

VIVIEL RODRIGO JOSÉ DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO E PADRÃO DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA
CLAUDINA NA MUCOSA CÓLICA COM E SEM TRANSITO INTESTINAL:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Bragança Paulista

2013

VIVIEL RODRIGO JOSÉ DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO E PADRÃO DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA
CLAUDINA NA MUCOSA CÓLICA COM E SEM TRANSITO INTESTINAL:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

Orientador: Prof. Dr. Carlos
Augusto Real Martinez

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

Área de Concentração: Ciências
da Saúde

**Bragança Paulista
2013**

WI 522	Carvalho, Viviel Rodrigo José de.
C329a	Avaliação do conteúdo e padrão de expressão da proteína claudina na mucosa cólica com e sem trânsito intestinal: estudo experimental em ratos / Viviel Rodrigo José de Carvalho. -- Bragança Paulista, 2013. 75 p. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação

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

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

Membros Titulares:

1. Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

2. Prof. Dr. Marcos Antonio Santana Castro

3. Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro


Membros suplentes:

Prof. Dr. Alfredo Luiz Jácomo

Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini

Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco.


CARVALHO R. J., Viviel, "Avaliação do conteúdo e padrão de expressão da proteína claudina na mucosa cólica com e sem trânsito intestinal: estudo experimental em ratos". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em seis de Junho de 2013 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Marcos Antonio Santana Castro
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro
Universidade Estadual de Campinas

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José e Alba que sempre me apoiaram em mais essa caminhada, me dando amor, carinho e me ajudando no enriquecimento como profissional e principalmente humano.

A minha querida e amada irmã Viviam, minha grande amiga e incentivadora.

A minha esposa Adriana, pela compreensão, apoio e parceria durante esta trajetória.

A Carol, pela companhia e amizade.

E principalmente a Deus, Nossa Senhora, Divino Espírito Santo e meu Anjo da Guarda que me concederam o dom da vida, me deram força e coragem e me guardaram sempre, em toda minha vida, me presenteando com mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS

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

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

Aos acadêmicos, pelo inestimável auxílio de leitura dos resultados do experimento;

A **FUNDAÇÃO DE AMPARO E PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP)** pelo apoio financeiro ao projeto.

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

A **UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO**, pela infraestrutura e pela concretização de mais este sonho;

Ao **CENTRO UNIVERSITÁRIO DO SUL DE MINAS – UNIS/MG** na figura do Professor **GUARACY SILVA** pela liberação dos dias que precisei para realização deste trabalho.

RESUMO

Colite de exclusão é o termo empregado para descrever o processo inflamatório que ocorre em segmentos do intestino grosso desprovidos de trânsito intestinal. Estudos mostraram que a inflamação da mucosa cólica decorre da deficiência de ácidos graxos de cadeia curta no interior da luz intestinal, principal substrato energético para o metabolismo das células da mucosa cólica. Já se demonstrou que existem modificações no conteúdo e no local de expressão tecidual de proteínas de adesão celular (E-caderina e β -catenina) em modelo experimental de colite de exclusão, contudo, nenhum estudo avaliou a expressão das proteínas de junções ocludentes ou de exclusão (claudina e ocludina) nos mesmos modelos. **Objetivo:** Mensurar o conteúdo tecidual total de claudina, comparando a mucosa cólica provida e desprovida de trânsito intestinal; avaliar se existem modificações no local de expressão da proteína claudina nas criptas da mucosa cólica comparando segmentos com e sem trânsito intestinal, e verificar a influencia do tempo de exclusão nessa variáveis; **Método:** Quarenta e cinco ratos Wistar machos foram divididos em três grupos experimentais compostos por 15 animais segundo o sacrifício ter sido realizado em 6, 12 e 18 semanas após o procedimento cirúrgico. Em cada grupo experimental utilizando o mesmo animal obtivemos o cólon provido de trânsito intestinal e o cólon desprovido de trânsito intestinal, não sendo necessária a utilização de grupo controle. A quantificação dos níveis teciduais de claudina foi determinada através da graduação em cruzes, feita por três observadores independentes e os resultados conflitantes foram posteriormente analisados em conjunto. Nenhum deles conhecia o local do cólon de onde o material havia sido removido nem a proteína estudada. Para a comparação entre os níveis teciduais de claudina nos segmentos com e sem trânsito fecal utilizamos o teste t de Student e o teste t-pareado. Para análise de variância entre os grupos experimentais utilizamos o teste de ANOVA, estabelecendo-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). **Resultados:** Houve redução no conteúdo tecidual de claudina nos segmentos desprovidos de trânsito fecal, quando comparado aos do cólon com trânsito preservado. Verificou-se que independente do tempo de exclusão considerado não houve influência no conteúdo tecidual total e local da expressão da proteína claudina. **Conclusões:** O conteúdo da proteína claudina nas criptas cólicas de segmentos desprovidos de trânsito fecal é sempre menor em relação aos segmentos providos de trânsito fecal; a proteína claudina aparece em maior quantidade no ápice das criptas da mucosa cólica tanto nos segmentos providos de trânsito intestinal quanto nos desprovidos, mantendo uma expressão praticamente constante na região do fundo das criptas.

Unitermos: Cólon; Colite; Proteína Claudina; Ratos;

ABSTRACT

Diversion colitis is the term used to describe the inflammatory process that occurs in segments of the large intestine without intestinal transit. Studies have shown that inflammation of the colon mucosa results from the deficiency of short-chain fatty acids within the intestinal lumen, the main energy substrate for the metabolism of the cells of the colon mucosa. It has been shown that there are changes in the content and location of tissue expression of cell adhesion proteins (E-cadherin and β -catenin) in an experimental model of colitis exclusion, however, no study has assessed the expression of proteins or junctions occludentes exclusion (and claudin occludina) in the same models. **Objective:** To measure total tissue content of claudin comparing the colonic mucosa provided and devoid of intestinal transit, assess whether there are changes in the location of claudin protein expression in the crypts of the colon mucosa comparing segments with and without intestinal transit, and check the influence of time of this exclusion variables; **Method:** Forty-five male Wistar rats were divided into three experimental groups consisting of 15 animals according to the sacrifice was performed at 6, 12 and 18 weeks after surgery. In each group using the same experimental animals obtained the colon provided with bowel and colon devoid of intestinal transit, it is not necessary to use the control group. Quantification of the tissue levels of claudin was determined by undergraduate crosses, made by three independent observers and the conflicting results were subsequently analyzed together. Neither knew the location of the colon where material has been removed or the protein studied. To compare tissue levels of claudin segments with and without fecal stream used the Student t test and paired t-test. For analysis of variance between experimental groups used the ANOVA test, establishing a significance level of 5% ($p < 0.05$). **Results:** There was a reduction in tissue content of claudin segments without fecal stream, compared to the colon with transit preserved. It was found that independent of time exclusion considered to have no influence on the contents and location of total tissue protein expression claudin. **Conclusions:** The content of claudin protein in colon crypts segments without fecal stream is always lower than in segments with fecal stream; claudin protein appears in greater quantity at the apex of the crypts of the colon mucosa in both segments with intestinal transit as lacking in maintaining a substantially constant expression in the fundus of the crypts.

Keywords: Colon; Colitis; Claudin Protein; Rats;

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
CAR	Receptor de Coxsackievirus e Adenovirus
CCR	Câncer de Colorretal
CE	Colite de Exclusão
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
F	French
GAP	Junções Comunicantes
HE	Hematoxilina-Eosina
JAM	Moléculas de Adesão Juncional
Mg	Miligramas
ML	Mililitros
Mm	Milímetros
PBS	Tampão Fosfato
RLO	Radicais Livres de Oxigênio
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Junções Celulares. Modificado de Alberts et al., 2004.....	15
FIGURA 2 – Junções Ocludentes. Modificado de Alberts et al., 2004.....	16
FIGURA 3 – Claudinas e Ocludinas. Alberts et al., 2004.....	17
FIGURA 4 – Organograma dos grupos experimentais, 45 ratos divididos em três grupos com 15 ratos cada grupo.....	19
FIGURA 5 – Técnica operatória e resultado do pós-operatório nos ratos de 6, 12 e 18 semanas. Local da secção na placa de Peyer (seta branca).....	22
FIGURA 6 – Expressão da proteína claudina em segmentos cólicos providos de trânsito de animal submetido à exclusão fecal por 12 semanas.....	27
FIGURA 7 – Expressão da proteína claudina em segmentos cólicos desprovidos de trânsito de animal submetido à exclusão fecal por 12 semanas.....	28
FIGURA 8 – Expressão de claudina no ápice e no fundo da cripta nos animais do grupo de 6 semanas no cólon provido de trânsito.....	28
FIGURA 9 – Expressão de claudina no ápice e no fundo da cripta nos animais do grupo de 6 semanas no cólon desprovido de trânsito.....	29
FIGURA 10 – Expressão de claudina no ápice das criptas entre os cólons providos e desprovidos de trânsito após 6 semanas.....	30
FIGURA 11 – Expressão de claudina no fundo das criptas entre os cólons providos e desprovidos de trânsito após 6 semanas.....	30
FIGURA 12 – Expressão de claudina no ápice e fundo das criptas nos cólons providos de trânsito intestinal após 12 semanas.....	31
FIGURA 13 – Expressão de claudina no ápice e fundo nos animais do grupo de 12 semanas no cólon desprovido de trânsito.....	32
FIGURA 14 – Expressão de conteúdo de claudina no ápice das criptas entre os cólons providos e desprovidos de trânsito após 12 semanas.....	32
FIGURA 15 – Expressão do conteúdo de claudina no fundo das criptas entre os cólons providos e desprovidos de trânsito após 12 semanas.....	33

FIGURA 16 – Expressão do conteúdo de claudina no ápice e fundo nos animais do grupo de 18 semanas no cólon provido de trânsito intestinal.....	33
FIGURA 17 – Expressão do conteúdo de claudina no ápice e fundo nos animais do grupo de 18 semanas no cólon desprovido de trânsito intestinal.....	34
FIGURA 18 – Expressão do conteúdo de claudina no ápice das criptas entre cólons providos e desprovidos de trânsito após 18 semanas.....	35
FIGURA 19 – Expressão de conteúdo de claudina no fundo das criptas entre cólons providos e desprovidos de trânsito após 18 semanas.....	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Colite de Exclusão	7
2.2 Etiopatogenia da CE	7
2.3 Quadro Clínico (Sinais e Sintomas)	8
2.4 Diagnóstico	8
2.5 Aspectos macro e microscópios da colite de exclusão	8
2.6 Alterações histopatológicas da colite de exclusão	9
2.7 Estudos sobre colite de exclusão	9
2.8 Modelos experimentais de colite de exclusão	10
2.9 Junções Celulares	14
2.9.1 Junções bloqueadores ou ocludentes	15
2.9.1.1 Claudinas	16
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Animais de experimentação	19
4.2 Grupos experimentais	19
4.3 Etapa pré-operatória	20
4.4 Anestesia	20
4.5 Técnica operatória	20
4.6 Pós-operatório	21
4.7 Sacrifício dos animais	22
4.8 Confeção dos blocos de parafina e lâminas	23
4.9 Técnicas de coloração	23
4.10 Técnica imunoistoquímica (claudina)	24
4.11 Avaliação histológica	25
4.12 Análise da expressão tecidual da claudina	25
4.13 Método estatístico	26
5 RESULTADOS	27
5.1 Expressão e conteúdo tecidual de claudina	27
5.2 Intensidade de expressão da proteína claudina segundo o local da cripta	28

5.3	Variações segundo o tempo de exclusão.....	36
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÕES	45
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	46
	FONTES CONSULTADAS	57
	ANEXOS.....	59
	ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa (CEUAP) da Universidade São Francisco, Bragança Paulista	59
	ANEXO II – RESULTADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS - 06 SEMANAS (3 Examinadores)	60
	ANEXO III – RESULTADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS - 12 SEMANAS (3 Examinadores)	62
	ANEXO IV – RESULTADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS - 18 SEMANAS (3 Examinadores)	64

1. INTRODUÇÃO

No final do século passado demonstrou-se que o câncer colorretal (CCR) tinha sua origem relacionada a modificações funcionais das células epiteliais decorrentes de alterações estruturais do DNA (Fearon e Vogelstein, 1990). Estudos demonstraram que a agressão inflamatória constante à mucosa cólica, tal como acontece nos portadores de colite, representa o mecanismo desencadeante mais importante para as mutações relacionadas ao CCR (Pravda, 2005).

A manutenção da integridade do trato gastrointestinal, permanentemente exposto à flora bacteriana patogênica, depende do estabelecimento e preservação de dois compartimentos distintos e separados, representados pelo lume intestinal e o meio interno (Clayburgh et al., 2004; Watson et al., 2005; Laukoetter et al., 2008).

As células epiteliais da mucosa cólica são mantidas unidas umas às outras e à lâmina basal, por complexos mecanismos de adesão celular. Esse sistema deve ser permeável a nutrientes e outras moléculas, importantes para o crescimento e desenvolvimento das células e, ao mesmo tempo, impedir a invasão do meio interno por bactérias e antígenos existentes na luz intestinal (Laukoetter et al., 2008).

A camada epitelial da mucosa cólica constitui-se em uma das mais perfeitas barreiras funcionais conhecida nos organismos vivos separando a luz intestinal com grande concentração bacteriana, das camadas estéreis que formam a parede intestinal (Pravda, 2005). A barreira mucosa é composta por diversos mecanismos de defesa contra a invasão bacteriana, representados pela camada de muco que recobre a superfície epitelial, firmes junções intercelulares, proteínas de adesão celular e membrana basal (Pravda, 2005; Gaudier e Hoebler, 2006).

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

Essas barreiras fisiológicas citadas anteriormente encontram-se danificadas nas fases iniciais das colites, sugerindo que o comprometimento desses sistemas de

defesa, precede a infiltração neutrofílica que caracteriza a doença (Dogan et al., 1995; Jankowski et al., 1998; Parrish et al., 1999; Martinez et al., 2010).

As células do epitélio cólico aderem umas às outras e à matriz extracelular por proteínas de superfície conhecidas como moléculas de adesão celular. As moléculas protéicas que formam o complexo de adesão celular são as principais responsáveis pela manutenção da permeabilidade seletiva do epitélio intestinal (Laukoetter et al., 2008).

Esse complexo é formado por três tipos de junções intercelulares: as junções bloqueadoras, também conhecidas como junções de oclusão ou íntimas; as junções de ancoramento ou aderentes e as junções comunicantes ou eletrotônicas (Alberts et al., 2004). Cada junção é composta por proteínas com funções específicas que atravessam as membranas plasmáticas e se fixam a proteínas componentes do citoesqueleto celular. As junções especializadas não só mantêm as células epiteliais firmemente aderidas, como possibilitam ainda, a comunicação funcional entre elas. Este sistema de comunicação permite que as células precursoras localizadas na zona germinativa sejam constantemente informadas do índice de apoptose nas células situadas na superfície das glândulas em constante descamação. Modificações no conteúdo e na estrutura química das proteínas que formam o complexo de junções intercelulares foram descritas em doentes com colite ulcerativa (Ozawa; et al., 1990; Schimitz et al., 1999; Usami et al., 2006).

Os mecanismos moleculares que determinam a quebra de junções aderentes, rompendo a barreira funcional nos doentes com colite ainda não foram totalmente esclarecidos. A teoria de indução da colite por radicais livres de oxigênio (RLO) foi proposta para explicar os fenômenos moleculares que desencadeiam a lesão da barreira epitelial e possibilitam a infiltração neutrofílica da mucosa cólica (Pravda, 2005).

A teoria de indução da colite por RLO consiste em duas fases distintas no dano à barreira epitelial, chamadas, respectivamente, indução e propagação.

Na fase de indução, a lesão à barreira epitelial é ocasionada por RLO formados em excesso pelas próprias células epiteliais com modificação no seu metabolismo energético (Pravda, 2005). Alterações nas reações celulares de redução da molécula de oxigênio e água (H_2O), durante a fosforilação oxidativa mitocondrial, produzem grandes quantidades de RLO. Como são moléculas tóxicas

para as células, por danificarem membranas e organelas celulares, os RLO podem romper as diferentes linhas de defesa que formam a barreira epitelial e, em particular, as junções aderentes (Grisham et al., 1990; Sheridan et al., 1996; Sousa et al., 2008; Nonose et al., 2009; Martinez et al., 2010; Kadri, 2010; Fabris, 2011).

Com a ruptura da barreira epitelial possibilita-se a penetração de bactérias do lume cólico para a intimidade da camada submucosa estéril (Pravda, 2005). Com objetivo de combater a infiltração bacteriana do meio interno estéril, neutrófilos migram para o local, levando às alterações inflamatórias que caracterizam a doença (Kucharzik et al., 2001; Pravda, 2005).

A fase de propagação somente tem início após a quebra da barreira funcional e a migração neutrofílica. Nesta fase, a contínua infiltração bacteriana, aumenta a quimiotaxia de neutrófilos, as quais, liberam citocinas, mediadores inflamatórios, enzimas proteolíticas e produzem maior quantidade de RLO, agravando e perpetuando o dano tecidual (Pravda, 2005).

Estudos experimentais confirmaram o potencial tóxico dos RLO à barreira epitelial ao mostrarem que a exposição da mucosa cólica a pequenas concentrações de H₂O₂ provoca alterações histológicas semelhantes às encontradas na colite ulcerativa humana (Sheehan e Brynjolfsson, 1960; Schwartz et al., 1995; Marques et al., 2010).

Com o advento de programas de análise de imagem assistida por computador, estudos demonstraram a possibilidade de se determinar, de forma objetiva, diferentes parâmetros histológicos como, por exemplo, a expressão tecidual de diversas proteínas existentes na parede cólica (Biondo-Simões, et al., 2000; Martinez et al., 2002; Priolli et al., 2003; Priolli et al., 2007).

Os estudos avançaram e novos modelos experimentais de colite de exclusão (CE) capazes de assegurar a completa eliminação de resíduos fecais no segmento intestinal excluído de trânsito surgirão (Margarido et al., 2003; Nasri et al., 2003; Nasri et al., 2008; Sousa et al., 2008). Estudos histológicos realizados nos segmentos excluídos de trânsito quando se adota esses novos modelos vêm demonstrando as mesmas alterações histológicas encontradas nos enfermos que convivem com a enfermidade (Sousa et al., 2008; Nasri et al., 2008).

Pesquisas realizadas dentro do nosso grupo de estudo, demonstraram que em pacientes com CE, apresentam alterações nas proteínas que formam as junções

aderentes (E-caderina e β - catenina) (Kadri, 2010; Fabris, 2011). Até o momento nenhum estudo avaliou as alterações das proteínas das junções de oclusão (claudina) num modelo de CE, algo que torna nosso estudo inédito.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Colite de Exclusão

Em 1981 foi descrita, pela primeira vez, uma enfermidade denominada colite de exclusão (CE) (Glotzer et al., 1981). Apresentada sem etiopatogenia esclarecida, a CE foi definida como um processo inflamatório que surgia na mucosa cólica de segmentos desprovidos de trânsito intestinal, após a realização de operação de derivação intestinal, em doentes que não apresentavam doença inflamatória intestinal preexistente. Desde então, esta enfermidade vem sendo reconhecida com maior frequência (Geraghty e Talbot, 1991; Habr-Gama et al., 1997).

A incidência da CE pode ser ainda maior que o referido pela literatura ao constatar-se, em revisões de casuística, que o trânsito intestinal somente é restabelecido em 18,3% dos enfermos com colostomia temporária condenando o restante dos enfermos a conviverem pelo resto de suas vidas com a doença (Habr-Gama et al., 1997).

Nos doentes cujo trânsito intestinal é restabelecido, o tempo médio para a reconstituição do trânsito é de nove meses, podendo chegar até sessenta meses tempo este mais do que suficiente para o desenvolvimento da CE (Habr-Gama et al., 1997).

2.2 Etiopatogenia da CE

As bases etiopatogênicas para o desenvolvimento da CE ainda não se encontram totalmente esclarecidas. Já se levou em consideração que a enfermidade possa ter origem nas mudanças na quantidade e características da flora bacteriana (Keli et al., 1997 Villanacci et al., 2007), com redução da população bacteriana e predomínio de bactérias redutoras de nitrato (Neut et al.,1989; .Neut et al., 1997), ou se deva ao quadro isquêmico , por fatores inflamatórios liberados durante o sofrimento mucoso (Villanacci et al., 2007). Contudo, os pesquisadores em sua maioria, propõem que a doença surja em decorrência da deficiência de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) na luz intestinal, ocasionada pela derivação do trânsito fecal (Roediger, 1982; Roediger, 1990; Neut et al.,1995; Giardiello et al., 1995; Mortensen e Clausen, 1996; Christl et al., 1996; Scheppach et al.,1997; Cook e Selin, 1998; Kiely et al.,2001; Oliveira-Neto e Aguilar- Nascimento, 2004).

2.3 Quadro Clínico (Sinais e Sintomas)

A sintomatologia da CE é variável e mostra-se diretamente relacionada ao tempo decorrido desde a confecção do estoma derivativo e à extensão da mucosa cólica excluída de trânsito (Glotzer et al., 1981; Sousa et al., 2008). No começo da CE, o paciente pode evoluir assintomático, pois o comprometimento da mucosa é menor (Lu et al., 1995; Keli et al., 1997). Os doentes com maior tempo de evolução e comprometimento intestinal mais extenso são sintomáticos apresentando dor abdominal, tenesmo e eliminação de sangue e muco pelo segmento excluído (Ona e Boger, 1985). O aparecimento de estenoses colorretais, úlceras perianais e fístulas pode ocorrer mais raramente, sobretudo quando o reto é o segmento mais comprometido (Korelitz et al., 1985; Ona e Boger, 1985).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da CE geralmente é feito pelo exame endoscópico e estudo histopatológico da mucosa excluída de trânsito, no entanto, o enema opaco com a técnica do duplo contraste, possibilita o diagnóstico de hiperplasia linfóide folicular, alteração encontrada na CE em mais de 80% dos doentes (Lechner et al., 1990). O exame endoscópico do segmento excluído de trânsito encontra-se alterado em até 90% dos portadores de CE, podendo atingir 100% após 36 meses de exclusão (Ferguson e Siegel, 1991; Haas et al., 1990).

2.5 Aspectos macro e microscópios da colite de exclusão

Macroscopicamente, a mucosa apresenta-se hiperemiada, congesta, friável, com apagamento dos vasos sanguíneos da submucosa e sangramento espontâneo ao mínimo contato do endoscópio (Lechner et al., 1990). Nos doentes muito sintomáticos, encontram-se úlceras aftóides na mucosa cólica, macroscopicamente indistinguíveis daquelas encontradas na colite ulcerativa, tornando problemático o diagnóstico diferencial (Lusk et al., 1984; Geraghty e Charles, 1994; Lu et al., 1995).

As alterações microscópicas diferem quando se compara os resultados de diferentes estudos, provavelmente pela falta de uniformidade em relação à doença de base que motivou a derivação fecal e, principalmente, pelas diferenças no tempo transcorrido desde a exclusão intestinal (Sousa et al., 2008). Estudos em seres humanos e em modelos experimentais de CE mostraram redução na espessura da

camada mucosa, à custa de atrofia das criptas intestinais, bem como modificações na espessura das demais camadas da parede cólica (Ma et al., 1990; Biondo-Simões et al., 2000; Lopes-Paulo, 2002; Sousa et al., 2008).

2.6 Alterações histopatológicas da colite de exclusão

Embora a CE tenha sido descrita pela primeira vez há mais de três décadas, seus aspectos histopatológicos ainda permaneceram obscuros (Murray et al., 1987; Pinto Júnior et al., 2007).

As principais alterações histopatológicas encontradas na CE relacionam-se a presença de graus diferentes de inflamação da parede cólica (Geraghty e Talbot, 1991; Kieli et al., 2001; Sousa et al., 2008). Estudos realizados em portadores de CE apresentam resultados controversos, demonstrando que a doença cursa com uma variedade de alterações histológicas, não existindo, entretanto, padrão característico (Geraghty e Talbot, 1991).

As alterações mais comuns incluem erosões ou ulcerações da mucosa, processo inflamatório crônico inespecífico, hiperplasia linfóide nodular difusa, criptite, infiltrado inflamatório na lâmina própria, depleção de mucinas no epitélio mucoso, atrofia das criptas cólicas e, mais raramente, displasias teciduais (Geraghty e Talbot, 1991; Kieli et al., 2001; Sousa et al., 2008). A hiperplasia linfóide é considerada a alteração histológica mais característica (Murray et al., 1987; Komorowski et al., 1990; Yeong et al., 1991; Drut et al., 1992). Estas alterações parecem aumentar de intensidade à medida que progride o tempo de exclusão e, podem ser revertidas após o restabelecimento do trânsito intestinal (Kieli et al., 2001, Sousa et al., 2008; Nonose et al., 2009; Martinez et al., 2010).

2.7 Estudos sobre colite de exclusão

Mostrou-se em uma série de estudos seqüenciais que os mecanismos de lesão ao epitélio mucoso na CE, encontram-se relacionados ao estresse oxidativo decorrente da produção aumentada de RLO pelas células epiteliais carentes de AGCC (Martinez et al., 2007; Longatti et al., 2010; Martinez et al., 2010c). Os resultados encontrados sugerem, em última análise, que o estresse oxidativo pode ocasionar quebra da função da barreira epitelial, favorecendo o surgimento da colite. A melhora significativa do padrão histológico da CE, após administração de enemas

com AGCC ou ácido 5 aminosalicílico (5-ASA), um potente antioxidante, no segmento excluído parece reforçar essas evidências (Nobels et al., 1989; Caltabiano et al., 2010).

A maioria dos estudos publicados avaliando as alterações histopatológicas da CE tem sido feitos em casuísticas humanas, o que torna difícil análise uniforme, pois, a doença de base, as diferentes técnicas cirúrgicas utilizadas e o tempo de exclusão do trânsito variam de forma significativa em cada publicação (Biondo-Simões, 2000). A falta de uniformidade na descrição dos diferentes aspectos histopatológicos encontrados na CE, além da casuística heterogênea, torna problemático o estabelecimento de um padrão histopatológico peculiar. Não obstante as evidências conhecidas até a presente data, poucos estudos avaliaram a CE de modo experimental, existindo questionamentos quanto às alterações encontradas na parede cólica e sua relação com o tempo de exclusão de trânsito (Keli et al., 1997, Biondo-Simões, 2000; Lopes-Paulo, 2002; Sousa et al., 2008). Na maioria dos estudos, a interpretação das alterações histológicas encontradas é feita de forma subjetiva, portanto, dependentes da experiência do patologista na avaliação dos espécimes estudados (Lopes-Paulo, 2002).

2.8 Modelos experimentais de colite de exclusão

Revisando a literatura, encontram-se vários modelos experimentais de CE. A maioria deles utiliza diferentes técnicas para realizar a derivação intestinal, bem como adota diferentes períodos de exclusão de trânsito para avaliar o desenvolvimento da doença.

Kissmeyer-Nielsen et al., (1994), utilizando ratos, realizaram a derivação intestinal através da confecção de colostomia em dupla boca exteriorizada em uma única abertura na parede abdominal. Não descreveram nenhum cuidado em relação ao emprego de preparo mecânico no segmento cólico excluído de trânsito. Sacrificaram os animais 1, 2, 4 e 12 semanas após o procedimento, e a análise estereológica para mensurar diferentes aspectos da parede cólica, comparando segmentos providos e desprovidos de trânsito nos diferentes períodos de exclusão fecal. Encontraram redução significativa da espessura da camada mucosa bem como de seu peso. Demonstraram ainda, redução no número de células da camada epitelial por menor capacidade proliferativa das células da base das criptas.

Keli et al., (1997) utilizando o rato como modelo experimental, realizaram a derivação intestinal pela confecção de colostomia no cólon sigmóide proximal e a exteriorização do cólon distal como fístula mucosa. Os autores preferiram utilizar este tipo de procedimento, pois acreditavam que ele assegurava maior eficácia na exclusão fecal. Não descreveram qualquer cuidado tomado em relação à limpeza mecânica do segmento distal excluído. Sacrificaram os animais imediatamente, 06 e 17 semanas após a operação. Não encontraram modificações na população de células caliciformes comparando segmentos com e sem trânsito intestinal.

Pinto Júnior et al., (1999) com o objetivo de criar um modelo experimental de CE, dividiram 65 ratos em 13 grupos experimentais segundo a data do sacrifício. Também não descreveram qualquer cuidado tomado em relação ao preparo mecânico do cólon excluído. Realizaram a derivação intestinal pela técnica de Hartmann. Encontraram redução estatisticamente significativa da espessura da mucosa cólica a partir do 40º dia do pós-operatório. Concluíram que a colostomia desfuncionalizante realizada em ratos reproduz alterações histopatológicas compatíveis com a CE, e que estas alterações eram reversíveis após a reconstrução do trânsito intestinal.

Biondo-Simões et al., (2000) utilizando o rato como animal de experimentação realizaram a derivação do trânsito fecal no cólon esquerdo, através da operação de Hartmann. Não tomaram qualquer cuidado com relação à limpeza mecânica do cólon excluído. Sacrificaram os animais 01, 02, 04 e 08 semanas após a derivação intestinal.

Avaliaram as alterações histológicas da parede cólica, comparando segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal pela coloração hematoxilina-eosina (HE) e concluíram que existia atrofia da mucosa, formação de úlceras com reação inflamatória discreta.

Lopes-Paulo (2002) realizou, em ratos, a derivação fecal através da confecção de colostomia em alça no cólon esquerdo. Da mesma forma, o autor não descreveu qualquer método de preparo mecânico no segmento intestinal excluído de trânsito. Sacrificou os animais imediatamente e após quatro semanas da intervenção cirúrgica.

Com o emprego de análise estereológica verificou redução significativa da espessura das criptas cólicas e do volume parcial da mucosa, após quatro semanas, entretanto não quantificou a população de células caliciformes.

Margarido et al., propuseram em 2003, um novo modelo experimental de CE onde preconizavam, de maneira rotineira, o preparo mecânico do segmento cólico a ser excluído de trânsito. Os autores chamavam à atenção, pela primeira vez, para a necessidade de eliminar todo o conteúdo fecal do segmento excluído de trânsito como uma etapa fundamental para a adequada interpretação das alterações histológicas encontradas em modelos experimentais de CE.

Nasri et al., (2003) com o objetivo de validar esse novo modelo experimental de CE, confirmaram a necessidade de realizar o preparo mecânico do cólon a ser excluído de trânsito. Os autores ressaltaram que a omissão desse cuidado não permite assegurar que o cólon distal fique completamente livre de resíduos fecais, o que pode interferir no desenvolvimento da CE pela manutenção de um substrato fecal, rico em AGCC, nutrindo a mucosa cólica do segmento excluído de trânsito.

Pinto Júnior et al., (2007), com o objetivo de avaliar a translocação bacteriana em segmentos excluídos de trânsito fecal, utilizaram o rato como animal de experimentação. Realizaram a derivação intestinal por meio de colostomia terminal no cólon proximal e fechamento do coto distal do cólon. Descreveram o emprego de preparo mecânico antes da realização da colostomia através da infusão de solução salina pelo ânus.

Dividiram os animais em quatro grupos experimentais, segundo o tipo de intervenção realizada no segmento excluído de trânsito (infusão retal de solução salina e soluções com concentrações crescentes de *Escherichia coli*). Concluíram que apesar da derivação intestinal determinar alterações importantes na função de barreira exercida pelo epitélio cólico, não se pode, relacionar a maior possibilidade de translocação bacteriana.

Nasri et al., (2008) avaliaram a influência da infusão de soluções ricas em AGCC nas alterações histológicas da parede cólica em modelo experimental de CE. Utilizaram o rato como modelo experimental e realizaram a derivação intestinal por meio de colostomia proximal terminal e fístula mucosa distal. Dividiram 30 animais em três grupos experimentais, segundo a irrigação com a solução nutricional ter sido realizada pela infusão de solução salina a 0,9% (grupo controle), solução de glicose

a 50% ou solução de AGCC (butirato, acetato e propionato na proporção 3:2:1). Utilizaram de maneira rotineira o preparo mecânico anterógrado do cólon a ser excluído de trânsito, através da infusão de soro fisiológico pela fístula mucosa distal. Os enemas com as soluções de intervenção foram realizados no 04^o, 08^o, 12^o, 16^o e 20^o pós-operatório. Sacrificaram todos os animais no 21^o pós-operatório. Encontraram redução significativa na altura das criptas cólicas; entretanto, a atrofia era menor nos animais tratados com soluções de AGCC quando comparados aos tratados com glicose hipertônica. Verificaram menor congestão vascular e infiltrado inflamatório nos animais tratados com AGCC. Destacaram a importância dos AGCC na melhoria das alterações encontradas na superfície epitelial da mucosa cólica com CE.

Sousa et al., (2008) mensuraram por morfometria computadorizada as alterações na espessura das diferentes camadas da parede cólica, congestão vascular, infiltrado celular segundo escala de inflamação, e presença de células caliciformes em modelo experimental de CE. Realizaram a derivação intestinal do cólon esquerdo por colostomia proximal terminal e fístula mucosa distal. Utilizaram de maneira rotineira o preparo mecânico anterógrado do cólon excluído pela fístula mucosa distal com infusão de solução salina a 0,9% na temperatura de 37°C. Dividiram os animais em três grupos experimentais segundo o sacrifício ter sido realizado 06, 12 e 18 semanas após a operação. Constataram que a população de células caliciformes no segmento desprovido de trânsito aumentava com o decorrer do tempo de exclusão.

Depreende-se da literatura que a maioria dos modelos experimentais de CE, utilizou diferentes períodos de exclusão de trânsito para avaliar as alterações histológicas descritas, o que dificulta a interpretação dos resultados. A maioria deles não utilizou o preparo mecânico no segmento a ser excluído de trânsito, o que poderia modificar os resultados encontrados.

Diante de todos esses modelos experimentais e os resultados encontrados com os mesmos, nosso grupo de estudo vem adotando o modelo de colite de exclusão de Sousa et al., (2008), tendo publicado vários estudos e mostrando que padronizando este período de exclusão (6, 12 e 18 semanas), os animais desenvolvem colite após a sexta semana, tendo um agravamento rápido no decorrer do tempo de exclusão, sendo possível avaliar o comportamento das proteínas que

compõem a barreira fisiológica do epitélio cólico, destacando as junções celulares (Nonose et al., 2009; Martinez et al., 2010).

2.9 Junções Celulares

De acordo com Alberts et al., (2004) no epitélio intestinal, o espaço entre as células vizinhas precisa estar bem selado, impedindo que o fluido extracelular extravase. Também é importante que a união entre essas células suporte tensões sem se romper. Por último, já que as células de um tecido atuam de modo integrado, é importante que haja comunicação e cooperação metabólica entre elas. As junções celulares são áreas especializadas da membrana plasmática que são classificadas em três grupos, de acordo com a função que desempenham:

- Junções bloqueadoras ou ocludentes: selam as células adjacentes em uma camada epitelial, impedindo a passagem de substâncias entre o epitélio;
- Junções aderentes ou de ancoragem: conectam mecanicamente as células adjacentes e a matriz extracelular por meio do citoesqueleto;
- Junções comunicantes: permitem a passagem de sinais elétricos ou químicos entre as células adjacentes, formando junções conhecidas como *gap* ou fenda.

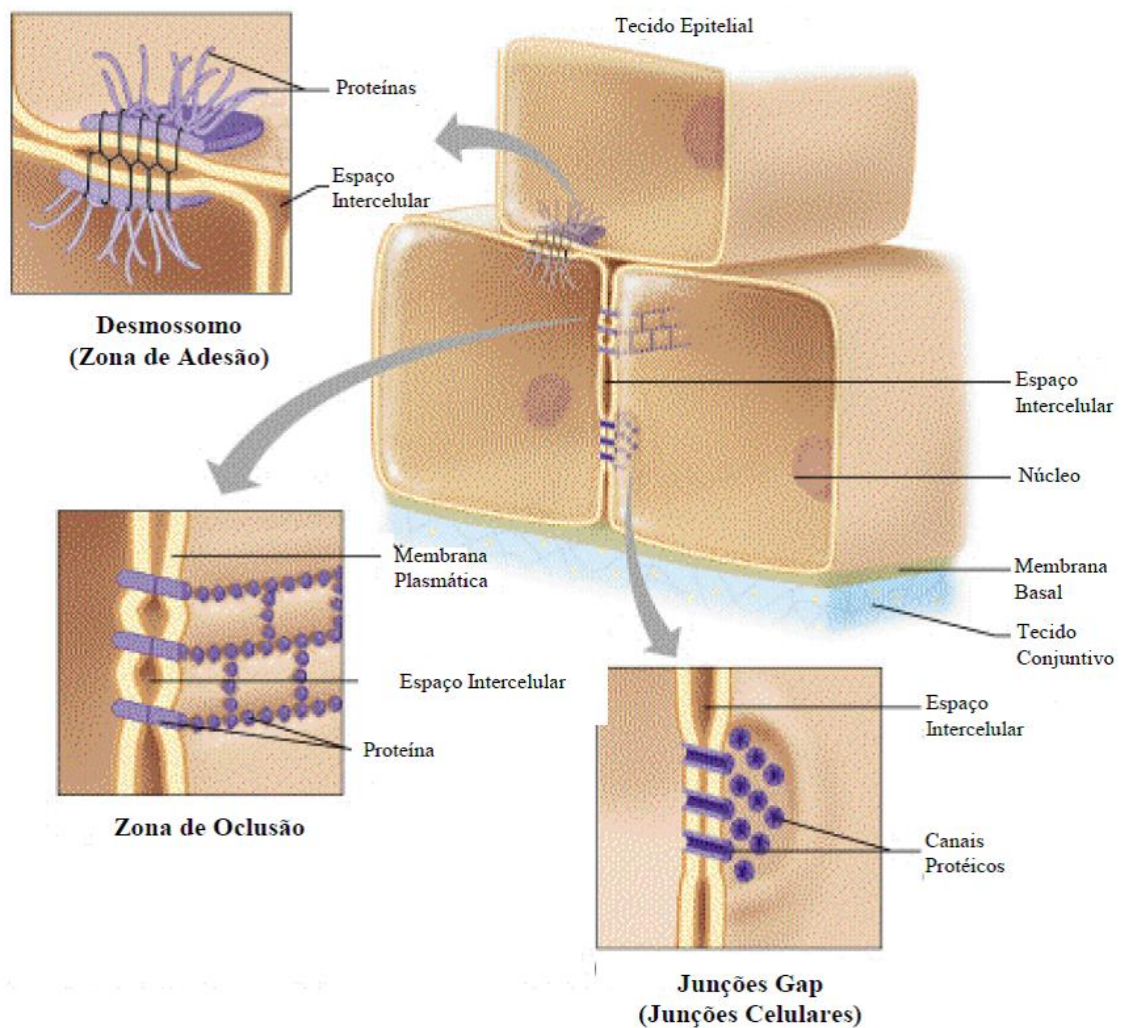


Figura 1 – Junções Celulares [Modificado de Alberts et al., (2004)]

2.9.1 Junções bloqueadoras ou ocludentes

As junções bloqueadoras ou ocludentes (*tight junctions*) fazem parte do complexo unitivo observado nos epitélios simples, juntamente com as outras junções observadas na Figura 1. Nas junções ocludentes estão unidas regiões específicas das superfícies externas das membranas plasmáticas adjacentes. Essas junções agem como uma barreira primária para a difusão de solutos através do espaço paracelular e criam uma fronteira entre os domínios apical e basolateral da membrana plasmática. Além disso, moléculas citoplasmáticas estruturais e de sinalização associadas a essas junções regulam diversos processos fisiológicos como proliferação celular, polaridade celular e difusão regulada (Alberts et al., 2004).

Junções ocludentes são formadas por proteínas integrais de membrana denominadas de claudinas, ocludinas e membros da superfamília Ig denominadas

moléculas de adesão juncional (JAM) e receptor do coxsackievirus e adenovírus (CAR), pouco se conhecem sobre as funções das moléculas JAM e CAR.

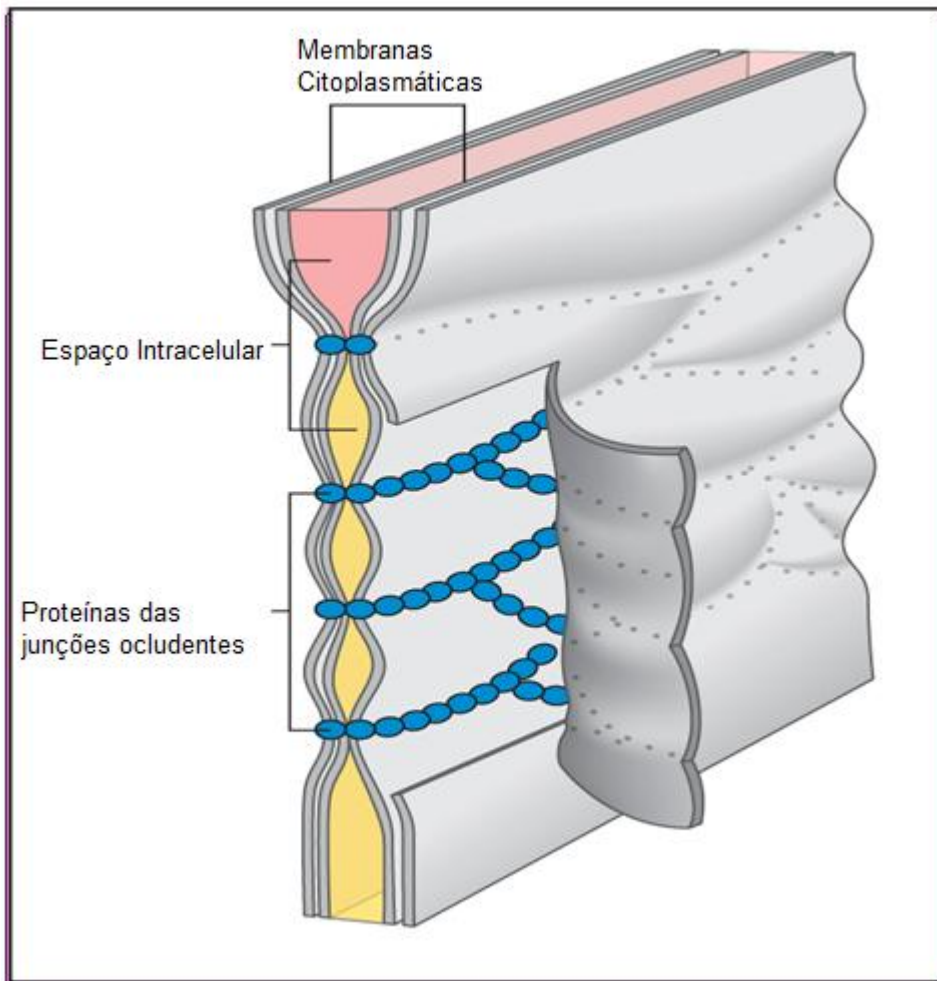


Figura 2 – Junções Ocludentes [Modificado de Alberts et al., (2004)]

2.9.1.1 Claudinas

As claudinas são as principais moléculas de adesão celular das junções ocludentes, sendo considerada uma família composta de aproximadamente 24 membros em humanos e camundongos, em que cada tecido apresenta um padrão único de expressão de claudina (Lal-Nag e Morin, 2009). Claudinas possuem quatro domínios transmembrana, duas porções extracelulares e domínios citoplasmáticos carboxi e amino terminal com uma porção intracelular curta. (Lal-Nag e Morin, 2009) As porções extracelulares se interligam com claudinas adjacentes das células endoteliais, formando a vedação primária das JAM (Albets et al. , 2004).

O principal papel das claudinas é a regulação da seletividade paracelular aos íons pequenos. Para isto as interações entre as diferentes classes acontecem de

duas maneiras: lateralmente no plano da membrana (interações heteroméricas) ou a ligação cabeça a cabeça entre células adjacentes (interações heterotípicas). Perturbações e disfunções dessa proteína acabam prejudicando a barreira de proteção da membrana e conduzindo a vários processos patológicos, destacando-se o câncer como o principal deles (Albets et al. , 2004).

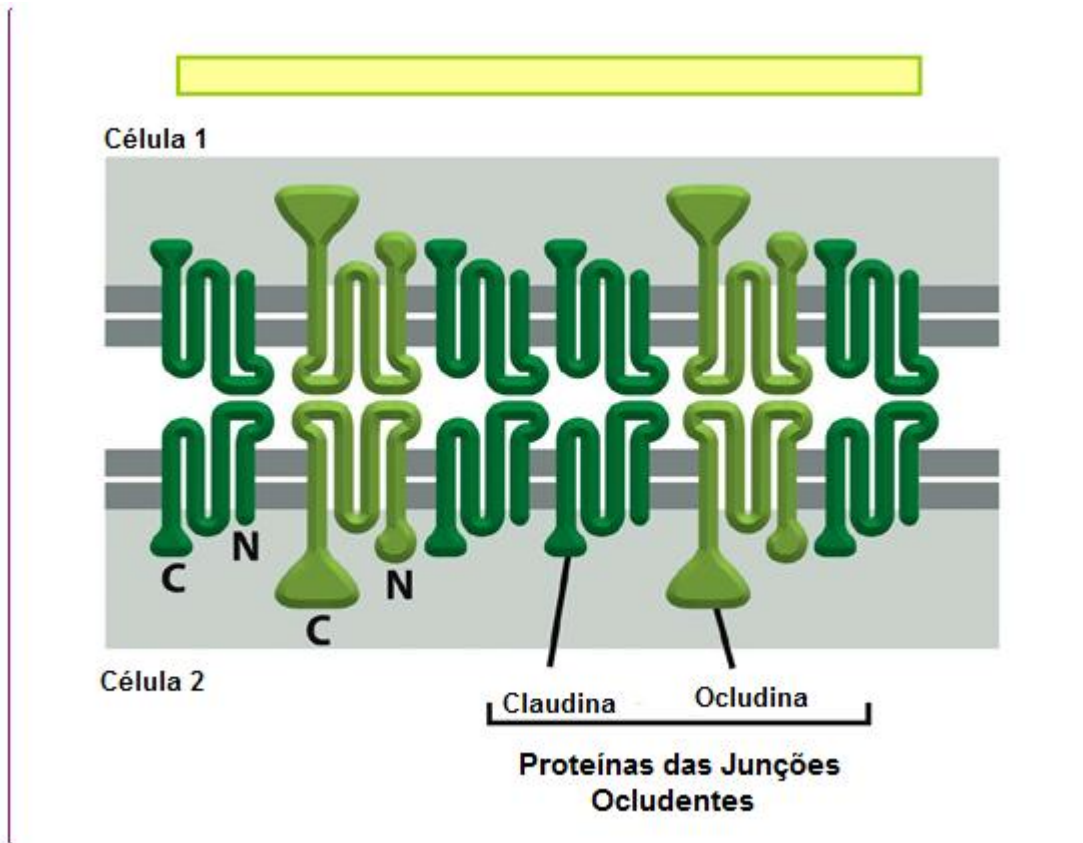


Figura 3 – Claudinas e Ocludinas (Albets et al., 2004)

3. OBJETIVOS

- a) Avaliar o conteúdo tecidual total de claudina, comparando a mucosa cólica provida e desprovida de trânsito intestinal;
- b) Avaliar se existem modificações no local de expressão da proteína claudina nas criptas da mucosa cólica comparando segmentos com e sem trânsito intestinal;
- c) Verificar a influência do tempo de exclusão do trânsito fecal no conteúdo tecidual total e local da expressão da proteína claudina comparando segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito intestinal;

4. MATERIAL E MÉTODOS

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

4.1 Animais de experimentação

Foram utilizados 45 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, SPF, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP), com peso variando entre 300 a 320g e média de idade de quatro meses.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais, com 15 ratos cada grupo dividido segundo a data do sacrifício ser realizado em 06 semanas, 12 semanas e 18 semanas. Todos os animais foram submetidos a cirurgia e desta forma obtemos do mesmo animal segmentos do cólon com trânsito e segmento do colón sem trânsito, como o comparativo é feito sobre o mesmo animal, não foi necessário a utilização do grupo controle neste experimento (Figura 4).

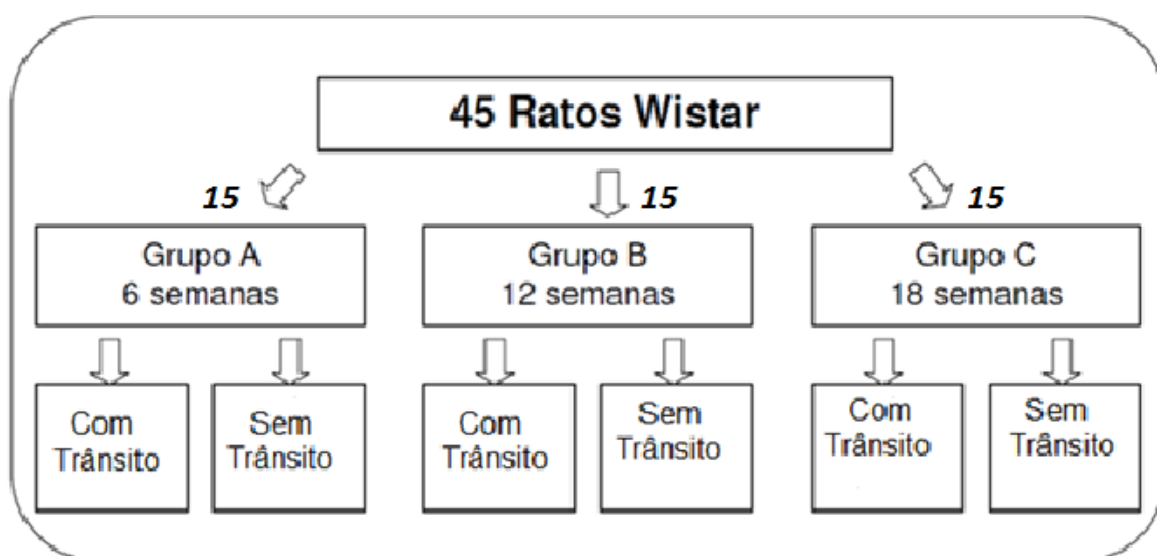


Figura 4 – Organograma dos grupos experimentais, 45 ratos divididos em três grupos com 15 ratos cada grupo.

4.3 Etapa pré-operatória

Durante o período de vigilância epidemiológica (sete dias) todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais permanecendo em ambiente climatizado, com controle de temperatura, luminosidade e ruídos. Foram pesados e no dia anterior ao procedimento cirúrgico mantidos em jejum, exceto água, por 24 h. As gaiolas individuais foram identificadas pelo número do animal, grupo e subgrupo experimental, aos quais, pertenciam. Estes mesmos números foram tatuados na cauda de cada animal.

4.4 Anestesia

No dia da intervenção, os animais foram pesados e anestesiados com o emprego de cloridrato de xilazina 2% (Anasedan®¹) + cloridrato de quetamina (Dopalen®¹) na dose de 0,1 mL / 100g, administradas por via intra-muscular na perna traseira esquerda.

4.5 Técnica operatória

Depois de anestesiados, os animais foram restringidos em mesa cirúrgica, em decúbito dorsal horizontal, realizando-se tricotomia abdominal e anti-sepsia com polivinil pirrolidona-iodo. A cavidade abdominal foi acessada por incisão longitudinal mediana com três centímetros de extensão, sendo identificada a placa de Peyer. Com o auxílio de paquímetro e, após ligadura dos vasos da arcada cólica marginal, seccionou-se o cólon três centímetros acima da placa e Peyer. Após remoção do conteúdo fecal eventualmente presente, o segmento proximal do cólon seccionado foi exteriorizado, como colostomia terminal, através de incisão circular, com três milímetros de diâmetro, realizada no hipocôndrio esquerdo.

A fixação da colostomia foi realizada com o emprego de pontos separados de fio absorvível monofilamentar 4-0 (Monocryl®)² nos quatro pontos cardinais e entre eles, sempre amarrados com três nós.

Terminada a confecção da colostomia proximal, o segmento distal do intestino grosso seccionado foi cateterizado com sonda de polivinil 12 F, fixada por ligadura frouxa, e irrigado com 40mL de soro fisiológico 0,9%, até que o efluente drenado pelo ânus do animal não apresentasse mais saída de material fecal.

¹ Agribrands do Brasil Ltda. Brasil

² Ethicon, Inc. Somerville, NJ, USA.

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

4.6 Pós-operatório

Concluída a operação, os animais foram mantidos por 10 minutos sob lâmpada aquecida, e após recuperação anestésica, alojados em gaiolas individuais, sendo liberados para ingestão de água e ração padronizada (Nuvilab CR1®⁴), após terem recuperado completamente o estado de vigília. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais até a data do sacrifício, permanecendo nas mesmas condições ambientais do período de vigilância epidemiológica, não tendo sido tomado nenhum cuidado adicional em relação à ferida operatória e ao estoma confeccionado. Todos os dados de acompanhamento pós-operatório (aceitação da dieta, aspecto da ferida cirúrgica, aspecto da colostomia, peso, características das evacuações) foram anotados em planilhas previamente elaboradas.

³ Ethicon, Inc. Somerville, NJ, USA.

⁴ Nuvital Nutrientes SA, São Paulo, Brasil.

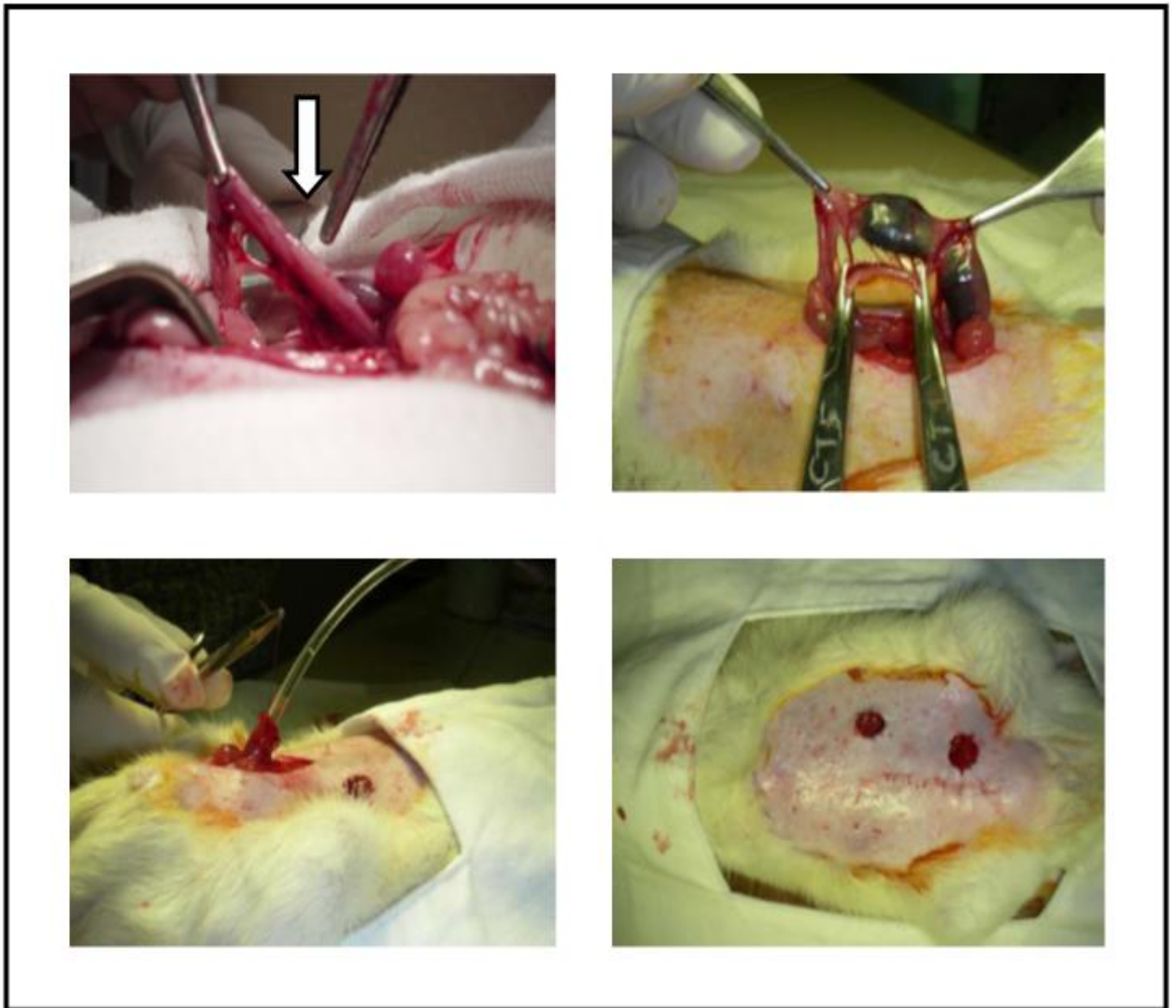


Figura 5 – Técnica operatória e resultado do pós-operatório nos ratos de 6, 12 e 18 semanas. Local da secção na placa de Peyer (seta branca).

4.7 Sacrifício dos animais

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

Os segmentos de cólon removidos foram abertos longitudinalmente pela borda anti-mesocólica e lavados com soro fisiológico a 0,9% para remoção de

detritos fecais presentes. Foram removidos dois fragmentos da parede cólica, medindo cada um deles 30 mm de extensão, e interessando toda a circunferência da parede cólica, sendo um fragmento do cólon provido e outro do cólon desprovido de trânsito intestinal. No segmento provido de trânsito foram colhidos dois centímetros a partir da face interna do estoma. Nos segmentos sem trânsito foram colhidos, um centímetro abaixo da face interna do estoma e um centímetro acima do ânus.

4.8 Confeção dos blocos de parafina e lâminas

Após o período de fixação os espécimes, foram processados em cinco banhos de álcool absoluto durando uma hora cada banho. Em seguida, foram submetidos a três banhos sucessivos de xilol durando uma hora cada. Terminada esta etapa foram submetidos a três banhos de parafina durando uma hora cada banho à temperatura constante de 60°C. Terminada a impregnação pela parafina os espécimes foram incluídos em blocos e submetidos a cortes histológicos com 5µ de espessura cada corte.

Para a confecção das lâminas, independente da técnica de coloração, os cortes foram desparafinados em dois banhos sucessivos de xilol, durando dez minutos cada banho. A seguir foram alcoolizados em três banhos sucessivos de álcool absoluto e hidratados com água destilada.

Todas as lâminas foram confeccionadas por um mesmo técnico e analisadas com microscópio óptico comum (Nikon Eclipse DS-50⁵) com magnificação final de 200 vezes, por patologista experiente em doenças colorretais que desconhecia os objetivos do estudo.

4.9 Técnicas de coloração

As lâminas obtidas dos animais do experimento (segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal) foram submetidas a técnicas de coloração com hematoxilina-eosina (HE).

Para a realização da técnica da HE as lâminas após terem sido desparafinadas em dois banhos sucessivos de xilol, durando dez minutos cada banho, foram alcoolizadas em três banhos sucessivos de álcool absoluto e hidratadas com água destilada. A seguir, foram expostas a hematoxilina de Harris

⁵ Nikon Inc., Osaka, Nippon.

filtrada em temperatura ambiente por um minuto. Após a exposição à hematoxilina de Harris foram submetidas à lavagem contínua e cuidadosa com água corrente e, posteriormente água destilada por três minutos cada etapa e expostas ao corante eosina por dois minutos a temperatura ambiente. A seguir foram lavadas em água corrente e posteriormente em água destilada por mais dois minutos. Terminada esta etapa foram desidratadas em três banhos sucessivos de álcool absoluto, e diafanizadas em xilol.

Terminada a diafanização, as lâminas foram montadas com resina e lamínulas.

4.10 Técnica imunoistoquímica (claudina)

Para realização da técnica imunoistoquímica para pesquisa da proteína Claudina nos blocos previamente confeccionados, foram realizados cortes histológicos, com 5 μ de espessura em todas as amostras colhidas dos animais do experimento (segmentos com e sem o fluxo fecal) nos três períodos de exclusão propostos. Os cortes foram dispostos em lâminas com margens foscas previamente identificadas com o grupo experimental, subgrupo, número do animal e local do cólon de onde o fragmento tinha sido removido. As lâminas foram desparafinadas, reidratadas em álcool em concentrações decrescentes (absoluto, 95%, 80% e 50%) e lavadas em água destilada. Depois da lavagem, as lâminas foram submersas em tampão fosfato (PBS) (0,05 M, pH 7,2) por 10 minutos e secas com papel filtro. Realizou-se bloqueio da atividade de peroxidases endógenas com H₂O₂ a 3% em câmara umidificada, à temperatura ambiente por 10 minutos, seguida por outra lavagem com PBS por mais 10 minutos. Realizou-se a recuperação antigênica em recipientes especiais contendo citrato de sódio 10 mM (pH 6,0) em um banho de água a 95°C por 45 minutos. A seguir, as lâminas foram deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos e, novamente, lavadas em PBS por cinco minutos. Para a avaliação da expressão tecidual da Claudina utilizou-se anticorpo primário monoclonal anti-claudina (Ref. E3834, Lote. 110520) diluído à 1:100 em albumina bovina (1%). As lâminas foram cobertas com 100 μ L das solução contendo os anticorpos primários e mantidas em refrigeração a 4°C por 24 horas. Concluída esta etapa foram então lavadas com PBS, incubadas com anticorpo secundário (Lote: H1011 Histofine Code: 414191N) e submetidas ao complexo de coloração

estreptavidina-biotina-peroxidase por 45 minutos, preparado com uma diluição de 1:100 em PBS. As lâminas foram desenvolvidas usando preparação recém preparada contendo tetrahidrocloro de diaminobenzidina (DAB, 10 mg em 10 ml de PBS com 3 mL H₂O₂), que foi gotejada sobre as lâminas e incubada por três minutos. A seguir foram lavadas, e contra-coradas com verde de metila por um minuto e, novamente, lavadas em água destilada. Finda a contra coloração, foram desidratadas por imersão em soluções crescentes de etanol (50%, 80%, 95% e 100%) e xileno. Finalmente, as lâminas foram montadas, rotuladas e mantidas em posição horizontal por 24 horas.

A imunocoloração foi considerada positiva quando se detectava coloração acastanhada difusamente presente, com pontos de intensidade variável e distribuição homogênea na membrana apical, basolateral ou citoplasma das células. Como recomenda o fabricante, o controle negativo para a imunocoloração foi realizado sem a adição do anticorpo primário e o positivo em tecido de cólon humano, sabidamente positivo para as proteínas.

4.11 Avaliação histológica

A análise das lâminas foi feita com microscópio óptico comum, Nikon Eclipse DS- 506, com magnificação final de 200 vezes, por patologista experiente em doenças colorretais e técnicas imunoistoquímicas e que desconhecia a origem do material e os objetivos do estudo. A documentação fotográfica das lâminas selecionadas foram feitas com câmera de vídeo-captura (DS-Fi-50⁶), acoplada ao microscópio trinocular. Para avaliar a presença de colite, consideramos os seguintes parâmetros histológicos: presença de ulcerações no epitélio e escore de graduação inflamatória (Gupta et al., 2007).

4.12 Análise da expressão tecidual da claudina

A expressão tecidual da proteína foi avaliada segundo o local e o conteúdo da imunocoloração. Inicialmente, consideramos o local onde ocorria a expressão da proteína, ao longo das criptas cólicas (ápice ou base) classificando a intensidade da imunocoloração, em cada um dos locais, em cruces (+ a +++). O padrão de expressão tecidual final adotado para cada lâmina foi à média aritmética e seu

⁶ Nikon Inc., Osaka, Nippon.

respectivo erro padrão, após leitura de três campos diferentes que apresentassem pelo menos três criptas íntegras e contíguas. A graduação em cruces foi feita por 3 observadores independentes e os resultados conflitantes foram posteriormente analisados em conjunto. Nenhum deles conhecia o local do cólon de onde o material havia sido removido nem a proteína estudada.

4.13 Método estatístico

Os resultados foram sempre descritos pelo valor da média aritmética com seu respectivo erro padrão. Adotamos sempre nível de significância de 5% ($p < 0,05$), portanto $p < 0,05$ (*) é significante e $p < 0,01$ (**) é muito significante. Utilizamos o teste de t-pareado para analisar o conteúdo de claudina, comparando segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal. Utilizamos o teste t de Student para comparar a intensidade de expressão da proteína Claudina nas regiões apical e basal das criptas cólicas nos segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito, nos diferentes tempos de exclusão. Empregamos o teste de ANOVA para análise de variância com relação ao tempo de exclusão do trânsito e as variações da expressão da proteína claudina entre as regiões apicais e basais. Para o estudo estatístico utilizamos o programa Bioestatic (versão 5.0).

5 RESULTADOS

5.1 Expressão e conteúdo tecidual de claudina

Na Figura 6 mostra-se a expressão tecidual da proteína claudina em segmentos cólicos providos de trânsito em animal submetido à exclusão fecal por 12 semanas, onde, observa-se mucosa trófica, com organização celular e presença de claudina com predominância em região apical.

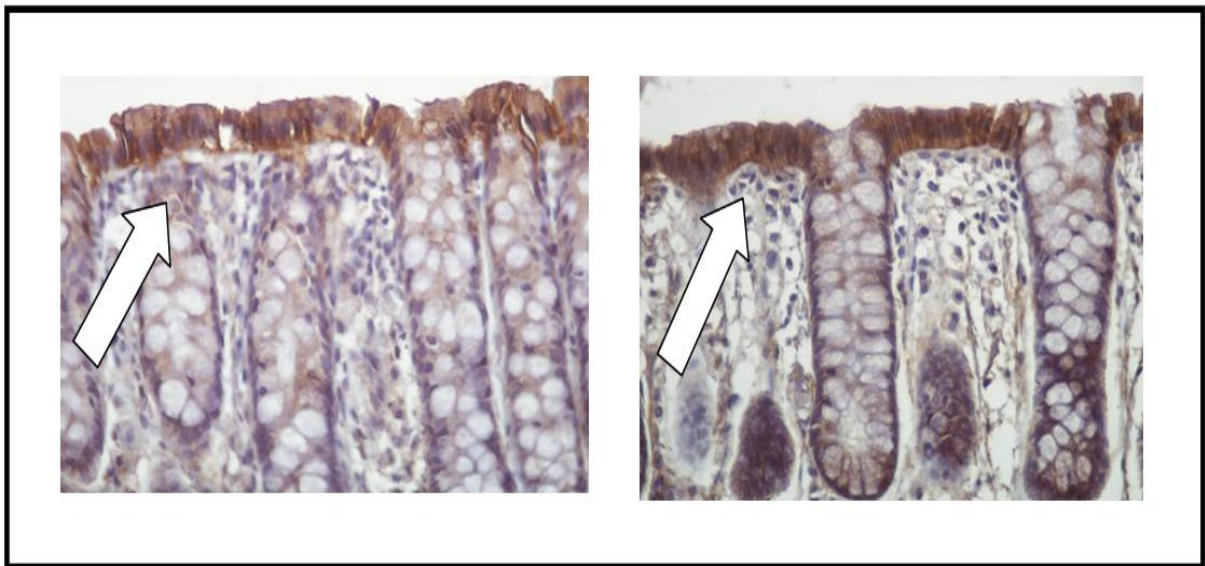


Figura 6 – Expressão da proteína claudina em segmentos cólicos providos de trânsito de animal submetido à exclusão fecal por 12 semanas. (Imunoistoquímica para claudina (200x)). Maior concentração de claudina na região apical das criptas cólicas (seta branca).

Na Figura 7 mostra-se a expressão tecidual da proteína claudina na mucosa cólica em segmentos desprovidos de transito intestinal respectivamente após 18 semanas com alterações na organização celular e maior concentração da proteína na região apical das criptas cólicas.

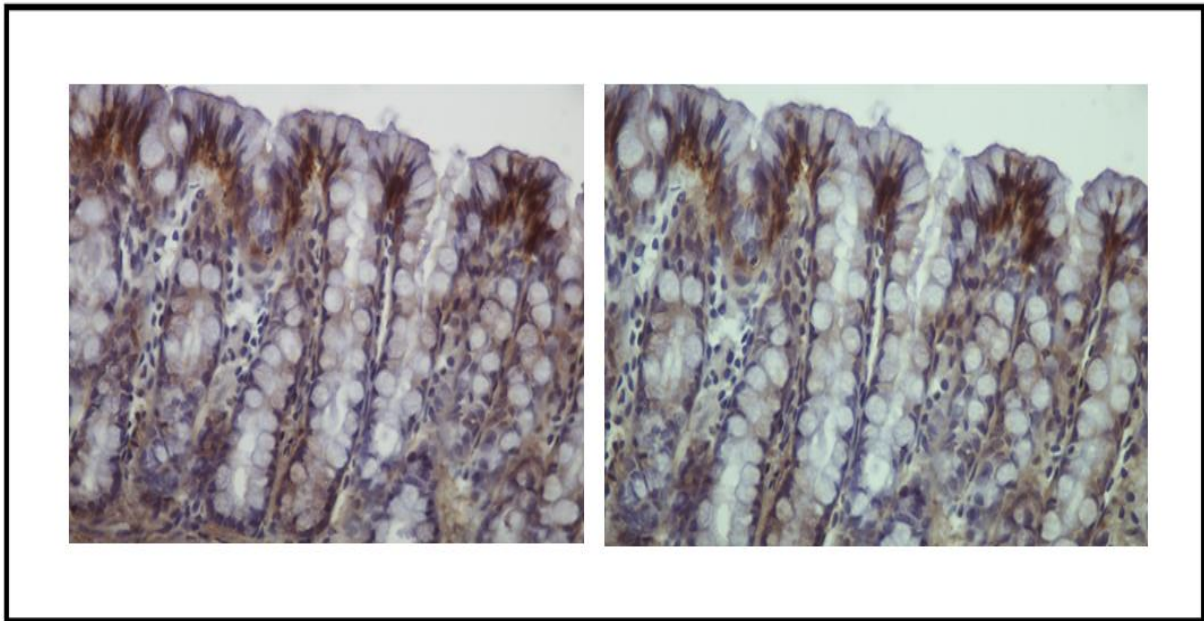


Figura 7 - Expressão da proteína claudina em segmentos cólicos desprovidos de trânsito de animal submetido à exclusão fecal por 12 semanas. (Imunoistoquímica para claudina (200x)).

5.2 Intensidade de expressão da proteína claudina segundo o local da cripta

Na Figura 8 mostra-se uma comparação entre a expressão de claudina no ápice e no fundo da cripta nos animais do grupo de 6 semanas no cólon provido de trânsito. O teste t-pareado mostra que a expressão de claudina no fundo da cripta é menor do que no ápice ($p < 0,0001$), tendo o ápice apresentado um erro padrão pequeno (0,1828) e o fundo não apresentado valor para o erro padrão.

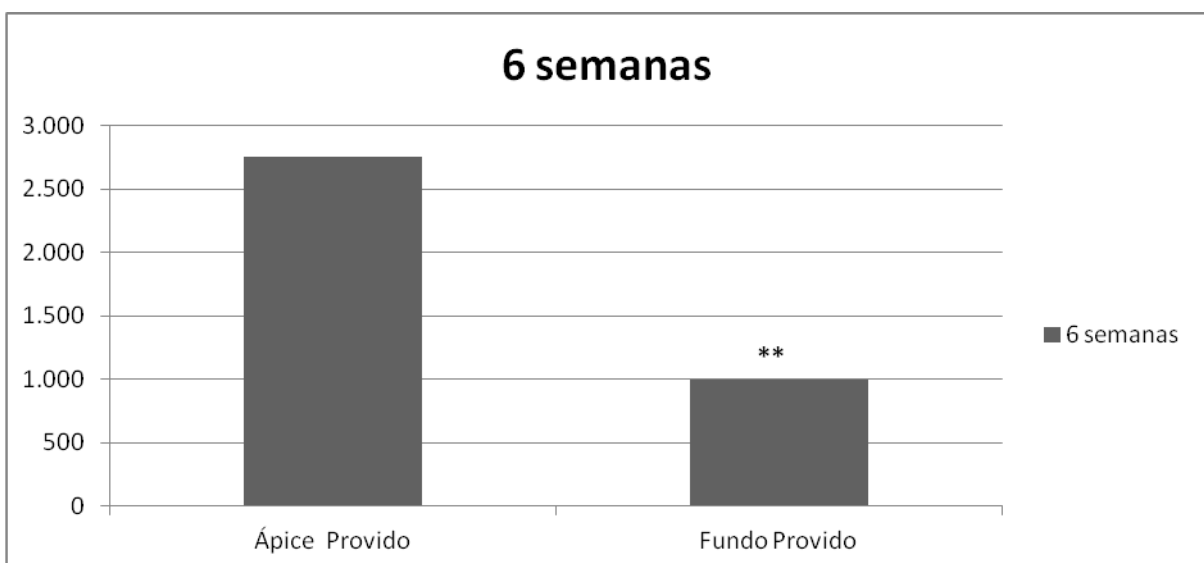


Figura 8 - Expressão de claudina no ápice e no fundo da cripta nos animais do grupo de 6 semanas no cólon provido de trânsito. ($p < 0,0001$), Teste t-pareado.

Na Figura 9 apresenta-se a mesma comparação anterior entre o ápice e fundo da cripta nos animais do grupo de 6 semanas no cólon desprovido de trânsito. Neste caso o teste t-pareado mostra que a expressão de claudina no fundo da cripta é menor que no ápice ($p < 0,001$), contudo, já é possível verificar que a expressão da proteína não tem a mesma diferença estatística do que no cólon provido de trânsito, mostrando que o desvio de trânsito já está reduzindo o conteúdo de claudina na região apical. O valor do erro padrão na região apical continua pequeno (0,2282), enquanto a região do fundo não apresenta valor de erro padrão.

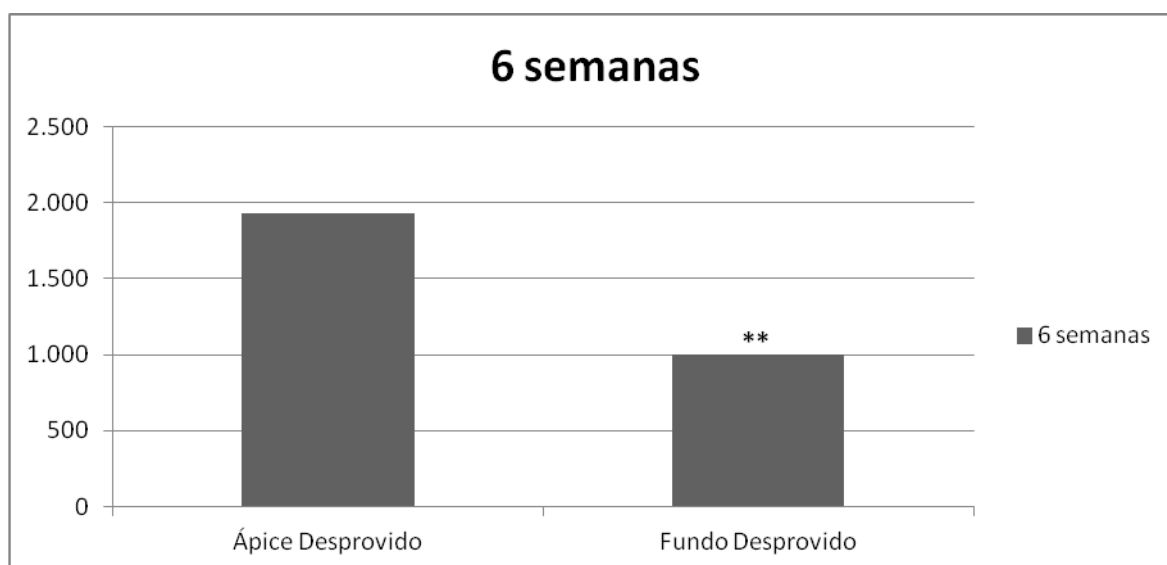


Figura 9 - Expressão de claudina no ápice e no fundo da cripta nos animais do grupo de 6 semanas no cólon desprovido de trânsito. ($p < 0,001$), Teste t-pareado.

Na Figura 10 apresenta-se a comparação direta entre a expressão de claudina no ápice das criptas entre os cólons providos e desprovidos de trânsito após 6 semanas. Neste caso o teste t Student demonstra que ocorre uma redução da expressão de claudina na região apical das criptas no cólon desprovido de trânsito intestinal ($p = 0,0096$).

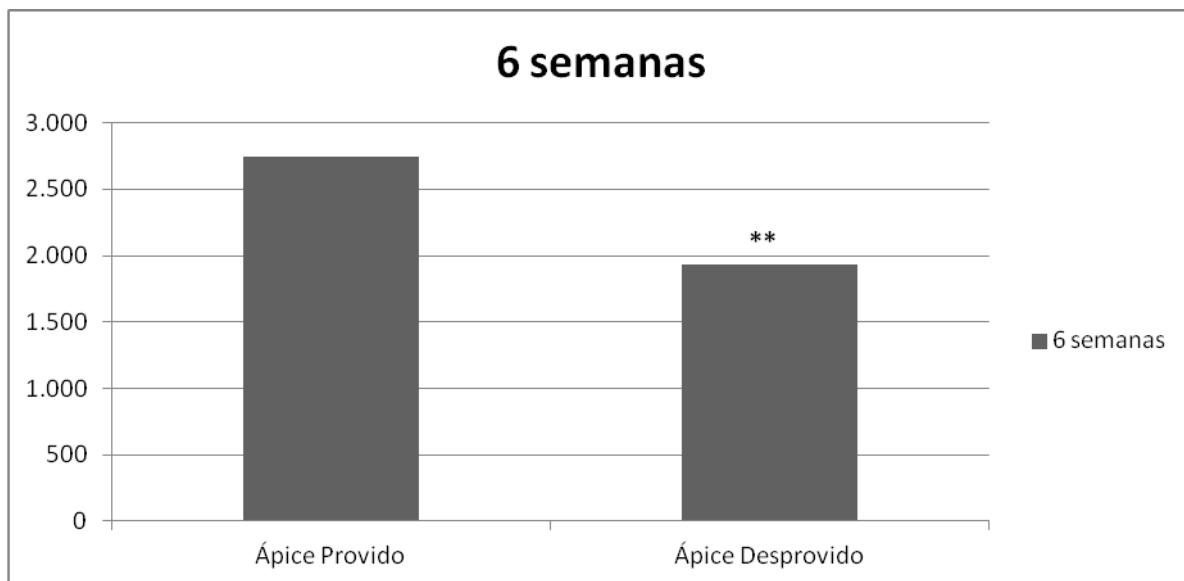


Figura 10 - Expressão de claudina no ápice das criptas entre os cólons providos e desprovidos de trânsito após 6 semanas. ($p = 0,0096$). Teste t Student.

Na Figura 11 realiza-se a comparação entre a expressão de claudina no fundo das criptas entre os cólons providos e desprovidos de trânsito após 6 semanas. Neste caso é possível notar que a expressão de claudina não se modifica no fundo das criptas dos cólons providos e desprovidos de trânsito intestinal após 6 semanas.

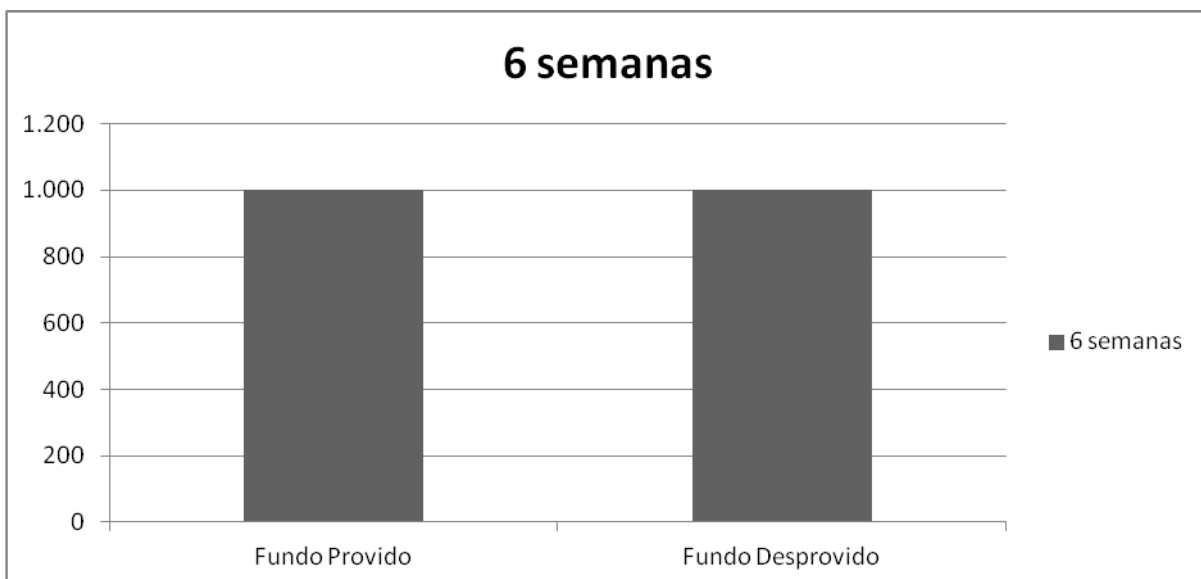


Figura 11 - Expressão de claudina no fundo das criptas entre os cólons providos e desprovidos de trânsito após 6 semanas.

Na Figura 12 apresenta-se a comparação entre a expressão de claudina no ápice e fundo das criptas nos cólons providos de trânsito intestinal após 12 semanas. O teste t-pareado mostra que a expressão de claudina no fundo das criptas é menor do que no ápice ($p < 0,0001$), tendo o ápice apresentado um valor de erro padrão (0,1117) e o fundo (0,0782), valores pequenos.

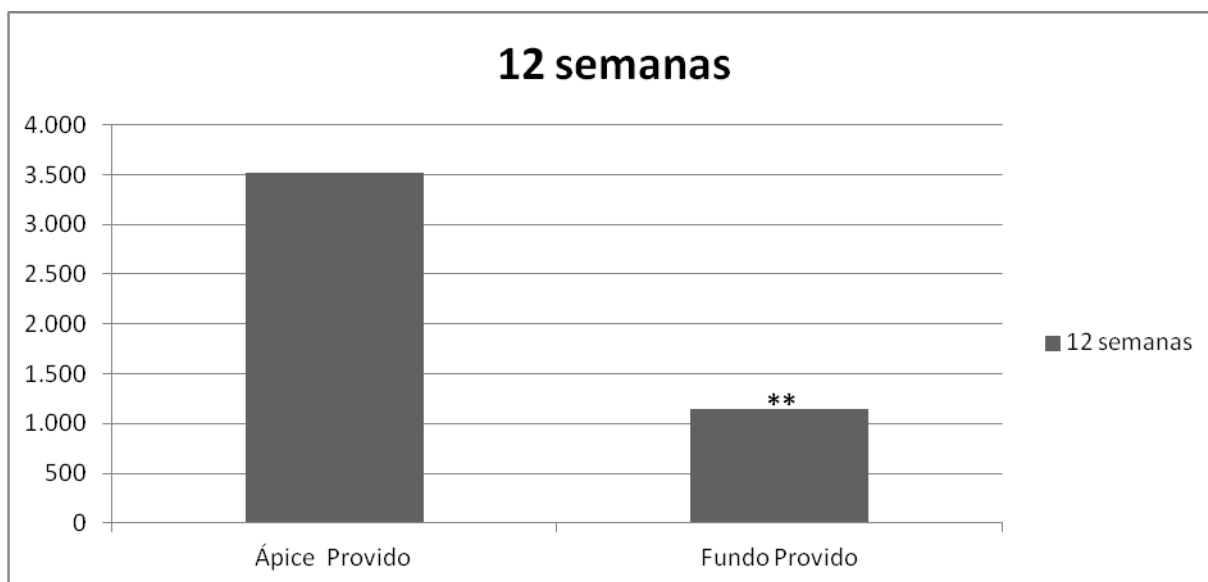


Figura 12 - Expressão de claudina no ápice e fundo das criptas nos cólons providos de trânsito intestinal após 12 semanas. ($p < 0,0001$), Teste t-pareado.

Na Figura 13 apresenta-se a comparação entre a expressão de claudina no ápice e fundo nos animais do grupo de 12 semanas no cólon desprovido de trânsito. O teste t-pareado mostra que a expressão de claudina no fundo da cripta ainda é menor do que no ápice ($p < 0,0001$), tendo o ápice apresentado um valor de erro padrão (0,1631), enquanto o fundo não apresentou valor para o erro padrão. Analisando os valores médios da expressão do conteúdo de claudina, já é possível verificar que está ocorrendo uma redução do conteúdo na região apical da cripta.

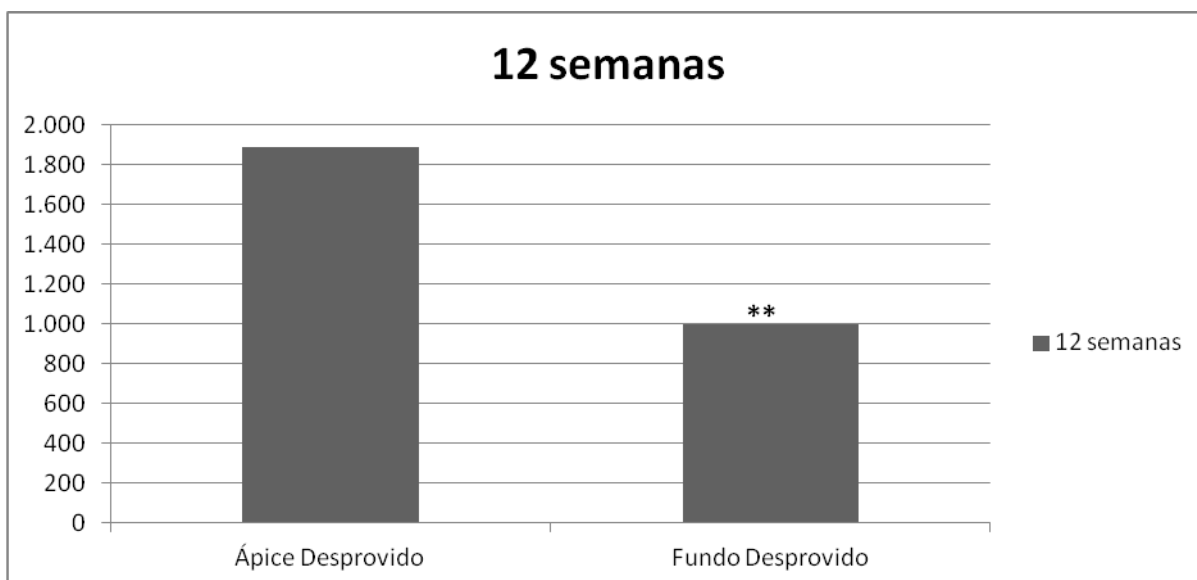


Figura 13 - Expressão de claudina no ápice e fundo nos animais do grupo de 12 semanas no cólon desprovido de trânsito. ($p < 0,0001$), Teste t-pareado.

Na Figura 14 realiza-se a comparação entre a expressão de conteúdo de claudina no ápice das criptas entre os cólons providos e desprovidos de trânsito após 12 semanas. O teste t Student confirma que há uma redução significativa da expressão do conteúdo de claudina no ápice das criptas cólicas no cólon desprovido de trânsito quando comparado ao cólon provido de trânsito intestinal ($p < 0,0001$).

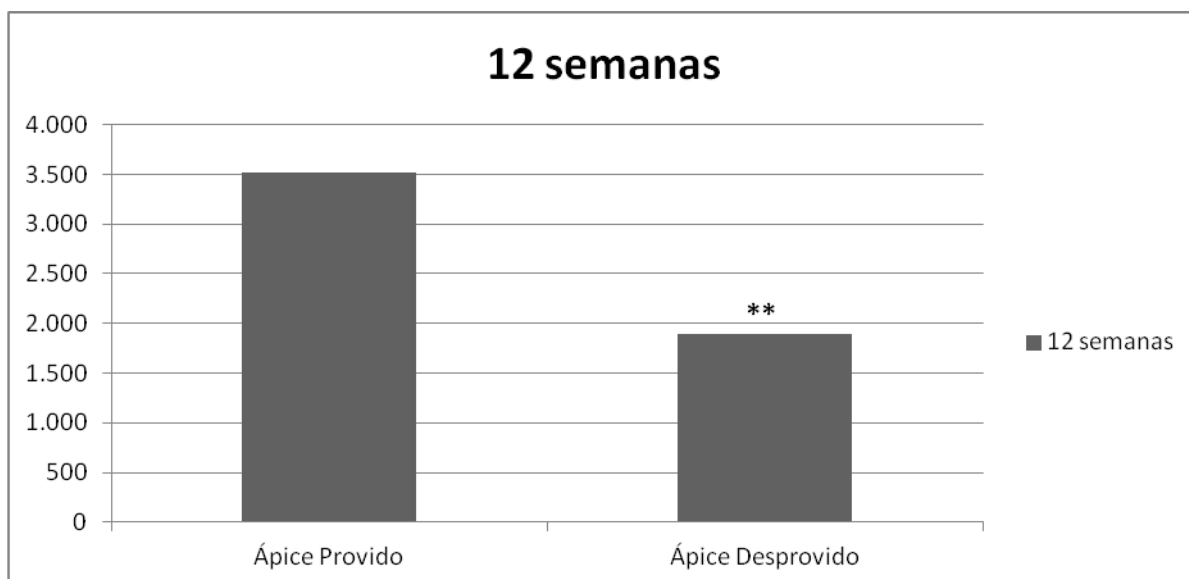


Figura 14 - Expressão de conteúdo de claudina no ápice das criptas entre os cólons providos e desprovidos de trânsito após 12 semanas. ($p < 0,0001$), Teste t Student.

Na Figura 15 apresenta-se a comparação entre a expressão do conteúdo de claudina no fundo das criptas entre os cólons providos e desprovidos de trânsito

após 12 semanas. O teste t Student mostrou que praticamente não existe modificação do conteúdo de claudina no fundo das criptas cólicas ao comparar segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal ($p = 0,0828$).

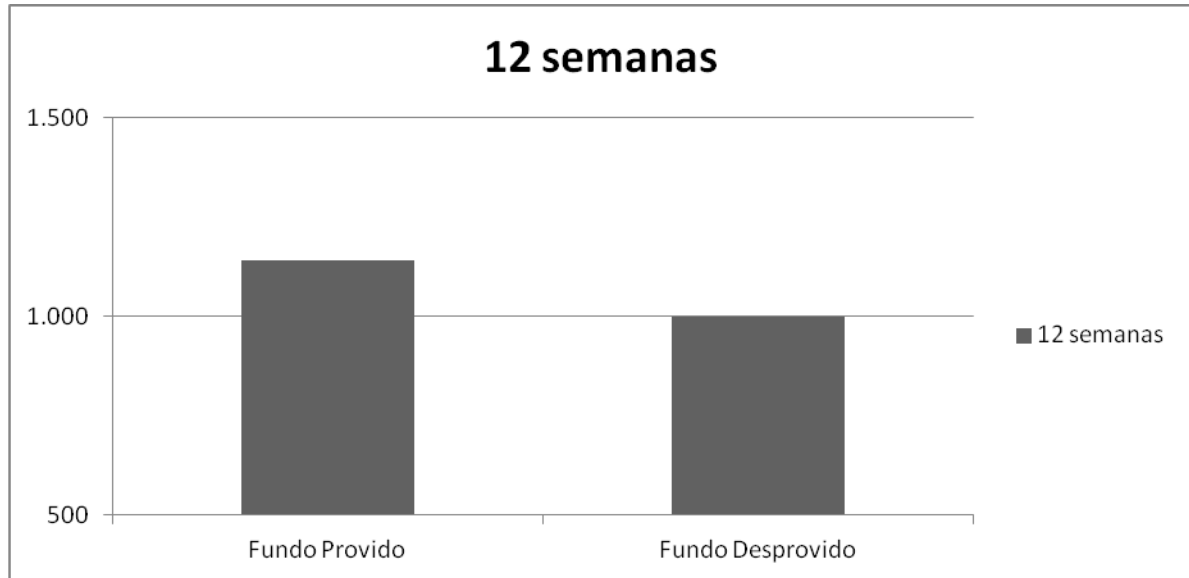


Figura 15 - Expressão do conteúdo de claudina no fundo das criptas entre os cólons providos e desprovidos de trânsito após 12 semanas. ($p = 0,0828$), Teste t Student.

Na Figura 16 mostra-se a comparação entre a expressão do conteúdo de claudina no ápice e fundo nos animais do grupo de 18 semanas no cólon provido de trânsito intestinal. O teste t-pareado mostra que o conteúdo de claudina no fundo da cripta é menor do que no ápice ($p < 0,0001$), apresentando o ápice um valor de erro padrão de (0,1445) e o fundo não apresentando valor para o erro padrão.

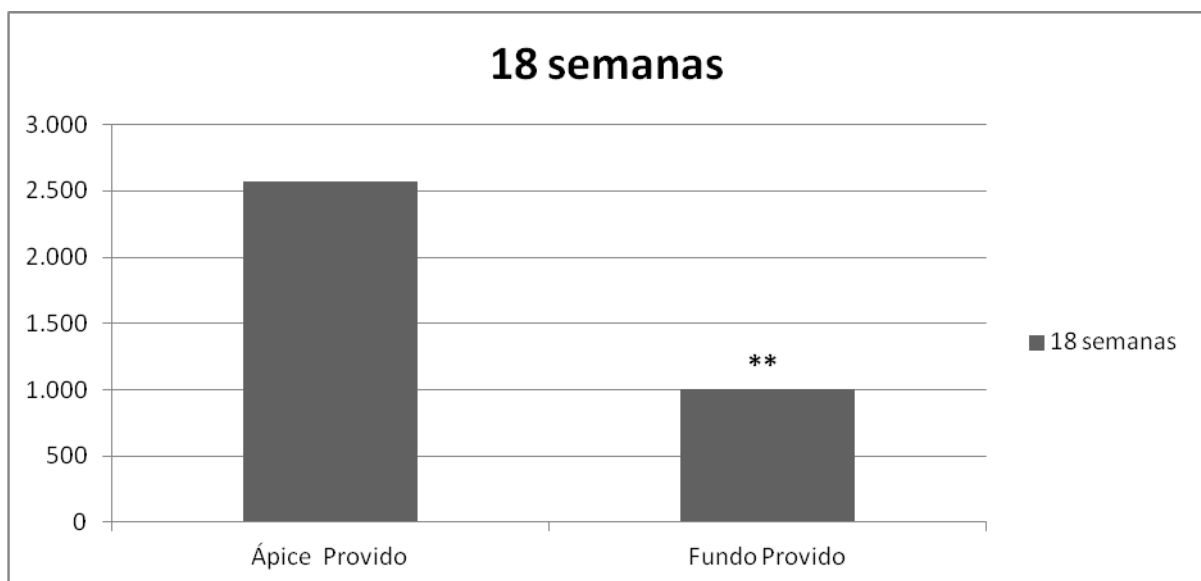


Figura 16 - Expressão do conteúdo de claudina no ápice e fundo nos animais do grupo de 18 semanas no cólon provido de trânsito intestinal. ($p < 0,0001$), Teste t-pareado.

Na Figura 17 apresenta-se a comparação entre ápice e fundo das criptas nos animais do grupo de 18 semanas no cólon desprovido de trânsito. O teste t-pareado ainda mostra que a expressão de conteúdo no fundo das criptas ainda é menor que no ápice, todavia apesar de ainda significativa os valores médios diferem menos ($p = 0,0422$). Em relação ao erro padrão, o ápice mostra um valor muito pequeno (0,0878) e o fundo permanece em expressar valor para o erro padrão.

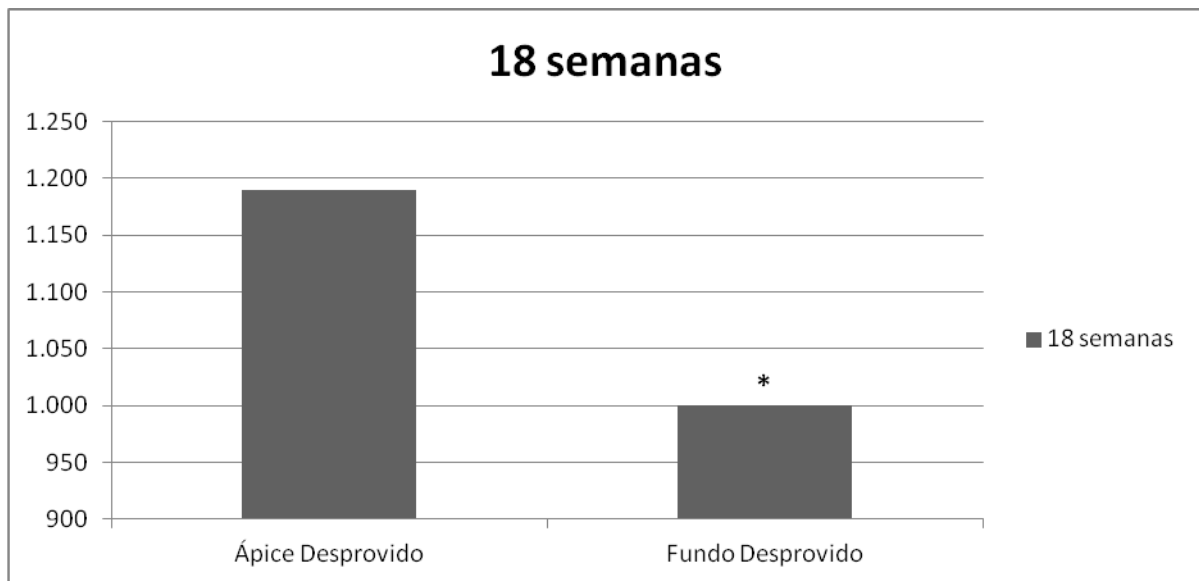


Figura 17 - Expressão do conteúdo de claudina no ápice e fundo nos animais do grupo de 18 semanas no cólon desprovido de trânsito intestinal. ($p = 0,0422$), Teste t-pareado.

Na Figura 18 têm-se a comparação entre a expressão do conteúdo de claudina no ápice das criptas entre cólons providos e desprovidos de trânsito após 18 semanas. O teste t Student mostra que existe redução do conteúdo de claudina no ápice das criptas cólicas no cólon desprovido de trânsito quando comparado ao cólon provido de trânsito intestinal ($p < 0,0001$).

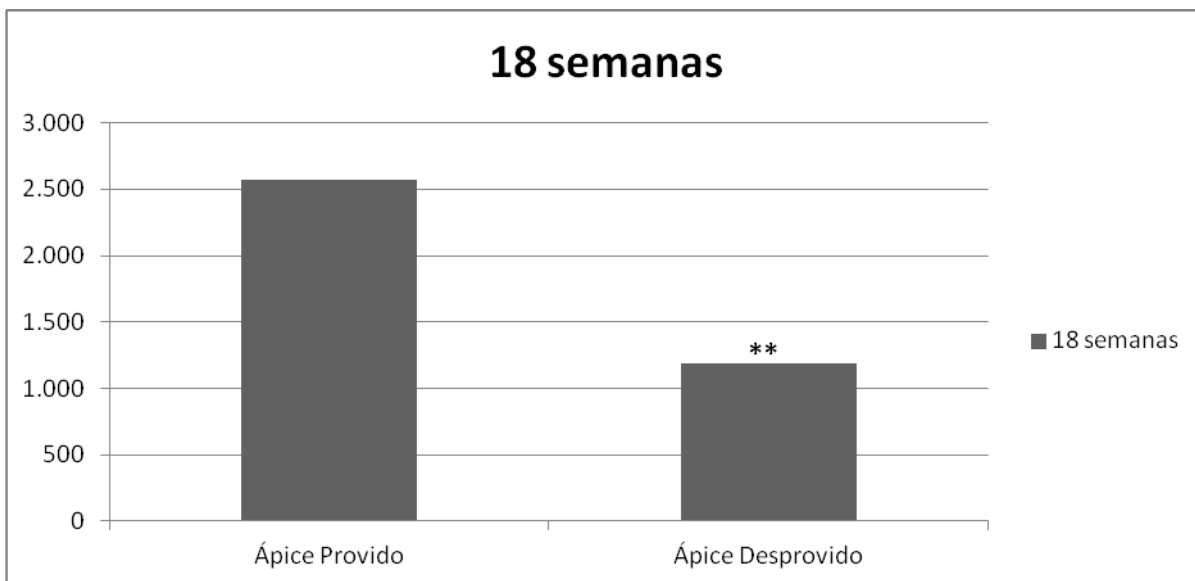


Figura 18 - Expressão do conteúdo de claudina no ápice das criptas entre cólons providos e desprovidos de trânsito após 18 semanas. ($p < 0,0001$), Teste t Student.

Na Figura 19 mostra-se a comparação da expressão de conteúdo de claudina no fundo das criptas entre cólons providos e desprovidos de trânsito após 18 semanas. O teste t Student não mostra variação da expressão de conteúdo de claudina no fundo das criptas cólicas ao se comparar segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal.

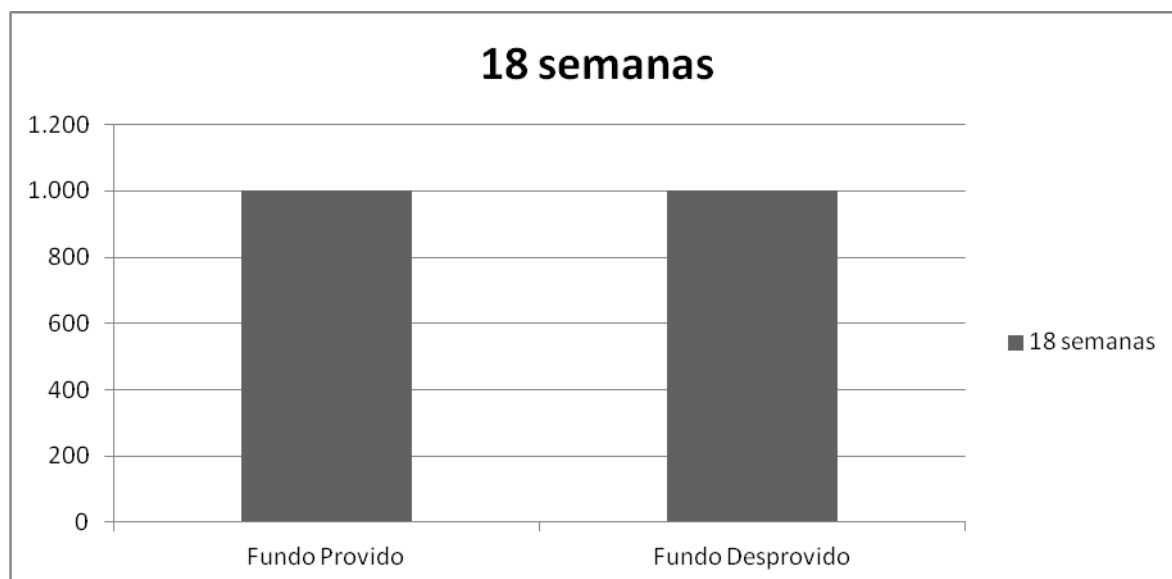


Figura 19 - Expressão de conteúdo de claudina no fundo das criptas entre cólons providos e desprovidos de trânsito após 18 semanas. Teste t Student.

5.3 Variações segundo o tempo de exclusão

Ao realizar-se o teste ANOVA, podemos verificar que não há modificação no conteúdo de claudina no ápice das criptas cólicas dos segmentos providos de trânsito intestinal independente do tempo de exclusão ($p = 0,8982$), fato esse que se repetiu ao analisarmos o conteúdo da proteína na região do fundo das criptas cólicas também nos cólons providos de trânsito intestinal ($p = 0,8017$).

Verificando-se o ápice das criptas cólicas nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, o teste ANOVA apresentou que mais uma vez não houve modificação no conteúdo de Claudina independente do tempo de exclusão ($p = 0,9987$). O mesmo acontece na região do fundo das criptas cólicas nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal ($p = 0,9999$). Esses dados sugerem que a redução do conteúdo após 6 semanas de exclusão já é intensa e não varia com o decorrer do tempo.

6 DISCUSSÃO

A CE é um processo inflamatório que acomete os segmentos do cólon e reto desprovidos de trânsito intestinal (Glotzer et al., 1981; Keli et al., 1997)

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

Para que ocorra o desenvolvimento das colites é necessária a ruptura dessa barreira funcional. A maior evidência da necessidade de violação da barreira epitelial para o desenvolvimento da colite foi demonstrada pelos modelos experimentais de colite quimicamente induzida. Nesses modelos, a translocação bacteriana e a consequente resposta imune ocorrem após induzir-se a lesão da camada epitelial, de forma artificial, pela aplicação de agentes químicos tóxicos, esses modelos são pouco eficientes, pois, não reproduzem as fases iniciais que antecedem e contribuem para o desenvolvimento da colite.

Portanto foi necessária, a busca de um modelo animal de CE, sem o emprego de substâncias químicas para o rompimento da barreira cólica, o rompimento deveria acontecer apenas alterando o metabolismo energético das células epiteliais (Martinez, 2009; Nonose, 2009; Nonose et al., 2009; Martinez et al., 2010c).

Em 2005, Pravda, avaliou a possibilidade de que o estresse oxidativo, provocado pela maior produção de RLO poderia ser responsabilizado pelo dano às diferentes linhas de defesa do epitélio cólico. Esse interesse foi despertado pela teoria de indução das colites por radicais livres (Pravda, 2005).

Com o modelo experimental de CE proposto, confirmou-se, inicialmente, que células da mucosa cólica desprovidas do suprimento regular de AGCC, consequente à derivação fecal sofrem modificações no seu metabolismo e aumentam a produção de RLO.

Os AGCC, representados pelo butirato, acetato e propionato, são formados partir da fermentação de fibras vegetais dietéticas e carboidratos pelas bactérias anaeróbicas existentes na luz intestinal (*Clostridium sp.*, *Eubacterium sp.*, *Fusobacterium sp.*), e representam a principal fonte de energia para os colonócitos (Roediger et al., 1980; Soergel et al., 1994; Jørgensen et al., 1997) respondendo por aproximadamente 80% das necessidades energéticas da mucosa cólica (Roediger, 1990).

Em segmentos derivados do cólon, a ausência do bolo fecal impede a formação dos AGCC, bem como sua absorção e utilização pelas células epiteliais. Os AGCC determinam maior fluxo sanguíneo para a parede intestinal, pela diminuição da resistência das arteríolas do cólon e reto, promovem aderência entre os colonócitos, aumentam a absorção de sódio e água, estimulam o crescimento normal das células do epitélio cólico, influenciam a motilidade cólica e favorecem a cicatrização de lesões da parede intestinal (Mortensen et al., 1991; Kissmeyer-Nielsen et al., 1994; Pinto et al., 1999). Os AGCC exercem papel protetor no desenvolvimento de neoplasias, em virtude de sua ação antiproliferativa interferir no processo de diferenciação celular favorecendo a apoptose (Velasques et al., 1997). Nos segmentos desprovidos de trânsito intestinal, a glutamina, substrato energético secundário para essas células, fornecida principalmente pelo suprimento sanguíneo passa a ser primordial, podendo ser utilizada preferencialmente à glicose como fonte energética (Roediger, 1982).

O estresse oxidativo resultante ocasiona alterações histológicas idênticas às descritas na CE humana e semelhante às encontradas na colite ulcerativa.

Essas alterações histológicas pioram com o progredir do tempo de exclusão (Martinez, 2009; Martinez et al., 2010c).

Esses achados confirmaram não só a maior capacidade de formação de RLO pelas células epiteliais com modificações metabólicas, mas a importância da flora bacteriana intestinal para manutenção infiltração neutrofílica que caracteriza a fase de propagação proposta pela teoria de indução da colite ulcerativa por radicais livres (Pravda, 2005).

Com os resultados apresentados acima, o nosso grupo de estudo iniciou diversos trabalhos relacionados a CE e principalmente as proteínas que fazem parte

das linhas de defesa do epitélio cólico, iniciando pelas mucinas, componentes do muco, primeira linha de defesa da barreira intestinal.

Desta forma verificou-se que o estresse oxidativo era capaz de provocar dano à primeira linha de defesa da barreira intestinal, avaliaram-se, as modificações no conteúdo e padrão de expressão dos principais tipos e subtipos de mucinas no epitélio cólico (Nonose, 2009; Nonose et al., 2009; Martinez et al., 2010b).

Depois de ser confirmado que a falta do suprimento de AGCC, era capaz de provocar estresse oxidativo, que ocasiona atrofia das criptas cólicas, redução do conteúdo e modificações no padrão de expressão da camada de muco e dano ao DNA nuclear, faltava verificar se os RLO poderiam infringir dano às demais linhas de defesa do epitélio cólico.

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

Estudos avaliando especificamente as junções aderentes encontraram redução e modificações no padrão de expressão das proteínas E-caderina, β -catenina e p-120 nas células da mucosa intestinal cronicamente inflamada e na mucosa normal próximo de locais onde já existia a infiltração neutrofílica das criptas intestinais (Gassler et al., 2001; Kucharzik et al., 2001).

Modificações nas junções aderentes interferem na diferenciação celular, na maturação epitelial, possibilitam a infiltração bacteriana e encontram-se diretamente relacionadas carcinogênese colorretal (Nollet et al., 1999; Jankowski et al., 1997; Larsson, 2006).

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

Estudos analisando a expressão tecidual das proteínas claudina, E-caderina e β -catenina, a primeira componente das junções de oclusão e as duas últimas das junções aderentes, mostraram que a migração de neutrófilos ativados durante a fase aguda da colite é associada à menor expressão das proteínas, principalmente nos sítios de inflamação ativa (Kucharzik et al., 2001; Usami et al., 2006). Entretanto,

outros autores sugerem que a ruptura do complexo de adesão formado pelas proteínas, não ocorre pela ação de proteases liberadas pelos neutrófilos, mas por interleucinas, interferon gama (INF γ) e o fator de necrose tumoral (TNF) liberados no local (Kucharzik et al., 2001).

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

Portanto coube ao nosso grupo de estudos mostrar se a produção de RLO, ou seja, o estresse oxidativo era capaz de quebrar o complexo E-caderina/ β -catenina, algo que foi realizada com sucesso e demonstrou resultados surpreendentes, da quebra do complexo e menor concentração das proteínas nos animais submetidos a CE (Kadri, 2010; Martinez et al., 2010; Fabris, 2011). Este fato nós levou a analisar as junções de oclusão, avaliando neste caso uma proteína específica da mesma, a claudina, buscando desta forma reforçar os resultados encontrados.

Até o presente momento, não se havia estudado a possibilidade de que existam modificações no conteúdo e padrão de expressão das proteínas das junções de oclusão em modelos experimentais de CE. Como já havia sido demonstrado que no modelo de CE o estresse oxidativo era capaz de danificar outros mecanismos de defesa da barreira epitelial assim como o DNA, no presente estudo julgou-se oportuno verificar se poderia existir dano às proteínas formadoras das junções de oclusão.

O modelo de CE utilizado assegurava que a lesão das junções de oclusão não era provocada por agentes tóxicos ou pela infiltração contínua de bactérias a partir da luz intestinal, uma vez que o intestino estava desprovido de trânsito fecal e, apesar de não encontrar-se absolutamente estéril, possuía um menor contingente bacteriano, baseado no estudo de Pinto et al., 2007. Caso fosse possível demonstrar que modificações no metabolismo celular, aumentando a produção de RLO, também pudessem modificar o conteúdo ou o padrão de expressão das proteínas da junção de oclusão, destacando no estudo a claudina, ter-se-ia mais uma evidência experimental a favor da teoria de indução da colite por radicais livres.

Desta forma podemos destacar que possivelmente alterações na expressão da proteína claudina na mucosa cólica cronicamente inflamada e a maior possibilidade de desenvolvimento do CCR nessa situação confirmam a importância da preservação dessa proteína não só na manutenção da barreira funcional, mas na prevenção do CCR (Gassler et al., 2001; Gupta et al., 2007).

Portanto no presente estudo, inicialmente nos preocupamos em confirmar se os animais de experimentação desenvolviam colite nos segmentos excluídos de trânsito.

Adotando a mesma metodologia anteriormente empregada, avaliamos a presença de colite pelos estudos histopatológico e bioquímico analisando as principais alterações microscópicas da parede cólica e o infiltrado neutrofílico pelos níveis teciduais de MPO (Martinez, 2009; Longatti et al., 2010).

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

Esses achados sugerem que os maiores níveis de estresse oxidativo no cólon excluído estejam relacionados tanto à maior formação de RLO pelos próprios neutrófilos presentes no tecido, quanto pelas células epiteliais desprovidas de AGCC.

Quando estudamos a expressão do conteúdo da proteína claudina na região apical das criptas cólicas dos animais derivados por seis semanas, encontramos redução nos segmentos desprovidos de trânsito fecal em relação aos segmentos com trânsito preservado, mostrando que o desvio do trânsito, reduzindo o fornecimento de AGCC, já está reduzindo o conteúdo de claudina na região apical. Esse fato também é observado nos animais derivados por 12 semanas e nos animais derivados por 18 semanas.

Apesar de não existir consenso, a maioria dos estudos demonstrou o papel importante dos AGCC para manutenção do adequado trofismo das células epiteliais da mucosa cólica. Os AGCC são substratos importantes na preservação da integridade dos mecanismos de barreira, por induzirem a expressão de genes formadores das proteínas responsáveis pela permeabilidade seletiva das junções de

oclusão e evitarem o estresse oxidativo que provoca lesões nesses sistemas de defesa (Sousa et al., 2008; Gaudier et al., 2009; Nonose, 2009; Nonose et al., 2009).

A inibição da metabolização dos AGCC leva ao aparecimento de colite (Agarwal e Schimmel, 1989; Roediger e Millard, 1995), enquanto o restabelecimento do trânsito fecal, a administração de AGCC, glutamina, soluções nutricionais mistas e ácidos graxos poliinsaturados ricos em ômega-3 e ômega-6 melhoram as alterações histológicas encontradas nas colites, provavelmente por diminuírem o estresse oxidativo tecidual (Harig et al., 1989; Vieira de Barros et al., 2010). A importância do estresse oxidativo na etiopatogenia da CE fica evidente ao demonstrar-se que o uso de substâncias antioxidantes apresenta efeitos terapêuticos benéficos na colite ulcerativa, colite quimicamente induzida e na CE (Nosál'ová et al., 2000; Caltabiano et al., 2010). Em outras palavras, os resultados de todos esses estudos demonstram que a manutenção do fornecimento de AGCC às células da mucosa cólica ou a neutralização dos RLO com substâncias antioxidantes são estratégias eficazes para o tratamento das colites (Bajka et al., 2008) Essas evidências corroboram a importância dos RLO no desenvolvimento das colites (Martinez, 2009).

Avaliando a redução da proteína claudina de forma isolada no cólon provido de trânsito intestinal, verificamos que ocorre uma pequena variação positiva da proteína no cólon de 12 semanas e uma redução e estabilização da mesma no cólon de 18 semanas, já no cólon desprovido de trânsito essa pequena variação ocorre de forma negativa ao longo das 6, 12 e 18 semanas, sendo um pouco mais evidente nos animais de 18 semanas.

É possível que citocinas e proteases produzidas pelos neutrófilos ativados, presentes nessa fase do experimento, também pudessem ser responsabilizadas pela maior degradação da claudina, devido ao fato de ser uma proteína intracelular, e estar ocorrendo um processo inflamatório e um consequente estresse tecidual, neste momento também podemos observar que embora tenhamos uma pequena variação no conteúdo de claudina no ápice das criptas, a mesma sempre se manteve maior quando comparada ao fundo, provavelmente devido ao fato que a claudina é uma proteína ligada adesão, adesão essa que deve acontecer no ápice, portanto a claudina tende a uma mobilidade celular em direção a região apical e lateral.

Talvez, a piora do metabolismo das células epiteliais do cólon, pelo déficit mais prolongado de AGCC, pudesse ser responsabilizada pela maior formação de RLO e piora do dano tecidual.

A expressão do conteúdo da claudina no fundo dos segmentos desprovidos de trânsito em relação aos segmentos providos de trânsito, praticamente não apresentou nenhuma variação em relação ao tempo de exclusão (6, 12 e 18 semanas), portanto podemos considerar essa expressão constante.

Esses achados reforçam nossas suspeitas que o aumento da concentração da claudina na região apical das criptas, quando comparado a região basal, provavelmente é devido ao aumento da divisão celular na zona proliferativa das criptas (basal) e tentativa de substituir células da superfície apical cada vez mais danificadas pelo processo inflamatório, nos animais desprovidos de trânsito fecal.

Podemos observar de forma geral que o conteúdo de claudina diminui no ápice do cólon desprovido de trânsito, em relação ao cólon provido de trânsito, pois existe o dano epitelial. Na região profunda esse conteúdo é constantemente menor tanto no colón provido quanto no cólon desprovido de trânsito.

Os resultados apresentados são muito importantes ao considerarmos estudos anteriores dentro do nosso grupo de estudo, estudos estes que também encontraram resultados parecidos com os apresentados, embora tenham utilizados proteín

as das junções aderentes (E-caderina e β - catenina) (Kadri, 2010; Fabris, 2011).

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

Confirmou-se que as células epiteliais, com modificações no metabolismo energético, produzem maiores níveis de RLO, principalmente nas fases mais tardias da exclusão fecal, possibilitando maior dano tecidual e ao DNA nuclear (Carmo, 2010; Martinez et al., 2010). Constatou-se que segmentos cólicos desprovidos de trânsito, apresentam alterações histológicas e bioquímicas indistinguíveis daquelas

encontradas na CE humana e semelhantes às descritas nos modelos experimentais de colite quimicamente induzida (Sousa et al., 2008; Nonose, 2009; Nonose et al., 2009; Longatti et al., 2010). Demonstrou-se que o estresse oxidativo altera o conteúdo e modifica o padrão de expressão das proteínas que formam as junções de oclusão, com destaque para a claudina.

Com esses achados mostra-se, pela primeira vez na literatura, que a proteína claudina, a principal componente das junções de oclusão encontra-se alterada na CE assim como ocorre na colite ulcerativa.

Do ponto de vista prático, os resultados encontrados sugerem que o restabelecimento do suprimento de AGCC ao cólon exclusivo, quer pela reconstituição do trânsito fecal, quer pela administração de soluções nutricionais ou o uso de substâncias antioxidantes, deve ser considerado estratégia válida na prevenção e tratamento da CE.

Contudo, podemos notar que com o epitélio mucoso apical sendo constantemente agredido, torna-se necessária a renovação celular, o que justifica uma menor expressão da proteína na região apical dos cólons. Esses achados sugerem que a maior intensidade de renovação celular, aumentando o índice de divisão poderia ser uma das explicações possíveis para as diferentes expressões de proteínas.

O grupo de estudo relacionado a colite de exclusão permanece em busca de novos projetos e novas comprovações, como um estudo relacionado a outra proteína de junção de oclusão (occludina) onde possamos realizar um comparativo entre os resultados encontrados, comparativo este que possa ser apresentado em breve.

7 CONCLUSÕES

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

1. Existe menor conteúdo de claudina na região profunda das criptas cólicas em segmentos providos e desprovidos de trânsito fecal em relação a região apical;
2. Existe redução do conteúdo tecidual de claudina nos ápices das criptas cólicas nos segmentos desprovidos de trânsito fecal;
3. Não houve influência do tempo de exclusão do trânsito fecal no conteúdo tecidual total e local da expressão da proteína claudina.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. *Biologia molecular da célula*. 4a. ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. Cap. 19, p. 1065-126: Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular.

BAJKA BH, CLARKE JM, COBIAC L, TOPPING DL. Butyrylated starch protects colonocyte DNA against dietary protein-induced damage in rats. **Carcinogenesis**. 2008;29(11): 2169-74.

BIONDO-SIMÕES MLP, GRECA FH, ABICALAFFE MD, COLNAGHI MC, MATTOS E SILVA E, YAMASAKI ES, SMANIOTTO G. Colite do cólon exclusivo: modelo experimental em ratos. **Acta Cir Bras** 2000; 15(supl 3): 7-11.

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

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

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

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

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

DOGAN A, WANG ZD, SPENCER J. E-Cadherin expression in intestinal epithelium. **J Clin Pathol**. 1995; 48(2):143-6.

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

FABRIS FM. Avaliação do conteúdo e padrão de expressão da proteína B-catenina na mucosa cólica com e sem trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos. Tese (Mestrado). Bragança Paulista: Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco; 2011.

FEARON ER, VOGELSTEIN B. A genetic model of carcinogenesis. **Cell**. 1990;61(5):759-67.

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

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

GAUDIER E, RIVAL M, BUISINE MP, ROBINEAU I, HOEBLER C. Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. **Physiol Res**. 2009;58(1):111-9.

GASSLER N, ROHR C, SCHNEIDER A, KARTENBECK J, BACH A, OBERMÜLLER N, OTTO HF, AUTSCHBACH F. Inflammatory bowel disease is associated with

changes of enterocytic junctions. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**2001;281(1):G216-28.

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

GERAGHTY JM, TALBOT IC. Diversion colitis: histological features in the colon and rectum after desfunctioning colostomy. **Gut.**1991;32:1020-3.

GIARDIELLO FM, LAZENBY AJ, BAYLESS TM. The new colitides: collagenous, lymphocytic, and diversion colitis. **Gastroenterology Clinics of North America.** 1995; 24 (3), 717-729.

GLOTZER DJ, GLICK ME, GOLDMAN H. Proctitis following diversion of fecal stream. **Gastroenterology.**1981;80:438-41.

GRISHAM MB, GAGINELLA TS, VON RITTER C, TAMAI H, BE RM, GRANGER DN. Effects of neutrophil-derived oxidants on intestinal permeability, electrolytic transport and epithelial cell viability. **Inflammation.** 1990; 14(5):531-42.

GUEDES MLS, GUEDES JS. Descrição da Amostra: Tabelas e Gráficos. In: Guedes MLS, Guedes JS. Bioestatística para profissionais da saúde. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico; 1988. p.43-58.

GUPTA RB, HARPAZ N, ITZKOWITZ S, HOSSAIN S, MATULA S, KORNBLUTH A, BODIAN C, ULLMAN T. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. **Gastroenterology.** 2007;133(4):1099-105.

HAAS PA, FOX TA JR, SZILAGY EJ. Endoscopic examination of the colon and rectum distal to a colostomy. **Am J Gastroenterol.** 1990;85(7):850-4.

HABR-GAMA A, TEIXEIRA MG, VIEIRA MJF, MILÉU LF, LAURINO NETO R, PINOTTI HW. Operação de Hartmann e suas conseqüências. **Rev bras Coloproctol.** 1997;17(1):5- 10.

HARIG JM, SOERGEL KH, KOMOROWSKI RA, WOOD CM. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. **N Engl J Med.** 1989;320(1):23-8.

JANKOWSKI JA, BEDFORD FK, BOULTON RA, CRUICKSHANK N, HALL C, ELDER J, ALLAN R, FORBES A, KIM YS, WRIGHT NA, SANDERS DS. Alterations in classical cadherins associated with progression in ulcerative and Crohn's colitis. **Lab Invest.** 1998;78(9):1155-67.

JANKOWSKI JA, BEDFORD FK, KIM YS. Changes in gene structure and regulation of E-Cadherin during epithelial development, differentiation, and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1997; 57: 187-215.

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

KADRI CJ. Níveis de estresse oxidativo e conteúdo tecidual de E-caderina nos segmentos cólicos providos e desprovidos de trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos. Tese (Mestrado). Bragança Paulista: Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco; 2010.

KELI E, BOUCHOUCHA M, DEVROEDE G, CARNOT F, OHRANT T, CUGNENC PH. Diversion-related experimental colitis in rats. **Dis Colon Rectum.**1997;40:222-8.

KIELY EM, AJAYI NA, WHEELER RA, MALONE M. Diversion procto-colitis: response to treatment with short-chain fatty acids. **J Pediatric Surg.** 2001; 36(10):1514-7.

KISSMEYER_NIELSEN P, CHRISTENSEN H, LAURBERG S. Diverting colostomy induces mucosal and muscular atrophy in rat distal colon. **Gut** 1994; 35:1275-82.

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

KUCHARZIK T, WALSH SV, CHEN J, PARKOS CA, NUSRAT A. Neutrophil Transmigration in Inflammatory Bowel Disease Is Associated with Differential Expression of Epithelial Intercellular Junction Proteins. **Am J Pathol**. 2001;159(6):2001- 9.

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

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

LECHNER GL, FRANK W, JANTSCH H, PICHLER W, HALL DA, WANECK R, WUNDERLICH M. Lymphoid follicular hyperplasia in excluded colonic segments: a radiologic sign of diversion colitis. **Radiology**. 1990;176(1):135-6.

LONGATTI TS, ACEDO SC, DE OLIVEIRA CC, MIRANDA DD, PRIOLLI DG, RIBEIRO ML, GAMBERO A, MARTINEZ CA. Inflammatory alterations in excluded colon in rats: a comparison with chemically induced colitis. **Scand J Gastroenterol**. 2010;45(3):315- 24.

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

LU ES, LIN T, HARMS BL, GAUMNITZ EA, SINGARAM C. A severe case of diversion colitis with large ulcerations. **Am J Gastroenterol**. 1995;90(9):1508-10.

LUSK LB, REICHEN J, LEVINE JS. Aphthous ulceration in diversion colitis. Clinical implications. **Gastroenterology**. 1984;87(5):1171

MA, C.K.; GOTTLIEB, C.; HAAS, P.A. Diversion colitis: A clinicopathologic study of 21 cases. **Human Pathology**, 21(4):429-36, 1990.

MARGARIDO NF, NASSRI CGC, NASSRI AB, ROTTA CM. Modelo experimental em ratos de colite por exclusão. **Rev Col Bras Cir**. 2003;30(Supl.1):179.

MARQUES LHS, SILVA CMG, LAMEIRO TMM, ALMEIDA MG, CUNHA FL, PEREIRA JA, MARTINEZ CAR. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica em células da mucosa cólica após aplicação de enemas com peróxido de hidrogênio. Estudo experimental em ratos. **Rev Bras Coloproct**. 2010.

MARTINEZ, CAR. Estudo morfométrico da superfície mucosa do estômago de cães submetidos a esplenectomia e a vagotomia gástrica proximal isoladas e associadas.[Tese de Doutorado]. São Paulo: Hospital Servidor Público Estadual “Francisco Morato Oliveira”; 2002.

MARTINEZ CAR, PRIOLLI DG, PORTES AV, CARDINALLI IA, PEREIRA JA; MARGARIDO NF. Avaliação por processamento de imagem assistida por computador das alterações histopatológicas da parede cólica de segmentos providos e desprovidos de trânsito intestinal. **Rev Bras Coloproct**. 2007;27(Supl.1):36-7

MARTINEZ CAR, PRIOLLI DG, RIBEIRO ML, GAMBERO A, MIRANDA DDC, PEREIRA JA, NADAL SR. The importance of oxygen free radicals in the etiopathogenesis of diversion colitis in rats. **Acta Cir Bras**. 2010c.

MARTINEZ CAR, SOUZA CAF, NORONHA MR, ALFREDO CH, SPADARI APP, BARTOCCI PCM, PRIOLLI DG. Pseudolipomatose do cólon: relato de caso. **Rev Bras Coloproct**. 2008;28(1):104-7.

MARTINEZ CAR. O estresse oxidativo na etiopatogenia da colite de exclusão. Estudo experimental em ratos. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2009.

MARTINEZ CA. Inflammatory alterations in excluded colon in rats: a comparison with chemically induced colitis. **Scand J Gastroenterol**. 2010;45(3):315-24.

MARTINEZ CA, BARTOCCI PC, DO CARMO CV, PEREIRA JA, MIRANDA DD, RIBEIRO ML. The effects of oxidative DNA damage and mutations in the p53 protein on cells of the colonic mucosa with and without the fecal stream: an experimental study in rats. **Scand J Gastroenterol**. 2010;45(6):714-24 (a).

MARTINEZ CAR, NONOSE R, SPADARI AP, MÁXIMO FR, PRIOLLI DG, PEREIRA JA, MARGARIDO NF. Quantification by computerized morphometry of tissue levels of sulfomucins and sialomucins in diversion colitis in rats. **Acta Cir Bras**. 2010b;25(3):231- 40.

MARTINEZ CAR, RIBEIRO ML, GAMBEROM A, MIRANDA DDC, PEREIRA JA, NADAL SR. The importance of oxygen free radicals in the etiopathogenesis of diversion colitis in rats. **Acta Cir Bras**. 2010;25(5):387-95

MORTENSEN FV, HESSOV I, BRIKE H, KORSGAARD N, NIELSEN H. Microcirculatory and trophic effects of short chain fatty acids in the human rectum after Hartmann's procedure. **Br J Surg** 1991;78:1208-11.

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

MURRAY FE, O'BRIEN MJ, BIRKETT DH, KENNEDY SM, LAMONT JT. Diversion colitis: pathologic findings in a resected sigmoid colon and rectum. **Gastroenterology**. 1987;93(6):1404-8.

NASSRI CGG, MARGARIDO NF, NASSRI AB, ROTTA CM, SOARES LA. Modelo experimental de colite por exclusão. In: Anais do XXIV Fórum de Pesquisa do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. Rio de Janeiro, Brasil, 2003.

NASSRI CGG, NASSRI AB, FAVERO E, ROTTA CM, MARTINEZ CAR, MARGARIDO NF. Influência da irrigação de soluções nutricionais no colo excluído de trânsito intestinal. Estudo experimental em ratos. **Rev bras Coloproct.** 2008;28(3):306-14.

NEUT, C.; GUILLEMOT, F.; GOWER-ROUSSEAU, C.; BIRON, N.; CORTOT, A.; COLOMBEL, J.F. Treatment of diversion colitis with short-chain fatty acids. Bacteriological study. **Gastroenterol Clin Biol**, 19(11):871-5, 1995.

NEUT C, COLOMBEL, JF, GUILLEMOT F. Impaired bacterial flora in human excluded colon. **Gut**. 1989;30:1094-8.

NEUT C, GUILLEMONT F, COLOMBEL JF. Nitrate-reducing bacteria in diversion colitis. A clue to inflammation? **Digestive Diseases and Sciences**. 1997; 24 (12):2577-2580.

NOBELS F, COLEMONT L, VAN MOER E. A case of diversion rectitis. **Acta Clin Bel**. 1989;44(3):202-4.

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

NONOSE R. Avaliação do padrão de expressão e conteúdo de mucinas na mucosa cólica em modelo experimental de colite de exclusão: Estudo em ratos [dissertação]. Bragança Paulista, São Paulo: Universidade São Francisco; 2009.

NONOSE R, SPADARI APP, PRIOLLI DG, MÁXIMO FR, PEREIRA JA, MARTINEZ CAR. Tissue quantification of neutral and acid mucins in the mucosa of the colon with and without fecal stream: Experimental study in rats. **Acta Cir Bras**. 2009;24(4):267-75.

NOSÁL'OVÁ V, CERNÁ S, BAUER V. Effect of N-acetylcysteine on colitis induced by acetic acid in rats. **Gen Pharmacol**. 2000;35(2):77-81.

OLIVEIRA-NETO JP, AGUILAR-NASCIMENTO JE. Intraluminal irrigations with fibers improves inflammation and atrophy in diversion colitis. **Nutrition**.2004;20:197-9.

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

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

PARRISH AR, CATANIA JM, OROZCO J, GANDOLFI AJ. Chemically induced oxidative stress disrupts e-cadherin/catenin cell adhesion complex. **Toxicol Sci**. 1999; 51(1): 80-86.

PINTO JÚNIOR, FRANCISCO EDILSON LEITE; OLIVEIRA, ARIANO JOSÉ FREITAS DE; MEDEIROS, KALLYANDRE FERREIRA DE; RAMOS, ANA MARIA DE OLIVEIRA; RAMOS, CARLOS CÉSAR DE OLIVEIRA; MEDEIROS, ALDO DA CUNHA. Repercussões histopatológicas da colostomia no coto colônico distal desfuncionalizado: estudo experimental em ratos/ Histopathological consequences of colostomy in the defunctional intestinal segment: an experimental study in rats. **Rev. Col. Bras. Cir**, v. 26, n. 6, p. 327-33, 1999.

PINTO FE JR, BRANDT CT, MEDEIROS AC, OLIVEIRA AJ, JERÔNIMO SM, BRITO HM. Bacterial translocation in rats nonfunctioning diverted distal colon. **Acta Cir Bras**. 2007;22(3):195-201.

PINTO A, FIDALGO P, CRAVO M, MIDÕES J, CHAVES P, ROSA J, BRITO MA, LEITÃO CN. Short chain fatty acids are effective in short-term treatment of chronic

radiation proctitis: randomized, double-blind, controlled trial. **Dis Colon Rectum**.1999;42(6):788-95.

PRAVDA J. Radical Induction Theory of ulcerative colitis. **World J Gastroenterol**. 2005;11:2371-84.

PRIOLLI DG, CARDINALLI IA, PIOVESAN H, MARGARIDO NF, MARTINEZ CAR. Proposta para estadiamento do câncer colorretal baseada em critérios morfofuncionais. 119 Correlação com níveis séricos do antígeno carcinoembrionário. **Rev Bras Coloproct**, v. 27, n.4, p. 374-83, 2007.

PRIOLLI DG, MARGARIDO NF, MARTINEZ CAR, ROTTA CM, STEPHANI SM. Edema quantification by computerized morphometry as an evaluation parameter for the resistance of colon anastomoses. **Acta Cir Bras** 2003;18:398-406.

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

ROEDIGER WE. Anaerobic bacteria, the colon and colitis. **Aust N Z J Surg**.50(1):73-5, 1980.

ROEDIGER WE. The starved colon - diminished mucosal nutrition, diminished absorption, and colitis. **Dis Colon Rectum**.1990;33:858-62.

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

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

SCHEPPACH W, CHRISTL SU, BARTRAM H-P, RICHTER F, KASPER H. Effects of short chain fatty acids on the inflamed colonic mucosa. **Scand J Gastroenterology**. 1997; 32, suppl 222:53-7.

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

SCHMITZ H, BARMAYER C, FROMM M, RUNKEL N, FOSS HD, BENTZEL CJ, RIECKEN EO, SCHULZKE JD. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. **Gastroenterology.** 1999;116(2):301-9.

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

SHERIDAN AM, FITZPATRICK S, WANG C, WHEELER DC, LIEBERTHAL W. Lipid peroxidation contributes to hydrogen peroxide induced cytotoxicity in renal epithelial cells. **Kidney Int.** 1996;49(1):88-93.

SOUSA MV, PRIOLLI DG, PORTES AV, CARDINALLI IA, PEREIRA JA, MARTINEZ CAR. Evaluation by computerized morphometry of histopathological alterations of the colon wall in segments with and without intestinal transit in rats. **Acta Cir Bras.** 2008;23(5):417-24.

SOERGEL KH. Colonic fermentation: metabolic and clinical implications. **Clin Investig.** 1994;72(10):742-8.

THEWS O, LAMBERT C, KELLEHER DK, BIESALSKI HK, VAUPEL P, FRANK J. Impact of reactive oxygen species on the expression of adhesion molecules in vivo. **Adv Exp Med Biol.** 2009;645:95-100.

USAMI Y, CHIBA H, NAKAYAMA F, UEDA J, MATSUDA Y, SAWADA N, KOMORI T, ITO A, YOKOZAKI H. Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Hum Pathol** 2006.37(5):569- 77.

VELAZQUEZ OC, LEDERER HM, ROMBEAU JL. Butyrate and colonocyte. Production, absorption, metabolism and therapeutic implications. **Adv Exp Med Biol.**1997;427:123- 34.

VIEIRA DE BARROS K, GOMES DE ABREU G, NAVARRO XAVIER RA, REL MARTINEZ CA, RIBEIRO ML, GAMBERO A, OLIVEIRA PC, SILVEIRA VLF. Effects of a high fat or a balanced omega 3/omega 6 diet on cytokines levels and DNA damage in experimental colitis. **Nutrition.** 2010.

VILLANACCI V, TALBOT IC, ROSSI E, BASSOTTI G. Ischaemia: a pathogenetic clue in diversion colitis? **Colorectal Dis.** 2007;9(7):601-5.

WATSON AJ, CHU S, SIECK L, GERASIMENKO O, BULLEN T, CAMPBELL F, CKENNA M, ROSE T, MONTROSE MH. Epithelial barrier function in vivo sustained despite gaps in epithelial layers. **Gastroenterology.** 2005;129(3):902-12.

YEONG ML, BETHWAIT PB, PRASAD J, ISBISTER WH. Lymphoid follicular hyperplasia - a distinctive feature of diversion colitis. **Histopathology.**1991;19:55-61.

FONTES CONSULTADAS

1. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR-6023: Informação e documentação, referências-elaboração. Rio de Janeiro; 2000.
2. Cunha AC. Estrutura e Apresentação de Dissertações e Teses. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1991. 48p.
3. Guedes MLS, Guedes JS. Descrição da Amostra: Tabelas e Gráficos. In: Guedes MLS, Guedes JS. Bioestatística para profissionais da saúde. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico; 1988. p.43-58.
4. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. N Eng J Med. 1997;336(4):309- 16.

5. International Committee of Medical Journal Editors. Requisitos uniformes para manuscritos apresentados a periódicos biomédicos. Ver Saúde Pública. 1999;33:6-15
6. Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. São Paulo, 2001. 85p.
7. Walker JR MLA. Style citations of eletronic sources. [online]. Available from: <http://www.cas.usf.edu/english/walker/mla.html>. (25 set. 2012)
8. Guimarães CA. Normas para manuscritos submetidos às revistas biomédicas: Escrita e edição da publicação biomédica (tradução integral do texto). Ver Col Bras Cir. 2008;35(6):425-41.
9. Ayres M, Ayres Júnior M, dos Santos AS. In: Ayres M, Ayres Júnior M, dos Santos AS. Bioestat 2.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; 2000. 227p.
10. CIOMS Council for International Organization of Medical Sciences. Ethical code for animal experimentation. WHO Chronicle. 1985;39(2):51-6.
11. Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Princípios éticos para o uso de animais de laboratório. [online]. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20eticos>. (25 set. 2012)
12. Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório. Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais (COBEA) - Legislação - Disponível em: <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=legislacao>. Acesso em: 09 Mar.2012.

ANEXOS

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa (CEUAP) da Universidade São Francisco, Bragança Paulista

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



Bragança Paulista, 22 de Novembro 2007.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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

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

Instituição: Universidade São Francisco

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

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

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

Parecer: Aprovado

Atenciosamente,


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

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Curia D'Ars CEP 13045-270 (19) 3779-3300
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933

ANEXO II – RESULTADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS - 06 SEMANAS (3 Examinadores)

Examinador 1

6 Semanas				
Rato	Com Trânsito		Sem Trânsito	
	Ápice	Fundo	Ápice	Fundo
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	1	0	0	0
8	1	0	0	0
9	1	0	2	0
10	1	0	0	0
11	0	0	0	0
12	3	0	0	0
13	1	0	0	0
14	3	0	0	0
15	2	0	2	0
16	3	0	2	0

Examinador 2

6 Semanas				
Rato	Com Trânsito		Sem Trânsito	
	Ápice	Fundo	Ápice	Fundo
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	1	0	0	0
8	0	0	0	0
9	1	0	1	0
10	1	0	0	0
11	0	0	0	0
12	3	0	0	0
13	1	0	0	0
14	3	0	0	0
15	2	0	1	0
16	3	0	2	0

Examinador 3

6 Semanas				
Rato	Com Trânsito		Sem Trânsito	
	Ápice	Fundo	Ápice	Fundo
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	1	0	1	0
8	1	0	0	0
9	1	0	1	0
10	1	0	0	0
11	0	0	0	0
12	3	0	0	0
13	2	0	0	0
14	3	0	0	0
15	2	0	1	0
16	3	0	2	0

ANEXO III – RESULTADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS - 12 SEMANAS (3 Examinadores)

Examinador 1

12 Semanas				
Rato	Com Trânsito		Sem Trânsito	
	Ápice	Fundo	Ápice	Fundo
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	2	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	2	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	3	0	1	0
9	2	0	1	0
10	0	0	0	0
11	2	0	0	0
12	2	0	1	0
13	2	1	0	0
14	2	0	0	0
15	0	0	2	0
16	0	0	0	0

Examinador 2

12 Semanas				
Rato	Com Trânsito		Sem Trânsito	
	Ápice	Fundo	Ápice	Fundo
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	3	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	2	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	3	0	1	0
9	3	0	1	0
10	0	0	1	0
11	3	0	0	0
12	2	0	1	0
13	2	1	0	0
14	3	0	1	0
15	0	0	3	0
16	0	0	0	0

Examinador 3

12 Semanas				
Rato	Com Trânsito		Sem Trânsito	
	Ápice	Fundo	Ápice	Fundo
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	3	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	2	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	3	0	1	0
9	3	0	1	0
10	0	0	0	0
11	3	0	0	0
12	2	0	0	0
13	2	1	0	0
14	3	0	0	0
15	0	0	2	0
16	0	0	0	0

ANEXO IV – RESULTADOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS - 18 SEMANAS (3 Examinadores)

Examinador 1

18 Semanas				
Rato	Com Trânsito		Sem Trânsito	
	Ápice	Fundo	Ápice	Fundo
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	3	0	0	0
5	0	0	2	0
6	3	0	0	0
7	1	0	0	0
8	1	0	1	0
9	2	0	1	0
10	3	0	0	0
11	0	0	0	0
12	2	0	0	0
13	2	0	0	0
14	2	0	0	0
15	1	0	2	0
16	0	0	0	0

Examinador 2

18 Semanas				
Rato	Com Trânsito		Sem Trânsito	
	Ápice	Fundo	Ápice	Fundo
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	2	0	0	0
5	0	0	0	0
6	2	0	0	0
7	1	0	0	0
8	1	0	0	0
9	1	0	1	0
10	2	0	0	0
11	0	0	0	0
12	2	0	0	0
13	1	0	0	0
14	1	0	0	0
15	1	0	0	0
16	0	0	0	0

Examinador 3

18 Semanas				
Rato	Com Trânsito		Sem Trânsito	
	Ápice	Fundo	Ápice	Fundo
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	2	0	0	0
5	0	0	0	0
6	2	0	0	0
7	1	0	1	0
8	1	0	0	0
9	3	0	0	0
10	3	0	0	0
11	0	0	0	0
12	2	0	0	0
13	2	0	0	0
14	2	0	1	0
15	1	0	1	0
16	0	0	0	0