RAQUEL FRANCO LEAL

EXPRESSÃO DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, DA PROTEÍNA PRÓ-APOPTÓTICA p-Bad E ATIVAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF-ΚB EM RESERVATÓRIOS ILEAIS DE DOENTES OPERADOS POR RETOCOLITE ULCERATIVA INESPECÍFICA E POR POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAR

CAMPINAS

2007

RAQUEL FRANCO LEAL

EXPRESSÃO DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, DA PROTEÍNA PRÓ-APOPTÓTICA p-Bad E ATIVAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF-ΚB EM RESERVATÓRIOS ILEAIS DE DOENTES OPERADOS POR RETOCOLITE ULCERATIVA INESPECÍFICA E POR POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAR

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Cirurgia, área de concentração em Cirurgia

ORIENTADOR: *Cláudio Saddy Rodrigues Coy*

CO-ORIENTADORES: *Lício Augusto Velloso e Juvenal Ricardo Navarro Góes*

CAMPINAS

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira - CRB-8ª / 6044

L473e

Leal, Raquel Franco
Expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β, IL-6,IL-8, da proteína pró-apoptótica p-Bad E ativação do fator de transcrição NF-KB em reservatórios ileais de doentes com retocolite ulcerativa inespecífica e polipose adenomatosa familiar / Raquel Franco Leal. Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadores: Cláudio Saddy Rodrigues Coy; Lício Augusto Velloso; Juvenal Ricardo Navarro Góes
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cirurgia. 2. Biologia Molecular. 3. Intestino - - Doenças. I. Coy, Cláudio Saddy Rodrigues. II. Velloso, Lício Augusto. III. Góes, Juvenal Ricardo Navarro. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. V. Título.

Título em inglês: Expression of proinflammatory cytokines TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, pro-apoptotic protein p-Bad and activation of transcription factor NF-KB in ileal pouches of patients with ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis

Keywords:
- Surgery
- Molecular Biology
- Intestinal diseases

Área de concentração: Cirurgia

Titulação: Mestrado em Cirurgia

Banca examinadora: Profº Drº Cláudio Saddy Rodrigues Coy
Profº Drº João José Fagundes
Profº Drº Aderson Omar Mourão Cintra Damião

Data da defesa: 28-03-2007

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Saddy Rodrigues Coy

Membros:

1. Prof. Dr. Cláudio Saddy Rodrigues Coy
2. Prof. Dr. Aderson Omar Mourão Cintra Damião
3. Prof. Dr. João José Fagundes

Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/03/2007

000734733

Aos meus pais,

Lucindo e Edna,

e aos meus irmãos

Patrícia e Marcelo,

que acompanharam meu crescimento e,

muitas vezes,

renunciaram os seus sonhos para que os meus se realizassem.

Exemplos de fé e esperança

que me trouxeram a força e a coragem

para vencer mais esta etapa de minha vida,

pelo apoio,

compreensão e

amizade.

Muito obrigada.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela credibilidade depositada e por ser a casa que durante 11 anos entre graduação, residência médica e mestrado, tornou possível minha formação profissional e garantiu meu crescimento pessoal.

Ao Prof. Dr. Cláudio Saddy Rodrigues Coy, Docente do Departamento de Cirurgia, Grupo de Coloprotoctologia da Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestório (FCM-UNICAMP), pelo privilégio de tê-lo como Orientador, pela confiança, incentivo, contribuição intelectual, estímulo à participação de eventos científicos tornando possível a realização deste trabalho: expresso meus maiores agradecimentos e o mais profundo respeito, os quais sempre serão poucos, diante do muito que me foi oferecido.

Ao Prof. Dr. Juvenal Ricardo Navarro Góes, Professor Titular do Departamento de Cirurgia, Grupo de Coloproctologia da Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestório (FCM-UNICAMP), pela honra de tê-lo como Co-Orientador, Mestre dedicado, exemplo de profissional e de pessoa, aprimoramento de técnicas e condutas médicas, colaboração na elaboração desta, e pela inestimável contribuição em minha formação acadêmica, expresso meus maiores agradecimentos e o mais profundo respeito.

Ao Prof. Dr. Lício Augusto Velloso, Professor Livre-Docente do Departamento de Clínica Médica (FCM-UNICAMP), pela honra de tê-lo como Co-Orientador, pela oportunidade de desenvolver as análises experimentais no Laboratório de Sinalização Celular (FCM-UNICAMP), e adentrar no campo da Biologia Molecular.

Ao Prof. Dr. João José Fagundes, Docente do Departamento de Cirurgia, Grupo de Coloprotoctologia da Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestório (FCM-UNICAMP), Mestre e amigo, pela honra de estar ao seu lado, a quem muito estimo pelos grandes ensinamentos acadêmicos, aprimoramento de técnicas e condutas médicas e valores éticos, que me guiaram para além das teorias e das técnicas, pelo incentivo à Ciência, expresso meus maiores agradecimentos e o mais profundo respeito.

Ao Prof. Dr. Luiz Sérgio Leonardi, Titular da Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestório - UNICAMP, exemplo de dedicação e liderança junto ao Departamento, a quem estimo muito.

Ao Prof. Dr. Mário Mantovani, Titular da Disciplina de Cirurgia do Trauma - UNICAMP, pelos ensinamentos acadêmicos, incentivo e orientação na realização de trabalhos científicos durante a graduação.

Ao Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo, Titular da Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestório e Chefe do Departamento de Cirurgia - UNICAMP, pela inestimável contribuição em minha formação acadêmica, e pelo exemplo de dedicação e trabalho junto à Universidade.

À Prof. Dra. Maria de Lourdes Setsuko Ayrizono, pela amizade, estímulo à pós-graduação, exemplo de perseverança, trabalho e dedicação junto ao Grupo de Coloproctologia - UNICAMP.

Ao Sandro Nunes Ângelo, pós-graduando do Departamento de Cirurgia, Grupo de Coloprotoctologia da Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestório (FCM-UNICAMP), pelo incentivo, trabalhos científicos em parceria e pela amizade.

À Patrícia Franco Leal, mestre em Engenharia (FEA-UNICAMP), irmã e amiga, pelo exemplo de organização, planejamento experimental, e pelo grande incentivo à Ciência e a pós-graduação.

Aos doentes voluntários, que participaram deste estudo, contribuindo para o desenvolvimento deste trabalho, possibilitando o aprimoramento científico das técnicas médicas. Muito Obrigada.

Ao Gastrocentro (HC-UNICAMP), local de atendimento dos doentes e realização das colonoscopias.

Ao Laboratório de Sinalização Celular (FCM-UNICAMP), local onde foram desenvolvidos os ensaios experimentais com auxílio financeiro parcial da FAPESP, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

À Marciane Milanski, nutricionista **e Andressa Coope**, bióloga, ambas pós-graduandas da Clínica Médica, pelo profissionalismo, eficiência, paciência, dedicação e auxílio na parte experimental deste estudo no Laboratório de Sinalização Celular e amizade nascida durante o convívio.

À Ana Lúcia Nunes Domingues, enfermeira do Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais (Gastrocentro - UNICAMP), pela dedicação, incentivo e auxílio no processo de recepção dos doentes voluntários.

À Elisa, do setor de Estatística (FCM-UNICAMP), pelas sugestões na análise estatística deste estudo.

À Mercedes e Alexandro, do Apoio Didático Científico e Computacional (FCM - UNICAMP), pelo assessoramento na realização dos gráficos e figuras.

Ao Sr. Luiz Joneri e Sr. Jósimo Pinheiro, técnicos do Laboratório de Sinalização Celular (FCM-UNICAMP), e **Sr. Gerson Júlio Nery Ferraz,** técnico do Laboratório do Gastrocentro (UNICAMP), exemplos de dedicação ao trabalho que realizam, agradeço a disponibilidade e auxílio.

"Aprender
é a única coisa de que
a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e
nunca se arrepende."

Leonardo da Vinci

Pág.

RESUMO..... *xiv*

ABSTRACT..... *xvi*

1- INTRODUÇÃO..... 18

1.1- Considerações Gerais..... 19

1.2- Dados da literatura..... 19

1.2.1- Ileíte do reservatório..... 19

1.2.2- Mecanismo inflamatório molecular em doença inflamatória intestinal..... 21

1.2.3- Mecanismo inflamatório molecular em reservatórios ileais..... 24

1.2.4- Apoptose celular (proteínas da família Bcl-2)..... 25

1.2.5- Mecanismos de apoptose celular em reservatórios ileais..... 27

2- OBJETIVOS..... 29

2.1- Objetivo geral..... 30

2.2- Objetivos específicos..... 30

3- CASUÍSTICA E MÉTODO..... 31

3.1- Casuística..... 32

3.1.1- Fatores de exclusão..... 33

3.1.2- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa..... 33

3.2- Método..... 33

3.2.1- Anticorpos, reagentes químicos e materiais..... 34

3.2.2- Soluções utilizadas..... 35

3.2.3- Extração de tecidos, imunoblot e imunoprecipitação..... 36

3.2.4- Determinação das bandas..... 38

3.2.5- Apresentação dos dados e análise estatística..... 39

4- RESULTADOS..... 40

4.1- Expressão de IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α..... 41

4.2- Ativação do fator de transcrição NF-ĸB..... 43

4.3- Expressão da proteína pró-apoptótica p-Bad..... 43

5- DISCUSSÃO..... 45

6- CONCLUSÃO..... 51

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 53

8- ANEXOS..... 64

8.1- Grupo RCUI..... 65

8.2- Grupo PAF..... 66

8.3- Grupo Controle..... 67

8.4- Questionário específico..... 68

8.5- Hábito intestinal e continência fecal - Grupo RCUI..... 69

8.6- Hábito intestinal e continência fecal - Grupo PAF..... 70

8.7-Parecer de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa..... 71

8.8- Termo de consentimento informado - Grupos RCUI e PAF..... 73

8.9- Termo de consentimento informado - Grupo Controle..... 74

DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Teste imunoenzimático
IL-1α	Interleucina 1 alfa
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
NF-ĸB	Fator nuclear de transcrição KappaB
PAF	Polipose adenomatosa familiar
p-Bad	Proteína pró-apoptótica phospho-Bad
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonila
RCUI	Retocolite ulcerativa inespecífica
RI	Reservatório ileal
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRIS	Tri(hidroximetil)-aminometano

Pág.

Figura 1 Mecanismos inflamatórios moleculares envolvendo TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 e ativação do fator de transcrição nuclear NF-KB em mucosa intestinal..... 23

Figura 2 Família de proteínas Bcl-2 relacionadas à apoptose celular. A proteína Bad é uma das únicas capazes de ativar a proteína pró-apoptótica Bax, e inibir a proteína anti-apoptótica Bcl-2, por possuir apenas o domínio BH3. O domínio BH3 é composto por uma seqüência de 21 aminoácidos dispostos em α-hélice..... 26

Figura 3 Mecanismos de apoptose celular (proteínas da família Bcl-2), envolvidos com a citocina TNF-α e o fator de transcrição nuclear NF-KB. As duas vias, tanto de apoptose, quanto de sobrevida da célula, podem ser ativadas pelo ligante TNF-α e seu receptor..... 27

Figura 4 Apoptose celular ativada pela proteína ligante e seu receptor CD95-CD95L (Fas-FasL), pertencente à família TNF, via caspases intracelulares, e ativação da proteína BID da família Bcl-2..... 28

Figura 5 Instalações do GASTROCENTRO, onde as reservatorioscopias foram realizadas..... 34

Figura 6 RI - Aspectos endoscópicos..... 34

Figura 7 Aplicação das amostras no gel de poliacrilamida..... 38

Figura 8 Separação das proteínas por eletroforese com fonte elétrica a 120 volts..... 38

Figura 9 Análise das bandas auto-radiografadas pelo programa "Scion Image", através de densitometria óptica..... 39

Figura 10 Determinação da expressão protéica de IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=10, *p<0.05 vs Controle; § p<0.05 vs PAF..... 42

Figura 11 Ativação de NF-KB em RI nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=10, *p<0.05 vs Controle; § p<0.05 vs PAF..... 43

Figura 12 Determinação da expressão protéica de p-Bad nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=9, *p<0.05 vs Controle; § p<0.05 vs PAF..... 44

RESUMO

A ileíte do reservatório pós retocolectomia total constitui uma das complicações mais comuns aos doentes com retocolite ulcerativa (RCUI), apresentando pequena freqüência nos doentes com polipose adenomatosa familiar (PAF). **Objetivo:** Avaliar a atividade inflamatória em mucosa de reservatórios ileais endoscopicamente normais pela expressão de IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, da proteína pró-apoptótica p-Bad e a ativação do NF-KB em doentes operados por RCUI e PAF. **Casuística e Métodos:** Estudou-se 20 doentes submetidos à retocolectomia total com reservatório ileal (RI) em "J", sendo 10 doentes com RCUI e 10 com PAF. O grupo controle foi constituído por doentes com íleo-colonoscopia normal. As biópsias foram congeladas em nitrogênio líquido e as expressões de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 e p-Bad foram avaliadas por meio de imunoblot de extrato protéico total. A ativação do NF-KB foi determinada por meio de ensaio de imunoprecipitação e imunoblot. **Resultados:** Expressões de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 e p-Bad foram maiores em RCUI, quando comparados com PAF ($p<0.05$), enquanto que a ativação de NF-KB foi similar nestes grupos. Os controles apresentaram pequena expressão de TNF-α ($p<0.01$), comparados com RCUI e PAF. **Conclusão:** Os doentes com RCUI apresentaram maiores níveis de expressão das citocinas estudadas, mesmo na ausência de sinais clínicos e endoscópicos de ileíte do reservatório. Além disso, neste grupo, houve expressão aumentada de p-Bad. Estes achados podem justificar a maior susceptibilidade dos doentes operados por RCUI a esta complicação e explicar o aumento da apoptose celular, que estaria correlacionada com a atrofia da mucosa em pacientes com ileíte do reservatório.

ABSTRACT

Pouchitis after total retocolectomy is the commonest complication in ulcerative colitis (UC), while is quite rare in familial adenomatous polyposis (FAP). **Objective:** To evaluate the inflammatory activity in endoscopically normal ileal pouch mucosa, by determining the expressions of IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, a pro-apoptotic protein, p-Bad and the activation of NF-KB in operated patients with UC and FAP. **Patients and Methods:** Twenty patients submitted to total retocolectomy and J pouch were evaluated, 10 patients with UC and 10 with FAP. The control group consisted of individuals with normal ileo-colonoscopy examination. The collected specimens were snap-frozen in liquid nitrogen and expression of TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 and p-Bad were determined by immunoblot of total protein extracts. NF-KB was evaluated by immunoprecipitation and immunoblot. **Results:** TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 and p-Bad expression was increased in patients with UC, when compared with FAP ($p<0.05$). Otherwise, NF-KB activation was similar in both groups. The control group had little TNF-α expression ($p<0.01$) when compared with UC and FAP. **Conclusion:** Patients with UC had increased cytokines levels, even without clinic and endoscopic evidence of pouchitis. Moreover, there was increased p-Bad expression. These findings may suggest a higher susceptibility to this complication in operated patients with UC, and could explain the increased epithelial cell apoptosis, that could be correlated with the mucosa atrophy in patients with pouchitis.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Considerações Gerais

O tratamento cirúrgico da retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) e da polipose adenomatosa familiar (PAF) baseia-se na retocolectomia total com confecção do reservatório ileal (RI) e anastomose ao canal anal. Esta tem sido a melhor opção, nas últimas três décadas, para o tratamento cirúrgico destas afecções (PARKS e NICHOLLS, 1978; NICHOLLS et al., 1987; NICHOLLS e BANERJEE, 1998; M'KOMA, 2006).

No Brasil, o RI foi introduzido em 1984 por Góes et al. com publicação dos três primeiros casos operados (GÓES et al., 1984). Várias modificações na confecção do RI foram propostas como alternativas ao formato original em "S" (PARKS e NICHOLLS, 1978; NICHOLLS et al., 1984) e em "J" (UTSUNOMIYA et al., 1980). Reservatórios com alças isoperistálticas (FONKALSRUD, 1980; FONKALSRUD, 1984), em "W" (NICHOLLS e PEZIM, 1985a) e em dupla câmara (GÓES et al., 1993) foram descritos, visando ao aprimoramento na função de armazenamento de conteúdo assim como o seu esvaziamento adequado.

O RI em "J" tem sido o mais utilizado, com relatos de acompanhamento a longo prazo (NICHOLLS et al., 1985b; DOZOIS, 1985; PEZIM e NICHOLLS, 1985; GÓES et al., 1987; NICHOLLS e BANERJEE, 1998; GÓES et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2003; GÓES et al., 2004; M'KOMA, 2006). Este tipo de reservatório apresenta como vantagens a facilidade na sua confecção, além de maior eficiência de evacuação (O'CONELL et al., 1987, GÓES e BEART, 1995).

A etiologia da inflamação do RI, uma complicação freqüente no pós-operatório, é desconhecida e ainda apresenta aspectos pouco esclarecidos, como sua maior ocorrência em pacientes com RCUI.

1.2- Dados da Literatura

1.2.1- Ileíte do reservatório

A ileíte primária do reservatório ("pouchitis") é inflamação inespecífica do RI, sendo a complicação tardia mais comum, principalmente nos portadores de RCUI. Nestes, esta ocorrência pode ser superior a 50% dos casos, enquanto que apenas 5% dos

doentes com PAF operados a apresentam (MOSKOWITZ et al., 1986; KIEHNE et al., 2006). O diagnóstico da ileíte do reservatório implica na piora da qualidade de vida, risco de disfunção e até perda do RI (KUHBACKER et al., 1998; FAROUK et al., 2000; TULCHINSKY et al., 2003; SHEN et al., 2006).

A inflamação do RI pode ser aguda (evolução com menos de quatro semanas) ou crônica (mais de quatro semanas) e o diagnóstico é baseado nas manifestações clínicas, achados endoscópicos e histológicos (SANDBORN et al., 1994a; HEUSCHEN et al., 2002; SHEN et al., 2003).

A etiologia da íleite do reservatório é ainda desconhecida, mas a susceptibilidade genética e estase fecal com proliferação bacteriana parecem ser fatores importantes no desencadeamento do processo inflamatório (MCLEOD et al., 1994; LAAKE et al., 2004; LAAKE et al., 2005; OHGE et al., 2005; KUEHBACHER et al., 2006), assim como a isquemia (LEVIN et al., 1992; ARMSTRONG et al., 1995). Além disso, pacientes com RI e ileostomias continentes, devido à estase fecal e à ação de bactérias anaeróbias, apresentam no interior dos reservatórios maior concentração de ácidos biliares não conjugados, em comparação com os portadores de ileostomias incontinentes (KAY et al., 1980; NATORI et al., 1992; SANDBORN et al., 1995). Os ácidos biliares não conjugados são potencialmente citotóxicos e poderiam afetar a mucosa do RI (MERRETT et al., 1997). No entanto, Sandborn et al (1995) não constataram diferenças na concentração destes em RI de doentes com ou sem ileíte do reservatório.

A deficiência intraluminal de ácidos graxos de cadeia curta seria outra hipótese para a etiologia da ileíte do reservatório. Estes ácidos graxos são produzidos por bactérias do cólon, sendo fonte primária de nutrientes para as células epiteliais do mesmo. Como as células da mucosa do RI apresentam mudanças morfológicas semelhantes ao epitélio cólico, têm-se postulado que estas células ileais também precisariam de maior concentração de ácidos graxos de cadeia curta, relativamente restritos no RI. Porém, alguns estudos não evidenciaram correlação consistente destes achados com a presença da ileíte do reservatório (CLAUSEN et al., 1992; SANDBORN et al., 1995).

A raridade da ileíte do reservatório entre os doentes com PAF tem levado os pesquisadores a postularem que a etiologia desta afecção envolveria a reativação da RCUI.

Alguns doentes com esta complicação, apresentam até mesmo manifestações extra-intestinais da RCUI, de forma semelhante aos períodos de maior atividade da doença (LOHMULLER et al., 1990; HATA et al., 2003; AKERLUNG e LOFBERG, 2004).

1.2.2- Mecanismo inflamatório molecular em doença inflamatória intestinal

Diversos mediadores inflamatórios são produzidos, a partir de estímulos intra-luminais, nos processos inflamatórios intestinais, levando à liberação de interleucinas, que estimulam a proliferação e ativação de linfócitos. Assim, citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α, desencadeiam a ativação de outras proteínas, como o fator de transcrição pró-inflamatório NF-KB, que atua dentro do núcleo celular, verificado em doenças inflamatórias intestinais (PODOLSKY, 2002; O'SHEA et al., 2002; AGGARWAL, 2003; CHEN e GREENE, 2004). Além disso, TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8 desempenham papel importante na ativação de células mononucleares da lâmina própria intestinal em doentes com RCUI, propiciando a manutenção do processo inflamatório. (MAHIDA et al., 1989; PULLMAN et al., 1992; GROSS et al., 1992; RAAB et al., 1993; REINECKER et al., 1993; O'SHEA et al., 2002; AGGARWAL, 2003; CHEN e GREENE, 2004). Entretanto, outros poucos estudos mostraram diminuição destas citocinas nesta afecção (HYAMS et al., 1991; NIELSEN et al., 1993; GROTTRUP et al., 1993).

Mahida et al. (1989) evidenciaram maior expressão de IL-1β em biópsias de mucosa intestinal com doença inflamatória intestinal em 16 doentes, sendo nove com RCUI, utilizando o método de isolamento de células mononucleares da lâmina própria.

Pullmann et al. (1992) demonstraram em 14 portadores de doença inflamatória intestinal (dez doentes com doença de Crohn e quatro com RCUI), expressão aumentada de IL-1 em mucosa de cólon, por meio de cultura de células mononucleares isoladas da lâmina própria, pelo método ELISA.

Gross et al. (1992) demonstraram haver maior produção de IL-6 nos doentes com doença de Crohn do que naqueles com RCUI em atividade, estudando 70 doentes com doença de Crohn e 23 com RCUI.

Reinecker et al. (1993), observaram em células mononucleares isoladas da lâmina própria, produção aumentada de TNF-α, IL-6 e IL-1β em doentes com doença inflamatória intestinal, podendo constituir método sensível para monitorar o grau de inflamação na mucosa.

Raab et al. (1993) relataram concentrações aumentadas de IL-8 e TNF-α em lavado intestinal de sigmóide e reto em 16 doentes com doença inflamatória intestinal em atividade nestas localizações. No entanto, Hyams et al. (1991), Nielsen et al. (1993) e Grottrup et al. (1993), estudando respectivamente 18, 25, e 11 doentes com RCUI, não conseguiram demonstrar aumento da expressão de TNF-α nesta doença.

A IL-1β, ativa linfócitos T estimulando a produção de IL-2 e inibindo a produção de IL-4, esta com ação antiinflamatória. Além disso, ativa linfócitos B produzindo imunoglobulinas, sendo importante fator regulador da resposta inflamatória (SADOUK et al., 1995; SANDBORG et al., 1995).

A produção de IL-6 está presente em vários tipos de células, como macrófagos, células endoteliais e fibroblastos e participa de múltiplos processos biológicos, como a diferenciação celular de linfócitos B, além da ativação e proliferação de linfócitos T (PULLMAN et al., 1992).

A IL-8, secretada predominantemente por macrófagos, exerce potente ação de quimiotaxia em neutrófilos e promove a degranulação dos mesmos. Além disso, a IL-8 está envolvida com respiração celular e migração dos granulócitos na mucosa intestinal. Demonstrou-se também que as células endoteliais e fibroblastos produzem elevados níveis de IL-6 e IL-8 em resposta a IL-1β e TNF-α, havendo interligação entre estas citocinas pró-inflamatórias (STRIETER et al., 1988; STRIETER et al., 1989; COLDITZ et al., 1989; SCHOEDER e CHRISTOPHERS, 1989).

As proteínas denominadas α e β defensinas estão presentes na mucosa intestinal normal, apresentando importante papel na homeostase microbiológica e defesa intestinal primária, sendo reguladas pelas citocinas TNF-α, IL-1α e IL-1β. As β defensinas foram estudadas em doenças inflamatórias intestinais por meio de biópsias de mucosa intestinal de

36 doentes portadores de RCUI e em 24 com doença de Crohn, verificando-se expressão aumentada dos principais subtipos HBD-2 e HBD-3 em mucosa de cólon de doentes portadores de RCUI. No entanto, não mostraram o mesmo resultado quando analisaram IL-8 e TNF-α. Os dados foram obtidos a partir da medida de RNA mensageiros nas amostras por meio da reação em cadeia da polimerase. (WEHKAMP et al., 2002; WEHKAMP et al., 2003).

O fator nuclear NF-KB é um dos fatores de transcrição das células eucarióticas mais estudado, desde sua descoberta há 20 anos. É codificado por cinco genes NFKB1, NFKB2, RELA, c-REL, e RELB, que levam à produção de sete proteínas, p105, p100, p50, p52, RELA, c-REL e RELB, envolvidas na comunicação entre proteínas citoplasmáticas e o núcleo. Níveis elevados de NF-KB nuclear ativado foram encontrados em portadores de doenças inflamatórias intestinais em atividade (TAK e FIRESTEIN, 2001; BADWIN, 2001; ZHANG e GHOSH, 2001).

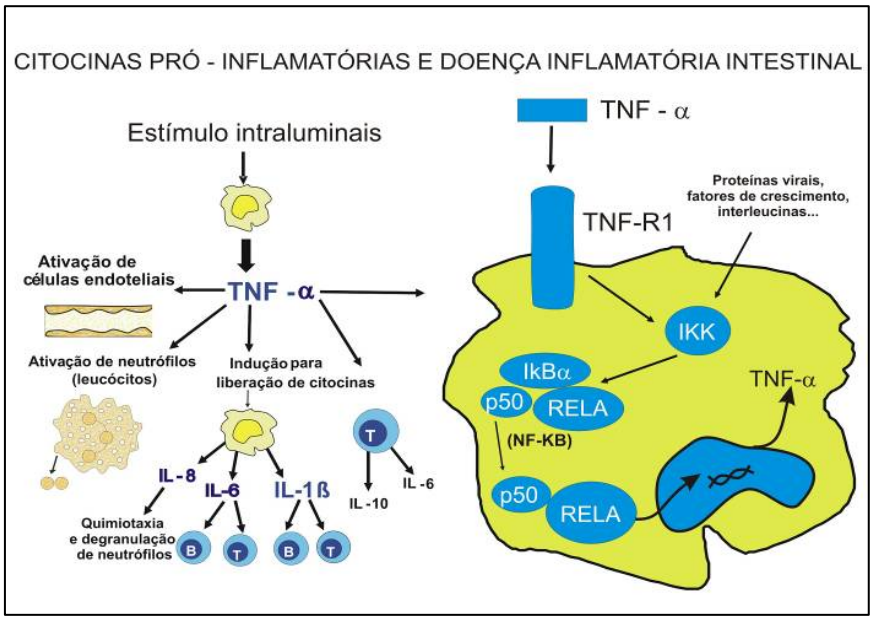

Figura 1- Mecanismos inflamatórios moleculares envolvendo TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 e ativação do fator de transcrição nuclear NF-KB em mucosa intestinal.

1.2.3- Mecanismo inflamatório molecular em reservatórios ileais

No entanto, existem poucos estudos na literatura avaliando o mecanismo inflamatório, bem como as citocinas presentes no RI com ou sem inflamação. Verificou-se em um estudo, pelo método de ELISA, concentrações aumentadas de IL-1β, IL-6 e IL-8 em mucosa de RI com ileíte, quando comparados à mucosa de RI normal e em íleo terminal do grupo controle. No entanto, TNF-α não foi detectado nos espécimes analisados com este método (GIONCHETTI et al., 1994).

Outro estudo analisou a expressão de IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α em culturas de células mononucleares da lâmina própria da mucosa de RI com e sem ileíte, mucosa intestinal de doentes com RCUI ativa e íleo terminal normal. Os autores demonstraram níveis aumentados destas citocinas pró-inflamatórias na ileíte do RI e na RCUI ativa, quando comparados com RI sem ileíte e com controle de íleo distal. Houve correlação importante entre os níveis de citocinas expressos na ileíte do RI e na RCUI ativa (PATEL et al., 1995).

Evgenikos et al. (2002) evidenciaram níveis aumentados de IL-1β e IL-8 em fluído de lavado intestinal em casos de ileíte do reservatório. Balzano et al. (1998), da mesma forma, verificaram maior expressão de IL-1β e IL-8 em mucosa de RI nestas condições de ileíte. Por outro lado, estudo avaliando a expressão tissular de IL-8 e IL-10 em reservatórios ileais com e sem ileíte, por meio de reação em cadeia de polimerase, não comprovou diferença entre os grupos (BULOIS et al., 2000).

Helwig et al. (2004) e Schmidt et al. (2006) observaram maior expressão de IL-8 em doentes com ileíte do reservatório quando comparados a doentes com RI, assintomáticos.

Lammers et al. (2005) verificaram a diminuição de IL-1β e IL-8 na mucosa de RI, por meio da expressão de RNA mensageiro, após a administração de probióticos em doentes com ileíte do reservatório.

Kiehne et al. (2006) avaliaram a expressão de α e β defensinas em RI, demonstrando níveis diminuídos das mesmas e aumento das citocinas TNF-α, IL-1β e IL-10 em mucosa de RI de doentes portadores de RCUI. Este mesmo estudo evidenciou níveis aumentados de defensinas e diminuídos das citocinas pró-inflamatórias em RI de

doentes operados por PAF, podendo ser considerado importante, pois comparou os fatores imunológicos nos reservatórios ileais de RCUI e PAF.

No entanto, não há estudos avaliando a ativação do fator de transcrição NF-KB em mucosa de RI.

1.2.4- Apoptose celular (proteínas da família Bcl-2)

Tanto o TNF-α, quanto o NF-KB, estão envolvidos com os mecanismos de apoptose celular. Estudos têm relatado a ativação de uma família de proteases, denominadas de caspases intracelulares, pelo TNF-α, que por sua vez, ativam alguns membros da família Bcl-2 (Bax e Bad), induzindo a apoptose celular (BARKETT et al., 1997; ADAMS e CORY, 1998; MINN et al., 1998; WIDMANN et al., 1998; GROSS et al., 1999; KUWANA e NEWMEYER, 2003; FESTJENS et al., 2004; VERMEULEN et al., 2005). Por outro lado, o fator de transcrição NF-KB apresenta função anti-apoptótica, ativando a expressão de outros membros da família Bcl-2, que impedem a morte celular (LAURENT et al., 1999; MC COLE et al., 2000; VERMEULEN et al., 2005).

Os membros da família de proteínas Bcl-2 são responsáveis pela homeostase entre apoptose e sobrevida celular, e apresentam três importantes domínios de ligação, BH1, BH2 e BH3. Este último domínio está envolvido com a dimerização da proteína Bcl-2, inativando-a, e ativação da proteína pró-apoptótica Bax. Algumas, como a proteína p-Bad apresentam função agonista, sendo pró-apoptótica, e expressam apenas o domínio BH3, e não o BH1 e BH2. Esta proteína não possui "âncoras transmembrana" e está presente livre no citossol, aguardando sua ativação por outros fatores, como citocinas, e a partir de então ser fosforilada. O mecanismo de ocorrência da morte celular ainda é desconhecido, no entanto, a conformação destas proteínas quando ativadas tem levado os pesquisadores a compará-las aos domínios de certas toxinas bacterianas. Estas seriam capazes de formar poros nas membranas biológicas e mesmo formar canais iônicos na membrana mitocondrial, ativando outras proteínas, que por sua vez, ativariam novamente as caspases celulares, e contribuiriam para a apoptose celular (MINN et al., 1998). Por possuir principalmente o domínio BH3, a proteína p-Bad é uma das únicas capazes de

neutralizar a ação anti-apoptótica de outros membros da família Bcl-2, como a proteína Bcl-2 (FESTJENS et al., 2004). Não há estudos avaliando a expressão da proteína p-Bad em RI.

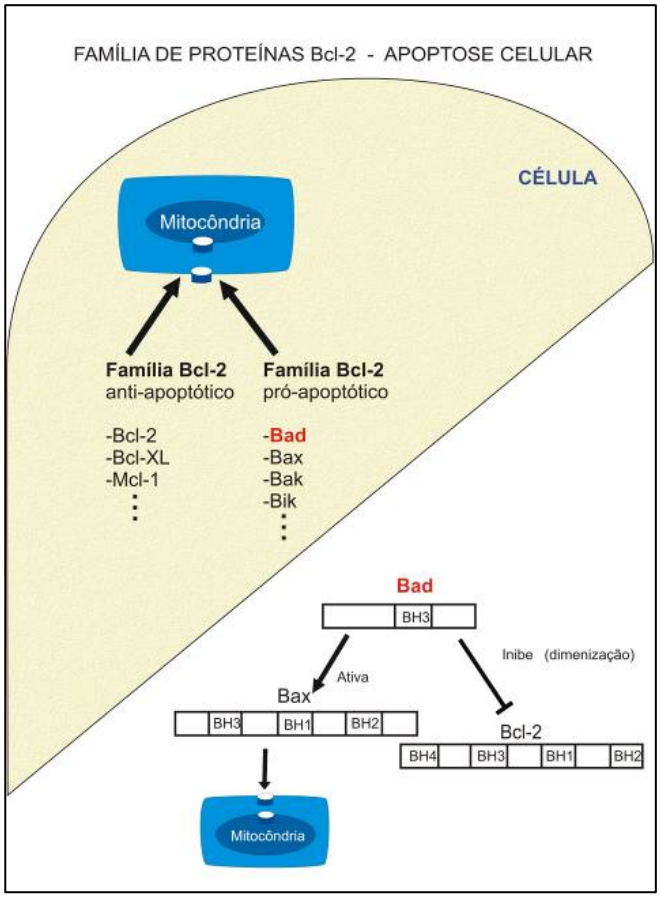

Figura 2- Família de proteínas Bcl-2 relacionadas à apoptose celular. A proteína Bad é uma das únicas capazes de ativar a proteína pró-apoptótica Bax, e inibir a proteína anti-apoptótica Bcl-2, por possuir apenas o domínio BH3. O domínio BH3 é composto por uma seqüência de 21 aminoácidos dispostos em α-hélice.

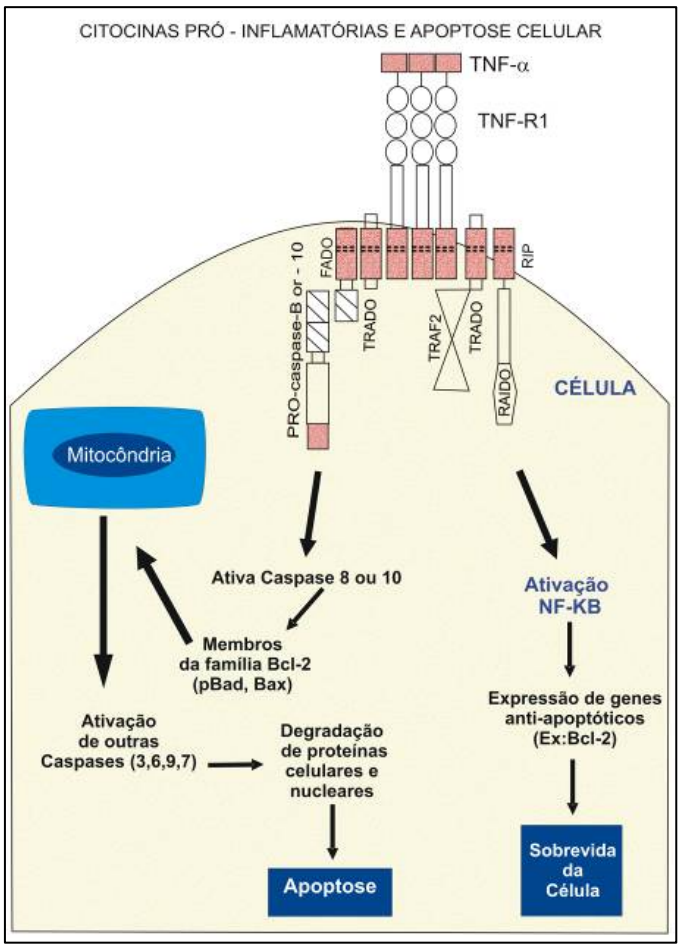

Figura 3- Mecanismos de apoptose celular (proteínas da família Bcl-2), envolvidos com a citocina TNF-α e o fator de transcrição nuclear NF-KB. As duas vias, tanto de apoptose, quanto de sobrevida da célula, podem ser ativadas pelo ligante TNF-α e seu receptor.

1.2.5- Mecanismos de apoptose celular em reservatórios ileais

A alteração na regulação da apoptose celular pode estar envolvida na ileíte do reservatório, uma vez que a mesma correlaciona-se com atrofia da mucosa, podendo predispor à infecção do RI por microorganismos comensais. Coffey et al. (2001) correlacionaram a ocorrência de atrofia de mucosa de RI com o nível de apoptose celular, estudando 24 doentes operados por RCUI, com e sem ileíte do reservatório. Demonstrou-se correlação direta entre os níveis aumentados de apoptose no epitélio e atrofia da mucosa,

através da pesquisa da expressão da proteína ligante e seu receptor Fas-FasL (CD95-CD95L) em células mononucleares da mucosa. A proteína ligante CD95L e seu receptor CD95 fazem parte da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), sendo uma de suas funções, a indução de apoptose celular, estando desta maneira, ligados aos mecanismos inflamatórios já mencionados. A apoptose seria importante fator também na ileíte do reservatório, uma vez que a morte celular poderia estar associada à atrofia da mucosa verificada nesta condição (COFFEY et al., 2001).

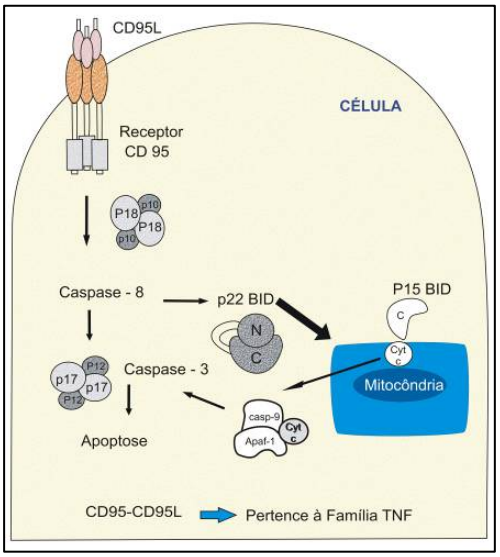

Figura 4- Apoptose celular ativada pela proteína ligante e seu receptor CD95-CD95L (Fas-FasL), pertencente à família TNF, via caspases intracelulares, e ativação da proteína BID da família Bcl-2.

O esperado, quando se transpõe esses conceitos para as condições potencialmente inflamatórias da parede intestinal do RI, é que haja a possibilidade de se antever futuras transformações, dentro desta cascata inflamatória, que poderiam estar associadas à ocorrência da íleite do reservatório. Além da tentativa de explicação da maior ocorrência de ileíte do RI em doentes operados por RCUI. Por isso há grande interesse clínico no conhecimento dos fatores envolvidos no processo inflamatório do RI nos portadores de RCUI e PAF, bem como os fatores que exacerbariam e perpetuariam este processo.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Avaliar doentes portadores de RCUI e de PAF, submetidos à retocolectomia total com RI, quanto à presença de possíveis fatores envolvidos na atividade inflamatória na mucosa dos reservatórios.

2.2- Objetivos Específicos

Avaliar a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, da proteína pró-apoptótica p-Bad e ativação do fator de transcrição NF-KB, em fragmentos de mucosa de RI endoscopicamente normal de doentes portadores de RCUI e PAF.

3- CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1- Casuística

Vinte doentes submetidos à retocolectomia total com RI em "J", operados no período de 1992 a 2002 pelo Grupo de Coloproctologia da Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestório da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) foram selecionados, sendo 10 portadores de RCUI - Grupo RCUI (Anexo 8.1) e outros 10 portadores de PAF – Grupo PAF (Anexo 8.2).

Selecionou-se 10 doentes, que constituíram o Grupo Controle (Anexo 8.3), que foram submetidos à colonoscopia por outros motivos, coletando-se biópsias de íleo distal sem alterações endoscópicas para compor o grupo controle.

Sessenta por cento dos doentes com RCUI são do sexo feminino, com média de idade atualizada de 48,1 (31 - 63) anos, enquanto que cinqüenta por cento dos portadores de PAF são do sexo feminino, com média de idade atualizada de 33,6 (21-59) anos ($p=0,0053$). O tempo médio de acompanhamento dos doentes após a cirurgia do RI, foi de 73,1 (24 - 168) meses, sendo 77,8 meses para os doentes com RCUI e 64,9 meses para aqueles com PAF ($p>0,05$). O tempo médio de pós-operatório até o fechamento da ileostomia foi de 66,3 (12-144) meses para os doentes com RCUI e de 57,6 (26-82) meses naqueles com polipose ($p>0,05$). Os doentes não estavam em uso de medicações, e não haviam tido episódio prévio de ileíte do reservatório.

As indicações cirúrgicas dos doentes com RCUI foram intratabilidade clínica (40%), megacólon tóxico (40%) e presença de displasia de alto grau nas biópsias de seguimento endoscópico (20%). Nos doentes com PAF, a indicação da retocolectomia total estava ligada à presença de numerosos pólipos no reto, em geral mais do que vinte pólipos adenomatosos.

Em relação à técnica operatória, empregou-se a preservação da arcada do cólon direito (GÓES et al., 1994; GÓES et al., 2002), em todos os doentes para irrigação sanguínea suplementar do reservatório ileal, além da realização de mucosectomia a partir da linha pectínea numa extensão média de dois a três cm, completando o procedimento com anastomose íleo-anal manual e ileostomia derivativa.

O hábito intestinal e continência fecal foram avaliados por meio de questionário específico (Anexo 8.4). A média de evacuações diárias foi de 6,9, variando de 3 a 12 vezes no grupo de doentes operados por RCUI (Anexo 8.5), enquanto que no grupo de doentes operados por PAF (Anexo 8.6) foi de 6,8, variando de 4 a 10 vezes ao dia ($p>0,05$). Sete doentes (35%) relataram perdas noturnas eventuais (menor ou igual a duas vezes por mês), sendo quatro doentes com RCUI, e três com PAF. Os demais doentes negaram a ocorrência de incontinência fecal.

3.1.1- Fatores de Exclusão

Excluíram-se os doentes com menos de um ano de fechamento da ileostomia, e aqueles com evidência clínica e/ou endoscópica de ileíte do reservatório, de tal maneira que todos os reservatórios ileais assim como o íleo distal dos pacientes do Grupo Controle eram considerados endoscopicamente normais. Os sintomas considerados para o diagnóstico clínico de ileíte do reservatório foram: febre, mialgia, aumento súbito do número de evacuações com ou sem sangue. Os critérios endoscópicos utilizados foram: presença de enantema com ou sem erosões, apagamento da trama vascular submucosa, mucosa friável e com exsudato.

3.1.2- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, registrado sob nº 543/2005 (Anexo 8.7). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento informado (Anexos 8.8 e 8.9).

3.2- Método

Os doentes foram submetidos à reservatorioscopia no Serviço de Colonoscopia - (GASTROCENTRO - UNICAMP) e coleta de seis biópsias endoscópicas de íleo do reservatório para posterior análise da atividade inflamatória. Os aparelhos utilizados foram videocolonoscópios das marcas Fujinon® e Olympus®.

A análise da expressão de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 e ativação do fator NF-KB foram realizadas a partir das amostras teciduais obtidas por biópsias endoscópicas dos doentes dos Grupos RCUI, PAF e Controle. O estudo da expressão da proteína p-Bad, também feita através de espécimes obtidos por biópsia endoscópica, foi realizada em nove pacientes de cada grupo.

Figura 5- Instalações do GASTROCENTRO, onde as reservatorioscopias foram realizadas.

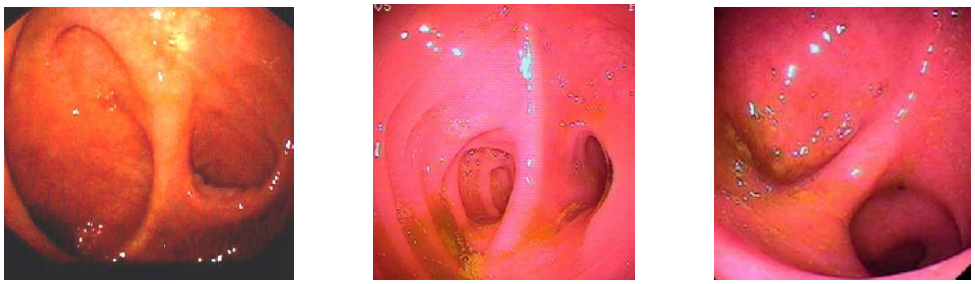

Figura 6- RI - Aspectos endoscópicos.

3.2.1- Anticorpos, Reagentes Químicos e Materiais

Os reagentes e aparelhos para realização de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA). Metano hidroximetilamina (TRIS), fenil-metilsufonilfluoreto (PSMF),

aprotinina e ditiotreitol (DTT), Triton X-100, Tween 20, e glicerol foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). A membrana de nitrocelulose (BA85, 0.2μm) e a proteína A Sepharose 6 MB foram obtidas da Amersham (Aylesbury, UK). Os anticorpos anti-IL-1β (sc-1252, goat polyclonal), anti-IL-6 (sc-1266, goat polyclonal), anti-IL-8 (sc-7922, goat polyclonal), anti-TNF-α (sc-1347, goat polyclonal), anti-phospho-Bad (Ser 136, sc-7999, goat polyclonal), anti-p65-NFKB (sc-1643, mouse polyclonal) e anti-IKK-b (mouse monoclonal, sc-8014) foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). O marcador de peso molecular foi o PageRuler^{TM} da Fermentas (MD, USA). Os reagentes para a reação de quimioluminescência foram da SuperSignal® (Rockford). A albumina 5% utilizada foi de origem bovina.

3.2.2- Soluções utilizadas

- Tampão de extração A: utilizado para a extração das proteínas celulares dos tecidos estudados, contém: Trisma base pH 7,5 (hidroximetil amino metano) 100mM, SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, EDTA (Ácido etileno-diamino tetracético) 10mM, fluoreto de sódio 100mM, pirofosfato de sódio 10mM, ortovanadato de sódio 10mM. O ortovanadato foi colocado no momento de utilização do tampão.

- Solução tampão de extração B, para imunoprecipitação: utilizada para a extração de proteínas celulares dos tecidos estudados, que são posteriormente imunoprecipitadas. Contém: Trisma base 100mM, EDTA 10mM, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2 mM (diluído em álcool etílico), Triton X-100 1% e 0,1mg/ml de aprotinina. A solução foi mantida a 4^0C, sendo que o ortovanadato, o PMSF e a aprotinina foram acrescidos no momento do uso.

- Tampão de Laemmli (5X): usado para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletrofororese (SDS-PAGE), contém: azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%.

- Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): contém: Trisma base 200mM, glicina 1,52M, EDTA 7,18mM e SDS 0,4%. Para uso, a solução é diluída 1:4.

- Solução tampão para transferência: empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose, contém: Trisma base 25mM, glicina 192 mM, Metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a diluição de proteínas de alto peso molecular. Mantida estocada a 4^0C.
- Solução tampão para SDS-PAGE – Gel de resolução (resolving): tampão composto de EDTA 4mM, SDS 2%, Trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.
- Solução tampão para SDS-PAGE – Gel da fase de empilhamento (stacking) das proteínas: contém: EDTA 4 mM, SDS 2%, Trisma base 50mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.
- Solução basal: solução básica utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas, contém: Cloreto de sódio 150 mM, Trisma base 10 mM, Tween 20 0,02%.
- Solução bloqueadora: albumina 5% e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal para as citocinas IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α e para a proteína pró-apoptótica p-Bad. Para o NF-KB foi utilizado solução com 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal.
- Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado: contém: Trima base 100mM, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 2 mM e Triton X-100 0,5%.
- Solução para anticorpos: solução contendo anticorpos específicos que identificam as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal.

3.2.3- Extração de tecidos, imunoblot e imunoprecipitação

Fragmentos obtidos a partir de biópsias endoscópicas da mucosa de RI e de íleo distal foram congelados em nitrogênio líquido, e armazenados a -80^{o}C, no Laboratório de Sinalização Celular - FCM UNICAMP, para posterior homogeneização em tampão de imunoprecipitado contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4),

100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1mg/ml de aprotinina a 4^0C, com Polytron PTA 20S em velocidade máxima por 30 segundos (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY).

O homogeneizado foi então centrifugado a 11.000 rpm por 20 minutos a 4^0C. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e posteriormente preparou-se amostra contendo 125μg de proteína total para ser utilizado nos experimentos de immunoblot e separação por SDS-PAGE. As amostras foram diluídas em tampão de Laemmli, contendo 100mmol/L de DTT. Após rápida fervura, foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose, em aparelho de transferência da BIO-RAD. As membranas de nitrocelulose foram incubadas "overnight" com 10μl de anticorpo específico (anti-IL-1β, anti-IL-6, anti-IL-8, anti-TNF-α ou anti-p-Bad). A ligação do anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (albumina 5%) por 90 minutos (VELLOSO et al., 1996; ARAÚJO et al., 2005).

Utilizou-se a técnica de imunoprecipitado (IP) para o NF-KB, na qual a amostra de 1.0 mg de proteína foi incubada "overnight" por 12 a 14 horas a 4^oC, com 10μl de anticorpo contra p65-NFKB. Após a incubação os imunocomplexos foram recuperados com Proteína A Sepharose 6MB por 2 horas a 4^oC e decantados por centrifugação por 15 minutos a 4^oC/11.000rpm. O precipitado foi lavado três vezes, em intervalos de 5 minutos com tampão de lavagem (2 mM ortovanadato de sódio, 100 mM Trisma base, 10mM EDTA, 0,5% Triton X-100). O sobrenadante foi descartado retendo-se apenas as proteínas precipitadas (imunocomplexos). Os imunocomplexos foram ressuspensos em 25μl de tampão de Laemmli, contendo 100mmol/l de DTT. Seguiu-se a separação por SDS-PAGE, e a partir de então a proteína foi transferida para a membrana de nitrocelulose, sendo incubada com anticorpos anti-IKK-β. A ligação do anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (leite em pó desnatado 5%) (VELLOSO et al., 1996).

Figura 7- Aplicação das amostras no gel de poliacrilamida.

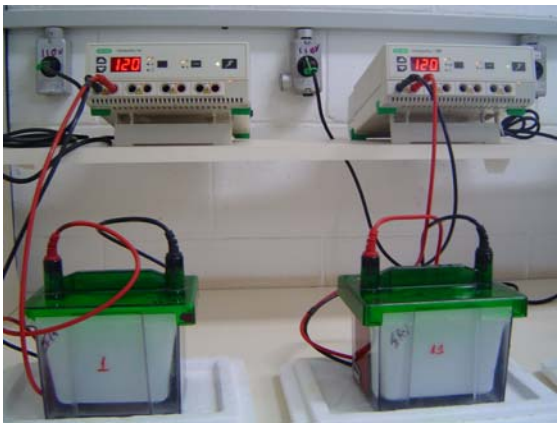

Figura 8- Separação das proteínas por eletroforese com fonte elétrica a 120 volts.

3.2.4- Determinação das bandas

Após incubação com anticorpo primário específico, foi realizada incubação com anticorpo secundário, que possui em sua porção Fc uma peroxidase, que é uma enzima que se ligará ao reagente da reação de quimioluminescência que contém luminol, produzindo luz, que será captada através de auto-radiografia.

O sinal foi detectado por meio de reação de quimioluminescência (SuperSignal®West Pico Chemiluminescent Substrate from Pierce Biothecnology, Inc. Rockford).

3.2.5- Apresentação dos dados e análise estatística

Os resultados são apresentados em unidades arbitrárias, como comparações diretas das bandas protéicas nas auto-radiografias, as quais foram quantificadas através de densitometria usando o programa "Scion Image" (Scion Corp). Os resultados são notificados como média, com variação do erro padrão. Foi utilizada análise de variância (Anova), seguida por análise de significância (Teste de Tukey-Kramer). Nível de significância adotado foi $p<0,05$.

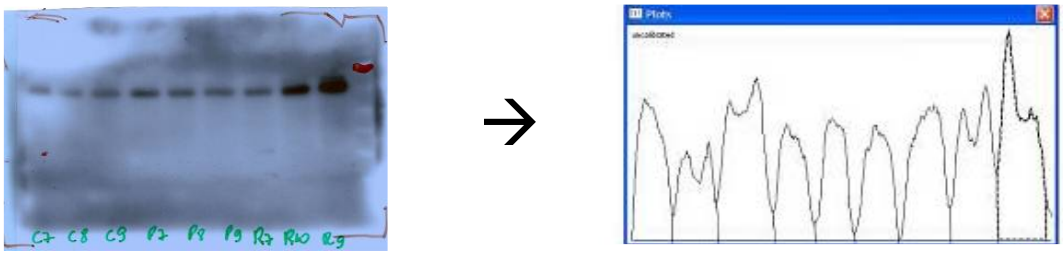

Figura 9- Análise das bandas auto-radiografadas pelo programa "Scion Image", através de densitometria óptica.

4- RESULTADOS

4.1- Expressão de IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α

As expressões de IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α, foram significativamente maiores no Grupo RCUI em relação ao Grupo PAF ($p<0,05$). A expressão de TNF-α no Grupo Controle foi menor quando comparada com os demais grupos ($p<0,01$). No entanto, não se observou diferenças significativas para expressão de IL-1β, IL-6 e IL-8 no Grupo Controle em relação aos Grupos RCUI e PAF ($p>0,05$). A distribuição dos achados para cada citocina individualmente é mostrada na Figura 5 (A, B, C e D), juntamente com as bandas autoradiografadas quantificadas por densitometria óptica.

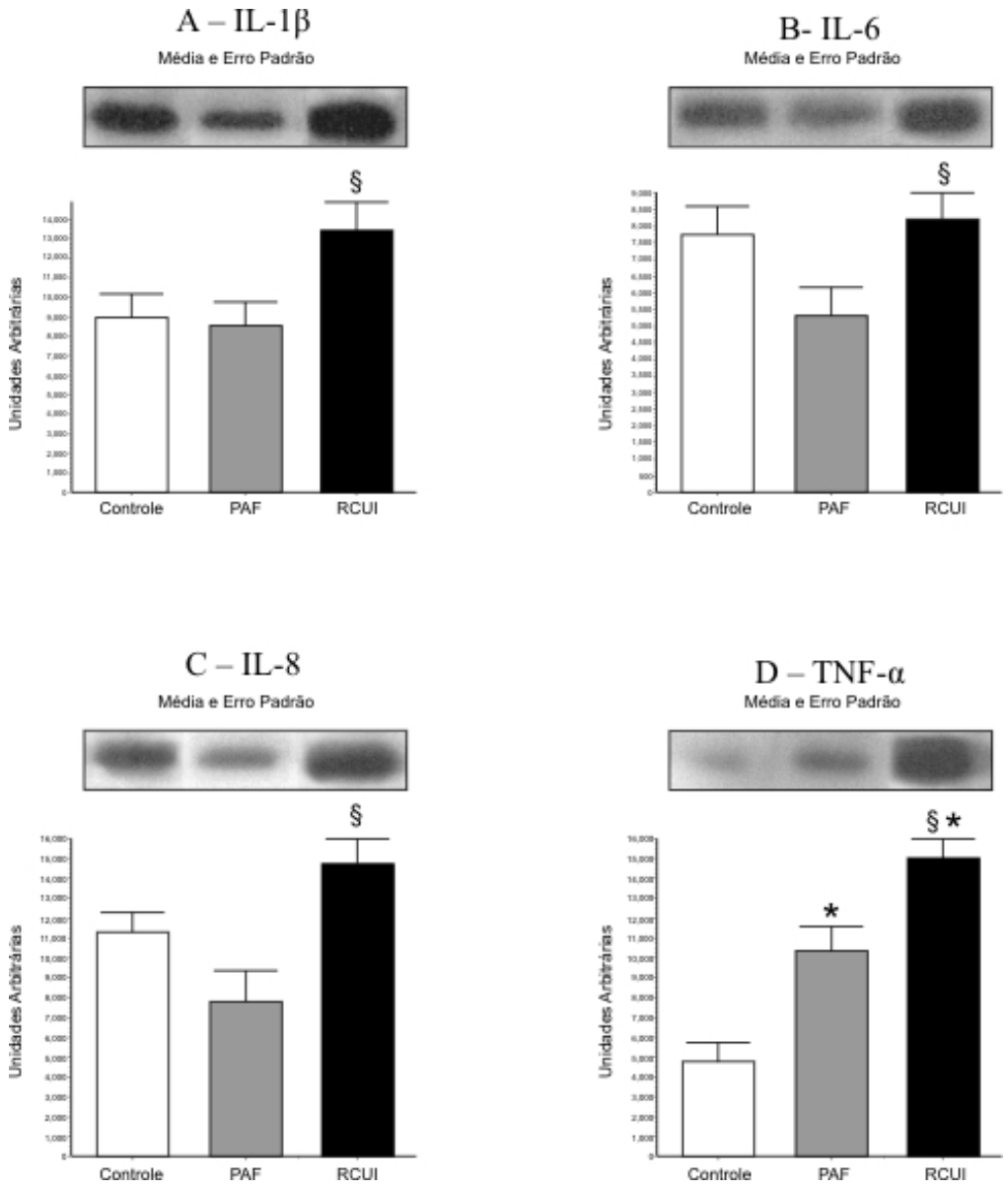

Figura 10- Determinação da expressão protéica de IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=10, *p<0.05 vs Controle; § p<0.05 vs PAF.

4.2- Ativação do fator de transcrição NF-ĸB

A análise mostrou níveis similares de NF-KB ativado no Grupo RCUI, comparado ao Grupo PAF (p>0,05). Da mesma forma, o Grupo Controle não apresentou diferença significativa deste fator quando comparado aos Grupos RCUI e PAF (p>0,05). A ativação do fator de transcrição NF-KB é ilustrada na Figura 6.

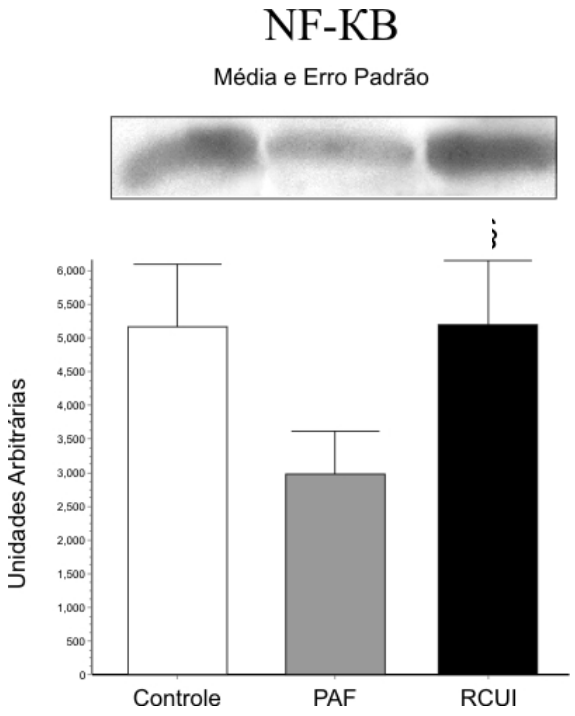

Figura 11- Ativação de NF-KB em RI nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=10, *p<0.05 vs Controle; § p<0.05 vs PAF.

4.3- Expressão da proteína pró-apoptótica p-Bad

A expressão da proteína pró-apoptótica p-Bad foi significativamente maior no Grupo RCUI em relação ao Grupo PAF (p<0,05). Não houve diferença significativa da expressão desta proteína no Grupo Controle, quando comparado aos demais grupos (p>0,05) (Figura 7).

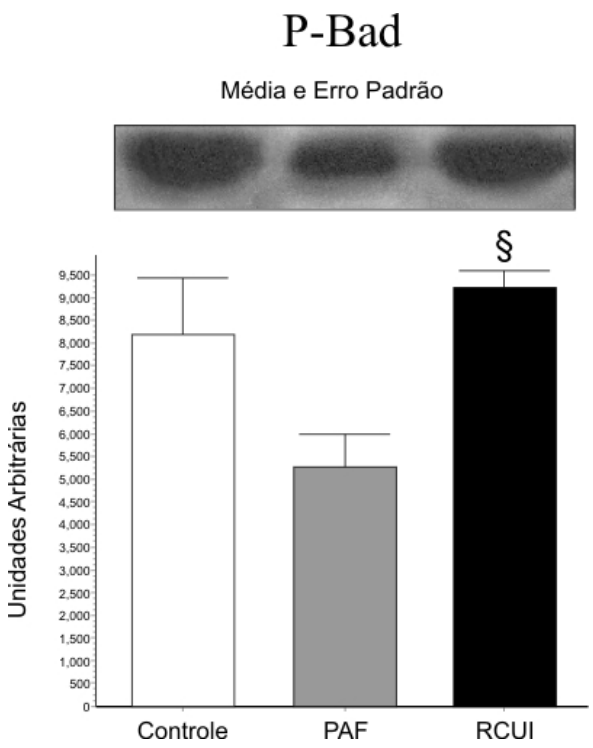

Figura 12- Determinação da expressão protéica de p-Bad nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=9, *p<0.05 vs Controle; § p<0.05 vs PAF.

5- DISCUSSÃO

A cirurgia do RI foi criada como alternativa para restabelecimento do trânsito intestinal após retocolectomia total, sem a utilização de derivação intestinal definitiva. A forma mais utilizada para confecção do RI atualmente é o "J", e no Grupo de Coloproctologia da UNICAMP, utiliza-se na maioria dos doentes a preservação da arcada do cólon direito como irrigação sangüínea suplementar (GÓES et al., 1994). As afecções mais freqüentes para o emprego desta técnica cirúrgica são RCUI e PAF.

O seguimento pós-operatório nas diversas instituições tem demonstrado que a íleite do reservatório ("pouchitis") é a complicação mais comum, evidenciada principalmente nos doentes operados de RCUI (MOSKOWITZ et al., 1986; KIEHNE et al., 2006). O diagnóstico é realizado principalmente pelos achados clínicos e endoscópicos utilizados para mensurar o índice de atividade da ileíte do reservatório, desenvolvido por Sandborn et al. (1994b) e modificado por Shen et al. (2003). Sendo este último estudo relevante para mostrar que a ausência de biópsia e achados histopatológicos da mucosa dos RI não modifica o diagnóstico de ileíte do reservatório, simplificando assim seus critérios diagnósticos. Os fatores causais desta afecção, no entanto, estão ainda pouco elucidados, principalmente em relação a maior ocorrência nos portadores de RCUI operados.

A expressão das citocinas pró-inflamatórias em doenças inflamatórias intestinais tem sido alvo de muitos estudos, particularmente IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α (MAHIDA et al., 1989; HYAMS et al., 1991; PULLMAN et al., 1992; GROSS et al., 1992; GROTTRUP et al., 1993; NIELSEN et al., 1993; RAAB et al., 1993; REINECKER et al., 1993; O'SHEA et al., 2002; AGGARWAL, 2003; CHEN e GREENE, 2004).

Em relação às atividades inflamatória e imunológica envolvidas especificamente no RI, existem poucos estudos na literatura.

A expressão aumentada das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 em mucosa de RI no Grupo RCUI verificada no presente estudo, foi também demonstrada em outros. Gionchetti et al. (1994) estudaram 30 doentes com RI operados por RCUI, sendo 17 assintomáticos e 13 com ileíte do reservatório no momento da biópsia, demonstrando o aumento da expressão de IL-1β, IL-6 e IL-8, nas condições de inflamação do RI. No entanto, não houve comparação com RI de doentes com PAF.

Além disso, contrariamente, pelo método de ELISA, estes autores não detectaram TNF-α nas amostras, enquanto que no presente estudo se demonstrou a presença desta citocina no RI por meio de eletroforese de proteínas, além de sua maior expressão no Grupo RCUI. Provavelmente esta diferença deva-se à utilização de diferentes métodos.

Patel et al. (1995) evidenciaram a presença de IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α na inflamação do RI, correlacionando estes achados a uma possível etiologia da ileíte do reservatório. Estes autores estudaram doentes portadores de RCUI operados e assintomáticos, comparando-os à condição de ileíte do reservatório, sem abordar, no entanto, portadores de PAF.

Balzano et al. (1998) verificaram níveis aumentados de IL-1β e IL-8, através do método de ELISA, em mucosa de RI em oito doentes com ileíte, quando comparados a 10 doentes assintomáticos. Schmidt et al. (2006) também verificaram aumento da expressão de IL-8 nas condições de ileíte do reservatório, no entanto, por meio de reação em cadeia da polimerase.

Evgenikos et al. (2002) estudaram citocinas em RI, no entanto seus achados decorreram de outro método que não o de extração protéica e separação em gel de poliacrilamida, e sim pela dosagem das citocinas IL-1β e IL-8 em lavado intestinal do RI, o que pode ser alterado pela quantidade de efluente do RI. Porém estes autores demonstraram aumento destas citocinas na ileíte do reservatório em RCUI, sendo que portadores de PAF não foram estudados.

As citocinas IL-6 e IL-8 são produzidas pelas células endoteliais e fibroblastos mediante estímulo da IL-1β e TNF-α (STRIETER et al., 1988; STRIETER et al., 1989). Estes achados podem explicar o aumento da expressão de IL-6 e IL-8 em mucosa de RI de doentes com RCUI verificado neste estudo e em todos os outros já mencionados.

Entretanto, Bulois et al. (2000), não mostraram diferença na expressão de IL-8 em RI com e sem ileíte do reservatório, em 18 doentes portadores de RCUI estudados. O RNA mensageiro da IL-8 foi quantificado através da reação em cadeia da polimerase.

A expressão de α e β defensinas em RI foi relatada em estudo de Kiehne et al. (2006), no qual verificou-se que estes peptídeos estão pouco expressos na condição de ileíte do reservatório nos doentes com RCUI, e aumentados nos doentes com PAF. Contrariamente, a expressão das citocinas TNF-α e IL-1β foi maior nos reservatório ileais de doentes com RCUI no pós-operatório sem ileíte, como observado no presente estudo, e também nos casos de ileíte do reservatório, quando comparados à expressão destas citocinas em RI de PAF.

A menor expressão das defensinas, associada ao aumento das citocinas pró-inflamatórias, poderia estar associada à maior ocorrência de ileíte do reservatório, em portadores de RCUI. A regulação da expressão de algumas defensinas hBD-2, hBD-3 e HD-5 depende das citocinas TNF-α e IL-1β, tendo sido evidenciada através de cultura de células (WEHKAMP et al., 2002).

A menor expressão das citocinas pró-inflamatórias no RI de doentes com PAF, pode explicar a menor suscetibilidade à ileíte do reservatório nestes doentes.

Existem 29 receptores celulares descritos para o TNF-α, que estão envolvidos em várias funções tais como resposta imune, indução de proliferação e diferenciação celular e apoptose (AGGARWAL, 2003). Como o fator de transcrição NF-KB constitui apenas uma das vias de ativação da transcrição do TNF-α, isto poderia explicar a expressão similar do NF-KB no grupo de doentes com RCUI, comparados ao de PAF como demonstrado no presente estudo. Outras vias (SCHREIBER et al., 2002) podem estar ativadas para a maior expressão de TNF-α no grupo com RCUI, quando comparados ao de PAF. Além disso, os doentes avaliados estavam assintomáticos, sem evidências de ileíte, o que pode explicar a presença da menor ativação da via final de sinalização nuclear nesta condição.

A citocina pró-inflamatória TNF-α e seu fator de transcrição nuclear NF-KB também estão envolvidos nos mecanismos de apoptose celular. Estudos têm revelado a ativação pelo TNF-α, de caspases intracelulares (BARKETT et al., 1997; VERMEULEN et al., 2005) e aumento da expressão de p-Bad. Os achados de aumento da expressão desta proteína no Grupo RCUI poderiam ser decorrentes do aumento da expressão de TNF-α,

demonstrada neste trabalho. Como a ativação de NF-KB não mostrou diferença nos grupos RCUI e PAF, adicionado ao fato do mesmo possuir ação anti-apoptótica (ZHANG e GHOSH, 2001), pode-se inferir que além das vias que induzem apoptose estarem mais expressas, aquelas que impedem a morte celular poderiam estar diminuídas.

A expressão menor da proteína p-Bad no grupo de doentes com PAF, quando comparada aos de RCUI, e sua tendência a ser menor que no grupo controle, pode explicar um baixo potencial de renovação celular da mucosa no primeiro grupo, ou seja, menor ocorrência de apoptose celular. Se por um lado, ocorre menor susceptibilidade à inflamação nos RI de doentes com PAF, por outro poderia haver maior susceptibilidade à proliferação celular, e muitas vezes de maneira desorganizada, levando presuntivamente ao aparecimento de adenomas.

Mesmo utilizando-se no presente estudo, uma proteína pró-apoptótica pertencente a uma família de proteínas distinta do estudo realizado por Coffey et al. (2001), pode-se identificar uma tendência ao aumento da expressão destas proteínas (CD95-CD95L e pBad) em RI de doentes com RCUI, apesar destes autores não terem estudado RI de doentes com PAF.

Além disso, o fato de ter sido encontrado no presente estudo, aumento tanto de citocinas inflamatórias específicas quanto de proteína relacionada à apoptose, no Grupo RCUI, sendo similares àquelas demonstradas em mucosa de cólon com RCUI em outros estudos (MAHIDA et al., 1989; PULLMAN et al., 1992; GROSS et al., 1992; RAAB et al., 1993; REINECKER et al., 1993; LEE, 1993; UEYAMA et al., 1998; AKBAR, 1998; BENNETT et al., 1998), pode ser uma evidência a favor da existência de fator etiológico comum para a RCUI e a ileíte do reservatório.

A proliferação bacteriana aumentada verificada em reservatórios ileais poderia ser decorrente da atrofia da mucosa que ocorre nos casos de ileíte do RI, propiciando a infeção por microorganismos comensais, sendo menos provável de ser a causa desta complicação.

Desta maneira, o estudo da atividade imunológica no RI é importante para demonstrar que estes doentes expressam as citocinas pró-inflamatórias na mucosa de RI, mesmo quando clínica e endoscopicamente normais, além de evidenciar que os doentes

portadores de RCUI apresentam níveis maiores destas proteínas, quando comparados aos doentes com PAF, sendo os primeiros provavelmente mais suscetíveis às complicações inflamatórias do RI. Estas citocinas poderiam exacerbar e perpetuar o processo de inflamação inespecífica do reservatório ileal, desencadeados por processos intrínsecos ligados à doença inflamatória que se manteriam no período pós-operatório, além de ativar proteínas relacionadas a apoptose celular, justificando a atrofia da mucosa do RI nestes casos.

6- CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, demonstrou-se que:

1- A expressão de TNF-α foi maior nos Grupos RCUI e PAF em relação ao Grupo Controle.

2- As expressões de IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α e p-Bad foram maiores no Grupo RCUI em relação ao Grupo PAF.

3- Não houve diferença entre as expressões de IL-1β, IL-6, IL-8 e p-Bad no Grupo Controle quando comparadas aos demais Grupos.

4- A ativação do fator de transcrição NF-KB foi semelhante nos três Grupos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science 1998; 281:1322-1326.

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edge sword. Nature Reviews 2003; 3:745-756.

Akbar NA. Life (and death) in the Fas lane. Gut 1998; 43:5-6.

Akerlung JE, Lofberg R. Pouchitis. Curr Opin Gastroenterol 2004; 20(4):341-344.

Armstrong DN, Sillin LF, Chung R. Reduction in tissue blood flow in J-shaped pelvic ileal reservoirs. Dis Colon Rectum 1995; 38:526-9.

Araújo EP, De Souza CT, Gasparetti AL, Ueno M, Boschero AC, Saad MJ, et al. Short-term in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistence, hyperinsulinemia, and increased adiposity. Endocrinology 2005;146:1428-1437.

Baldwin Jr AS. The transcription factor NF-KB and human disease. J Clin Invest 2001; 107(1):3-6.

Balzano A, Bevilacqua N, Nappo C, Gionchetti P, Campieri M, Grande G, et al. Cytokines and ulcerative colitis: mucosal balance between pro and anti-inflamatory cytokines in patients with and without pouchitis. Gastroenterology 1998; 114:A925.

Barkett M, Xue D, Horvitz HR, Gilmore TD. Phosphorylation of IKappaB-alpha inhibits its cleavage by caspase CPP32 in vitro. J Biol Chem 1997; 272:29419-29422.

Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, Roche D, Brady C, Kelly J, et al. Fas ligand expression by normal human esophageal squamous epithelium: another site of immune privilege. Gastroenterology 1998;114:A929.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.

Bulois P, Tremaine WJ, Maunoury V, Gambiez L, Hafraoui S, Leteurtre E, et al. Pouchitis is associated with mucosal imbalance between interleukin-8 and interleukin-10. Inflamm Bowel Dis 2000;6:157-167.

Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-κB. Nature Reviews 2004; 5:392-401.

Clausen MR, Tvede M, Mortensen PB. Short-chain fatty acids in pouch contents from patients with and without pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis. Gastroenterology 1992;103:1144-1153.

Coffey JC, Bennett MW, Wang JH, O'Connell J, Neary P, Shanahan F, et al. Upregulation of Fas-Fas-L (CD95/CD95L)- mediated ephitelial apoptosis – a putative role in pouchitis? J Surg Res 2001;98:27-32.

Colditz I, Zwahlen R, Dewald B, Baggiolini M. *In vivo* inflammatory activity of neutrophil activating factor, a novel chemotactic peptide derivated from human monocytes. Am J Pathol 1989;134(4):755-760.

Dozois RR. Ileal J-pouch-anal anastomosis. Br J Surg 1985;72:580-582.

Evgenikos N, Bartolo DCC, Hamer-Hodges DW, Ghosh S. Assessment of ileoanal pouch inflammation by interleukin 1β and interleukin 8 concentrations in the gut lumen. Dis Colon Rectum 2002;45:249-255.

Farouk R, Pemberton JH, Wolff BG, Dozois RR, Browning S, Larson D. Functional outcomes after ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis. Ann Surg 2000; 231(6):919-926.

Festjens N, Van Gurp M, Van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Bcl-2 family members as sentinels of cellular integrity and role of mitochondrial intermembrane space proteins in apoptotic cell death. Acta Haematol 2004;111:7-27.

Fonkalsrud EW. Total colectomy and endorectal ileal pull-through with ileal reservoir for ulcerative colitis. Surg Gynecol Obstet 1980;150:1.

Fonkalsrud, EW. Endorectal ileoanal anastomosis with isoperistaltic ileal reservoir after colectomy anal mucosal proctectomy. Ann Surg 1984;199:151-157.

Gionchetti P, Campieri M, Belluzzi A, Bertinelli E, Ferretti M, Brignola C, et al. Mucosal concentrations of interleukin-1 beta, interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in pelvic ileal pouches. Dig Dis Sci 1994;39:1525-1531.

Góes JRN, Medeiros RR, Fagundes JJ. Colectomia Total, Proctomucosectomia e anastomose íleo-anal com reservatório ileal. Rev bras Coloproct 1984;4(3):138.

Góes JRN, Fagundes JJ, Costa AM, Peres MAO, Medeiros RR, Leonardi LS. Detalhes da técnica operatória e avaliação das complicações. Rev bras Coloproct 1987; 7(3):94-98.

Góes JRN, Fagundes JJ, Coy CSR, Amaral CAR, Peres MAO, Medeiros RR. The Two-Chamber Ileal Pelvic Reservoir – An Alternative Design. Dis Colon Rectum 1993;36:403-404.

Góes JRN, Fagundes JJ, Coy CSR, Amaral CAR, Oliveira C, Ayrizono MLS, et al. O emprego da artéria cólica média e da arcada vascular do cólon direito na irrigação de reservatórios ileais. Rev bras Coloproct 1994;14(3):169-171.

Góes JRN, Beart RW. Physiology of Ileal Pouch-Anal Anastomosis. Current Concepts. Dis Colon Rectum 1995;38:996-1005.

Góes JRN, Fagundes JJ, Coy CSR, Ayrizono MLS, Medeiros RR, Leonardi LS. Retocolectomia total e anastomose íleo-anal com reservatório ileal: Experiência de 16 anos. Rev bras Coloproct 2000;27:33-39.

Góes JRN, Fagundes JJ, Coy CSR, Ayrizono MLS, Leonardi LS. Preservação da arcada vascular do cólon direito para o alongamento mesenterial na cirurgia do reservatório ileal. Rev Col Bras Cir 2002;29(1):36-42.

Góes JRN, Fagundes JJ, Coy CSR, Ayrizono MLS, Moreira APP, Leonardi LS. Retocolectomia total, anastomose íleo-anal com reservatório ileal e ocorrência de obstrução intestinal. Rev bras Coloproct 2004;24(4):329-333.

Gross V, Andus T, Caesar I, Roth M, Scholmerich J. Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. Gastroenterology 1992;102:514-519.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev 1999;13:1899-1911.

Grottrup E, Moeller J, Karbach U, Endres S. Elevated levels of IL-1β and IL-6 but not of TNF-α in inflamed mucosa of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1993; 104:A710.

Hata K, Watanabe T, Shinozaki M, Nagawa H. Patients with extraintestinal manifestations have a higher risk of developing pouchitis in ulcerative colitis: multivariate analysis. Scand J Gastroenterol 2003;38:1055-1058.

Helwig U, Gionchetti P, Rizzello F, Lammers K, Kuhbacher T, Schreiber S, et al. CXC and CC chemokine expression in inflamed and noninflamed pelvic ileal pouch tissue. Int J Colorectal Dis 2004;19(2):165-170.

Heuschen UA, Allemeyer EH, Hinz U, Autschbach F, Uehlein T, Herfarth C, et al. Diagnosing pouchitis: comparative validation of two scoring system in routine follow-up. Dis Colon Rectum 2002;45(6):776-786.

Hyams JS, Treem WR, Eddy E, Wyzga N, Moore RE. Tumor necrosis factor-α is not elevated in children with inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1991; 12(2):233-236.

Kay RM, Cohen Z, Siu KP, Petrunka CN, Strasberg SM. Ileal excretion and bacterial modification of bile acids and cholesterol in patients with continent ileostomy. Gut 1980;21:128-132.

Kiehne K, Brunke G, Wegner F, Banasiewicz T, Foesch UR, Herzig KH. Defensin expression in chronic pouchitis in patients with ulcerative colitis or familial adenomatous polyposis coli. World J Gastroenterol 2006;21:12(7):1056-1062.

Kuhbacher T, Schreiber S, Runkel N. Pouchitis: pathophysiology and treatment. Int J Colorectal Dis 1998;13:196-207.

Kuehbacher T, Ott SJ, Helwig U, Mimura T, Rizzello F, Kleessen B, et al. Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy in pouchitis. Gut 2006;55(6):833-841.

Kuwana T, Newmeyer DD. Bcl-2 family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. Curr Opin Cell Biol 2003;15:691-699.

Laake KO, Line PD, Grzyb K, Aamodt G, Aabakken L, Roset A, et al. Assessment of mucosal inflammation and blood flow in response to four weeks'intervention with probiotics in patients operated with J-configurated ileal-pouch-anal-anastomosis. Scand J Gastroenterol 2004;12:1230-1235.

Laake KO, Bjorneklett A, Aamodt G, Aabakken L, Jacobsen M, Bakka A, et al. Outcome of four weeks's intervention with probiotics on symptoms and endoscopic appearance after surgical reconstruction with a J-configurated ileal-pouch-anal-anastomosis in ulcerative colitis. Scand J Gastroenterol 2005;40:43-51.

Lammers KM, Vergopoulos A, Babel N, Gionchetti P, Rizzello F, Morselli C, et al. Probiotic therapy in the prevention of pouchitis onset: decreased interleukin-1beta, interleukin-8, and interferon-gamma gene expression. Inflamm Bowel Dis 2005; 11(5):447-454.

Laurent F, McCole D, Eckmann L, Kagnoff MF. Pathogenesis of Cryptosporidium parvum infection. Microbes Infect 1999;2:141-148.

Lee FD. Importance of apoptosis in the histopathology of drug related lesions in the large intestine. J Clin Pathol 1993;46:118-122.

Levin KE, Pemberton JH, Phillips SF, Zinsmeister AR, Pezim ME. Role of oxygen free radicals in the etiology of pouchitis. Dis Colon Rectum 1992;35:452-456.

Lohmuller JL, Pemberton JH, Dozois RR, Ilstrup D, Heerden JV. Pouchitis and extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease after ileal pouch-anal anastomosis. Ann Surg 1990;211(5):622-629.

Mahida YR, Wu K, Jewell DP. Enhanced production of interleukin 1-β by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. Gut 1989; 30:835-838.

MacLeod RS, Antonioli D, Cullen J, Dvorak A, Onderdonk A, Silen W, et al. Histologic and microbiologic features of biopsy samples from patients with normal and inflamed pouches. Dis Colon Rectum 1994;37:26-31.

McCole DF, Eckmann L, Laurent F, Kagnoff MF. Intestinal ephitelial cell apoptosis following Cryptosporidium parvum infection. Infect Immun 2000;68(3):1710-1713.

Merrett MN, Owen RW, Jewell DP. Ileal pouch dialysate is cytotoxic to epithelial cell lines, but not to CaCo-2 monolayers. Ileal pouch: adaptation and inflammation. Eur J Gastroenterol Hepatol 1997;9:1219-1226.

Minn AJ, Swain RE, Ma A, Thompson CB. Recent progress on the regulation of apoptosis by Bcl-2 family members. Adv Immunol 1998;70:245-279.

M'Koma AE. Serum biochemical evaluation of patients with functional pouches ten to 20 years after restorative proctocolectomy. Int J Colorectal Dis 2006;26:1-10.

Moskowitz RL, Shepard NA, Nicholls RJ. An assessment of inflammation in the reservoir after restorative proctocolectomy with ileoanal ileal reservoir. Int J Colorectal Dis 1986; 1:167-174.

Natori H, Utsunomiya J, Yamamura T, Benno Y, Uchida K. Fecal and stomal bile acid composition after ileostomy or ileoanal anastomosis in patients with chronic ulcerative colitis and adenomatosis coli. Gastroenterology 1992;102(4):1278-1288.

Nicholls RJ, Pescatori M, Motson RW. Restorative proctocolectomy with a three-loop ileal reservoir for ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis: clinical results in 66 patients followed for up to 6 years. Ann Surg 1984;199:383-388.

Nicholls RJ, Pezim ME. Restorative proctocolectomy with ileal reservoir for ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis: a comparison of three reservoir designs. Br J Surg 1985a;72:470-474.

Nicholls RJ, Moskovitz RL, Shepard NA. Restorative proctocolectomy with ileal reservoir. Br J Surg 1985b;72:76-79.

Nicholls RJ. Restorative proctocolectomy with various types of reservoir. World J Surg 1987;11:751-762.

Nicholls RJ, Banerjee AK. Pouchitis: risk factores, etiology, and treatment. World J Surg 1998;22:347-356.

Nielsen OH, Brynskov J, Bendizen K. Circulating and mucosal concentrations of tumor necrosis factor and inhibitor(s) in chronic inflammatory bowel disease. Dan Med Bull 1993;40:247-249.

O'Connell R, Pemberton JH, Brown ML, Kelly KA. Determinants of stool frequency after ileal pouch-anal anastomosis. The Am J Surg 1987;153:157-164.

Ohge H, Furne JK, Springfield J, Rothenberger DA, Madoff RD, Levitt MD. Association between fecal hydrogen sulfide production and pouchitis. Dis Colon Rectum 2005; 48:469-475.

O'Shea J, Ma A, Lipsky P. Cytokines and autoimmunity. Nature Reviews 2002;2:37-45.

Parks AG, Nicholls RJ. Proctocolectomy without ileostomy for ulcerative colitis. Br Med J 1978;2:85-87.

Patel RT, Bain I, Youngs D, Keighley MR. Cytokine production in pouchitis is similar to that in ulcerative colitis. Dis Colon Rectum 1995;38:831-837.

Pezim ME, Nicholls RJ. Quality of life after restorative proctocolectomy with pelvic ileal reservoir. Br J Surg 1985;72:31-33.

Podolsky, DK. Inflammatory Bowel Disease. N Engl J Med 2002;347(6):417-429.

Pullman WE, Elsbury S, Kobayashi M, Hapel AJ, Doe WF. Enhanced mucosal cytokine production in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1992;102:529-537.

Raab Y, Gerdin B, Ahlstedt S, Hallgren R. Neutrophil mucosal involvement is accompanied by enhanced local production of interleukin-8 in ulcerative colitis. Gut 1993; 34:1203-1206.

Reinecker HC, Steffen M, Witthoeft T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, et al. Enhanced secretion of tumor necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patient with ulcerative colitis and Crohn's disease. Clin Exp Immunol 1993;94:174-181.

Sadouk MB, Pelletier JP, Tardif G, Kiansa K, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor. Lab Invest 1995;73:347-355.

Sandborg CI, Imfeld KL, Zaldivar F Jr, Wang Z, Buckingham BA, Berman MA. IL-4 expression in human T cells is selectively inhibited by IL-1α and IL-1β. J Immunol 1995; 155:5206-5212.

Sandborn WJ. Pouchitis following ileal pouch anal anastomosis: definition, pathogenesis, and treatment. Gastroenterology 1994a;107:1856-1860.

Sandborn WJ, Tremaine WJ, Batts KP, Pemberton JH, Phillips SF. Pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis: a Pouchitis disease activity Index. Mayo Clin Proc 1994b; 69:409-415.

Sandborn WJ, Tremaine WJ, Batts KP, Pemberton JH, Rossi SS, Hofmann AF, et al. Fecal bile acids, short-chain fatty acids, and bacteria after ileal pouch-anal anastomosis do not differ in patients with pouchitis. Dig Dis Sci 1995;40(7):1474-1483.

Schmidt C, Giese T, Ludwig B, Menges M, Schilling M, Meuer SC, et al. Increased cytokine transcripts in pouchitis reflect the degree of inflammation but not the underlying entity. Int J Colorectal Dis 2006;21(5):419-426.

Schoeder J, Christophers E. Secretion of novel and homologous neutrophil-activating peptides by LPS-stimulated human endothelial cells. J Immunol 1989;142(1):244-251.

Schreiber S, Rosenstiel P, Hampe J, Nikolaus S, Groessner B, Schottelius A, et al. Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease. Gut 2002;51(3):379-385.

Shen B, Achkar JP, Connor JT, Ormsby AH, Remzi FH, Bevins CL, et al. Modified Pouchitis Disease Activity Index. A simplified approach to the diagnosis of pouchitis. Dis Colon Rectum 2003;46(6):748-753.

Shen B, Fazio VW, Renzi FH, Brzezinski A, Bennett AE, Lopez R, et al. Risk factors for disease of ileal pouch-anal anastomosis after restorative proctocolectomy for ulcerative colitis. Clin Gastroenterol Hepatol 2006;4(1):81-89.

Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, Marks RM. Monokine-induced gene expression of a human endothelial cell-derivated neutrophil chemotactic factor. Biochem Biophys Res Commun 1988;156:1340-1345.

Strieter RM, Phan SM, Showell HJ, Remick DG, Lynch JP, Genord M, et al. Monokine-induced neutrophil chemotactic factor gene expression in human fibroblasts. J Biol Chem 1989;264(18):10621-10626.

Tak PP, Firestein GS. NF-KB: a key role in inflammatory diseases. J Clin Invest 2001; 107(1):7-11.

Teixeira MG, Ponte AC, Sousa M, Almeida MG, Silva Filho E, Calache JE, et al. Short-and long-term outcomes if ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 2003;58(4):193-198.

Tulchinsky H, Hawley PR, Nicholls J. Long-term failure after restorative proctocolectomy for ulcerative colitis. Ann Surg 2003;238(2):229-234.

Ueyama H, Kiyohara T, Sawada N, Isozaki K, Kitamura S, Kondo S, et al. High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. Gut 1998;43:48-55.

Utsunomiya J, Iwama T, Imajo M, Matsuo S, Sawai S, Yaegashi K, et al. Total colectomy, mucosal proctectomy, and ileoanal anastomosis. Dis Colon Rectum 1980;23(7):459-466.

Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:12490-12495.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Bernemann ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. Ann Hematol 2005;84:627-639.

Wehkamp J, Schwind B, Herrlinger KR, Baxmann S, Schmidt K, Duchrow M, et al. Innate immunity and colonic inflammation: enhanced expression of epithelial alpha-defensins. Dig Dis Sci 2002;47:1349-1355.

Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Felermann K, et al. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 2003;9:215-223.

Widmann C, Gibson S, Johnson GL. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. J Biol Chem 1998; 273:7141-7147.

Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF-KB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. J Clin Invest 2001;107(1):13-19.

8- ANEXOS

8.1- Grupo RCUI

Doentes	Idade	Sexo	Indicação da Cirurgia	Tempo pós-operatório (meses)	Tempo pós fechamento ileostomia (meses)
1- JSN	48	M	displasia de alto grau	120	108
2- INB	55	F	megacólon tóxico	168	144
3- JS	63	M	displasia de alto grau	84	72
4- RMGDS	48	F	megacólon tóxico	60	55
5- CSS	36	F	Intratabilidade clínica	48	42
6- FV	53	M	megacólon tóxico	42	30
7- GCS	31	F	pioderma gangrenoso	36	30
8- JGS	55	F	Intratabilidade clínica	96	84
9- CAB	49	M	intratabilidade clínica	24	12
10- DF	43	F	Megacólon tóxico	100	86

8.2- Grupo PAF

Doentes	Idade	Sexo	Indicação da cirurgia	Tempo pós-operatório (meses)	Tempo pós fechamento ileostomia (meses)
1- VCH	37	M	polipose	86	82
2- LRA	33	F	polipose	62	50
3- JMF	59	M	polipose	86	79
4- CMSS	21	F	polipose	84	79
5- RPS	35	M	polipose	72	63
6- AMH	40	M	polipose	62	48
7- ACB	28	F	polipose	60	57
8- JLPF	27	F	polipose	38	26
9- ECPF	24	F	polipose	51	48
10- MRIP	32	M	polipose	48	44

8.3- Grupo Controle

Doentes	Idade	Sexo
1- CRJ	50	F
2- MLCL	52	F
3-VPS	70	F
4- JPR	68	M
5- CUS	41	M
6- NM	63	M
7- MRF	55	F
8- MASS	46	F
9- MSPG	34	F
10- MAO	30	M

8.4- Questionário específico

Questionário de Inclusão dos Doentes

Nome: _____ Prontuário:_____

Data de Nascimento: ___/___/_____ Idade: _____

Etnia:_____ Procedência: _____

( ) Retocolite Ulcerativa

( ) Polipose Familiar

Data da Cirurgia: ___/___/_____

Data do Fechamento da Ileostomia de Proteção: ___/___/_____

Tempo de Acompanhamento pós-operatório: _____

Tempo de Acompanhamento pós Fechamento da Ileostomia: _____

Indicação da Cirurgia:_____

Comprimento do Reservatório Ileal: _____

Complicações intra-operatórias:_____

Complicações imediatas (até 30 dias): _____

Complicações tardias: _____

Hábito intestinal atual (últimas 2 semanas): _____

Continência fecal: ( ) presente ( ) ausente

( ) perdas freqüentes ( ) perdas eventuais

8.5- Hábito intestinal e continência fecal - Grupo RCUI

RCUI

Doente	Número de evacuações	Continência Fecal
1	3	presente
2	10	presente
3	3	presente
4	4	presente
5	10	*
6	7	*
7	12	presente
8	4	*
9	10	*
10	6	presente
Média	6,9 (3-12)	

*perda noturna eventual

8.6- Hábito intestinal e continência fecal - Grupo PAF

PAF

Doente	Número de evacuações	Continência Fecal
1	8	presente
2	6	*
3	10	presente
4	7	*
5	5	presente
6	10	*
7	6	presente
8	4	presente
9	5	presente
10	7	presente
Média	6,8 (4-10)	

*perda noturna eventual

8.7- Parecer de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em pesquisa

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
(0_19) 3788-8936
FAX (0_19) 3788-7187
www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
cep@fcm.unicamp.br

CEP, 18/10/05.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 543/2005
CAAE: 1450.0.146.000-05

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: **"ESTUDO DA ATIVAÇÃO DO TNF-ALFA E DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF-KB EM RESERVATÓRIOS ILEAIS DE DOENTES OPERADOS POR POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAR E RETOCOLÍTE ULCERATIVA"**
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Raquel Franco Leal
INSTITUIÇÃO: HC/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 12/09/05

II - OBJETIVOS

Avaliar doentes portadores de retocolite ulcerativa (RCUI) e de polipose adenomatosa familiar (PAF), submetidos à retocolectomia total com reservatório ileal, quanto aos resultados funcionais, aspectos endoscópicos do mesmo, e presença de atividade inflamatória nos reservatórios.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um projeto de mestrado que vai pesquisar uma população de 20 pacientes submetidos à retocolectomia total com reservatório ileal em J, sendo 10 doentes portadores de RCUI e 10 portadors de PAF operados o período de 1992 a 2002 pelo grupo de Coloproctologia da Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestório da FCM/UNICAMP. Dentre os participantes 50% serão doentes do sexo masculino, com média de 37,7 anos. Os pacientes serão submetidos a reservatorioscopia, a fim de coletar biópsias e avaliar aspectos endoscópicos, serão obtidas capturas de imagens, será feita a análise da atividade inflamatória. O grupo controle será formado por 10 pacientes que farão colonoscopia por outros motivos

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas as pendências, o protocolo encontra-se adequado, bem como o TCLE.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter

aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de setembro de 2005.

Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

8.8- Termo de consentimento informado - Grupos RCUI e PAF

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (doentes portadores de retocolite ulcerative ou polipose familiar)

Eu _____(nome do paciente), HC:_____, estou ciente de estar participando da pesquisa científica, que tem por objetivo estudar a inflamação do intestino após a cirurgia, que fui submetido (a) por ser portador de retocolite ulcerativa ou polipose familiar. Fui informado(a) de que minha participação neste trabalho não mudará o meu tratamento neste hospital, que será o mesmo independentemente de eu estar ou não colaborando para este trabalho, e que minha identidade não será divulgada.

Autorizo e concordo em ser submetido ao exame endoscópico do intestino (exame este que já sou submetido periodicamente no meu acompanhamento pós-operatório), que sejam colhidas biópsias da porção terminal do intestino, e enviadas para este estudo.

Fui informado(a) que os riscos decorrentes do exame endoscópico são perfuração do intestino e sangramento, que podem ocorrer em menos de 1% dos casos.

Prontifico-me a fornecer informações clínicas sobre meu estado geral e sobre meu acompanhamento pós operatório, caso seja necessário.

Campinas, _____ de _____ de 20___.

_____ _____

Paciente

Raquel Franco Leal
Médico pesquisador responsável

Telefone para contato com pesquisador: 37887615 (ambulatório proctologia).

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa local: 37888936.

8.9- Termo de consentimento informado - Grupo Controle

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Grupo Controle)

Eu _____(nome do paciente), HC:_____, estou ciente de estar participando da pesquisa científica, que tem por objetivo estudar a inflamação do intestino após a cirurgia que outros doentes foram submetidos. Fui informado(a) de que minha participação neste trabalho não mudará o meu tratamento neste hospital, que será o mesmo independentemente de eu estar ou não colaborando para este trabalho, e que minha identidade não será divulgada.

Autorizo e concordo, ao ser submetido ao exame endoscópico do intestino por outros motivos de doença, fornecer biópsias da porção terminal do intestino fino, que serão enviadas para este estudo, como amostras comparativas.

Fui informado(a) que os riscos decorrentes do exame endoscópico do intestino são perfuração do intestino e sangramento, que podem ocorrer em menos de 1% dos casos, e os riscos decorrentes da medicação utilizada são alergia e diminuição da pressão. Esta medicação poderá ser ou não utilizada.

Prontifico-me a fornecer informações clínicas sobre meu estado geral caso seja necessário.

Campinas, _____ de _____ de 20___.

_____ _____

Paciente

Raquel Franco Leal
Médico pesquisador responsável

Telefone para contato com pesquisador: 37887615 (ambulatório proctologia).

Telefone do Comitê de Ética e Pesquisa local: 37888936.