil) + cloridrato de quetamina (Dopalen™ Agribrands do Brasil Ltda. Brasil) na dose de 0,1ml/100g, administradas por via intramuscular.

Foi realizada uma incisão longitudinal mediana, infra-umbilical com 4 cm de extensão (Figura 3). A abertura da cavidade abdominal, efetuada por planos, identificar-se-á a porção retossigmoideana do intestino grosso. Após a localização da placa de Peyer e mobilização o conteúdo fecal, realizou-se a secção da artéria marginal justa cólica e do cólon propriamente dito, 8 cm acima da extremidade proximal da placa (Figura 4 e Figura 5). Após secção do cólon, em todos os animais foi realizada remoção de segmento de intestino grosso com 2 cm de extensão, que servía como controle dos parâmetros estudados.

O segmento distal do intestino grosso secionado foi cateterizado com sonda de polivinil 10F fixada por meio de ligadura frouxa e irrigada com 40 ml de soro fisiológico 0,9%, para promover a remoção de resíduos fecais do segmento distal, até que o efluente fecal drenado pelo ânus do animal encontre-se claro (Figura 6). Esta etapa visava remover detritos fecais que por ventura tenham remanescido após a mobilização manual e que poderiam influenciar no

desenvolvimento da RE .Terminada a irrigação o segmento caudal fechado com sutura contínua de fio de nylon 5-0 (cirurgia de Hartmann) e fixado na goteira parieto-cólica para facilitar sua identificação quando da eutanásia dos animais (Figura 7). O cólon proximal (provido de trânsito fecal) seccionado foi exteriorizado através de um estoma terminal localizado no hipocôndrio esquerdo (Figura 8). Após a fixação da colostomia e revisão da cavidade abdominal, a parede abdominal foi fechada. Após a recuperação anestésica os animais foram liberados para ingestão de água e, após seis horas, ração padronizada (Nuvilab CR1™ Nuvital Nutrientes AS, Brasil).



**FIGURA 6** – Laparotomia mediana para acesso a cavidade abdominal.

Acervo pessoal - Professor Carlos Augusto Real Martinez



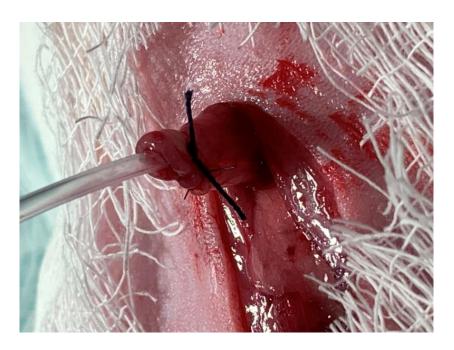
**FIGURA 7 -** Identificação e ligadura da artéria marginal justa cólica.

Acervo pessoal - Professor Carlos Augusto Real Martinez



**FIGURA 8 -** Secção do cólon esquerdo acima da placa de Peyer.

Acervo pessoal - Professor Carlos Augusto Real Martinez



**FIGURA 9 -** Cateterização do cólon distal e aplicação de solução salina para remoção de resíduos fecais.

Acervo pessoal - Professor Carlos Augusto Real Martinez



**FIGURA 10 -** Fechamento do cólon distal (cirurgia de Hartmann).

Acervo pessoal - Professor Carlos Augusto Real Martinez



**FIGURA 11 -** Colostomia terminal proximal (cirurgia de Hartmann).

Acervo pessoal - Professor Carlos Augusto Real Martinez

# 3.4 Pós-operatório

Para indução da RE os animais foram mantidos separados por 12 semanas até a data do sacrifício onde permanecerão em ambiente climatizado e com controle de umidade temperatura e luminosidade sem restrição hídrica ou alimentar. Os animais foram pesados semanalmente e nenhum cuidado adicional foi tomado em relação ao estoma confeccionado nem com a ferida operatória. Na véspera do dia programado para o sacrifício foram novamente mantidos em jejum de 12 horas exceto para água.

## 3.5 Grupos experimentais

Após randomização, os animais foram divididos em três grupos experimentais segundo a intervenção ser realizada com:

- Grupo A Intervenção com Solução Fisiológica (controle) (6 animais)
- Grupo B Intervenção com Infliximabe na dose de 5mg/kg/semana (8 animais)
- Grupo C Intervenção com Infliximabe na dose de 10mg/kg/semana (8 animais)

Todos os animais foram submetidos à administração das substâncias de intervenção por via subcutânea na região dorsal, na prega cervical uma vez por semana durante 5 semanas consecutivas.

#### 3.6 Eutanásia dos animais

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

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

Concluída a exérese dos espécimes cirúrgicos os animais sofreram eutanásia por injeção intracardíaca de dose letal de tiopental. A morte do animal foi constatada pela ausência de reflexos córneo-palpebral e de batimentos cardíacos por 5 minutos.

#### 3.7 Histologia

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

Após montagem as lâminas foram posteriormente coradas pelas técnicas da hematoxilinaeosina para análise das alterações histológicas dos espécimes e imuno-histoquímica para avaliação da expressão de colágeno tipo I e III.

A análise de cada lâmina foi feita em microscópio óptico comum com aumento final de 200x. Os parâmetros histológicos relacionados a presença de inflamação foram analisados qualitativamente e quantitativamente (morfometria computadorizada) por patologista.

O escore para a avaliação histopatológica do grau inflamatório foi graduado de 0 a 4 de acordo com critérios previamente propostos da seguinte maneira: 0 – sem infiltração leucocitária; 1- pequena infiltração leucocitária; 2- moderada infiltração leucocitária; 3- grande densidade

vascular e aumento da espessura das camadas mucosa e submucosa; 4- infiltração leucocitária transmural, diminuição do número de células caliciformes, grande densidade vascular, presença de ulcerações e aumento da espessura das camadas mucosa e submucosa.

#### 3.8 Quantificação do conteúdo de colágeno total (Técnica do tricrômio de Masson)

A técnica do tricrômio de Masson utilizada foi a proposta pela Disciplina de Patologia da UNICAMP. Inicialmente as lâminas foram desparafinadas e hidratadas em xilol e concentrações decrescentes de álcool. Após, foram lavadas por 5 minutos e água corrente e cobertas com solução de Bouin e mantidas em temperatura ambiente por 24 horas. Concluído o período, foram lavadas em água corrente até a completa remoção do corante de Bouin. A seguir foram lavadas em água destilada e coradas com hematoxilina férrica de Weigart por 10 minutos. Terminada esta etapa as lâminas foram novamente lavadas em água corrente por 10 minutos e em água destilada. A seguir foram coradas pela solução de escartale de Biebrich por cinco minutos e novamente lavadas com água destilada. Terminada esta fase foram diferenciadas pela solução de ácido fosfotúngstico-fosfomonolíbdico por 15 minutos e novamente lavadas em água destilada. Após, foram coradas pela solução de azul de anilina por 10 minutos, lavadas em água destilada e passadas em solução de ácido acético glacial 1% por 5 minutos. A seguir foram novamente lavadas em água destilada, desidratadas, diafanizadas e montadas em lâminas e lamínulas com resina.

#### 3.9 Técnica imuno-histoquímica

Todos os espécimes, fixados em formalina e emblocados em parafina, foram submetidos a dois cortes adicionais de 4μm, retirados da parede intestinal e depositados em lâminas previamente identificadas. Inicialmente as lâminas foram desparafinadas por três banhos sucessivos de cinco minutos em xilol. Realizou-se a reidratação, submergindo as lâminas em álcool absoluto, 95%, 80% e 50% seguida de lavagem por cinco minutos em água corrente e posteriormente em água destilada. As lâminas foram, então, acondicionadas em recipiente próprio e submersas em solução tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 7,2 (PBS) por 10 minutos e depois secas com papel filtro. Foi realizado bloqueio das peroxidases endógenas pelo gotejamento de peróxido de hidrogênio 30V a 3%, em câmara úmida, à temperatura ambiente, durante 10 minutos, seguido de mais uma lavagem com PBS por 10 minutos. Terminadas estas etapas, foi realizada a recuperação antigênica na qual as lâminas serão acondicionadas em cuba com solução de citrato 10 mM, pH 6,0 e submetidas a banho-maria durante 15 minutos (três ciclos

de cinco minutos cada, completando o recipiente com solução de citrato ao término de cada ciclo). Ao fim desse processo, as lâminas foram deixadas esfriar por 20 minutos seguindo-se nova lavagem com PBS por cinco minutos. Os anticorpos primários utilizados foram o anti-colágeno tipo I e o anti-colágeno tipo III. Todas as lâminas foram cobertas com cerca de 50 µL dessa solução, mantidas por 30 minutos à temperatura ambiente e levadas para câmara úmida em refrigeração a 4°C por 24 horas. Após esse período de incubação, as lâminas foram novamente lavadas com PBS por cinco minutos, gotejadas com o anticorpo secundário específico, na diluição de 1:160 em PBS, e reservadas em câmara úmida durante uma hora à temperatura ambiente. A seguir, nova lavagem com PBS por cinco minutos e aplicação do complexo estreptavidina-biotinaperoxidase preparado no momento de sua utilização, na diluição de 1:100 em PBS, por 45 minutos. As lâminas foram reveladas, após nova lavagem com PBS por cinco minutos, usandose cromógeno (tetrahidrocloridrato de diaminobenzidina DAB 10mg em 10 ml de PBS + 3 mL de água oxigenada), preparado cinco minutos antes de terminar o tempo de exposição ao complexo ABC, gotejado e permanecendo sobre elas por três minutos. Completado este tempo, as lâminas foram lavadas em água corrente destilada por cinco minutos, contra-coradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos, e novamente lavadas em água corrente destilada por cinco minutos para em seguida serem desidratadas, por submersão em etanol 50%, 80%, 95% e absoluto e em xilol, duas vezes por um minuto cada. Finalmente as lâminas foram montadas, rotuladas e mantidas em posição horizontal por 24 horas. O controle positivo foi realizado conforme orientação do fabricante em tecidos de cólon humano que sabidamente expressem a imunocoloração para colágeno tipo I e tipo III, enquanto o controle negativo foi realizado com lâminas confeccionadas, com a mesma técnica, sem adição do anticorpo primário.

Para análise microscópica foi utilizado microscópio óptico comum, com magnificação final de 200 vezes. Foi considerado como reação positiva à coloração que ocorrer de modo difuso, com pontos de intensidade variáveis e distribuição homogênea. Todas as lâminas foram lidas por patologista experiente sem conhecimento prévio das demais variáveis histológicas, e com acesso somente aos seus próprios resultados que classificará a expressão tecidual do anticorpo primário estudado segundo a presença ou ausência de imunoreação. Considerou-se imunocoloração positiva quando mais de 10 por cento do tecido estudado apresentar imunoreação positiva. Adoutou-se como valor individual final à moda entre a leitura de três campos diferentes.

# 3.10 Quantificação do conteúdo de colágeno tipo I e III por análise de imagem assistida por computador (morfometria computadorizada)

A quantificação da expressão tecidual de colágeno tipo I e III, foi mensurada por morfometria computadorizada em três campos em que existam pelo menos três criptas íntegras em toda sua extensão.

A leitura das lâminas foram sempre realizadas em local onde existiam pelo menos três criptas contíguas íntegras. Altura das criptas da mucosa cólica, número de células caliciformes e espessura das camadas muscular da mucosa, submucosa e muscular própria foram mensuradas por morfometria computadorizada, estudando-se a imagem de três campos aleatórios. A imagem selecionada será capturada por câmera de vídeo previamente acoplada a microscópico óptico (Eclipse DS50® - Nikon Inc., Japan). A imagem capturada foi processada e analisada pelo programa NIS-Elements® (Nikon Inc., Japan) instalado em um computador (Pentium® 4 DC, 1 Gbyte Memória RAM, 2 HD de 200Gbyte, placa de vídeo-captura ASUS®). O valor final adotado para cada variável mensurada nos segmentos provido e desprovido de trânsito intestinal foi representado pela média dos valores encontrados na avaliação dos três campos diferentes.

Para mensuração do conteúdo tecidual de colágeno tipo I e III identificado pela técnica imuno-histoquímica o programa através de histogramas de cor determinou a intensidade de cor de cada área selecionada com a presença da proteína para a mensuração, transformando a cor escolhida (marrom) em expressão numérica porcentual para cada campo de visão selecionado. O valor final adotado para cada campo mensurado nos segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal foi representado pela média dos valores encontrados na avaliação de três campos diferentes.

#### 3.11 Análise Estatística

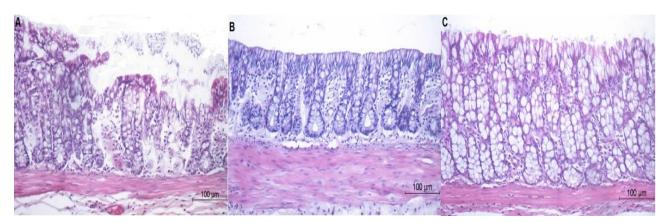
Para o cálculo dos valores encontrados após as medidas de cada variável em cada segmento cólico (com e sem trânsito fecal) e em cada grupo experimental (SF 0,9%, infliximabe 5mg/kg/sem e infliximabe 10mg/kg/sem) utilizou-se estatística descritiva e os resultados foram expressos pelo valor médio e respectivo erro padrão. Para avaliação do padrão de distribuição amostral utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação de todas as variáveis (escore inflamatório, conteúdo total de colágeno e colágeno do tipo I e III), nos diferentes segmentos cólicos e entre os grupos experimentais utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis adotando-se nível de significância de 5% (p<0,05). Os resultados

significantes obtidos quando se comparou, de forma pareada, os valores obtidos nos cólons com e sem trânsito fecal de um mesmo grupo experimental foram marcados com um asterisco (\*) quando o valor de p era menor que 5% (p<0,05) e com dois asteriscos (\*\*) quando menor que 1% (p<0,01). Os resultados significantes obtidos quando se comparou, de forma pareada, os valores obtidos nos animais submetidos a intervenção com SF 0,9%, infliximabe 5mg/kg/sem e infliximabe 10mg/kg/sem, dentro de um mesmo segmento cólico (com ou sem trânsito intestinal) foram marcados com uma cruz (†) quando o valor de p, era menor que 5% (p<0,05) e com duas cruzes (††) quando menor do que 1% (p<0,01).

#### 4. RESULTADOS

## 4.1 Avaliação Histológica da Presença de RE

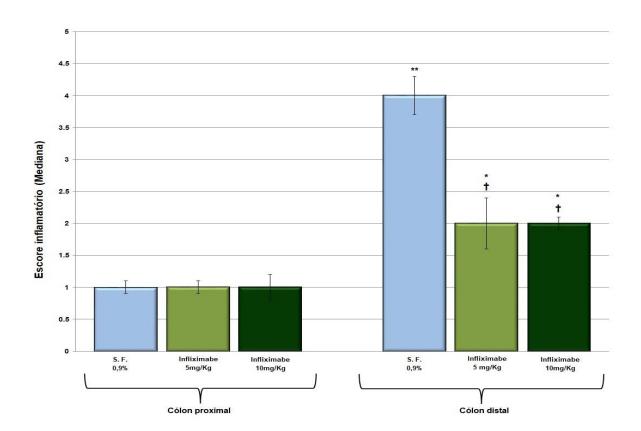
Nas Figuras 12A, 12B e 12C observa-se a parede cólica de segmentos desprovidos de trânsito intestinal em animais submetidos a intervenção com SF e infliximabe nas doses 5mg/kg/sem e 10mg/kg/semana por 5 semanas.



**FIGURA 12 - A**- Segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com SF 0.9% onde é possivel identificar-se a presença de úlcera epitelial (HE 100x). **B**- Segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com infliximabe na dose de 5mg/kg/sem, onde observa-se a integridade da superfície epitelial (HE 100x). **C**- Segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com infliximabe na dose de 10mg/kg/sem, onde observa-se a integridade da superfície epitelial e maior população de células caliciformes (HE 100x).

## 4.2 Escore de inflamação tecidual

No gráfico 1 observa-se o escore inflamatório comparando-se os segmentos com trânsito do cólon com (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal) nos animais que receberam SF 0,9% e infliximabe nas concentrações de 5mg/kg/sem e 10mg/kg/semana por 5 semanas). Os resultados mostraram aumento significativo do escore inflamatório nos segmentos desprovidos de trânsito fecal quando comparado aos cólons proximais, independente do grupo experimental considerado (p<0,01). Nos segmentos sem trânsito fecal nos animais tratados com infliximabe, independente da dose utilizada, houve redução do escore inflamatório quando comparado aos animais tratados com SF 0.9%.



**GRÁFICO 1 -** Escore inflamatório comparando-se os cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal), nos animais submetidos à intervenão com SF 0,9% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10/mg/kg/sem. \*\*= p<0,01. Teste de Mann-Whitney.

## 4.3 Expressão Tecidual de Colágeno Total - Tricrômio de Masson

A Figura 13A, 13B e 13C mostra o padrão de expressão de colágeno total do cólon distal tratados com SF e infliximabe nas doses de 5mg/kg/dia e 10mg/kg/semana durante 5 semanas

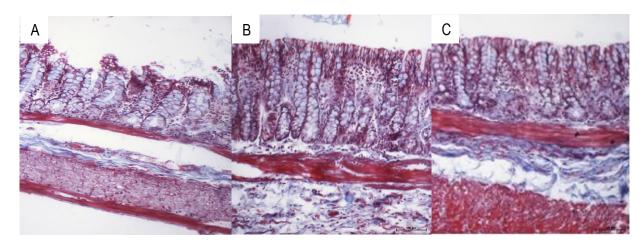
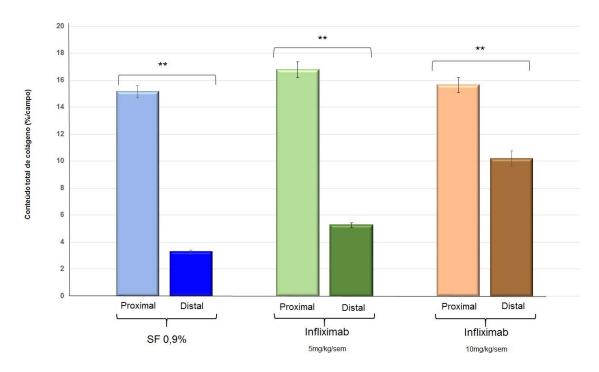


FIGURA 13 – A- Expressão tecidual de colágeno (cor azul) em segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com SF 0.9% (TM 100x). B- Expressão tecidual de colágeno total em segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com infliximabe na dose de 5mg/kg/sem (TM 100x). C- Expressão tecidual de colágeno total na parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com infliximabe na dose de 10mg/kg/sem (TM 100x).

#### 4.4 Conteúdo tecidual de colágeno total – Tricrômio de Masson

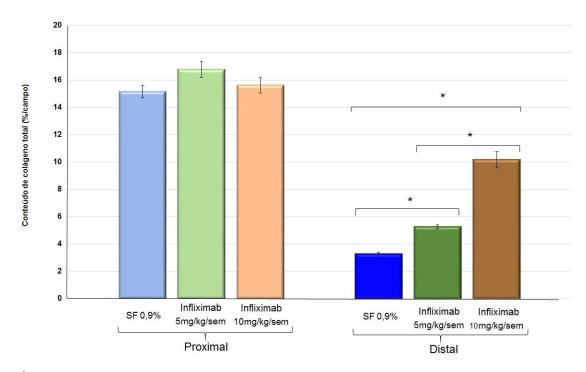
No Gráfico 2 observa-se o conteúdo total de colágeno total comparando-se os segmentos com trânsito do cólon fecal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal) nos animais que receberam SF 0,9% e infliximabe nas concentrações de 5mg/kg/sem e 10mg/kg/semana por 5 semanas). Os resultados mostraram redução significativa do conteúdo total de colágeno total nos segmentos desprovidos de trânsito fecal quando comparado aos cólons proximais, independente do grupo experimental considerado (p<0,01).



**GRÁFICO 2 -** Conteúdo de colágeno total comparando-se os cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal), nos animais submetidos à intervenão com SF 0,9% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10/mg/kg/sem. \*\*= p<0,01. Teste de Mann-Whitney.

# 4.5 Variação no conteúdo tecidual de colágeno total - Tricrômio de Masson

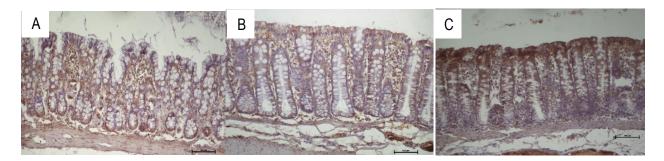
No Gráfico 3 observa-se os valores encontrados para o conteúdo de colágeno total comparando os cólons proximais e distais nos diferentes grupos experimentais. Quando se consideram os valores encontrados nos cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) não houve diferença estatística no conteúdo de colágeno total independente da substância aplicada. Porém, ao comparar-se o conteúdo de colágeno total nos cólons distais entre os três grupos, observa-se que ocorre aumento no conteúdo total de colágeno nos animais tratados com infliximabe independente da dose utilizada. Houve aumento do conteúdo de colágeno total nos animais tratados com 10mg/kg/sem quando comparado aos que receberam infliximabe na dose de 5mg/kg/semana (p<0,05).



**GRÁFICO 3 -** Variação no conteúdo de colágeno total nos cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal), nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10/mg/kg/sem. \*\*= p<0,01. Teste de Kruskal-Wallis.

## 4.6 Expressão Tecidual de Colágeno Tipo I

As Figuras 14A, 14B e 14C mostram a expressão tecidual de colágeno do tipo I em segmentos desprovidos de trânsito intestinal nos animais submetidos a intervenção com SF e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10/mg/sem, por 5 semanas.

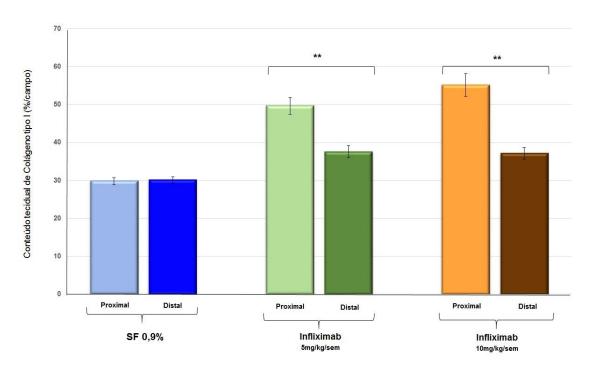


**FIGURA 14 - A:** Expressão tecidual de colágeno do tipo I em segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com SF 0.9% (IH 100x). **B:** Expressão tecidual de colágeno tipo I em segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com infliximabe na dose

de 5mg/kg/sem (IH 100x). **C:** Expressão tecidual de colágeno do tipo I na parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com infliximabe na dose de 10mg/kg/sem (IH 100x).

# 4.7 Conteúdo tecidual de colágeno tipo I - Imuno-histoquímica

No Gráfico 4, observa-se o conteúdo total de colágeno do tipo I comparando-se os segmentos com trânsito do cólon fecal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal) nos animais que receberam SF 0,9% e infliximabe nas concentrações de 5mg/kg/sem e 10mg/kg/semana por 5 semanas). Os resultados mostraram conteúdo maior colágeno do tipo I nos segmentos providos de trânsito fecal quando se comparou animais submetidos a intervenção com infliximabe, independente da dose utilizada (p<0,001).

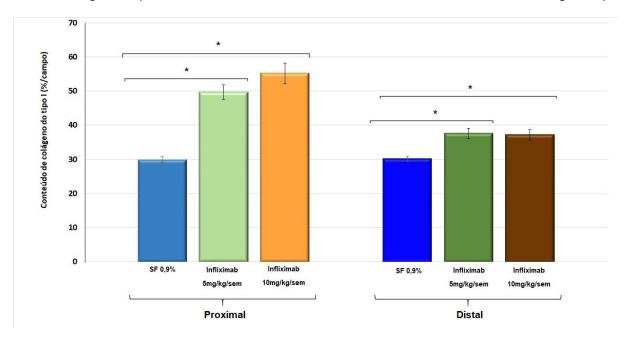


**GRÁFICO 4 -** Conteúdo de colágeno do tipo I comparando-se os cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal), nos animais submetidos à intervenão com SF 0,9% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10/mg/kg/sem. \*\*= p<0,01. Teste de Mann-Whitney.

## 4.8 Variação no conteúdo tecidual de colágeno do tipo I – Imuno-histoquímica

No Gráfico 5, observa-se a variação no conteúdo de colágeno do tipo I comparando os cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e os cólon sem trânsito fecal (cólon distal) nos

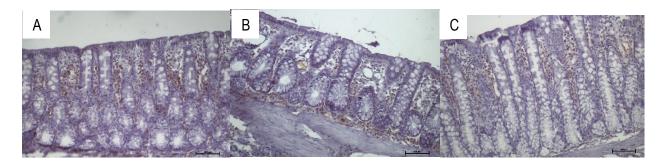
submetidos a aplicação de SF 0,9% e infliximabe nas concentrações de 5mg/kg/sem e 10/mg/kg/sem. Verifica-se que aumento no conteúdo de colágeno tipo I tanto no cólon proximal quanto no distal nos animais tratados com infliximabe independente da dose utilizada. Não houve diferença estatística no conteúdo de colágeno do tipo I quando se comparou os cólons com e sem trânsito fecal nos animais tratados com doses de 5mg/kg/sem ou 10mg/kg/sem. Esses achados sugerem que a dose do medicamento não influenciou no conteúdo de colágeno tipo I.



**GRÁFICO 5 -** Variação no conteúdo de colágeno do tipo I nos cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal), nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10/mg/kg/sem. \*= p<0,05. Teste de Kruskal-Wallis.

#### 4.9 Expressão Tecidual de Colágeno Tipo III

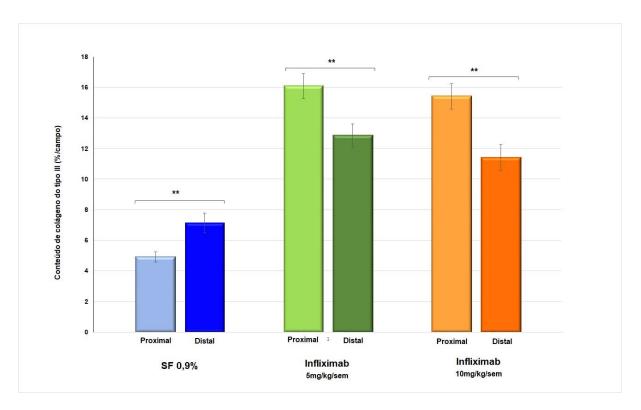
As Figuras 15A, 15B e 15C observa-se a expressão tecidual de colágeno do tipo III em segmentos desprovidos de trânsito intestinal nos animais submetidos a intervenção com SF 0,8% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10mg/kg/semana, por 5 semanas.



**FIGURA 15 - A-** Expressão tecidual de colágeno do tipo III em segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com SF 0.9% (IH 100x). **B-** Expressão tecidual de colágeno tipo III em segmento de parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com infliximabe na dose de 5mg/kg/sem (IH 100x). **C-** Expressão tecidual de colágeno do tipo III na parede cólica sem trânsito fecal de animal submetido a intervenção com infliximabe na dose de 10mg/kg/sem (IH 100x).

# 4.10 Conteúdo tecidual de colágeno tipo III – Imuno-histoquímica

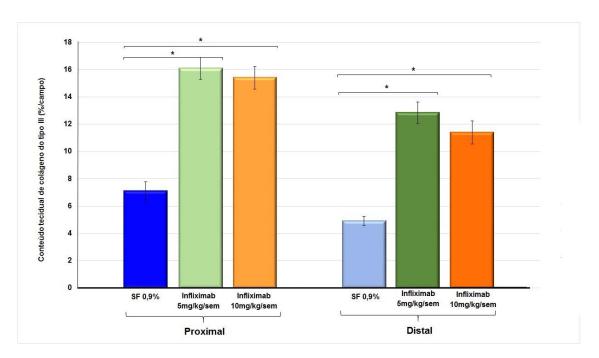
No Gráfico 6, observa-se os valores encontrados para conteúdo de colágeno tipo III nos cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e sem trânsito intestinal (cólon distal) nos animais que receberam SF 0,9% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10mg/kg/sem, por 5 semanas). Os resultados encontrados mostram os segmentos com trânsito intestinal (cólon proximal) apresentavam sempre maior conteúdo de colágeno do tipo III quando comparado ao cólon sem trânsito fecal, independente da substância de intervenção utilizada.



**GRÁFICO 6 -** Conteúdo de colágeno do tipo III comparando-se os cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal), nos animais submetidos à intervenão com SF 0,9% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10/mg/kg/sem. \*\*= p<0,01. Teste de Mann-Whitney.

## 4.11 Variação no conteúdo tecidual de colágeno do tipo III - Imuno-histoquímica

No Gráfico 7, observa-se a variação no conteúdo de colágeno do tipo III nos cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e sem trânsito intestinal, nos animais que receberam SF 0,9% ou infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem ou 10mg/kg/sem. Verifica-se, que o conteúdo de colágeno do tipo III foi sempre maior em ambos os segmentos cólicos (com ou sem trânsito intestinal) nos animais que receberam infliximabe, independente da dose aplicada.

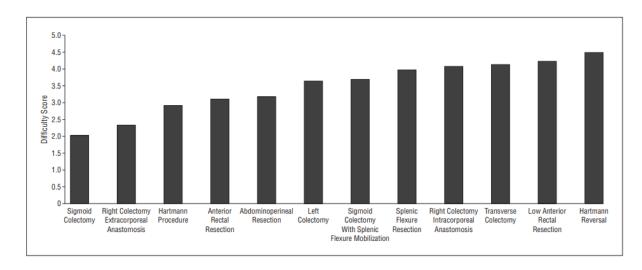


**GRÁFICO 7** – Variação no conteúdo de colágeno do tipo III nos cólons com trânsito intestinal (cólon proximal) e sem trânsito fecal (cólon distal), nos animais submetidos à intervenção com SF 0,9% e infliximabe nas doses de 5mg/kg/sem e 10/mg/kg/sem. \*= p<0,05. Teste de Kruskal-Wallis.

# 5. DISCUSSÃO

A reconstrução do trânsito intestinal após a CH é um dos procedimentos mais desafiadores para o cirurgião colorretal. Inquérito realizado com os 35 maiores expoentes da cirurgia colorretal em todo o mundo, considerando mais de 6.300 cirurgias colorretais realizadas por via de acesso minimamente invasiva, estabeleceu escores de dificuldade para os diferentes procedimentos em cirurgia colorretal (JAMALI, et al., 2008). Os autores constataram que entre os 12 procedimentos mais frequentemente realizados a ressecção isolada do cólon sigmoide com anastomose primária obteve o escore mais baixo, enquanto a restauração do trânsito intestinal após a CH o mais alto (Gráfico 8). Os cirurgiões com maior experiência em cirurgia minimamente invasiva e que possuíam o maior volume de doentes operados, foram unânimes em considerar a reversão do trânsito após a CH, como o procedimento mais difícil de ser realizado (HORESH et al., 2018). Esta dificuldade pode ser explicada por dois fatores principais: a presença de aderências significativas, tornando o acesso e a exposição da cavidade abdominal difícil, além da necessidade de mobilizar-se a flexura esquerda do cólon, para consequir confeccionar uma

anastomose livre de tensão. Esses dois fatores aumentam, significativamente, a complexidade do procedimento.



**GRÁFICO 8** – Grau de dificuldade dos 12 procedimentos colorretais mais frequentemente realizados por acesso minimamente invasivo (Figura original: JAMALI et al., 2008). Disponível em: <a href="http://archsurg.jamanetwork.com">http://archsurg.jamanetwork.com</a>

Apesar da CH ser realizada na maioria dos casos com intenção temporária, uma série de estudos mostrou que a restauração do trânsito intestinal após o procedimento deve ser considerada pelo cirurgião como um procedimento de alto risco, associado a índices de complicações maiores que 58% e de mortalidade de 3,6% (BANERJEE et al., 2005; GARGER; HYMAN; OSLER, 2014; HALLAN; MOTHE; TIRUMULAJU, 2018).

A maioria dos doentes submetidos a CH queixam-se do impacto que a presença do estoma determina na sua qualidade de vida (VERMEULEN et al., 2010). Os doentes apresentam-se insatisfeitos e desejam a reversão do procedimento muitas vezes pressionado o cirurgião a realizá-la. Contudo, em muitos doentes a dificuldade técnica para a realização do procedimento é de tal magnitude, que o trânsito não pode ser restaurado, condenando esses enfermos a conviverem com a colostomia pelo resto de suas vidas. Ao realizar uma derivação de trânsito intestinal temporária, como geralmente é o intuito da CH, o cirurgião deve estar consciente que metade desses indivíduos vão conviver com esse estoma temporário, pelo resto de suas vidas. O impacto na qualidade de vida desses doentes torna-se ainda maior, quando desenvolvem as formas graves da RE. Assim, quando se decide restabelecer o trânsito fecal de um enfermo submetido a CH, essa decisão, obrigatoriamente, deve ser compartilhada com o doente. O

paciente deve estar suficientemente esclarecido, dos potenciais riscos relacionados ao procedimento, assim como da incerteza do restabelecimento do trânsito intestinal (AYDIN et al., 2005; ROQUE-CASTELLANO et al., 2007). Não obstante todas essas limitações, a CH, ainda em nossos dias, continua sendo uma das opções cirúrgicas mais utilizadas pelos cirurgiões, particularmente para o tratamento das emergências cirúrgicas decorrentes do CCR obstruído ou perfurado, das DII, da diverticulite complicada do cólon sigmoide e dos traumas pélvicos complexos comprometem o cólon distal e o reto (PISANO et al.; 2018; HALL et al., 2020).

Dentre todas as técnicas de derivação do trânsito intestinal utilizadas para o tratamento cirúrgico das enfermidades que comprometem o cólon esquerdo e o reto, a CH é uma das estratégias mais comumente realizadas (KANG et al., 2020). A CH, na maioria dos doentes, é realizada com o objetivo que a colostomia terminal confeccionada seja temporária. Num cenário ideal a restauração do trânsito intestinal pode ser realizada após 60 dias da sua confecção. Todavia, por diferentes motivos, em muitos doentes o restabelecimento do trânsito intestinal não pode ser realizado, fazendo com que o estoma temporário se torne definitivo. O restabelecimento do trânsito intestinal após a CH ocorre em uma porcentagem significativamente baixa de pacientes. Estudo multicêntrico que incluiu 437 doentes submetidos a CH, mostrou que apenas em 127 (29%) foi possível restaurar o trânsito fecal. E o que é pior, desses doentes 46 (35,9%) apresentaram complicações pós-operatórias graves após a reconstrução do trânsito fecal (HORESH et al., 2017). Uma avaliação de 249 pacientes submetidos a CH mostrou que 62 (31,8%) pacientes apresentaram uma complicação importante após a reversão. Oito (4%) desses enfermos pacientes desenvolveram uma fístula da anastomose, 13 (6,67%) abscessos intraabdominais que exigiram reoperação ou drenagem cirúrgica percutânea. A maioria dos doentes que desenvolveu complicações graves apresentavam grande risco cirúrgico no momento da reversão, doença hepática descompensada, sepses e obesidade (WHITNEY et al., 2020). Estudo multicêntrico que avaliou 640 doentes submetidos a CH mostrou que apenas em 260 (40,6%) foi possível realizar a restauração do trânsito fecal, condenando mais da metade dos doentes a permanecerem com o estoma temporário (HORESH et al., 2017). Os autores verificaram que 121 (46,5%) dos doentes submetidos ao restabelecimento do trânsito intestinal evoluíram com alguma complicação após o procedimento. Nos doentes onde não foi possível realizar a restauração do trânsito intestinal a presença comorbidades (49,7%) e CCR metastático (21,6%) foram os principais motivos. Fatores como o gênero masculino, idade do paciente, número de comorbidades e a CH ter sido realizada em virtude do CCR também impactaram na manutenção do estoma. Revisão sistemática da literatura mostrou que ao comparar-se a ressecção do cólon sigmoide com anastomose primária com a CH, os doentes submetidos a anastomose primária apresentaram índices de complicação semelhante, mas menor possibilidade de terem que conviver com um estoma permanente (BEYER-BERJOT et al., 2020). Essa é uma das razões para que consensos venham propondo como alternativa a CH a realização de ressecções cirúrgicas com anastomoses primárias como alternativa para reduzir o número de doentes convivendo com um estoma (PISANO et al., 2018). Entretanto, nos doentes que se apresentam em más condições clínicas à admissão, nos idosos e naqueles que apresentam comorbidades graves a CH ainda é recomendada (HALL et al., 2020)

Dentre as principais complicações que podem ocorrer após a restauração do trânsito intestinal nos doentes previamente submetidos a CH, a deiscência da anastomose colorretal é a mais temida e que apresenta os maiores índices de mortalidade (SAKR, et al., 2017). O vazamento anastomótico é considerada a complicação cirúrgica mais catastrófica pois, o aumenta os índices de morbidade e mortalidade, na maioria dos casos necessita intervenções adicionais, aumenta o tempo de hospitalização e, eleva muitos os custos do tratamento (SAKR et al., 2017). Cabe lembrar que, o desenvolvimento de fístulas nas anastomoses colorretais, também impactam negativamente os resultados oncológicos e funcionais, aumentando consideravelmente os índices de estomas permanente (LINDGREN et al., 2011; SAKR, et al., 2017). Estudo avaliando 72 doentes submetidos a restauração do trânsito intestinal após a CH mostrou que o desenvolvimento de fístulas da anastomose colorretal ocorreu em mais de 5% dos doentes, com taxa de mortalidade de 8,3% (KARTAL et al., 2019). Cabe lembrar que as fístulas que surgem nas anastomoses colorretais protegidas por um ileostomia de proteção, o diagnóstico clínico é mais difícil de ser realizado e, geralmente, é feito após 30 dias da operação quando o doente desenvolve abscessos intracavitários ou pélvicos (LEAHY et al., 2014). Estudo avaliando 245 pacientes submetidos a anastomose colorretal com derivação proximal mostrou que um total de 34(14%) doentes apresentaram fístulas diagnosticadas clinicamente, em média de 43 dias após a operação. O diagnóstico clínico foi feito em 13 (5%) pacientes antes 30 dias da cirurgia e em 21(9%) doentes após 30 dias. Os autores chamam a atenção para o fato de que nos doentes portadores de DII, as deiscências das anastomoses foram mais frequentes (LEAHY et al., 2014). Quando se considera que a maioria das fístulas das anastomoses colorretais são diagnosticadas clinicamente, e que os exames de imagem apresentam resultados falso-negativos para o diagnóstico da complicação em uma porcentagem considerável de casos, o retardo na indicação de uma nova intervenção, talvez possa explicar os elevados índices de mortalidade (MARRES et al., 2017).

Uma série de fatores estão relacionados ao desenvolvimento de fístulas das anastomoses colorretais (MEYER et al., 2019). De modo semelhante ao que ocorre com anastomoses confeccionadas em outros segmentos do cólon, idade avançada, obesidade, experiência do cirurgião, erros técnicos, a presença de isquemia não identificada antes da realização da anastomose, confecção de anastomoses sob tensão, arteriosclerose generalizada, radioquimioterapia neoadjuvante, desnutrição, hipoproteinemia, imunossupressão, presença de inflamação nos segmentos cólicos a serem anastomosados são as condições mais frequentemente descritas (FRANCHINI; ROMAGNOLO, 2021). Portadores de todas as condições clínicas que ocasionam processo inflamatório no reto como, a proctite actínica, DII, e a RE são condições que dificultam a cicatrização das anastomoses colorretais. Cabe lembrar, que quando se realiza a restauração do trânsito intestinal, em um doente anteriormente submetido a CH, o cirurgião realiza a anastomose de um segmento de cólon com trânsito preservado, com um segmento de reto desfuncionalizado por diferentes períodos. O processo inflamatório que se instala nos segmentos retais exclusos de trânsito é diagnosticado na quase totalidade dos doentes após 36 meses da derivação fecal com intensidade variada (WHELLAN et al, 1994; AYDIN et al., 2005; BAEK et al., 2014). Em alguns doentes o processo inflamatório pode ser tão intenso que o diagnóstico diferencial com as DII é difícil de ser realizado (LIM et al. 1999). Estudos clínicos e experimentais mostraram que ocorrem transformações importantes na parede do cólon excluso, com intenso infiltrado inflamatório, formação de abscessos nas criptas, ulcerações epiteliais, congestão vascular com edema importante e atrofia das camadas mucosa e submucosa da parede retal (KORELITZ et al., 1985; KISSMEYER-NIELSEN; CHRISTENSEN; LAURBERG, 1994; SOUZA et al, 2008). Estudos experimentais também mostraram que o infiltrado inflamatório que se instala no local aumenta a produção de citocinas, RLO, TNF-α e enzimas proteolíticas com as metaloproteinases, capazes de degradar a produção de colágeno já deficiente pela falta de substrato energético (AGCC) para sua síntese local (MARTINEZ et al., 2010; BUANAIM et al., 2019; DELBEN et al., 2021; ALVES JÚNIOR et al., 2021). Demonstrou-se experimentalmente que nos segmentos sem trânsito fecal ocorre acentuada redução da produção e da qualidade do colágeno tecidual e aumento na produção de metaloproteinases (ALVES JÚNIOR et al., 2021). Quando se consideram esses achados é lícito supor que talvez, o menor conteúdo de colágeno no reto excluso, decorrente da ação dessas colagenases possa estar relacionado a maior possibilidade do desenvolvimento de fístulas.

A preocupação com relação aos efeitos da derivação do trânsito intestinal no conteúdo de colágeno nos segmentos cólicos com e sem trânsito fecal é antiga. Uma série de estudos

experimentais avaliou os efeitos da derivação fecal no metabolismo do colágeno em anastomoses realizadas a jusante da mesma (BLOMQUIST et al., 1984; BLOMQUIST; JIBORN; ZEDERFELDT, 1985; UDÉN et al., 1988; TÖRNQVIST, et al., 1990). Blomquist et al. (1984) mediram o conteúdo de colágeno em anastomoses confeccionadas no cólon esquerdo em animais submetidos ou não à exclusão do trânsito, por meio de uma colostomia proximal terminal realizada na flexura cólica direita e sepultamento do cólon distal (BLOMQUIST; JIBORN; ZEDERFELDT, 1985). Os autores tiveram o cuidado de limpar o cólon excluso para remover eventuais detritos fecais ainda presentes. Verificaram que nos animais submetidos a derivação fecal, o conteúdo de colágeno diminuiu no reto após 11 dias da derivação e nos segmentos cólicos à jusante da colostomia após 28 dias da derivação. Constataram ainda, que houve significativa redução da síntese de proteínas (hidroxiprolina) e colágeno nos segmentos sem trânsito fecal dos animais derivados, quando comparados àqueles que permaneciam com trânsito preservado. Nos animais derivados a síntese de proteínas e colágeno nos segmentos cólicos a montante da colostomia era semelhante ao dos animais não derivados. Os autores concluíram que o a derivação do trânsito intestinal é acompanhada por depressão da síntese de colágeno na parede do cólon excluído. Em outras palavras a menor síntese de colágeno nos segmentos sem trânsito fecal talvez possa estar relacionada a carência do suprimento regular de AGCC.

Posteriormente, utilizando o mesmo modelo experimental, o mesmo grupo mostrou que nos animais submetidos à colostomia proximal desfuncionalizante, a síntese e o acúmulo de colágeno na linha da anastomose diminuíram significativamente, assim como a resistência tênsil da anastomose (UDÉN et al., 1988). Mostraram que o fechamento precoce da colostomia resultava em um aumento rápido do conteúdo de colágeno na anastomose colorretal, quando comparado ao fechamento tardio, onde o conteúdo de colágeno só se elevava 14 dias após a restauração do trânsito intestinal (UDÉN et al., 1988). Esses achados, ao nosso ver, reforçam a importância dos AGCC para a síntese do colágeno, sugerindo que quanto mais rápido o suprimento de AGCC é restabelecido mais rápido será a produção de colágeno local. Em outras palavras, a normalização da oferta de AGCC é um dos principais fatores responsáveis pela produção de colágeno no reto excluso de trânsito (OLIVEIRA-NETO; AGUILAR-NASCIMENTO, 2004; BLOEMEN et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010: LAMEIRO et al., 2011; PACHECO et al., 2012; BOSMANS et al., 2017).

Greca et al., (2000), avaliaram a ação dos AGCC na cicatrização do cólon. Utilizaram-se 16 ratos divididos em 2 grupos experimentais. No grupo controle os animais foram submetidos à CH e infusão pós-operatória diária de solução salina isotônica via retal por 7 dias. No grupo

experimento realizaram o mesmo procedimento cirúrgico, mas aplicaram clisteres diários contendo solução isomolar de AGCC. Avaliaram a expressão tecidual dos colágenos dos subtipos I e II pela técnica do Picrosírius red e mensuraram seu conteúdo tecidual por morfometria computadorizada (GRECA et al., 2000). Constataram que nos animais tratados com AGCC houve aumento e predomínio do colágeno do subtipo I, quando comparado aos animais que receberam apenas SF 0,9%. Os mesmos achados foram encontrados quando mensuraram o conteúdo de colágeno total, obtido pela soma dos colágenos dos subtipos I e III. Concluíram que nos animais que receberam clisteres contendo AGCC havia maior concentração de colágeno maduro e total no cólon excluso, quando comparados aos do grupo controle (GRECA et al., 2000). Outros autores confirmaram a eficácia da aplicação de clisteres com AGCC, particularmente o butirato, como estratégia clínica para reduzir fístulas anastomóticas realizadas nos segmentos colorretais. (BOSMANS et al., 2017). A aplicação intrarretal de clisteres com AGCC, além de aumentar a produção de colágeno diminuiu a produção da principal enzima relacionada a sua degradação metaloproteína do tipo 9 (MMP-9).

Os resultados encontrados parecem referendar a importância do fornecimento regular de AGCC para a síntese de colágeno nas camadas mucosa e submucosa da parede cólica. Verificamos que o conteúdo de colágeno total e do subtipo III foram sempre menores nos segmentos desprovidos de trânsito fecal quando comparados aos segmentos com trânsito preservado, independente da substância de intervenção utilizada (SF 0,9% ou infliximabe). Apenas o conteúdo de colágeno do tipo I, não se modificou quando se comparou os cólons com e sem trânsito fecal nos animais que receberam SF 0,9%. De modo diferente, o conteúdo de colágeno do tipo I, embora tenha aumentado no cólon desprovido de trânsito dos animais tratados com infliximabe foi sempre maior nos segmentos com trânsito preservado. É possível que esses resultados estejam relacionados a maior degradação de colágeno do tipo I nos segmentos sem trânsito fecal decorrente da maior produção de colagenases como demonstrado por outro estudo (ALVES JÚNIOR et al., 2021). Os autores, utilizando o mesmo modelo experimental do presente estudo mostraram que o conteúdo de MMP-9 foi maior no cólon distal dos animais tratados com SF 0,9%, enquanto o conteúdo de colágeno total, menor (ALVES JÚNIOR et al., 2021).

A maioria dos estudos avaliou o conteúdo de colágeno tecidual por ensaios bioquímicos (BLOMQUIST et al., 1984; BLOMQUIST; JIBORN; ZEDERFELDT, 1985). Nesses estudos a metodologia para pesquisa do colágeno por ensaios bioquímicos permite avaliar apenas o conteúdo de colágeno total, não possibilitando a análise dos diferentes subtipos de colágeno (BLOMQUIST et al., 1984; BLOMQUIST; JIBORN; ZEDERFELDT, 1985). De modo diferente,

quando se avalia o conteúdo de colágeno por métodos histoquímicos é possível diferenciar qualitativamente se o colágeno presente é maduro ou imaturo, aspecto importante relacionado a qualidade do processo de cicatrização das anastomoses colorretais. De modo semelhante, mas com especificidade maior, quando se identifica a expressão tecidual do colágeno por técnica imuno-histoquímica, como a adotada no presente estudo, é possível identificar com precisão, o subtipo de colágeno presente (I, II, III, IV). A identificação do colágeno por imuno-histoquímica também possibilita identificar com precisão, o local onde o subtipo de colágeno se expressa na parede cólica. Outra vantagem é que com o emprego dessa metodologia e com o auxílio de programas de análise de imagem computadorizada, ainda é possível quantificar o conteúdo tecidual dos diferentes subtipos de colágeno. Foi por essa razão, que optamos por avaliar no presente estudo, o conteúdo de colágeno total e de seus subtipos I e III, utilizando ensaios histoquímicos e imuno-histoquímicos para identificar o local de expressão local do colágeno na parede cólica e a morfometria computadorizada para quantificar seu conteúdo.

A análise dos subtipos de colágeno por estudo histoquímico já tinha sido utilizada anteriormente (BIONDO-SIMÕES et al., 2000; GRECA et al., 2000). Biondo-Simões et al., (2000) avaliaram, em ratos, por ensaio histoquímico, o conteúdo de colágeno maduro e imaturo nas camadas mucosa e submucosa uma, duas, quatro e oito semanas após os animais terem sido submetidos à CH. Como controle utilizaram fragmento de cólon colhido durante a confecção da derivação intestinal. Utilizaram a técnica histoquímica do Picrosírius red, que sob luz polarizada permite identificar o subtipo de colágeno presente no tecido. Quando ocorre expressão de colágeno do tipo I, sob luz polarizada, as fibras se coram em tons que variam de amarelo a vermelho. De modo distinto, as fibras de colágeno do tipo III coram-se em verde. Para a medida do conteúdo tecidual dos subtipos de colágeno utilizaram sistema de leitura de imagem computadorizado. Verificaram que nos cortes histológicos removidos no momento da derivação intestinal (controle) predominou o colágeno do tipo I, enquanto após uma, duas, quatro e oito semanas de derivação houve predomínio do colágeno do tipo III. Referem que foi constante a diminuição do colágeno total, a perda do colágeno I e o aumento do colágeno III (imaturo) com a progressão do tempo de derivação fecal. Os autores concluíram que nos segmentos exclusos de trânsito fecal ocorre diminuição do colágeno I e aumento do colágeno III.

Esses mesmos resultados foram encontrados neste estudo quando mensuramos o conteúdo de colágeno total e colágenos dos subtipos I e III, comparando segmentos com e sem trânsito intestinal dos animais tratados com SF 0,9%. Os segmentos com trânsito preservado, sempre apresentaram maior conteúdo quando comparado aos segmentos desprovidos de

trânsito. Esses achados sugerem que a manutenção do suprimento regular de AGCC possibilita a produção normal de colágeno, e que de modo distinto, a falta no suprimento de AGCC nos animais tratados apenas com SF 0,9%, foi responsável, em parte, pela redução no conteúdo de colágeno total e de ambos os subtipos. Cabe lembrar que nesses animais, o processo inflamatório que se instalou nos segmentos exclusos de trânsito fecal foi significativamente maior. É possível que o conteúdo de colágeno total e de seus subtipos I e III também tenha diminuído nesses segmentos exclusos em virtude do maior processo inflamatório local. Já se demonstrou que o maior processo inflamatório no cólon excluso, aumenta a produção de MMP-9, enzima relacionada a maior degradação do colágeno (ALVES JÚNIOR et al., 2021). Assim seriam dois mecanismos diferentes na redução do conteúdo de colágeno nos segmentos sem trânsito fecal: a menor produção e a maior degradação local. Essa possibilidade é corroborada quando se demonstrou experimentalmente em modelo de RE semelhante ao utilizado neste estudo, que a administração de infliximabe, independente da dose utilizada, diminui o escore inflamatório tecidual, o infiltrado neutrofílico, os níveis teciduais de TNFα e a produção de metaloproteína-9 no cólon excluso de trânsito fecal (BUAINAIM et al., 2019; ALVES JÚNIOR et al., 2021; DELBEN et al., 2021). Assim, o infliximabe poderia diminuir a degradação de colágeno no cólo excluso por reduzir a inflamação local. No presente estudo, também encontramos aumento significativo do conteúdo tecidual de colágeno total e dos subtipos I e III, nos animais tratados com infliximabe quando comparados aos que receberam apenas SF 0.9%. Assim, é possível que o aumento do colágeno no cólon desprovido de trânsito fecal nos animais tratados com infliximabe esteja relacionado à sua potente ação anti-inflamatória. A melhora do processo inflamatório nos animais tratados com infliximabe possivelmente diminuiu a produção de metaloproteínas e, consequentemente, a degradação do colágeno.

As deiscências das anastomoses colorretais, provavelmente são multifatoriais. Todavia, os achados desses estudos experimentais mostraram que um dos fatores mais importantes para que as deiscências ocorram é a redução do conteúdo de colágeno tecidual (STUMPF et al., 2002). Alterações na quantidade e na qualidade do colágeno são importantes na manutenção das propriedades biomecânicas das anastomoses (RABAU et al., 1995; STUMPF et al., 2002). Já se mostrou que a diminuição da concentração de colágeno no cólon inflamado sugere que sua degradação excede sua síntese (TÖRNQVIST et al, 1990). Essa degradação do colágeno é feita por gelatinases e colagenases principalmente representadas pela metaloproteinas dos tipos 1, 2, 8, 9, 13 (SYK et al., 2003). Contudo, o uso do infliximabe como estratégia para diminuir a degradação e aumentar a síntese de colágeno no cólon excluso, ainda não foi avaliada

experimentalmente bem como no homem. Apenas três estudos experimentais avaliaram o efeito do infliximabe em modelos experimentais de RE (BUAINAIM et al., 2019; ALVES JÚNIOR, 2021; DELBEN et al., 2021). O primeiro mostrou que a aplicação de infliximabe nas doses de 5 mg/kg/sem e 10mg/kg/sem melhorou do ponto de vista histológico o processo inflamatório no cólon excluso, reduzindo ainda o grau de infiltração neutrofílica (BUAINAIM et al., 2019). No segundo confirmou-se esses achados mostrando ainda que a aplicação do infliximabe reduziu a atividade do TNF-α no cólon excluso de trânsito fecal (DELBEN et al., 2021). Mais recentemente, demonstrou-se que a aplicação subcutânea de infliximabe, independente da dose utilizada, reduziu não apenas o processo inflamatório no reto excluso, mas, também a produção de MMP-9, uma importante enzima relacionada a degradação do colágeno tecidual (ALVES-JÚNIOR et al., 2021). Nesse último estudo os autores mostraram que nos animais tratados com o infliximabe ocorre aumento na produção de colágeno total. Entretanto, os autores não avaliaram se esse aumento se dava à custas de um subtipo de colágeno específico de colágeno. Essa foi a proposta do presente estudo.

Os resultados encontrados no presente estudo confirmam os benefícios do uso do infliximabe no tratamento da RE. Mostrou ainda que o infliximabe aumenta o conteúdo de colágeno no cólon excluso. Verificou-se que nos segmentos desprovidos de trânsito fecal ocorre redução importante do conteúdo de colágeno total, tipo I e tipo III, em comparação aos segmentos com trânsito preservado. Contudo, a intervenção com infliximabe, independente da dose empregada, aumentou o conteúdo dos subtipos de colágeno I e III, assim como o conteúdo de colágeno total no cólon excluso. Todavia, o aumento do conteúdo dos subtipos de colágeno no cólon excluso nos animais tratados com o infliximabe foi sempre menor quando comparado ao conteúdo nos segmentos com trânsito preservado. A explicação para esses achados pode ser dada quando se considera a importância do suprimento dos AGCC para a síntese de colágeno. Os segmentos com trânsito preservado mantêm seu substrato energético para produção de colágeno, além de não desenvolverem a RE. De modo contrário, os segmentos sem trânsito, onde não existe o fornecimento de AGCC, apresentam redução da síntese de colágeno. A menor síntese associada a maior degradação decorrente do processo inflamatório local no cólon excluso talvez seja a explicação para o menor conteúdo no cólon excluso. É possível que a intervenção com infliximabe, reduzindo o processo inflamatório nesses segmentos, reduza a destruição local, aumentando o conteúdo de colágeno no cólon excluso quando comparado aos animais que receberam apenas SF 0,9%.

Os achados deste estudo reforçam a importância da manutenção do suprimento regular de AGCC à mucosa cólica para a adequada produção de colágeno. O maior conteúdo de colágeno, favorece o processo de cicatrização, diminuindo eventuais deiscências das anastomoses em indivíduos submetidos a CH. É possível que o uso do infliximabe antes da reconstrução do trânsito intestinal, reduzindo a degradação de colágeno no cólon excluso, possa melhorar os preocupantes índices de fístulas anastomóticas que ocorrem após a tentativa de restauração do trânsito intestinal em doentes submetidos à CH. No momento, no mesmo modelo experimental utilizado neste estudo, estamos avaliando a eficácia da associação do infliximabe, aplicado por via sistêmica, com a aplicação de clisteres contendo soluções ricas em AGCC. É possível que o uso dessa estratégia combinada possa além de diminuir a degradação do colágeno, restaurar a sua síntese nos segmentos exclusos de trânsito fecal. Em última análise, reduzir é possível que essa estratégia combinada possa reduzir os índices de fístulas anastomóticas após a reconstrução do trânsito nos doentes submetidos a CH.

Contudo, o presente estudo apresenta limitações relacionadas a metodologia utilizada. É importante lembrar que este estudo é experimental. Portanto, toda cautela deve ser empregada ao extrapolar-se os resultados encontrados para o ser humano.

## 6. CONCLUSÃO

Considerando a metodologia empregada e os resultados obtidos neste estudo é possível concluir que:

- O conteúdo de colágeno total é menor nos segmentos cólicos desprovidos de trânsito intestinal quando comparado aos cólons com trânsito preservado, independente da solução de intervenção utilizada;
- O conteúdo de colágenos do tipo I e III, nos animais que receberam infliximabe, foi sempre maior no cólon com trânsito intestinal preservado quando comparado ao mensurado no cólon desprovido de trânsito fecal;
- A administração de infliximabe, independente da dose utilizada, aumenta o conteúdo de colágeno total no cólon desprovido de trânsito fecal, quando comparado aos animais submetidos a intervenção com SF 0,9%;
- A aplicação de infliximabe, independente da concentração utilizada, aumenta o

- conteúdo de colágeno do tipo I nos segmentos com e sem trânsito fecal, quando comparados aos animais submetidos a intervenção com SF 0,9%;
- A intervenção com infliximabe, independente da concentração utilizada, aumenta o conteúdo de colágeno do tipo III, nos segmentos cólicos com e sem trânsito intestinal, quando comparado aos animais que receberam SF 0,9%.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRASO Associação Brasileira de Ostomizados. Quantitativo aproximado de pessoas ostomizadas no Brasil. Available at: http://www.abraso.org.br/estatisticaostomizados.htm. Acesso: 17 Abril de 2021.

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 (Rio J.)**, v.32, n.3, p.223-231, 2012

ALVES JÚNIOR, A.J.T.; PEREIRA, J.A.; DE ÁVILA, M.G.; DOMINGUES, F.A.; SATO, D.T.; MARTINEZ, C.A.R. Tissue content of metalloproteinase-9 and collagen in the colon with and without fecal stream after intervention with infliximabe in rats subjected to Hartmann's surgery. **Acta Cir Bras**, v. 36, n.4, p. e360401, 2021.

ALVES JÚNIOR, A.J.T.; PEREIRA, J.A.; PANSANI, A.H.C.; MAGRO, D.O.; COY, C.S.R.; MARTINEZ, C.A.R. Tissue sulfomucin and sialomucin content in colon mucosa without intestinal transit subjected to intervention with *Curcuma longa* (curcumin). **Acta Cir Bras**, v.32, n.3, p. 183-193, 2017.

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

AKBULUT, S.; DOGAN, Z.; BASKIRAN, A.; ELBE, H.; TURKOZ, Y. Effect of a honey and arginine-glutamine-hydroxymethylbutyrate mixture on the healing of colon anastomosis in rats immunosuppressed with tacrolimus. **Biotech Histochem**, v.94, n.7, p. 514-521, 2019.

ARUMUGAM, P.J.; BEVAN, L.; MACDONALD, L.; WATKINS, A.J.; MORGAN, A.R.; BEYNON, J. A prospective audit of stomas – analysis of risk factors and complications and their management. **Colorectal Dis**, v.5, n. 1, p.49-52, 2003.

AYDIN, H.N.; REMZI, F.H.; TEKKIS, P.P.; FAZIO, V.W. Hartmann's reversal is associated with high postoperative adverse events. **Dis Colon Rectum**, v.48, n. 11, p. 2117-2126, 2005.

BAASTRUP N.N.; HARTWIG, M.F.S.; KRARUP, PM.; JORGENSEN, L.N.; JENSEN, K.K. Anastomotic leakage after stoma reversal combined with incisional hernia repair. **World J Surg**, v.43, n. 4, p. 988-997, 2019.

BAEK, S.J.; KIM, S.H.; LEE, C.K.; ROH, K.H.; KEUM, B.; KIM, C.H.; KIM, J. Relationship between the severity of diversion colitis and the composition of colonic bacteria: a prospective study. **Gut Liver**, v.8, p.170-176, 2014.

BANERJEE, S.; LEATHER, A.J.M.; RENNIE, J.A.; SAMANO, N.; GONZALEZ, J.G.; PAPAGRIGORIADIS, S. Feasibility and morbidity of reversal of Hartmann's. **Colorectal Dis**, v.7, n.5, p. 454-459, 2005.

BAX, T.W.; MCNEVIN, M.S. The value of diverting loop ileostomy on the high-risk colon and rectal anastomosis. **Am J Surg**, v.193, n.5, p.585-587, 2007.

BEYER-BERJOT, L.; MAGGIORI, L.; LOISEAU, D.; DE KORWIN, J.D.; BONGIOVANNI, J.P.; LESPRIT, P.; SALLES, N.; ROUSSET, P.; LESCOT, T.; HENRIOT, A.; LEFRANÇOIS, M.; COTTE, E.; PARC, Y. Emergency surgery in acute diverticulitis: a systematic review. **Dis Colon Rectum**, v.63, n.3, p. 397-405, 2020.

BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; GRECA, F.H.; IOSHI, S.; ABICALAFFE, M.D.; COLNAGHI, M.C.; MATTOS E SILVA, E.; YAMASAKI, E.S.; SMANIOTTO, G. Colite do cólon excluso – modelo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 15, n.suppl.3, p.7-11, 2000.

BLOEMEN, J.G.; SCHREINEMACHER, M.H.; DE BRUINE, A.P.; BUURMAN, W.A.; BOUVY, N.D.; DEJONG, C.H. Butyrate enemas improve intestinal anastomotic strength in a rat model. **Dis Colon Rectum**, v.53, n.7, p.1609-1675, 2010.

BLOMQUIST, P.; AHONEN, J.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. The effect of relative bowel rest on healing of colonic anastomoses. Collagen synthesis and content in the colonic wall after left colon resection and anastomosis in the rat. **Acta Chir Scand**, v.150, n.8, p.677-681, 1984.

BLOMQUIST, P.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. Effect of diverting colostomy on collagen metabolism in the colonic wall. Studies in the rat. **Am J Surg**, v.149, n.3, p.330-333, 1985.

BOLAND, P.M.; FAKIH, M. The emerging hole of neoadjuvant chemotherapy for rectal cancer. **J Gastrointest Oncol**, v. 5, n.5, p.362-373, 2014.

BONASSA, C. E. G.; 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.

BOSMANS, J.W.; JONGEN, A.C.; BOONEN, B.T.; VAN RIJN, S.; SCOGNAMIGLIO, F.; STUCCHI, L.; GIJBELS, M.J.; MARSICH, E.; BOUVY, N.D. Comparison of three different application routes of butyrate to improve colonic anastomotic strength in rats. **Int J Colorectal Dis**, v.32, n.3, p.305-313, 2017.

BOSSHARDT, R. T.; ABEL, ME. Proctitis following fecal diversion. **Dis Colon Rectum**, v. 27, n. 9, p. 605-607, 1984.

BRASKEN, P. Healing of experimental colonic anastomosis. **Eur J Surg.**, v. 566, p. 1-51, 1991.

BUANAIM, R.P.; PEREIRA, J.A.; CAMPOS, F.G.; KOTZE, P.G.; GOTO, E.F.K.; MENDONÇA, R.L.S.; MARTINEZ, C.A.R. Effects of anti-TNF-α in experimental diversion colitis. **Acta Cir Bras**, v. 34, n. 10, p. e201901004, 2019.

BUTZNER, J.D.; PARMAR, R.; BELL, C.J.; DALAL, V. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. **Gut**, v.38, n.4, p.568-573, 1996.

CAMPOS, K.; BOT, B.L.H.; PETROIANU, A.; REBELO, P.A.; SOUZA, A.A.C.; PANHOCA, I. O impacto da colostomia na vida de seus portadores. J. **Coloproctol (Rio J)**, v. 37, n. 3, p. 205-210, 2017.

CARLSSON, E.; FINGREN, J.; HALLÉN, A.M.; PETERSÉN, C.; LINDHOLM, E. The Prevalence of ostomy-related complications 1 year after ostomy surgery: A prospective, descriptive, clinical study. **Ostomy Wound Manage**, v.62, n.10, p. 34-48, 2016.

CHAIM, F. M.; DATO, 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.

CHETTY, R.; HAFEZI, S.; MONTGOMERY, E. An incidental enterocolic lymphocytic phlebitis pattern is seen commonly in the rectal stump of patients with diversion colitis superimposed on inflammatory bowel disease. **J Clin Pathol**, v.62, n.5, p.464-467, 2009.

CHRISTL, S.U.; EISNER, H.D.; DUSEL, G.; KASPER, H.; SCHEPPACH, W. Antagonistic effects of sulfide and butyrate on proliferation of colonic mucosa: a potential role for these agents in the pathogenesis of ulcerative colitis. **Dig Dis Sci**, v. 41, n. 12, p. 2477-81, 1996.

COELHO, A.R.; SANTOS, F.S.; DAL POGGETTO, M.T. Stomas changing lives: facing the illness to survive [online]. 2013 [acesso 2021 Abr 17]; 17(2):258-77. Disponível em: http://www.reme.org.br/artigo/detalhes/649.

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

COSKUN, M. Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease. **Front Med (Lausanne)**, v. 1, p. 24, 2014.

CUNHA, F.L.; SILVA, C.M.G.; ALMEIDA, M.G.A.; 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 llex paraguariensis extract. **Acta Cir Bras**, v. 26, n.4; p.289-296, 2011.

CURI, A.; MASCARENHAS, J.C.S.; MOREIRA JUNIOR. H.; ALMEIDA, A.C.; MOREIRA, J.P.T.; AZEVEDO, I.F.; LOUZA, L.R.; MOREIRA, H. Morbimortalidade associada à reconstrução do trânsito intestinal - Análise de 67 casos. **Rev bras Coloproct**, v.22, n.2, p.88-97, 2002.

D'HAENS, G. et al. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. **Lancet**, v. 371, p. 660–67, 2008

DE ANDRADE, V.A.; COY, C.S.R.; FAGUNDES, J.J.; SOARES, P.F.D.C.; SETSUKO AYRIZONO, M.L.; REAL MARTINEZ, C.A. Paraestomal hernia with gastric outlet obstruction: a case report and literature review. **J Surg Case Rep**, v.2018, n.7, p.177, 2018.

DELBEN, A.G.; MARTINEZ, C.A.R.; SATO, D.T.; PEREIRA, J.A.; DOS SANTOS MENDONÇA, R.L.; KANNO, D.T.; DE LOURDES SETSUKO AYRIZONO, M. Evaluation of the effects of biological therapy with infliximabe in an experimental model of diversion colitis. **J Gastrointest Surg**, 2021 Mar 22. Online ahead of print.

DI SABATINO, A.; PENDER, S. JACKSON, C.; PROTHERO, J.; GORDON, J.; PICARIELLO, L. Functional modulation of Crohn's disease myofibroblasts by anti-TNF antibodies. **Gastroenterology**, v. 133, n. 1, p. 137-149, 2007.

FAUNO, L.; RASMUSSEN, C.; SLOTH, K.K.; SLOTH, A.M.; TOTTRUP, A. Low complication rate after stoma closure. Consultants attended 90% of the operations. **Colorectal Dis**, v.14, n.8, p. e409-505, 2012.

FERNANDEZ, O.O.A.; PEREIRA, J.A.; CAMPOS, F.G.; ARAYA, C.M.; MARINHO, G.E.; NOVO, RS.; OLIVEIRA, T.S.; FRANCESCHI, Y.T.; MARTINEZ, C.A.R. Evaluation of enemas containing sucralfate in tissue content of MUC-2 protein in experimental model of diversion colitis. **Arq Bras Cir Dig**, v. 30, n.2, p. 132-138, 2017.

FRANCHINI MELANI, A.G.; CAPOCHIN ROMAGNOLO, L.G. Management of postoperative complications during laparoscopic anterior rectal resection. **Minerva Surg**. 2021 May 4. doi: 10.23736/S2724-5691.21.08890-0. Online ahead of print.

GARGER, A.; HYMAN, N.; OSLER, T. Complications of Hartmann takedown in a decade of preferred primary anastomosis. **Am J Surg**, v.207, n.1, p.60-64, 2014.

GARG, P.K.; GOEL, A.; SHARMA, S.; CHISHI, N.; GAUR, M.K. Protective diversion stoma in low anterior resection for rectal cancer: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Visc Med**, v.35, n.3, p.156-160, 2019.

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.

GESSLER, B.; HAGLIND, E.; ANGETE, E. Loop ileostomies in colorectal cancer patients – morbidity and risk factors for non-reversal. **J Surg Res**, v.178, p. 708-714, 2012.

GIARDIELLO, F.M.; LAZENBY, A.J.; BAYLESS, T.M. The new colitides: collagenous, lymphocytic, and diversion colitis. **Gastroenterol Clin N Am**, 24 (3):717-29, 1995.

GIULIANI, G.; FORMISANO, G.; MILONE, M.; SALAJ, A.; SALVISCHIANI, L.; BIANCHI, P.P. Full robotic Hartmann's reversal: technical aspects and preliminary experience. **Colorectal Dis**, v. 22, n.11, p.1734-1740, 2020

GLOTZER, D. J; GLICK, M. E; GOLDMAN, H. Proctitis and colitis following diversion of fecal stream. **Gastroenterology**, v. 80, n. 3, p. 483-541, 1981.

GRECA, F.H.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; COLLAÇO L.M.; MARTINS V.D.M.; TOLAZZI, A.R.D.; GASPARETTO, E.L., ANDRADE DOS SANTOS, E.A. A ação dos ácidos graxos de cadeia curta na cicatrização de anastomoses colônicas estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, v.15, n. suppl 3, p. 12-16, 2000.

GRECA, F.H; BIONDO-SIMÕES, M.L.P; IOSHI, S.; SANTOS, E.A.A; CHIN, E.W.K. Cicatrização de anastomoses do cólon esquerdo com doença inflamatória: estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 15, p. 41-46, 2000.

GRIFFITHS, A.P.; DIXON, M.F. Microcarcinoids and diversion colitis in a colon defunctioned for 18 years. Report of a case. **Dis Colon Rectum**, v.35, n.7, p.685-688, 1992.

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

GUIMARÃES, D.P.; MANTUAN, L.A.; DE OLIVEIRA, M.A.; JUNIOR, R.L.H.; MAFRA DA COSTA, A.; ROSSI, S.; FAVA, G.; TAVEIRA, L.N.; GIARDINA, K.M.; TALARICO, T.; COSTA, M.; SCAPULATEMPO-NETO, C.; MATSUSHITA, M.; VÉO, C.A.R.; FREGNANI, J.H.T.; REIS, R.M.; HAWK, E.T.; MAUAD, E.C. The performance of colorectal cancer screening in Brazil: the first two years of the implementation program in Barretos Cancer Hospital. **Cancer Prev Res (Phila)**, v.30, p. canprevres.0179.2020, 2020.

GUINDIC, L. C. Aspectos anecdóticos e históricos de las ileostomías y colostomías. **Revista Medica del Hospital General de Mexico**, v. 69, p. 113-118, 2006.

HABR-GAMA, A.; TEIXEIRA, M.G.; VIEIRA, M.J.F.; MILEU, L.F. Operação de Hartmann e suas consequências. **Rev bras Coloproctol.**, v. 17, p. 5-10, 1997.

HALL, J.; HARDIMAN, K.; LEE, S.; LIGHTNER, A.; STOCCHI, L.; PAQUETTE, I.M.; STEELE, S.R.; FEINGOLD, D.L. The American Society of Colon and Rectal Surgeons clinical practice parameters guidelines for the treatment of left-side colonic diverticulitis. **Dis Colon Rectum**, v.63, n.6, p. 728-747, 2020.

HALLAM, S.; MOTHE, B.S.; TIRUMULAJU, R.M.R. Hartmann's procedure, reversal and rate of stoma-free survival. **Ann R Coll Surg Engl**, v.100, n. 4, p.301-307, 2018.

HAMER, H.M.; JONKERS, D.M.; BAST, A.; VANHOUTVIN, S.A.; FISCHER, M.A.; KODDE, A.; TROOST, F.J.; VENEMA, K.; BRUMMER, R.J. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. **Clin Nutr**, v.28. n.1. p.88-93, 2009.

HARIG, J.M.; SOERGEL, K.H.; KOMOROWSKI, R.A.; WOOD, C.M. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. **N Engl J Med**, v.320, n.1, p. 23-38, 1989.

HARTMANN, H. Nouveau procédé d'ablation des cancers de la partie terminale du colon pelvien. Trentieme Congres de Chirurgie; Strasburg, 1921. pp. 411-413.

HARTY, R.F. Energy, oxidative stress, and inflammation in the colon. **Dig Dis Sci**, v. 58, n.12, p. 3386-3388, 2013.

HAAS, P.A.; FOX, T.A.JR.; SZILAGY, E.J. Endoscopic examination of the colon and rectum distal to a colostomy. **Am J Gastroenterol**, v.85, n.7, p.850-854, 1990.

HOLMGREN, D. HULTBERG, D.E.; HAAPAMÄKI, M.M.; MATTHIESSEN, P.; RUTEGÅRD, J.; RUTEGÅRD, M. High stoma prevalence and stoma reversal complications following anterior resection for rectal cancer: a population-based multicentre study. **Colorectal Disease**, v. 19, p. 1067-1075, 2017.

HORESH, N.; LESSING, Y.; RUDNICKI, Y.; KENT, I.; KAMMAR, H.; BEN-YAACOV, A.; DREZNIK, Y.; TULCHINSKY, H.; AVITAL, S.; MAVOR, E.; WASSERBERG, N.; KASHTAN, H.; KLAUSNER, J.M.; GUTMAN, M.; ZMORA, O. Considerations for Hartmann's reversal and Hartmann's reversal outcomes-a multicenter study. **Int J Colorectal Dis**, v.32, n.11, p.1577-1598, 2017.

HORESH, N.; RUDNICKI, Y.; DREZNICK, Y.; ZBAR, A.P.; GUTMAN, M.; ZMORA, O.; ROSIN, D. Reversal of Hartmann's procedure: still a complicated operation. Tech Coloproctol, v.22, n.2, p.81-87, 2018.

HOSSNE, R. S.; COY, C. S. R. Atualização em doenças inflamatórias intestinais: conectando ciência à prática diária. **GEDIIB**-Grupo de Estudos da Doença Inflamatória Intestinal do Brasil, v. 18, 2019.

HUSAIN, S.G.; CATALDO, T.E. Late stomal complications. **Clin Colon Rectal Surg**, v.21, n.1, p.31-40, 2008.

JAMALI, F. R.; SOWEID, A. M.; DIMASSI, H. BAILEY, C.; LEROY, J. MARESCAUS, J. Evaluating the Degree of Difficulty of Laparoscopic Colorectal Surgery. **Arch Surg**, v. 143, n. 8, p. 762-767, 2008.

JØRGENSEN, J.R.; CLAUSEN, M.R.; MORTENSEN, P.B. Oxidation of short and médium chain C2-C8 fatty acids in Sprague-Dawley rat colonocytes. **Gut,** v. 40, n. 3, p. 400-405, 1997.

JØRGENSEN J.B.; ERICHSEN, R.; PEDERSEN B.G.; LAURBERG, S.; IVERSEN, L.H. Stoma reversal after intended restorative rectal cancer resection in Denmark: nationwide population-based study. **BJS Open**, v.4, n.6, p. 1162-1171, 2020.

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

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

KAKIZAWA, N.; TSUJINAKA, S.; MIYAKURA, Y.; KIKUGAWA, R.; HASEGAWA, F.; ISHIKAWA, H.; TAMAKI, S.; TAKAHASHI, J.; RIKIYAMA, T. The surgical treatment of acute and severe diversion colitis mimicking ulcerative colitis: a case report. **Surg Case Rep**, v.4, n.1, p.86, 2018.

KANG, J.H.; KANG, B.M.; YOON, S.N.; KIM, J.Y.; PARK, J.H.; OH, B.Y.; KIM, J.W. Analysis of factors affecting reversal of Hartmann's procedure and post-reversal complications. **Sci Rep**, v.10, n.1, p.16820, 2020.

KARTAL, K.; CITGEZ, B.; KOKSAL, M.H.; BESLER, E.; AKGUN, İ.E.; MIHMANLI, M. Colostomy reversal after a Hartmann's procedure. Effects of experience on mortality and morbidity. **Ann Ital Chir**, v.90, p.539-544, 2019.

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

KIMURA, C.A.; KAMADA, I.; GUILHEM, D.; MONTEIRO, P.S. Quality of life analysis in ostomized colorectal cancer patients. **J Coloproctol (Rio J)**, v.33, n.4, p. 216-221, 2013.

KISSMEYER-NIELSEN, P.; CHRISTENSEN, H.; LAURBERG, S. Diverting colostomy induces mucosal and muscular atrophy in rat distal colon. **Gut**, v.35, n.9, p. 1275-1281, 1994.

KOMOROWSKI, R.A. Histologic spectrum of diversion colitis. **Am J Sur Pathol**, v.14, n.6, p.548-554, 1990.

KORELITZ, B.I.; CHESKIN, L.J.; SOHN, N, SOMMERS S.C. The fate of the rectal segment after diversion of the fecal stream in Crohn's disease: its implications for surgical management. **J Clin Gastroenterol**, v. 7, n. 1, p. 37-43, 1985.

KRISHNAMURTY, D.M.; BLATNIK, J.; MUTCH, M. Stoma complications. **Clin Colon Rectal Surg**, v.30, n.3, p.193-200, 2017.

KRUIDENIER, L.; VERSPAGET, H.W. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease: radicals or ridiculous. **Aliment Pharmacol Ther**, v.16, n.12, p. 1997-2015, 2002.

KUMAR, A.; DAGA, R.; VIJAYARAGAVAN, P.; PRAKASH, A.; SINGH, R.K.; BEHARI, A.; KAPOOR, V.K.; SAXENA R. Anterior resection for rectal carcinoma – risk factors for anastomotic leaks and strictures. **World J Gastroenterol**, v.17, n.11, p.1475-1479, 2011.

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 coloproctol**, v.31, n.2, p.155-164, 2011.

LEAHY, J.; SCHOETZ, D.; MARCELLO, P.; READ, T.; HALL, J.; ROBERTS, P.; RICCIARDI, R. What is the risk of clinical anastomotic leak in the diverted colorectal anastomosis? **J Gastrointest Surg**, v.18, n.10, p.1812-1816, 2014.

LECHNER, G.L.; FRANK, W.; JANTSCH, H.; PICHLER, W.; HALL, D.A.; WANECK, R.; WUNDERLICH, M. Lymphoid follicular hyperplasia in excluded colonic segments: a radiologic sign of diversion colitis. **Radiology**, v.176, n.1, p.135-136, 1990.

LIH-BRODY, L.; POWELL, S.R.; COLLIER, K.P.; REDDY, G.M.; CERCHIA, R.; KAHN, E.; WEISSMAN, G.S.; KATZ, S.; FLOYD, R.A.; MCKINLEY, M.J.; FISHER, S.E.; MULLIN, G.E. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. **Dig Dis Sci**, v.41, n.10, p.2078-2086, 1996.

LIM, A.G.; LANGMEAD, F.L.; FEAKINS, R.M.; RAMPTON, D.S. Diversion colitis: a trigger for ulcerative colitis in the in-stream colon? **Gut**, v.44, n.2, p. 279-282, 1999.

LIM, S.W.; KIM, H.J.; KIM, C.H.; HUH, J.W.; KIM, Y.H.; KIM, H.R. Risk factors for permanent stoma after low anterior resection for rectal cancer. **Langenbecks Arch Surg**, v. 398, p. 259-64, 2013.

LINDGREN, R.; HALLBÖÖK, O.; RUTEGÅRD, J.; SJÖDAHL, R.; MATTHIESSEN, P. What is the risk for a permanent stoma after low anterior resection of the rectum for cancer? A six-year follow-up of a multicenter trial. **Dis Colon Rectum**, v.54, p. 41-47, 2011.

LIU, Q.; SHIMOYAMA, T.; SUZUKI, K.; UMEDA, T.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K. Effect of sodium butyrate on reactive oxygen species generation by human neutrophils. **Scand J Gastroenterol**, v. 36, n.7, p.744-750, 2001.

LODISH, H.; BERK, A., ZIPURSKY, A.L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D.; DARNELL, J. A integração das células nos tecidos. In: Biologia Celular e Molecular. Editora Revinter, 4a. ed., p.985-993, 2002.

LU, E.S.; LIN, T.; HARMS, B.L.; GAUMNITZ, E.A.; SINGARAM, C. A severe case of diversion colitis with large ulcerations. **Am J Gastroenterol**, v.90, n.9, p.1505-1510, 1995.

MA, C.K.; GOTTLIEB, C.; HAAS, P.A. Diversion colitis: a clinicopathologic study of 21 cases. **Hum Pathol**, v.21, n.4, p.429-436,1990.

MALIK, T.A.M.; LEE, M.J.; HARIKRISHNAN, A.B. The incidence of stoma related morbidity – a systematic review of randomised controlled trials. **Ann R Coll Surg Engl**, v.100, n.7, p.501-508, 2018.

MARRES, C.C.M.; VAN DE VEN, A.W.H.; LEIJSSEN, L.G.J.; VERBEEK, P.C.M.; BEMELMAN, W.A.; BUSKENS, C.J. Colorectal anastomotic leak: delay in reintervention after false-negative computed tomography scan is a reason for concern. **Tech Coloproctol**, v.21, n.9, p.790-714, 2017.

MARTIN, S.T.; VOGEL. J.D. Intestinal stomas: indications, management, and complications. **Adv Surg**, v, 46, p 19-49, 2012.

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. **Tese** (Livre-Docência em Cirurgia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MARTINEZ, C.A.; BARTOCCI, P.C.; DO CARMO, C.V.; PEREIRA, J.A.; MIRANDA, D.D.; RIBEIRO, M.L. The effects of oxidative DNA damage and mutations in the p53 protein on cells of the colonic mucosa with and without the fecal stream: an experimental study in rats. **Scand J Gastroenterol**, v.45, n.6, p. 714-724, 2010c.

MARTINEZ, C.A.R.; CAMPOS, F.G.; KANNO, D.T.; MENESESS E.C.; MATIJASCIC, G.M.; GOTO, E.F.K.; PEREIRA, J.A. Enemas with mesalazine increase the tissue contents of mucins in the colonic mucosa devoid of fecal stream. **Acta Cir Bras**, v.34, n.4, p.e201900406, 2019.

MARTINEZ, C.A.; DE ALMEIDA. M.G.; DA SILVA, C.M.; RIBEIRO, M.L.; DA CUNHA, F.L.; RODRIGUES, M.R.; SATO, D.T.; PEREIRA, J.A. Enemas with N-acetylcysteine can reduce the level of oxidative damage in cells of the colonic mucosa diverted from the faecal stream. **Dig Dis Sci**, v.58, n.12, p.3452-3459, 2013.

MARTINEZ, C.A.; DE CAMPOS, F.G.; DE CARVALHO, V.R.; DE CASTRO FERREIRA, 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, 2015.

MARTINEZ, C.A.R.; 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.

MARTINEZ, C.A.R.; KADRI, C.J.; KANNO, D.T.; ALVES JÚNIOR, A.J.T.; COY, C.S.R.; PEREIRA, J.A. Claudin-3 and occludin content in the glands of colonic mucosa devoid from fecal stream submitted to topical intervention with oil extract of Curcuma longa. **Acta Cir Bras**, v.32, n. 1, p.65-73, 2017a.

MARTINEZ, C.A.R.; 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, n.3, p. 231-240, 2010a.

MARTINEZ, C.A.R.; OLIVEIRA, V.P.; CAMPOS, F.G.; KANNO, D.T.; FERNANDEZ, O.O.A.; KADRI, C.J.; PEREIRA, J.A. Influence of the application of enemas with oily extract of curcumin (*Curcuma longa*) on the tissue content of neutral and acidic mucins in the colonic mucosa without fecal stream. J. **Coloproctol (Rio J.)**, v. 37, n.4, p.312-319, 2017b.

MARTINEZ, C.A.R.; RIBEIRO, M.L.; GAMBERO, A.; MIRANDA, D.D.C.; PEREIRA, J.A.; NADAL, S.R. The importance of oxygen free radicals in the etiopathogenesis of diversion colitis in rats. **Acta Cir Bras**, v.25, n.5, p,387-395, 2010b.

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

MATTHIESSEN, P.; HALLBÖÖK, O.; RUTEGÅRD, J.; SIMERT, G.; SJÖDAHL, R. Defunctioning stoma reduces symptomatic anastomotic leakage after low anterior resection of the rectum for cancer: a randomized multicenter trial. **Ann Surg**, v.246, n.2, p.207-214, 2007.

MELLO, R.O.; SILVA, C.M.G.; FONTE, F.P.; SILVA, D.L.F.; PEREIRA, J.A.; MARGARIDO, N.F.; MARTINEZ, C.A.R. Avaliação do número de células caliciformes nas criptas da mucosa colônica com e sem trânsito intestinal. **Rev Col Bras Cir**, v.39, n.2, p.139-145, 2012.

MELOTTI, L.F.; BUENO, Y.M.; SILVEIRA, G.V.; SILVA, M.E.N.; FEDOSSE, E. Characterization of patients with ostomy treated at a public municipal and regional reference center. **J Coloproctol** (Rio J), v. 33, n. 2, p. 70-74, 2013.

MEYER, J.; NAIKEN, S.; CHRISTOU, N.; LIOT, E.; TOSO, C.; BUCHS, N.C.; RIS, F. Reducing anastomotic leak in colorectal surgery: The old dogmas and the new challenges. **World J Gastroenterol**, v.14, n.34, p. 5017-5025, 2019.

MILLAR, A.D.; RAMPTON, D.S.; CHANDER, C.L.; CLAXSON, A.W.; BLADES, S.; COUMBE, A.; PANETTA, J.; MORRIS, C.J.; BLAKE, D.R. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. **Gut**, v.39, n.3, p. 407-415, 1996.

MILLER, E. J.; MATUKAS, V. J. Chick Cartilage Collagen: a New Type of α1 Chain Not Present in Bone or Skin of the Species. **PNAS**, v. 64, n. 4, p. 1264-68, 1969.

MORTENSEN, P.B.; CLAUSEN, M.R. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. **Scand J Gastroenterol Suppl,** v. 216, p. 132-148, 1996.

MOTA, M.S.; GOMES, G.C.; PETUCO, V.M. Repercussões no processo de viver da pessoa com estoma. **Texto Contexto Enferm**, v.21, n.1, p.e1260014, 2016.

MURKEN, D.R.; BLEIER, J.I.S. Ostomy-Related Complications. **Clin Colon Rectal Surg**, v.32, n.3, p.176-182, 2019.

MURRAY, F.E.; O'BRIEN, M.J.; BIRKETT, D.H.; KENNEDY, S.M.; LAMONT, J.T. Diversion colitis: pathologic findings in a resected sigmoid colon and rectum. **Gastroenterology**, v.93, n.6, p.1404-1408, 1987.

NAGELL, C.F.; PEDERSEN, C.R.; GYRTRUP, H.J. Complications after stoma closure. A retrospective study of 11 years' experience. **Ugeskr Laeger**, v. 167, n. 16, p.1742-1745, 2005.

NAITO, Y.; TAKAGI, T.; YOSHIKAWA, T. Neutrophil-dependent oxidative stress in ulcerative colitis. **J Clin Biochem Nutr**. v.41, n.1, p. 18-26, 2007.

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 excluso de trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos. **Rev bras Coloproct**, v.28, n.2, p.306-314, 2008.

NEUT, C.; COLOMBEL, J.F.; GUILLEMOT, F.; CORTOT, A.; GOWER, P.; QUANDALLE, P.; RIBET, M.; ROMOND, C.; PARIS, J.C. Impaired bacterial flora in human excluded colon. **Gut,** v. 30, n. 8, p. 1094-1098, 1989.

NEUT, C.; GUILLEMOT, F.; GOWER-ROUSSEAU, C.; BIRON, N.; CORTOT, A.; COLOMBEL, J.F. Treatment of diversion colitis with shorty-chain fatty acids. Bacteriological study. **Gastroenterol Clin Biol**, v. 19, n. 11, p. 871-875, 1995.

NONOSE, R.; SPADARI, A.P.; PRIOLLI, D.G.; MÁXIMO, F.R.; PEREIRA, J.A.; MARTINEZ, C.A. 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, p.267-275, 2009.

OLIVEIRA, A.J.; PINTO JÚNIOR, F.E.; FORMIGA, M.C.; MELO, S.P.; BRANDAO-NETO, J.; RAMOS, A.M. Comparison of prophylactic and therapeutic use of short-chain fatty acid enemas in diversion colitis: a study in Wistar rats. **Clinics (Sao Paulo)**, v.65, n.12, p. 1352-1356, 2010.

OLIVEIRA-NETO, J.P.; AGUILAR-NASCIMENTO, J.E. Intraluminal irrigations with fibers improve mucosal inflammation and atrophy in diversion colitis. **Nutrition**, v. 20, n 2, p. 197-199, 2004.

ONA, F.V.; BOGER, J.N. Rectal bleeding due to diversion colitis. **Am J Gastroenterol**, v.80, n.1, p.40-41,1985.

ONDER, A.; GORGUN, E.; COSTEDIO, M.; KESSLER, H.; STOCCHI, L.; BENLICE, C.; REMZI, F. Comparison of short-term outcomes after laparoscopic versus open Hartmann reversal: a case-matched study. **Surg Laparosc Endosc Percutan** Tech, v.26, n.4, p.75-79, 2016.

PACHECO, R.G.; ESPOSITO, C.C.; MÜLLER, S.C.M.; CASTELO-BRANCO, M.T.L.; QUINTELLA, L.P.; CHAGAS, V.L.A.; DE SOUSA, H.S.P.; SHANAIDER, A. Use of butyrate or

glutamine in enema solution reduces inflammation and fibrosis in experimental diversion colitis. **World J Gastroenterol**, v.18, n.32, p. 4278-4287, 2012.

PANACCIO, P.; GROTTOLA, T.; PERCARIO, R.; SELVAGGI, F.; CERICOLA, S.; LAPERGOLA, A.; FARRUKH, M.; MARTINO, G.D.; RICCIARDIELLO, M.; DI SEBASTIANO, P.; DI MOLA, F.F. Laparoscopic versus open Hartmann reversal: A case-control study. **Surg Res Pract**, v.23, n.2021, p.4547537, 2021.

PEREIRA, J.A.; 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 (Rio J)**, v. 33, n. 4, p. 182-190, 2013.

PISANO, M.; ZORCOLO, L.; MERLI, C.; CIMBANASSI, S.; POIASINA, E.; CERESOLI, M.; AGRESTA, F.; ALLIEVI, N.; BELLANOVA, G.; COCCOLINI, F.; COY, C.; FUGAZZOLA, P.; MARTINEZ, C.A.; MONTORI, G.; PAOLILLO, C.; PENACHIM, T.J.; PEREIRA, B.; REIS, T.; RESTIVO, A.; REZENDE-NETO, J.; SARTELLI, M.; VALENTINO, M.; ABU-ZIDAN, F.M.; ASHKENAZI, I.; BALA, M.; CHIARA, O.; DE' ANGELIS, N.; DEIDDA, S.; DE SIMONE, B.; DI SAVERIO, S.; FINOTTI, E.; KENJI, I.; MOORE, E.; WEXNER, S.; BIFFL, W.; COIMBRA, R.; GUTTADAURO, A.; LEPPÄNIEMI, A.; MAIER, R.; MAGNONE, S.; MEFIRE, A.C.; PEITZMANN, A.; SAKAKUSHEV, B.; SUGRUE, M.; VIALE, P.; WEBER, D.; KASHUK, J.; FRAGA, G.P.; KLUGER, I.; CATENA, F.; ANSALONI, L. 2017 WSES guidelines on colon and rectal cancer emergencies: obstruction and perforation. **World J Emerg Surg**, v.13, p. 36, 2018.

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

RABAU, M.Y.; HIRSHBERG, A.; HISS, Y.; DAYAN, D. Intestinal anastomosis healing in rat: collagen concentration and histochemical characterization by Picrosirius red staining and polarizing microscopy. **Exp Mol Pathol**, v.62, p. 160-165,1995;.

RÄSÄNEN, M.; RENKONEN-SINISALO, L.; CARPELAN-HOLMSTRÖM, M.; LEPISTÖ, A. Low anterior resection combined with a covering stoma in the treatment of rectal cancer reduces the risk of permanent anastomotic failure. **Int J Colorectal Dis**, v. 30, n. 10, p.1323-1328, 2015.

ROBERTSON, I.; EUNG, E.; HUGHES, D.; SPIRES, M.; DONNELLY, L.; MACKENZIE, I. Prospective analysis of stoma related complications. **Colorectal Dis**, v.7, n.3, p. 279-285, 2005.

ROEDIGER, W.E. The starved colon – diminished mucosal nutrition, diminished absorption, and colitis. **Dis Colon Rectum**, v. 33, n.10, p.858-862, 1990.

ROEDIGER, W.E. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. **Gastroenterology**, v.83, n.2, p. 424-429, 1982.

ROEDIGER, W.E.; NANCE, S. Metabolic induction of experimental ulcerative colitis by inhibition of fatty acid oxidation. **Br J Exp Pathol**, v. 67, n.6, p.773-782,1986.

ROEDIGER, W.E.; RAE, D.A. Trophic effect of short chain fatty acids on mucosal handling of ions by the defunctioned colon. **Br J Surg**, v. 69, n. 1, p. 23-25, 1982.

ROEDIGER, W.E.; TRUELOVE, S.C. Method of preparing isolated colonic epithelial cells (colonocytes) for metabolic studies. **Gut**, v. 20, n. 6, p. 549-557, 1979.

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.

ROQUE-CASTELLANO, C.; MARCHENA-GOMEZ, J.; HEMMERSBACH-MILLER, M.; ACOSTA-MERIDA, A.; RODRIGUEZ-MENDEZ, A.; FARIÑA-CASTRO, R.; HERNANDEZ-ROMERO, J. Analysis of the factors related to the decision of restoring intestinal continuity after Hartmann's procedure. **Int J Colorectal Dis**, p. 22, n.9, p. 1091–1096, 2007.

RUTGEERTS, P. Infliximabe for Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. **N Engl J Med**, v. 353, p. 2462-2476, 2005.

SAKALLIOGLU, A.E.; YAGMURLU, A.; DINDAR, H.; HASIRCI, N.; RENDA, N.; DEVECI, M.S. Sustained local application of low-dose epidermal growth factor on steroid-inhibited colonic wound healing. **J Pediatr Surg**, v.39, p. 591-595, 1994.

SAKR A.; EMILE, S.H.; ABDALLAH, E.; THABET, W.; KHAFAGY, W. Predictive factors for small intestinal and colonic anastomotic leak: a multivariate analysis. **Indian J Surg**, v. 79, p. 555-562, 2017.

SALOMÉ, G.M.; ALMEIDA, S.A. Association of sociodemographic and clinical factors with the self-image and self-esteem of individuals with intestinal stoma. **J Coloproctol (Rio J)**, v. 34, n. 3, p. 159-166, 2014.

SALOMÉ, G.M.; LIMA, J.A.; MUNIZ, K.S.; FARIA, E.C.; FERREIRA, L.M. Health locus of control, body image and self-esteem in individuals with intestinal stoma. **J Coloproctol (Rio J)**, v. 37, n. 3, p. 216-224, 2017.

SALVADALENA, G.D. The incidence of stoma and peristomal complications during the first 3 months after ostomy creation. **J Wound Ostomy Continence Nurs**, v.40, n.4, p.400-406, 2013.

SAVASSI-ROCHA, P.R.; LOPES, R.L.C. Anastomoses intestinais: bases da cicatrização e análise dos diferentes tipos. **Tópicos em Gastroenterologia**, n. 5, p.493-521, 1994.

SCHEPPACH, W.; CHRISTL, S.U.; BARTRAN. H.P.; RICHTER. F.; KASPER, H. Effects of shortchain fatty acids on the inflamed colonic mucosa. **Scand J Gastroenterol,** v. 222, p. 53-57, 1997.

SEO, S.I.; YU, C.S.; KIM, GS.; LEE, J.L.; YOON, Y.S.; KIM, C.W.; LIM, S.B.; KIM, J.C. The role of diverting stoma after an ultra-low anterior resection for rectal cancer. **Ann Coloproctol**, v. 29, n.2, p.66-71, 2013.

SHABIR, J.; BRITTON, D.C. Stoma complications: a literature overview. **Colorectal Dis**, v.12, n.10, p.958-964, 2010.

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

SHIN, U.S.; KIM, C.W.; Y.U.; C.S.; KIM, J.C. Delayed anastomotic leakage following sphincter-preserving surgery for rectal cancer. **Int J Colorectal Dis**, v.25, p. 843-849, 2010.

SHIOMI, A.; ITO, M.; SAITO, N.; HIRAI, T.; OHUE, M.; KUBO, Y.; TAKII, Y.; SUDO, T.; KOTAKE, M.; MORIYA, Y. The indications for a diverting stoma in low anterior resection for rectal cancer: a prospective multicentre study of 222 patients from Japanese Cancer Centers. **Colorectal Dis**, v.13, n. 12; p.1384-1389, 2011.

SIRIMARCO, M.T.; MORAES, B.H.X.; OLIVEIRA, D.R.L.S.; OLIVEIRA, A.G.; SCHLINZ, P.A.F. Thirty years of the health care service for ostomy patients in Juiz de Fora and surroundings. **Rev Col Bras Cir**, v.48, p. e20202644, 2021.

STELTON, S.; ZULKOWSKI, K.; AYELLO, E. Practice Implications for Peristomal Skin Assessment and Care from the 2014 World Council of Enterostomal Therapists International Ostomy Guideline. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 28, n. 6, p. 275-284, 2015.

SYK, I.; MIRASTSCHIJSKI, U.; JEPPSSON, B.W.; AGREN, M.S. Experimental colonic obstruction increases collagen degradation by matrix metalloproteinases in the bowel wall. **Dis Colon Rectum**, v. 46, n.9, p.1251-1259, 2003.

SLOAN, J.M.; DAY, D.W.; TALBOT, I.C.; PRICE, A.B.; JASS, J.R.; SHEPHERD, N.A.; WARREN, B.F.; WILLIANS, G.T. Inflammatory disorders of the large intestine. In. **Morson and Dawson's Gastrointestinal Pathology**. 5<sup>th</sup> edition ed., Chichester, West Sussex, U.K.: Wiley-Blackwell, 2013. p. 472-539.

SON, D.N.; CHOI, D.J.; WOO, S.U.; KIM, J.; KEOM, B.R.; KIM, C.H.; BAEK, S.J.; KIM, S.H. Relationship between diversion colitis and quality of life in rectal cancer. **World J Gastroenterol**, v.19, n.2, p.542-549, 2013.

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

STUMPF, M.; CAO, W.; KLINGE, U.; KLOSTERHALFEN, B.; KASPERK, R.; SCHUMPELICK, V. Collagen distribution and expression of matrix metalloproteinases 1 and 13 in patients with anastomotic leakage after large-bowel surgery. **Langenbecks Arch Surg**, v.386, p.502-506, 2002.

SUENAERT, P.; BULTEEL, V.; LEMMENS, L.; NOMAN, M.; GEYPENS, B.; VAN ASSCHE, G. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. **Am J Gastroenterol**, v. 97, n. 8, p. 2000-4, 2002.

TAN, W.S.; TANG, C.L.; SHI, L.; EU, K.W. Meta-analysis of defunctioning stomas in low anterior resection for rectal cancer. **Br J Surg**, v. 96; n.5, p.462-472, 2009.

TERZI, C.; SEVINÇ, A.I.; KOÇDOR, H.; OKTAY, G.; ALANYALI, H.; KÜPELIOĞLU, A.; ERGÖR, G.; FÜZÜN, M. Improvement of colonic healing by preoperative rectal irrigation with short-chain fatty acids in rats given radiotherapy. **Dis Colon Rectum**, v.47, n.12, p.2184-2194, 2004.

TÖRNQVIST, A.; BLOMQUIST, P.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. The effect of diverting colostomy on anastomotic healing after resection of left colon obstruction. An experimental study in the rat. **Int J Colorectal Dis**, v.5, n.3, p.167-169,1990.

TORRES NETO, J.R.; FAKHOURI. R.; MENEZES, M.V.A.; SANTOS, J.S.; PRUDENTE, A.C.L.; MONTEIRO, J.T.S.; FEITOSA, V.L.C. estudo histomorfométrico de anastomoses primárias de cólon em coelhos, com e sem preparo intestinal. **Rev bras Coloproct**, v.27, n.4, p. 3840390, 2007.

TORRES, U.S.; SATOMI, G.; RONCHI, L.S.; NETINHO, J.G. Infliximabee na doença de Crohn: experiência clínica de um centro terciário Paulista. **Rev bras Coloproct**, v. 29, n., p. 038-045, 2009.

TRUBIAN, P.S. Influência do octreotide na cicatrização de sutura gástrica em ratos: estudo tensiométrico e da morfologia do colágeno [Dissertação]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2004.

TURNBULL, G.B. Ostomy statistics: the \$64,000 question. **Ostomy Wound Manage**, v.49, n.6, p.22-23, 2003.

UDÉN, P.; BLOMQUIST, P.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. Influence of proximal colostomy on the healing of a left colon anastomosis: an experimental study in the rat. **Br J Surg**, v.75, n.4, p.325-329, 1988.

VAN OMMEREN-OLIJVE, S.J.; BURBACH, J.P.M.; FURNÉE, E.J.B.; Dutch Snapshot Research Group. Risk factors for non-closure of an intended temporary defunctioning stoma after emergency resection of left-sided obstructive colon cancer. **Int J Colorectal Dis**, v.35, n.6, p.1087-1093, 2020.

VELAZQUEZ, O.C.; LEDERER, H.M.; ROMBEAU, J.L. Butyrate and colonocyte. Production, absorption, metabolism and therapeutic implications. **Adv Exp Med Biol**, v.427, p.123-134, 1997.

VENTURA, L.A.S. Portaria SUS para pessoas ostomizadas precisa de atualização. Disponível em:https://brasil.estadao.com.br/blogs/vencer-limites/portaria-do-sus-para-pessoas ostomizadas precisa de atualização. Acesso em 16/04/2020.

VERMEULEN, J.; GOSSELINK, M.P.; BUSSCHBACH, J.J.V.; LANGE, J.F. Avoiding or reversing Hartmann's procedure provides improved quality of life after perforated diverticulitis. **J Gastrointest Surg**, v.14, n.4, p.651–657, 2010.

VILLANACCI, V.; TALBOT, I.C.; ROSSI, E.; BASSOTTI, G. Ischaemia: a pathogenetic clue in diversion colitis? **Colorectal Dis,** v. 9, n. 7, p. 601-605, 2007.

WHELAN, R.L.; ABRAMSON, D.; KIM, D.S.; HASHMI, H.F. Diversion colitis: a prospective study. **Surg Endosc**, v.8, n.1, p.19-24,1994.

WHITNEY, S.; GROSS, B.; MUI, A.; HAHN, S.; READ, B.; BAUER, J. Hartmann's reversal: factors affecting complications and outcomes. **Int J Colorectal Dis**, v.35, n.10, p. 1875-1880, 2020.

WINSLET, M.C.; POXON, V.; YOUNGS, D.J.; THOMPSON, H.; KEIGHLEY, M.R. A pathophysiologic study of diversion proctitis. **Surg Gynecol Obstet**, v.177, n. 1, p.57-81, 1993

WONG, N.Y.; EU, K.W. A defunctioning ileostomy does not prevent clinical anastomotic leak after a low anterior resection: a prospective, comparative study. **Dis Colon Rectum**, v.48, p.2076-2079, 2005.

YEONG, M.L.; BETHWAITE, P.B.; PRASAD, J.; ISBISTER, W.H. Lymphoid follicular hyperplasia – a distinctive feature of diversion colitis. **Histopathology**, v.19, n.1, p.55-61, 1991.

ZEMAN M.; CZARNECKI, M.; CHMIELARZ, A.; IDASIAK, A.; GRAJEK, M.; CZARNIECKA, A. Assessment of the risk of permanent stoma after low anterior resection in rectal cancer patients. **World J Surg Oncol**, v. 18, n.1, p. 2017, 2020.

ZHU, Q.Q.; JIANG, Z.N.; JIANG, Q. Clinicopathological features of diversion colitis similar to ulcerative colitis. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**, v.48, n.4, p.321-323, 2019.

#### 8. ANEXOS

### 8.1 Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais em Pesquisa





Bragança Paulista, 31 de Outubro de 2019

Projeto de Pesquisa: "Avaliação dos efeitos da terapia biológica com ANTI\_TNF-α na Colite de

Exclusão: Estudos em ratos".

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

Autores: Profs. Carlos Augusto Real Martinez; José Aires Pereira

Instituição: Universidade São Francisco

Protocolo: 006.10.2019
IP. Ciuca: 200.225.122.34
CIAEP/CONCEA Nº 01.226.2014

Vigência do Projeto: 01/11/2019 - 01/11/2022

Número e Animais: 24 animais Espécie: ratos heterogênicos: Wistar

Peso: 200 a 300gr

Total de Animais: 24 ratos heterogênico: Wistar (Machos)
Procedência do Animal: Biotério/CEMIB - UNICAMP

#### Prezado Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa – CEUA, da Universidade São Francisco analisou em reunião no dia 31/10/2019, o projeto de pesquisa, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

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

#### Parecer: Aprovado

Em resposta à solicitação de projeto de pesquisa utilizados no protocolo 006.10.2019, o Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa (CEUA) da USF. Considerando a proposta encaminhada a Comissão de Ética no Uso de Animal em Pesquisa (CEUA) deliberou parecer favorável.

Thatthat .

Profa. Thalita Rocha

Coordenadora do Comitê de Ética com Uso de Animais de Experimentação Universidade São Francisco

# 9. APÊNDICE

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

## **COLÁGENO TIPO I**

Grupos (colágeno I)	p (Kruskal-Wallis)	Comparações (método de Dunn)
G0P x G1P	0,0015	< 0.05
G0P x G2P	0,0005	< 0.05
G1P x G2P	0,2831	
G0D x G1D	0,0102	< 0.05
G0D x G2D	0,0051	< 0.05
G1D x G2D	0,4306	

Grupos (colágeno I)	p (unilateral) (Mann- Whitney)		p (bilateral) (Mann-Whitney)
G0P x G0D		0,3155	0,631
G1P x G1D		0,0005	0,0011
G2P x G2D	< 0.0001		< 0.0001

# **COLÁGENO TIPO III**

Grupos (colágeno III)	p (Kruskal-Wallis)	Comparações (método de Dunn)
G0P x G1P	0,0007	< 0.05
G0P x G2P	0,0005	< 0.05
G1P x G2P	0,6256	
G0D x G1D	0,0011	< 0.05
G0D x G2D	0,0102	< 0.05
G1D x G2D	0,2211	

Grupos (colágeno III)	p (unilateral) (Mann-Whitney)	p (bilateral) (Mann-Whitney)
G0P x G0D	0,0273	0,0547
G1P x G1D	0,0049	0,0097
G2P x G2D	0,0013	0,0026

# LEGENDA

G0P – grupo controle cólon proximal

- G0D grupo controle cólon distal
- G1P grupo dose 5mg/kg/sem cólon proximal
- G1D grupo dose 5mg/kg/sem cólon distal
- G2P grupo dose 10mg/kg/sem cólon proximal
- G2D grupo dose 10mg/kg/sem cólon distal