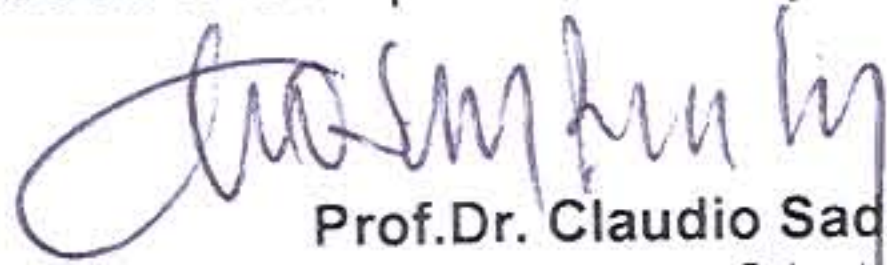


RAQUEL FRANCO LEAL

S
R-429

**ESTUDO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E APOPTOSE
EM RESERVATÓRIOS ILEAIS DE DOENTES OPERADOS
POR POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAR E
RETOCOLITE ULCERATIVA INESPECÍFICA**

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da FCM/UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Cirurgia, área de Cirurgia, da aluna, Raquel Franco Leal, RA:963084. Campinas, 28 de janeiro de 2009.



Prof.Dr. Claudio Saddy Rodrigues Coy
Orientador

CAMPINAS

Unicamp

2009

RAQUEL FRANCO LEAL

**ESTUDO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E APOPTOSE
EM RESERVATÓRIOS ILEAIS DE DOENTES OPERADOS
POR POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAR E
RETOCOLITE ULCERATIVA INESPECÍFICA**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Doutor em
Cirurgia, área de concentração em Cirurgia.

ORIENTADOR: Cláudio Saddy Rodrigues Coy

CO-ORIENTADOR: Lício Augusto Velloso

CAMPINAS

Unicamp

2009

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

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

L473e Leal, Raquel Franco
Estudo da atividade inflamatória e apoptose em reservatórios ileais de doentes operados por polipose adenomatosa familiar e retocolite ulcerativa inespecífica / Raquel Franco Leal. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientadores : Cláudio Saddy Rodrigues Coy, Lício Augusto Velloso

Tese (Doutorado) 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. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Inflammatory and apoptosis pathway in ileal pouches of patients with ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis

Keywords: • Surgery
• Molecular Biology
• Intestinal disease

Titulação: Doutor em Cirurgia
Área de concentração: Cirurgia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cláudio Saddy Rodrigues Coy
Profa. Dra. Angelita Habr-Gama
Prof. Dr. Délcio Matos
Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo
Prof. Dr. Joaquim Murray Bustorff Silva

Data da defesa: 28 - 01 - 2009

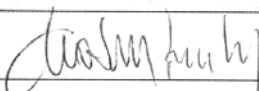
Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Raquel Franco Leal

Orientador: Prof. Dr. Claudio Saddy Rodrigues Coy

Membros:

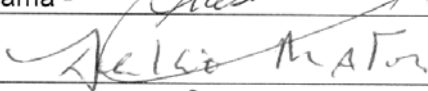
1. Prof. Dr. Claudio Saddy Rodrigues Coy -



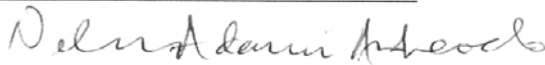
2. Profa. Dra. Angelita Habr-Gama -



3. Prof. Dr. Delcio Matos -



4. Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo -



5. Prof. Dr. Joaquim Murray Bustorff Silva -



Curso de pós-graduação em Cirurgia, da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/01/2009

DEDICATÓRIA

Ao Prof. Dr. Juvenal Ricardo Navarro Góes, pelo privilégio e honra de tê-lo conhecido, Mestre dedicado que era, exemplo de profissional e de pessoa, que nunca serão esquecidos. Pelo aprimoramento de técnicas e condutas médicas, colaboração na elaboração deste estudo e pela inestimável contribuição em minha formação acadêmica, expresso o mais profundo respeito. Muito obrigada.

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.

Ao Wallace Antony Feres, pelo amor, compreensão, companheirismo e incentivo à realização desta Tese.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela credibilidade depositada e por ser a casa que durante 13 anos entre graduação, residência médica, mestrado e doutorado, tornou possível minha formação profissional e garantiu meu crescimento pessoal.

Ao Prof. Dr. Cláudio Saddy Rodrigues Coy, Professor Livre-Docente do Departamento de Cirurgia, Chefe do Grupo de Coloproctologia 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. Lício Augusto Velloso, Professor Livre-Docente do Departamento de Clínica Médica (FCM-UNICAMP), exemplo de dedicação à Ciência, 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. Muito Obrigada.

Ao Prof. Dr. João José Fagundes, Professor Livre-Docente do Departamento de Cirurgia, Grupo de Coloproctologia 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.

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

À Prof. Dra. Luciana Rodrigues Meirelles, Docente do Departamento de Anatomia Patológica, pela amizade, trabalhos científicos em conjunto e auxílio na análise histológica deste estudo. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo, Diretor da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, e ao **Prof. Dr. Joaquim Murray Bustorff Silva**, coordenador da subcomissão de pós-graduação em Cirurgia, exemplos de dedicação e trabalho, pelo incentivo à pesquisa e à pós-graduação, que possibilitou a concretização desta Tese.

À Prof. Dra. Glauce Aparecida Pinto, Docente do Departamento de Anatomia Patológica, pela oportunidade de desenvolver a análise imunoistoquímica deste estudo no Laboratório de Patologia Experimental do CAISM (FCM – UNICAMP).

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 Patrícia Franco Leal, doutora 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 e da FAEPEX, Fundo de Apoio ao ensino, à Pesquisa e à Extensão da UNICAMP.

À Marciane Milanski, nutricionista, **Andressa Coope** e **Juliana Contin Moraes**, biólogas, 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 aposentada 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, 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.

À Sra. Cláudia e Sra. Luzia, técnicas dos Laboratórios de Patologia Experimental do CAISM e de Anatomia Patológica (FCM – UNICAMP), pela dedicação e auxílio nas técnicas laboratoriais.

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

Leonardo da Vinci

	PÁG.
RESUMO	<i>xvii</i>
ABSTRACT	<i>xix</i>
1- INTRODUÇÃO	21
1.1- Considerações Gerais	22
1.2- Dados da literatura	23
1.2.1- Ileíte do reservatório.....	23
1.2.2- Vias inflamatórias e de sinalização celular em doença inflamatória intestinal.....	25
1.2.3- Vias inflamatórias e de sinalização celular em reservatórios ileais	27
1.2.4- Mecanismos de apoptose em reservatórios ileais	30
2- OBJETIVOS	34
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS	36
3.1- Casuística	37
3.1.1- Fatores de exclusão.....	38
3.1.2- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	38
3.2- Método	38
3.2.1- Anticorpos, reagentes químicos e materiais.....	40
3.2.2- Soluções utilizadas.....	40
3.2.3- Extração de tecidos, imunoblot e imunoprecipitação.....	42
3.2.4- Determinação das bandas.....	44

3.2.5- Apresentação dos dados (imunoblot e imunoprecipitação) e análise estatística.....	44
3.2.6- Análise histológica (Hematoxilina – Eosina).....	45
3.2.7- Análise histológica (Estudo Imunoistoquímico para Bcl-2 e Bax).....	46
3.2.8- Análise histológica (Imunofluorescência com Anexina V).....	48
4- RESULTADOS.....	50
4.1- Expressão de IFN- γ e STAT-1	51
4.2- Expressão de IL-10 e SOCS-3.....	53
4.3- Expressão da proteína pró-apoptótica Bax	55
4.4- Expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2.....	56
4.5- Razão Bax/Bcl-2.....	57
4.6- Expressão de proteínas da via extrínseca da apoptose celular.....	57
4.7- Expressão de proteínas da via intrínseca da apoptose celular.....	58
4.8- Aspecto histológico por meio da coloração com Hematoxilina e Eosina.....	59
4.9 - Imunoistoquímica com marcação para Bax e Bcl-2.....	61
4.10 - Imunofluorescência com Anexina V.....	62
4.11 - Resumo dos resultados do Imunoblot, Imunoprecipitado e razão Bax/Bcl-2.....	63
5- DISCUSSÃO.....	64
5.1 – Reservatório ileal e vias inflamatórias.....	65
5.2 – Reservatório ileal e vias da apoptose celular.....	67
6- CONCLUSÃO.....	71
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

8- ANEXOS.....	87
8.1- Grupo RCUI.....	88
8.2- Grupo PAF.....	89
8.3- Grupo Controle.....	90
8.4- Mensuração do Índice de Atividade da Ileíte do Reservatório no Grupo RCUI.....	91
8.5- Mensuração do Índice de Atividade da Ileíte do Reservatório no Grupo PAF.....	92
8.6- Questionário específico.....	93
8.7- Hábito intestinal e continência fecal - Grupo RCUI.....	94
8.8- Hábito intestinal e continência fecal - Grupo PAF.....	95
8.9- Parecer de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa.....	96
8.10- Termo de consentimento informado -Grupos RCUI e PAF.....	99
8.11- Termo de consentimento informado -Grupo Controle.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS

Apaf-1	Fator ativador de apoptose 1
ATP	Adenosina Trifosfato
Bad	Proteína pró-apoptótica Bad
Bax	Proteína pró-apoptótica Bax
Bcl-2	Proteína relacionada à apoptose celular
Caspase	Protease cisteína aspartato específica
c-REL	Oncogene viral homólogo c relacionado à reticuloendoteliose
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Teste imunoenzimático
FADD	Domínio de apoptose associado à proteína Fas
Fas-L	Proteína ligante pró-apoptótica
IKB α	Quinase inibidora do fator nuclear de transcrição KappaB
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IFN- γ	Interferon gama

JAK	Proteína Janus Quinase
NF-KB	Fator nuclear de transcrição KappaB
NF-KB1	Gene codificador 1 do NF-KB
NF-KB2	Gene codificador 2 do NF-KB
PAF	Polipose adenomatosa familiar
PBS	Fosfato de sódio dibásico
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonila
RELA	Oncogene viral homólogo A relacionado à reticuloendoteliose ou subunidade p65 do NF-KB
RELB	Oncogene viral homólogo B relacionado à reticuloendoteliose
RCUI	Retocolite ulcerativa inespecífica
RI	Reservatório ileal
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SOCS-3	Supressor de sinalização de citocina 3
STAT-1	Fator ativador de transcrição e sinalizador de transdução 1
STAT-3	Fator ativador de transcrição e sinalizador de transdução 3
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF-R1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
TRADD	Domínio de apoptose associado a tumor
TRAIL-L	Proteína ligante pró-apoptótica relacionada ao fator de necrose tumoral
TRIS	Tri(hidroximetil)-aminometano

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Mecanismos de transdução do sinal do TNF- α	27
Figura 2- Mecanismos de apoptose celular: via extrínseca e intrínseca.....	32
Figura 3- RI – Aspectos endoscópicos.....	39
Figura 4- Biópsias coletadas.....	39
Figura 5- Aplicação das amostras no gel de poliacrilamida.....	43
Figura 6- Separação das proteínas por eletroforese com fonte elétrica a 120 volts.....	44
Figura 7- Análise das bandas auto-radiografadas pelo programa “Gel-Pro Analyzer 3.1”, por meio de densitometria óptica.....	45
Figura 8- Fragmento de biópsia congelada em base de inclusão para realização de cortes histológicos.....	46
Figura 9- Aspecto histológico de mucosa ileal (Controle) com coloração em Hematoxilina e Eosina. Aumento de 200X.....	46
Figura 10- Lâminas na estante incubadas com anticorpo primário e aspecto histológico de mucosa ileal (Controle) à microscopia óptica com aumento de 100X.....	48
Figura 11- Lâminas incubadas com Anexina V-FITC e aspecto histológico de mucosa ileal (Controle) à microscopia de imunofluorescência com aumento de 200X.....	49
Figura 12- Bandas auto-radiografadas da expressão de IFN- γ e STAT-1 nos Grupos Controle, PAF e RCUI.....	51
Figura 13- Determinação da expressão protéica de IFN- γ nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=09, *p<0.05 vs Controle § p<0.05 vs PAF.....	52

Figura 14-	Determinação da expressão protéica de STAT-1 nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=09, *p<0.05 vs Controle § p<0.05 vs PAF.....	52
Figura 15-	Bandas auto-radiografadas da expressão de IL-10 e SOCS-3 nos Grupos Controle, PAF e RCUI.....	53
Figura 16-	Expressão de IL-10 em RI nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=09, *p<0.05 vs Controle § p<0.05 vs PAF.....	54
Figura 17-	Expressão de SOCS-3 em RI nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=09, *p<0.05 vs Controle § p<0.05 vs PAF.....	54
Figura 18-	Bandas auto-radiografadas da expressão de Bax nos Grupos Controle, PAF e RCUI.....	55
Figura 19-	Determinação da expressão protéica de Bax nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=09, *p<0.05 vs Controle § p<0.05 vs PAF.....	55
Figura 20-	Bandas auto-radiografadas da expressão de Bcl-2 nos Grupos Controle, PAF e RCUI.....	56
Figura 21-	Determinação da expressão protéica de Bcl-2 nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=09, *p<0.05 vs Controle § p<0.05 vs PAF.....	56
Figura 22-	Razão da expressão Bax/Bcl-2 nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=09, *p<0.05 vs Controle § p<0.05 vs PAF.....	57
Figura 23-	Bandas auto-radiografadas da expressão de FADD/Caspase-8 nos Grupos Controle, PAF e RCUI.....	57
Figura 24-	Determinação da expressão protéica de FADD/Caspase-8 nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=09, *p<0.05 vs Controle § p<0.05 vs PAF.....	58

Figura 25-	Bandas auto-radiografadas da expressão de APAF-1/Caspase-9 nos Grupos Controle, PAF e RCUI.....	58
Figura 26-	Determinação da expressão protéica de APAF-1/Caspase-9 nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=09, *p<0.05 vs Controle § p<0.05 vs PAF.....	59
Figura 27-	Aspecto histológico à coloração com Hematoxilina e Eosina nos Grupos Controle, PAF e RCUI. Aumento de 200X.....	60
Figura 28-	Aspecto histológico de imunoistoquímica para Bax e Bcl-2 nos Grupos Controle, PAF e RCUI. Aumentos de 100 e 200X.....	61
Figura 29-	Aspecto histológico para marcação com Anexina V-FITC nos Grupos Controle (A), PAF (B) e RCUI (C). Aumento de 200X....	62

RESUMO

A retocoliectomia total com anastomose do reservatório ileal ao canal anal é a cirurgia de escolha para doentes com retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) refratária ao tratamento clínico e para polipose adenomatosa familiar (PAF), com pólipos retais. A ileíte do reservatório é uma das complicações mais comuns, sendo freqüente nos doentes com RCUI, porém rara na PAF. Objetivo: Avaliar a atividade inflamatória e apoptótica em mucosa de reservatórios ileais endoscopicamente normais pela expressão de IFN- γ , STAT-1, IL-10, SOCS-3, Bax, Bcl-2, FADD/Caspase-8 e Apaf-1/Caspase-9 em RCUI e PAF operados. Casuística e Métodos: Estudou-se 18 doentes submetidos à cirurgia com reservatório ileal (RI) em “J”, sendo nove doentes com RCUI e nove com PAF. O grupo controle foi constituído por nove doentes com íleo-colonosopia normal. As biópsias foram congeladas em nitrogênio líquido e as expressões de IFN- γ , STAT-1, IL-10, SOCS-3, Bax e Bcl-2 foram avaliadas por meio de imunoblot de extrato protéico total. As expressões de FADD/Caspase-8 e Apaf-1/Caspase-9 foram determinadas por meio de ensaio de imunoprecipitação e imunoblot. Utilizou-se imunoistoquímica para Bax e Bcl-2 e imunofluorescência com Anexina V. Resultados: Expressão de STAT-1 foi maior em RCUI, quando comparada com PAF e controles ($p < 0.05$). A expressão de IFN- γ foi maior em RCUI quando comparada aos controles ($p < 0.05$). Expressões de IL-10, SOCS-3 e Bcl-2 foram semelhantes em todos os grupos ($p > 0.05$). Expressão de Apaf-1/Caspase-9 foi maior em RCUI comparada à PAF ($p < 0.05$), entretanto FADD/Caspase-8 foi similar entre os grupos ($p > 0.05$). Conclusão: Os doentes com RCUI apresentaram maiores níveis das citocinas pró-inflamatórias na mucosa do RI, sendo estas semelhantes àquelas presentes em mucosa colorretal de RCUI ativa, mesmo na ausência de sinais clínicos e endoscópicos de ileíte do reservatório. Além disso, houve expressão aumentada de proteínas pró-apoptóticas no Grupo RCUI, podendo justificar a maior susceptibilidade dos doentes operados por RCUI a esta complicação. Demonstrou-se também, alteração dos mecanismos de apoptose em PAF, que poderia explicar a diminuição da renovação celular e presuntivamente, o aparecimento de adenomas nesta síndrome.

ABSTRACT

Ileal pouch-anal anastomosis is the surgical procedure of choice for patients with refractory ulcerative colitis (UC) and for familial adenomatous polyposis (FAP) with rectal polyps. Pouchitis is the most common complication in UC, while it is quite rare in FAP. Objective: Evaluate the inflammatory and apoptotic activity in endoscopically normal ileal pouch mucosa, by determining the expressions of IFN- γ , STAT-1, IL-10, SOCS-3, Bax, Bcl-2, FADD/Caspase-8 and Apaf-1/Caspase-9 in operated patients with UC and FAP. Patients and Methods: Eighteen patients submitted to total colectomy and J pouch were evaluated; nine were patients with UC and nine with FAP. The control group consisted of nine individuals with normal ileo-colonoscopy examination. The collected specimens were snap-frozen in liquid nitrogen and expressions of IFN- γ , STAT-1, IL-10, SOCS-3, Bax and Bcl-2 were determined by immunoblot of total protein extracts. FADD/Caspase-8 and Apaf-1/Caspase-9 were evaluated by immunoprecipitation and immunoblot. Immunohistochemistry analysis for Bax and Bcl-2, and immunofluorescence with Annexin V assays were applied in all biopsies. Results: STAT-1 expression was increased in patients with UC, when compared with FAP and controls ($p < 0.05$). IFN- γ expression was increased in UC when compared with controls ($p < 0.05$). IL-10, SOCS-3 and Bcl-2 were similar among the groups ($p > 0.05$). Apaf-1/Caspase-9 expression was increased in UC when compared with FAP ($p < 0.05$); however FADD/Caspase-8 was similar in the groups ($p > 0.05$). Conclusion: Patients with UC had increased pro-inflammatory cytokines levels, even without clinical and endoscopic evidence of pouchitis; these alterations were similar to those of UC disease. Indeed, there was increased pro-apoptotic protein expression in UC. These findings may suggest a higher susceptibility to this complication in operated patients with UC, when it was compared to PAF. In addition, a down-regulation of apoptosis in FAP was observed, possibly explaining the decreased cell turn over and presence of adenomas in this syndrome.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Considerações Gerais

A retocoliectomia total com confecção do reservatório ileal (RI) e anastomose ao canal anal tem sido a melhor opção, nas últimas três décadas, para o tratamento cirúrgico da retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI) e da polipose adenomatosa familiar (PAF) (PARKS e NICHOLLS, 1978; GÓES et al., 1984; NICHOLLS et al., 1985a; NICHOLLS, 1987; NICHOLLS e BANERJEE, 1998; M'KOMA, 2006; MCGUIRE et al., 2007).

Anteriormente à criação da cirurgia do RI, Nissen (1933) descreveu um doente com PAF que foi submetido à anastomose íleo-anal em três estágios, com resultados iniciais satisfatórios. Quatorze anos após, relataram-se cirurgias em que se removia a mucosa retal, permanecendo a camada muscular do reto e esfíncteres anais, refazendo-se o trânsito com sutura do íleo na linha pectínea (RAVITCH e SABISTON, 1947; RAVITCH, 1948). Martin et al. (1977) publicaram os resultados da anastomose íleo-anal em 17 crianças operadas por RCUI, obtendo sucesso nos resultados funcionais em 15 delas. Entretanto, o resultado funcional em adultos foi considerado ruim e estas técnicas foram abandonadas. Foi somente em 1978, que o RI com anastomose ao canal anal foi descrito por Parks e Nicholls (1978), seguindo o trabalho original de Valient e Bacon (1955) e adotando princípios da ileostomia continente de Koch (KOCK, 1976).

Várias modificações na confecção do RI foram propostas como alternativas ao formato original em “S” (PARKS e NICHOLLS, 1978; NICHOLLS et al., 1984) e ao em “J” (UTSUNOMIYA et al., 1980). Reservatórios com alças isoperistálticas (FONKALSRUD, 1980; FONKALSRUD, 1984), em “W” (NICHOLLS e PEZIM, 1985b) e em dupla câmara (GÓES et al., 1993) foram descritos, visando o aprimoramento da função de armazenamento do conteúdo fecal, assim como o seu esvaziamento adequado.

O RI em “J” tem sido o mais utilizado, com relatos de acompanhamento a longo prazo (DOZOIS, 1985; NICHOLLS et al., 1985a; 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'CONNELL et al., 1987, GÓES e BEART, 1995).

Desde a proposta de criação dos reservatórios ileais, inicialmente apresentados como técnica segura e alternativa à confecção de derivação intestinal definitiva, foram observadas complicações decorrentes do procedimento, como obstrução intestinal, estenose da anastomose ou sepse pélvica. No entanto, uma das complicações mais frequentes no pós-operatório, é a inflamação inespecífica do RI, cuja etiologia não é totalmente compreendida e ainda apresenta aspectos pouco esclarecidos, como sua maior ocorrência em pacientes com RCUI, justificando a realização de estudos sobre este assunto.

1.2- Dados da Literatura

1.2.1- Ileíte do reservatório

A ileíte primária do reservatório (“pouchitis”) é a 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 em cinco anos de acompanhamento pós-operatório, enquanto que apenas 5% dos doentes com PAF operados a apresentam (MOSKOWITZ et al., 1986; TEIXEIRA et al., 1999; KIEHNE et al., 2006; MCGUIRE et al., 2007; LEAL et al., 2008a). O risco cumulativo desta complicação é de 48% em 10 anos, conforme Meagher et al. (1998) em relato de 1310 doentes portadores de RCUI operados com anastomose do reservatório ileal no canal anal.

A inflamação do RI pode ser aguda (evolução com menos de três meses) ou crônica e o diagnóstico é feito por meio das manifestações clínicas, achados endoscópicos e histológicos (SANDBORN, 1994a; HEUSCHEN et al., 2001; HEUSCHEN et al., 2002; SHEN et al., 2003). Aproximadamente 5% a 10% desenvolvem a forma crônica desta complicação (MCGUIRE et al., 2007).

A ileíte do reservatório pode implicar na piora da qualidade de vida, risco de disfunção e até perda do RI (KUHBACHER et al., 1998; FAROUK et al., 2000; TULCHINSKY et al., 2003; SHEN et al., 2006). Deve ser diferenciada das formas secundárias de ileíte do RI, tais como “cuffitis”, síndrome do reservatório irritável e doença de Crohn no RI de diagnóstico tardio. A inflamação da mucosa residual do reto após a cirurgia de retocolectomia total, chamada de “cuffitis”, é diferenciada da ileíte primária do

RI pelo aspecto normal do mesmo à endoscopia, o mesmo ocorrendo com a síndrome do RI irritável. O diagnóstico de doença de Crohn no RI pode ser histológico e endoscópico, associado ao possível aparecimento de fistulas (MCGUIRE et al., 2007; AYRIZONO et al., 2008).

A etiologia da ileíte do reservatório é ainda desconhecida, porém a estase fecal com proliferação bacteriana parece ser fator importante 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; LIM et al., 2006; HEUSCHEN et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008), assim como a isquemia (LEVIN et al., 1992; ARMSTRONG et al., 1995). Kienle et al. (2001) associaram a ocorrência de ileíte do RI a complicações sépticas locais com hipoperfusão sanguínea no RI, medida por meio da análise do pH intramucoso.

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), sendo potencialmente citotóxicos, podendo afetar a mucosa do RI (MERRETT et al., 1997). No entanto, Sandborn et al. (1995) não constatarem 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). As marcantes diferenças na ocorrência da ileíte do RI em doentes com PAF comparados aos portadores de RCUI, apesar dos procedimentos cirúrgicos serem idênticos, não são explicadas completamente por estas possíveis hipóteses mencionadas.

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 manifestações extra-intestinais da RCUI, de forma semelhante aos períodos de maior atividade da doença (LOHMULLER et al., 1990; TEIXEIRA et al., 1999; HATA et al., 2003; AKERLUNG e LOFBERG, 2004). Penna et al. (1996) relataram maior ocorrência de inflamação inespecífica do RI entre os doentes com RCUI portadores de colangite esclerosante primária. Além disso, a ileíte do RI é mais comum naqueles doentes que apresentaram formas mais extensas da RCUI (SILVA et al., 1991) e da mesma forma que o fumo está associado a menor risco de manifestações clínicas na RCUI, o mesmo ocorre na ileíte do RI (MERRETT et al., 1996).

1.2.2- Vias inflamatórias e de sinalização celular em doença inflamatória intestinal

A citocina pró-inflamatória TNF- α é considerada um dos principais mediadores inflamatórios envolvidos nas doenças inflamatórias intestinais. Esta citocina desempenha várias funções e geralmente está em equilíbrio com as vias anti-inflamatórias, como a IL-10, promovendo o balanço imunológico do organismo. Em se tratando das doenças inflamatórias intestinais, ocorre uma exacerbação da expressão de TNF- α e de diversos mediadores inflamatórios na lâmina própria intestinal, a partir de estímulos intra-luminais, e por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos levam à liberação de interleucinas (IL-6, IL-8, IL-1 β), que estimulam a proliferação e ativação de linfócitos (MAHIDA et al., 1989; GROSS et al., 1992; PULLMAN et al., 1992; KÜHN et al., 1993; RAAB et al., 1993; REINECKER et al., 1993; O'SHEA et al., 2002; AGGARWAL, 2003; CHEN e GREENE, 2004).

Os macrófagos são as principais células envolvidas no processo inflamatório intestinal, uma vez que fazem parte do sistema imune inato na interface com o meio externo, e são responsáveis pela liberação de várias citocinas, como o TNF- α e IFN- γ . Uma vez liberadas, tais citocinas pró-inflamatórias desencadeiam, por meio de seus receptores, a ativação de proteínas intracelulares responsáveis pela transdução do sinal inflamatório e finalmente, levam à ativação de fatores de transcrição nucleares NF-KB e STAT-1, que

controlam a transcrição do TNF- α e de outros fatores inflamatórios (O'SHEA et al., 2002; PODOLSKY, 2002; SCHREIBER et al., 2002; AGGARWAL, 2003; CHEN e GREENE, 2004).

O fator de transcrição nuclear NF-KB é ativado por um dos 29 receptores de membrana do TNF- α , por meio da fosforilação do complexo protéico IKB α , liberando outro complexo formado pelas proteínas p50 e RELA, que se translocam para núcleo promovendo a transcrição do próprio TNF- α , além de interleucinas e proteínas da família Bcl-2. O NF-KB é considerado um dos fatores de transcrição das células eucarióticas mais estudado, desde sua descoberta há 20 anos. É codificado por cinco genes NF-KB1, NF-KB2, RELA, c-REL, e RELB, que levam também 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, principalmente em doença de Crohn (SCHREIBER et al., 1998; BALDWIN, 2001; TAK e FIRESTEIN, 2001; ZHANG e GHOSH, 2001).

O fator ativador de transcrição nuclear STAT-1, também está envolvido no mecanismo molecular das doenças inflamatórias intestinais. A ativação e expressão aumentadas deste fator podem ser encontradas em RCUI, principalmente. As proteínas STAT são fosforiladas pelas quinases JAK presentes no citosol, em resposta à ativação de receptores de membrana de fatores de crescimento e citocinas, em especial o IFN- γ , podendo conduzir à transcrição nuclear do TNF- α , por uma via alternativa (SCHREIBER et al., 1997a; SCHREIBER et al., 2002; KLAMPFER et al., 2003).

Em 1997, um novo grupo de proteínas foi descrito destacando-se sua especificidade em inibir a ativação de membros da família STAT, sendo chamadas de supressores da sinalização de citocinas, SOCS, sendo que a SOCS-3 inibe a fosforilação de STAT-1 e STAT-3 (STARR et al., 1997; ITO et al., 1999; SASAKI et al., 1999). Schreiber et al. (2002) evidenciaram aumento da expressão de SOCS-3 em biópsias cólicas de portadores de doença inflamatória intestinal, sendo um mecanismo compensatório ao processo inflamatório exacerbado. A Figura 1 demonstra as principais vias de transcrição nuclear do TNF- α .

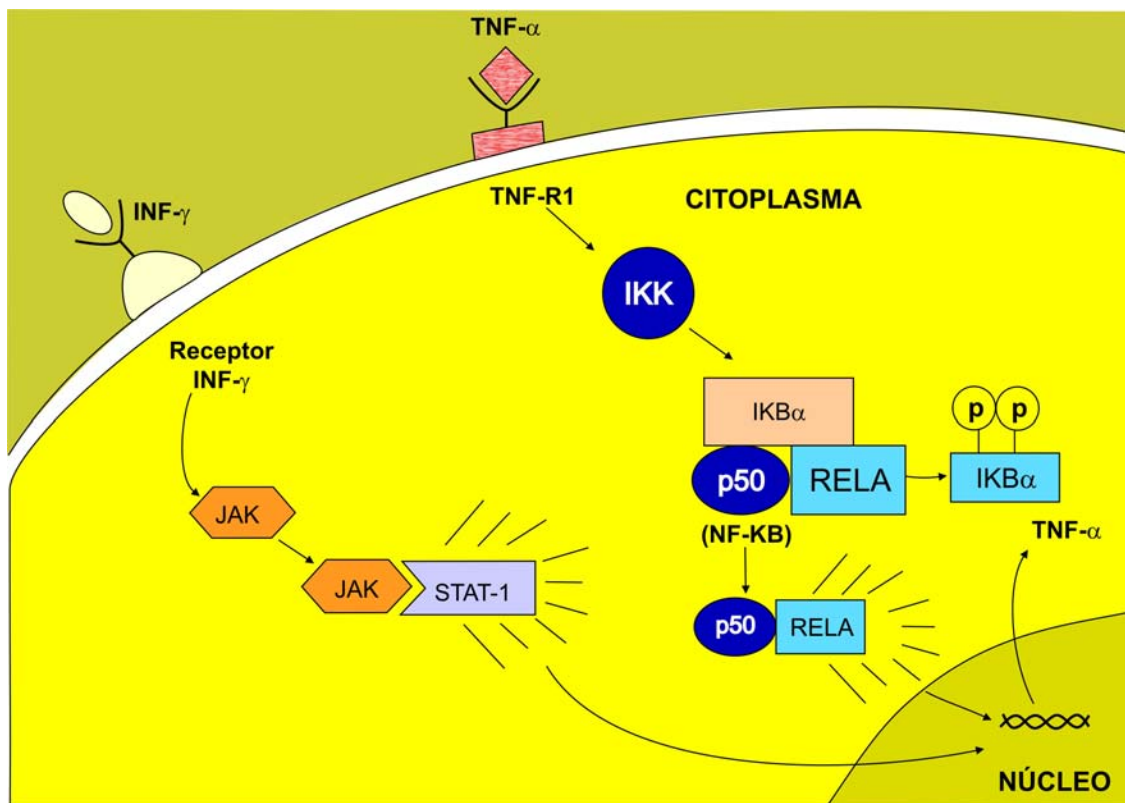


Figura 1- Mecanismos de transdução do sinal do TNF- α .

1.2.3- Vias inflamatórias e de sinalização celular em reservatórios ileais

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-1 β , 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-1 β , 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).

Goldberg et al. (1996) não demonstraram diferenças nas expressões de IFN- γ , TNF- α e IL-6 em mucosa de RI de doentes operados por RCUI e PAF, pela técnica de hibridização *in situ*. Entretanto, por meio de técnica imunoenzimática, Stallmach et al. (1998) detectaram aumento da expressão de células T CD4 positivas e de IFN- γ em mucosa de RI de portadores de RCUI com inflamação inespecífica do reservatório.

Ulisse et al. (2001), comparando doentes com e sem ileíte do RI operados por RCUI, evidenciaram pelo método de ELISA, aumento da expressão de IFN- γ e IL-1 α em mucosa de RI com ileíte, porém sem diferença estatística. Com a administração de probióticos demonstraram diminuição significativa destas citocinas e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10.

Evgenikos et al. (2002) evidenciaram níveis aumentados de IL-1 β 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-1 β 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. Além disso, Schmid et al. (2006) verificaram aumento de IFN- γ em RI de portadores de RCUI assintomáticos, quando comparado ao controle.

Lammers et al. (2005) verificaram a diminuição de IL-1 β , IL-8 e IFN- γ na mucosa de RI, por meio da expressão de RNA mensageiro, após a administração de probióticos em doentes com ileíte do reservatório, porém não verificaram aumento da expressão da IL-10.

O impacto do conteúdo ileal nas reações imunológicas no RI foram estudadas por Yamamoto et al. (2005). Observaram aumento significativo das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α em mucosa de RI de doentes com RCUI nos

três primeiros meses após o fechamento da ileostomia, quando comparados à mucosa de íleo terminal normal. Após 12 meses não houve diferença na expressão das citocinas nos RI em relação ao controle, concluindo que em um ano após o fechamento da ileostomia ocorreram processos inflamatórios de adaptação.

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-1 β 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. 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-1 α e IL-1 β , de tal forma que o aumento destas citocinas implica em diminuição das defensinas na mucosa intestinal (WEHKAMP et al., 2002; WEHKAMP et al., 2003).

Leal et al. (2006) observaram maior expressão de IL-1 β e TNF- α em mucosa de RI de doentes operados por RCUI quando comparados àqueles portadores de PAF. Não houve diferença na expressão de IL-1 β entre estes dois grupos e o grupo controle, devendo-se ao fato de serem doentes assintomáticos, com mucosa endoscopicamente normal.

Boerr et al. (1998) demonstraram aumento da expressão de IFN- γ em mucosa de RI com íleite de doentes com RCUI, quando comparados ao controle de íleo terminal normal, porém não detectaram diferença estatística quando comparados à mucosa de RI normal.

A ativação do fator de transcrição NF-KB em mucosa de RI de doentes operados por RCUI e PAF assintomáticos, e em grupo controle, foi estudada por Leal et al. (2008b), verificando-se expressões similares do fator nos diferentes grupos. Este achado foi justificado pela possibilidade de outras vias de transcrição do TNF- α poderem estar ativadas na RCUI.

Níveis aumentados de STAT-1 α e STAT-1 β foram verificados em mucosa de RI de doentes operados por RCUI com ileíte do RI quando comparados àqueles sem ileíte e grupo controle de íleo terminal normal (SCHREIBER et al., 1997b; KUHBACHER et al., 2001). Entretanto, não há estudos comparando estes achados em mucosa de RI de portadores de PAF, como também não há estudos avaliando SOCS-3, proteína inibidora de STAT-1, em reservatórios ileais.

1.2.4- Mecanismos de apoptose em reservatórios ileais

A apoptose também referida como morte programada e silenciosa da célula, é conhecida em mamíferos pela complexidade de suas vias e por estar relacionada às vias inflamatórias do organismo. Desta forma, tanto o TNF- α , quanto o NF-KB, estão envolvidos com os mecanismos de apoptose celular, uma vez que a ativação de um dos receptores de TNF- α leva à ativação de proteases denominadas caspases intracelulares, que estimulam alguns membros da família Bcl-2 (Bad e Bax), induzindo a morte celular. (BARKETT et al., 1997; ADAMS e CORY, 1998; MINN et al., 1998; WIDMANN et al., 1998; GROSS et al., 1999; KUWANA e NEWMAYER, 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, como a proteína Bcl-2, que impede a morte celular (LAURENT et al., 1999; MCCOLE et al., 2000; DEVERAUX et al., 2001; VERMEULEN et al., 2005).

A apoptose celular foi originalmente descrita por Kerr e Wyllie (1972), que observaram por meio de microscopia eletrônica as alterações morfológicas das células em apoptose, finalizando em fragmentação nuclear (CUMMINGS et al., 1997; ZIEGLER e GROSCURTH, 2004). Assim nos últimos 30 anos, devido à importância deste mecanismo celular em muitas doenças, foram sendo desenvolvidos métodos para detecção da apoptose celular bem como as proteínas envolvidas no processo, que à princípio é composto por duas principais vias, a intrínseca e extrínseca (HUERTA et al., 2007).

A via extrínseca da apoptose celular inicia-se pela ligação do TNF- α ou de outras proteínas como a Fas-L e TRAIL-L, aos seus respectivos receptores, recrutando, desta forma, moléculas adaptadoras como a FADD ou TRADD, resultando na ativação de

caspases iniciadoras, 8 e 10. Estas são responsáveis por ativar as caspases finalizadoras 3, 6 e 7, que culminarão na morte celular por induzirem a clivagem de DNA, levando à condensação da cromatina e fragmentação do núcleo (MARTIN e ELKON, 2004).

Por outro lado, a via intrínseca da apoptose, também chamada via mitocondrial de apoptose, envolve a ativação de proteínas da família Bcl-2 pró-apoptóticas, como a Bax e Bid. Estas proteínas não possuem “âncoras transmembrana” e estão presentes livres no citosol, aguardando sua ativação por outros fatores, como citocinas, e a partir de então serem fosforiladas. As proteínas Bad e Bid ativam a proteína pró-apoptótica Bax. 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 são capazes de formar poros nas membranas biológicas e mesmo formar canais iônicos na membrana mitocondrial, fazendo com que proteínas como o citocromo c, sejam liberados através da membrana da mitocôndria para o citoplasma. Uma vez no citosol, o citocromo c interage com outras proteínas, Apaf-1, procaspase-9 e ATP para formar o apoptossomo, que ativa a caspase-9, que em última análise conduz à apoptose celular por meio da ativação das caspases finalizadoras. O complexo Apaf-1 e Caspase-9 podem também ser ativados pela proteína p53, sendo importante complexo protéico relacionado à apoptose celular deflagrada por condições como processos inflamatórios. Recentemente demonstrou-se que a proteína p53 ativa diretamente a proteína pró-apoptótica Bax e seu gene, e em concentrações fisiológicas se liga à mitocôndria e mantém a proteína Bcl-2 inativa, contribuindo para apoptose celular (MIYASHITA e REED, 1995; MINN et al., 1998; SOENGAS et al., 1999; CHIPUK e GREEN, 2004; FESTJENS et al., 2004; SCHAFFER e KORNBLUTH, 2006). A Figura 2 mostra as principais proteínas envolvidas no processo de morte e sobrevivência celular, assim como as vias intrínseca e extrínseca do mesmo.

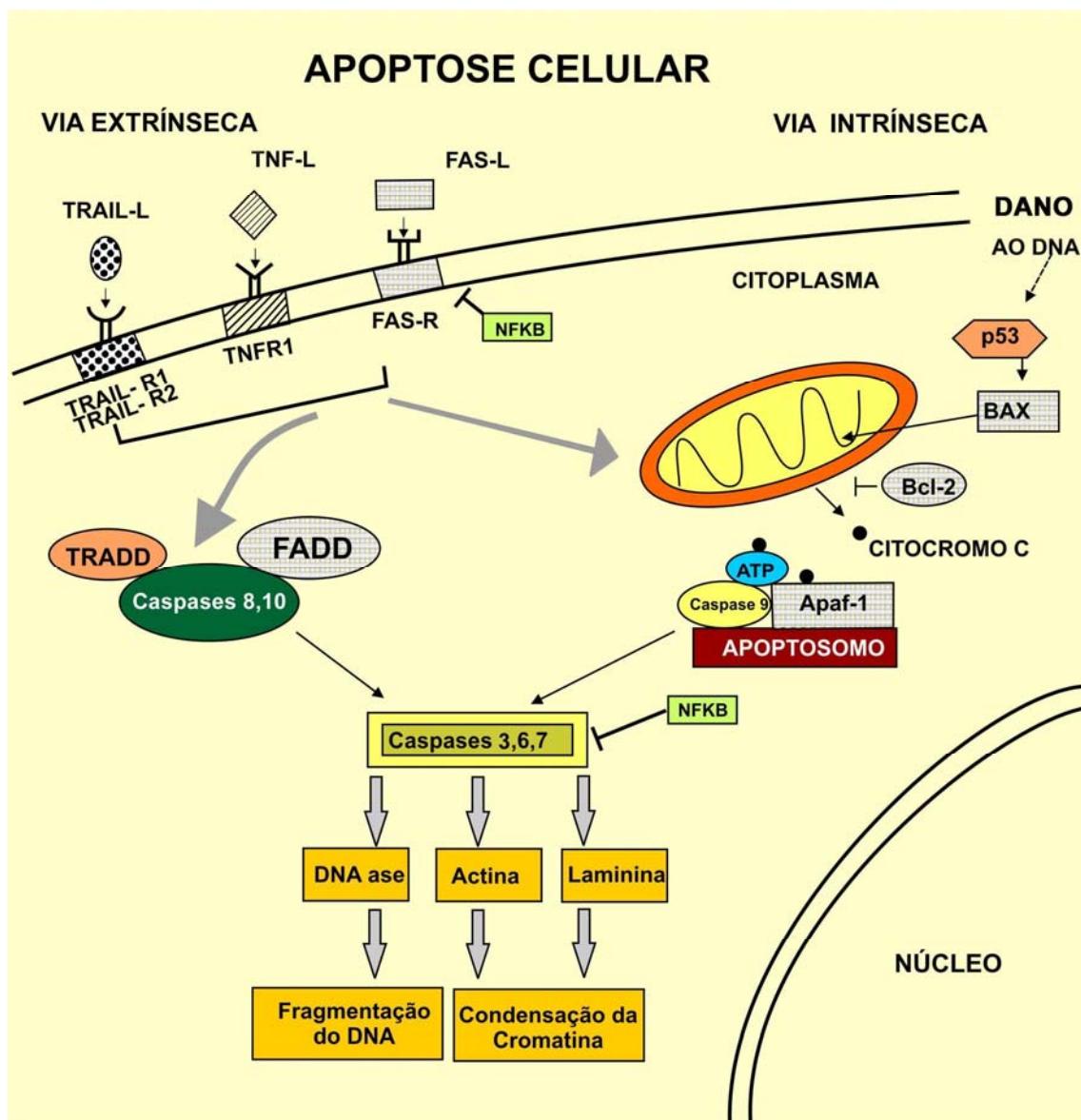


Figura 2- Mecanismos de apoptose celular: via extrínseca e intrínseca.

Em doença inflamatória intestinal, Bennett et al. (1998), verificaram expressão aumentada da proteína pró-apoptótica FasL, da família TNF, em áreas de mucosa intestinal comprometidas por RCUI ou doença de Crohn. Apesar da resistência à apoptose celular ser um evento importante na carcinogênese, os autores especularam que a ocorrência da expressão de FasL na ausência de apoptose em algumas áreas da mucosa poderia estar envolvida com o risco de displasia em doença inflamatória intestinal. Ueyama et al. (1998), da mesma forma, encontraram expressão aumentada de FasL em mucosa afetada por RCUI, mas não em doença de Crohn.

Sabatino et al. (2003), demonstraram apoptose celular via aumento de metaloproteinases em doença de Crohn ativa, mas não conseguiram estabelecer correlação com os níveis de expressão da proteína FasL.

Em se tratando de RI, Coffey et al. (2001) correlacionaram a ocorrência de atrofia de mucosa de RI, que poderia predispor à infecção do RI por microorganismos comensais, 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 FasL-Fas (CD95L-CD95) 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).

Leal et al. (2008b) demonstraram maior expressão da proteína pró-apoptótica Bad em biópsias de mucosa de reservatório ileal de doentes operados por RCUI quando comparado àqueles operados por PAF, mesmo na ausência clínica e endoscópica de ileíte do RI.

Existem poucos estudos na literatura avaliando apoptose celular em RI, bem como relacionando este aspecto à tendência inflamatória nos RI de portadores de RCUI quando comparados aos de PAF. Dessa forma, se por um lado há tentativa de explicar a maior ocorrência de ileíte do RI nos doentes com RCUI, por outro, evidenciam-se poucos dados na literatura sobre o processo de apoptose celular na PAF, uma doença cujo potencial de renovação celular pode ser menor, implicando presuntivamente em transformação maligna na mucosa do RI (PARC et al., 2001; FRIEDERICH et al., 2006; NILUBOL et al., 2007; SCHAUS et al., 2007).

2- OBJETIVOS

Dado o conhecimento atual, o objetivo do estudo foi verificar a atividade inflamatória e apoptótica na mucosa de RI de doentes portadores de RCUI e de PAF, submetidos à retocolectomia total, assintomáticos, quanto à presença de marcadores específicos, de maneira comparativa.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Casuística

Dezoito 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 nove portadores de RCUI – Grupo RCUI (Anexo 8.1) e outros nove portadores de PAF – Grupo PAF (Anexo 8.2).

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

Quanto aos doentes com RCUI, 55,6% eram do sexo feminino, com média de idade atualizada de 48,7 (31 - 63) anos, enquanto que 55,6% dos portadores de PAF eram do sexo feminino, com média de idade atualizada de 33,8 (21-59) anos. O tempo médio de acompanhamento dos doentes após a cirurgia do RI, foi de 71,1 (24 - 168) meses, sendo 75,3 meses para os doentes com RCUI e 66,7 meses para aqueles com PAF ($p>0,05$). O tempo médio de pós-operatório até o fechamento da ileostomia foi de 64,1 (12-144) meses para os doentes com RCUI e de 59,1 (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. Todos os doentes portadores de RCUI e PAF obtiveram índice de atividade da ileíte do reservatório mensurados de acordo com Sandborn et al. (1994b), menor que sete, portanto considerados sem ileíte (Anexos 8.4 e 8.5).

As indicações cirúrgicas dos doentes com RCUI foram intratabilidade clínica (33,3%), megacólon tóxico (33,3%), presença de displasia de alto grau nas biópsias de seguimento endoscópico (22,2%), e pioderma gangrenoso (11,1%). 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 centímetros, 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 8.6). A média de evacuações diárias foi de 7,0, variando de 3 a 12 vezes no grupo de doentes operados por RCUI (Anexo 8.7), enquanto que no grupo de doentes operados por PAF (Anexo 8.8) foi de 6,8, variando de 4 a 10 vezes ao dia ($p>0,05$). Sete doentes (38,9%) 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. 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, com exsudato e úlceras.

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 8.9). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento informado (Anexos 8.10 e 8.11).

3.2- Método

Os doentes foram submetidos à endoscopia do RI no Serviço de Colonoscopia – (GASTROCENTRO - UNICAMP) e coleta de seis fragmentos de biópsias para posterior análise da atividade inflamatória e de apoptose celular. Os aparelhos utilizados foram videocolonoscópios das marcas Fujinon® e Olympus®.

A análise da expressão das proteínas relacionadas à inflamação, IFN- γ , IL-10, SOCS-3, STAT1, e aquelas relacionadas à apoptose, Caspases 8 e 9, Apaf-1, Bax, Bcl-2 e FADD, além da análise de imunofluorescência para Anexina-V foram realizadas a partir das amostras teciduais obtidas por biópsias endoscópicas dos doentes dos Grupos RCUI, PAF e Controle no Laboratório de Sinalização Celular FCM, UNICAMP. O estudo histológico para Hematoxilina e Eosina, e imunoistoquímico para as proteínas Bcl-2 e Bax foram realizados nos Laboratórios de Patologia Experimental CAISM e de Anatomia Patológica FCM, UNICAMP, a partir das mesmas amostras.

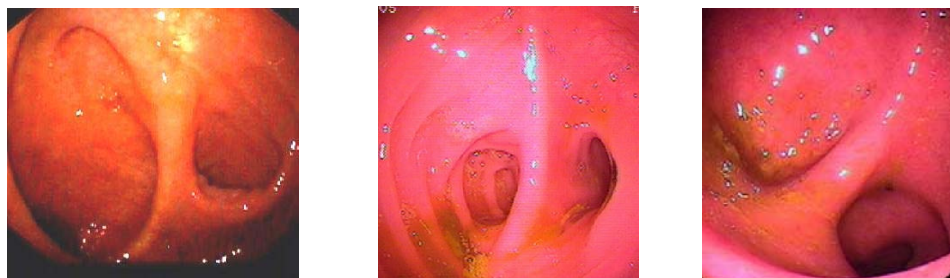


Figura 3- RI – Aspectos endoscópicos.

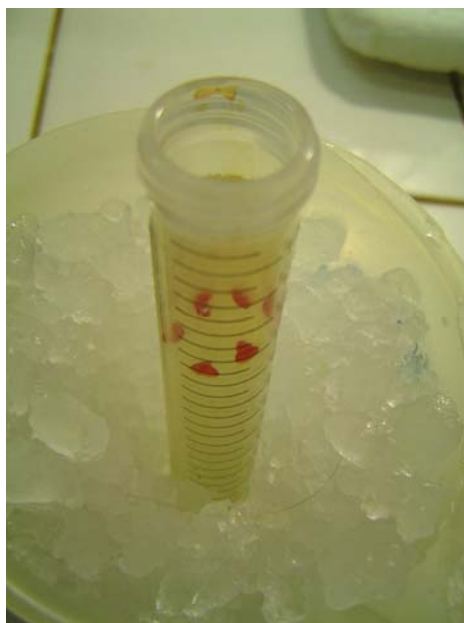


Figura 4- Biópsias coletadas.

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 ditioneitol (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 específicos anti-IFN-γ (sc-9344, goat polyclonal), anti-STAT-1 (sc-7988, goat polyclonal), anti-IL-10 (sc-1783, goat polyclonal), anti-SOCS-3 (sc-7009, goat polyclonal), anti-Bax (sc-493, rabbit polyclonal), anti-Bcl-2 (sc-492, rabbit polyclonal), anti-APAF-1 (sc-26685, goat polyclonal), anti-FADD (sc-5559, rabbit polyclonal), anti-Caspase 9 (sc-7885, rabbit polyclonal), anti-Caspase 8 (sc-7890, rabbit polyclonal) foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). O marcador de peso molecular utilizado foi o PageRuler™ da Fermentas (MD, USA). Os reagentes para a reação de quimioluminescência foram da SuperSignal® (Rockford). A albumina 5% utilizada é 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 4⁰C, 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 eletroforese (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 4⁰C.
- 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 ou solução com 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal.

- Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado. Contém: Trisma 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°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°C , 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°C . No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e posteriormente preparou-se amostra contendo 100 μg de proteína total para ser utilizado nos experimentos de imunoblot 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 10 μl de anticorpo específico (anti-IFN- γ , anti-STAT1, anti-IL-10, anti-SOCS-3, anti-Bax ou anti-Bcl-2). 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 FADD/Caspase-8 e APAF-1/Caspase-9, na qual a amostra de 1.0 mg de proteína foi incubada “overnight” por 12 a 14 horas a 4°C, com 10µl de anticorpo contra FADD e APAF-1. Após a incubação os imunocomplexos foram recuperados com Proteína A Sepharose 6MB por 2 horas a 4°C e decantados por centrifugação por 15 minutos a 4°C/11.000 rpm. 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 restando 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-Caspase-8 para FADD e anti-Caspase-9 para APAF-1. 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 5- Aplicação das amostras no gel de poliacrilamida.

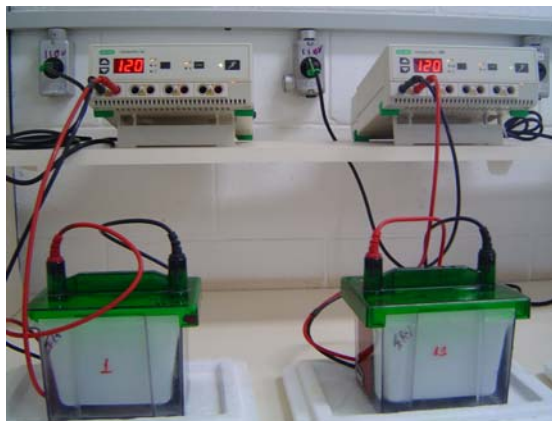


Figura 6- Separação das proteínas por eletroforese com fonte elétrica a 120 volts.

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 (imunoblot e imunoprecipitação) 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 “Gel-Pro Analyzer 3.1” (Exon-Intron Inc., Farrell, MD).

A razão Bax/Bcl-2 foi obtida dividindo-se os valores arbitrários das expressões de Bax pelos valores de Bcl-2 relativos a cada amostra (BEENKEN e BLAND, 2002; JOHN et al., 2007).

Os resultados foram notificados como média com variação do erro padrão. Por meio do teste de Kolmogorov Smirnov, verificou-se que os dados obtidos seguiram a distribuição normal ou de Gauss ($p>0,1$). Desta forma, foi utilizada análise de variância (Anova), seguida por análise de significância (Teste de Tukey-Kramer). Nível de significância adotado foi $p<0,05$.

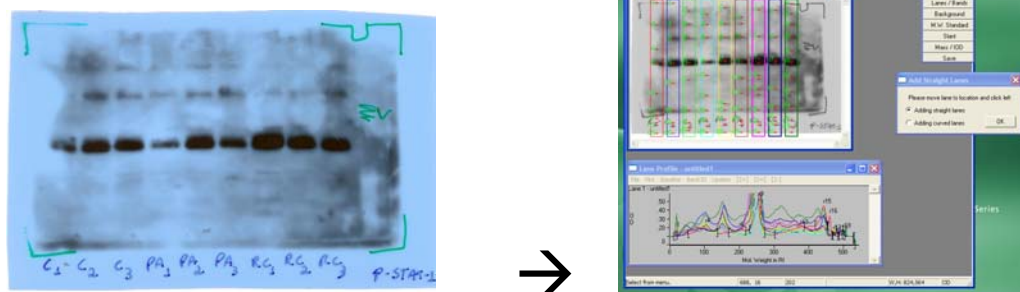


Figura 7- Análise das bandas auto-radiografadas pelo programa “Gel-Pro Analyzer 3.1”, por meio de densitometria óptica.

3.2.6- Análise Histológica (Hematoxilina – Eosina)

Foi realizada base de inclusão do fragmento de biópsia previamente congelado e armazenado a -80°C , e utilizado gel de inclusão da Thermo Fisher Scientific, Inc. (MA, USA). Realizaram-se cortes histológicos de 5 micra (μm) de espessura no Criocut (Modelo CM 1900; Leica, Germany) e colocação em lâminas de vidro do tipo silanizadas da EasyPath Erviegas (SP, BR). Passagem da lâmina no corante Hematoxilina por 20 segundos, lavagem em água corrente, seguida de passagem no corante Eosina por 10 segundos, com nova lavagem em água corrente. Seguiram-se quatro passagens no álcool absoluto anidro 99,3° INPM da Chemco® (SP, BR) e três passagens no xilol da Chemco® (SP, BR). Montagem das lâminas com resina Entellan (Merck, cód. 7961) (ALLEN, 1995).

A análise do grau de inflamação foi de acordo com o Índice de Atividade da Ileíte do RI – PDAI, por meio de microscopia óptica (SANDBORN et al., 1994b).



Figura 8- Fragmento de biópsia congelada em base de inclusão para realização de cortes histológicos.

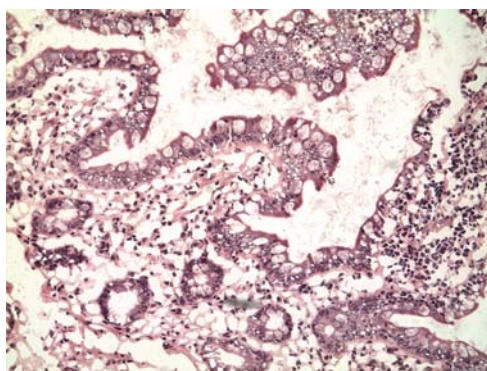


Figura 9- Aspecto histológico de mucosa ileal (Controle) com coloração em Hematoxilina e Eosina. Aumento de 200X.

3.2.7- Análise Histológica (Estudo Imunoistoquímico para Bcl-2 e Bax)

- Anticorpos, reagentes químicos e materiais:

Os anticorpos específicos anti-Bax (A-3533, rabbit polyclonal) e anti-Bcl-2 (M-0887, mouse monoclonal) foram obtidos da DAKO A/S (Denmark) e o anticorpo secundário, Novolink da Novocastra™ Laboratories Ltd (USA). Utilizou-se acetona 1% da Chemco® (SP, BR), e a peroxidase endógena (H_2O_2 – 10 volumes) da Bioquímica® (SP, BR). O diâmino benzidina tetrahydrocloreto (DAB) e os demais reagentes químicos para as soluções foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). A albumina 1% (BSA) é de origem bovina. Utilizou-se resina da Entellan, Merck (cód. 7961).

- Soluções utilizadas:

- a) Tampão de PBS 10X, contém: fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), cloreto de sódio (NaCl), água destilada, pH entre 7,2 e 7,6.
- b) Solução de lavagem com PBS, contém: 900ml de água destilada e 100ml de tampão de PBS 10X.
- c) Solução com Albumina Bovina (BSA) 1% contém: para cada 0,8g de BSA, 80ml de PBS 10X.
- d) Solução de anticorpo primário contém: anticorpo primário diluído em BSA 1%, na diluição 1:500 para anti-Bax, e 1:150 para anti-Bcl-2.
- e) Solução para revelação com DAB, contém: DAB, 60mg; PBS 10X aquecido à 37°C, 100ml; H_2O_2 (10%), 1500 μl ; dimetilssulfóxido (DMSO), 1ml.

Realizou-se base de inclusão do fragmento de biópsia previamente congelado e armazenado a -80° C. Utilizou-se gel de inclusão da Thermo Fisher Scientific, Inc. (MA, USA). Foram realizados cortes histológicos de 5 micra (μm) de espessura no Criocut (Modelo CM 1900; Leica, Germany) e colocação em lâminas de vidro do tipo silanizadas da EasyPath Erviegas (SP, BR).

Realizaram-se duas passagens em acetona 1% de 20 segundos cada, e uma passagem em PBS. Para bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram passadas por três banhos de cinco minutos cada, em solução de peróxido de hidrogênio a 3% e novamente lavadas em PBS 10X, três vezes por cinco minutos, em agitação.

A ligação do anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da lâmina com tampão de bloqueio de leite desnatado 3% (Molico®) por 30 minutos. Procedeu-se à lavagem em água corrente, delicadamente e em PBS 10X, uma vez de 5 minutos. As lâminas foram incubadas com 100 μl do anticorpo primário por 30 minutos em estufa a 37°C e, após, incubadas “overnight” (16-20 horas) a 4°C em câmara úmida.

As lâminas foram retiradas da incubação com anticorpo primário e foram realizadas três lavagens em solução de PBS, de cinco minutos cada, à temperatura ambiente, e os cortes incubados com um polímero marcado com peroxidase por 30 minutos a 37°C (anticorpo secundário). Lavagem com PBS, uma vez.

A coloração foi realizada com exposição à solução de revelação com DAB por cinco minutos à 37°C, com posterior lavagem em água corrente e em água destilada. Seguiu-se contra-coloração com hematoxilina de Mayer por 10 a 30 segundos e nova lavagem em água corrente. Passagem em solução de amônia 1% e novamente por água corrente. A seguir, as lâminas foram desidratadas com três banhos em álcool absoluto e passadas três vezes em xilol para posterior montagem com resina Entellan (Merck, cód. 7961). A positividade da reação foi evidenciada pela marcação em marrom das células, vista à microscopia óptica. (HSU et al., 1981; LUSTOSA et al., 2005)

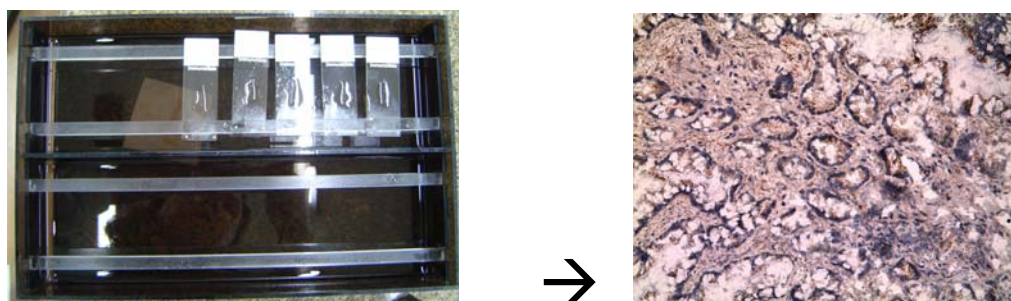


Figura 10- Lâminas na estante incubadas com anticorpo primário e aspecto histológico de mucosa ileal (Controle) à microscopia óptica com aumento de 100X.

3.2.8- Análise Histológica (Imunofluorescência com Anexina V)

- Anticorpos, reagentes químicos e materiais:

A anexina V-FITC foi obtida do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade de São Paulo (USP), onde é produzida. O marcador nuclear utilizado foi o diamidino fenilindol (DAPI) da Vector Laboratories, Inc., (CA, USA). Demais reagentes químicos foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

- Soluções utilizadas:

- a) Tampão de ligação contém: Hepes 10mM (pH 7,4), NaCl 150mM, KCl 5mM, MgCl₂ 1mM e CaCl₂ 1,8mM, esterilizado por filtração e mantido à 4°C.
- b) Tampão de PBS 0,1M contém: fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), cloreto de sódio (NaCl), água destilada, pH 7,4.

Realizou-se base de inclusão do fragmento de biópsia previamente congelado e armazenado a -80° C. Utilizou-se gel de inclusão da Thermo Fisher Scientific, Inc. (MA, USA). Realizado cortes histológicos de 5 micra (µm) de espessura no Criocut (Modelo CM 1900; Leica, Germany) e colocação em lâminas de vidro do tipo silanizadas da EasyPath Erviegas (SP, BR).

Os cortes congelados foram submetidos à marcação com Anexina V-FITC de acordo com as recomendações do fabricante. As lâminas foram lavadas três vezes de cinco minutos com PBS 0,1M à 4°C e uma vez de cinco minutos com tampão de ligação. Foram incubadas com Anexina V-FITC em tampão de ligação na diluição 1:500, por 20 minutos em temperatura ambiente, no escuro. Lavadas duas vezes com tampão de ligação e montadas com DAPI. A positividade da reação foi evidenciada pela marcação em verde fluorescente da membrana celular, vista à microscopia eletrônica. (HAYES e MOSS, 2004; BOERSMA et al., 2005)

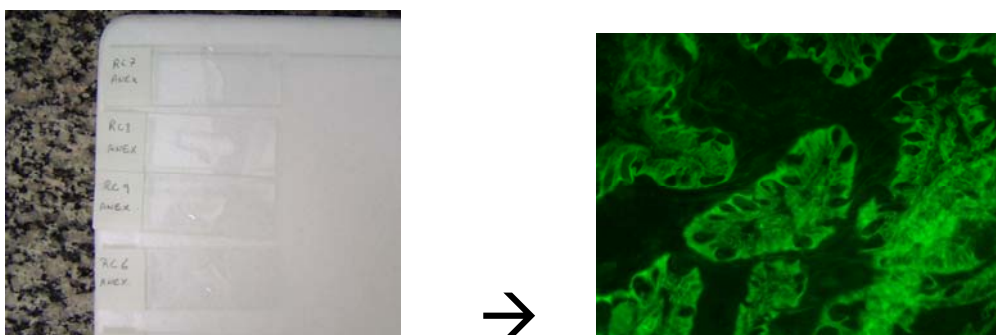


Figura 11- Lâminas incubadas com Anexina V-FITC e aspecto histológico de mucosa ileal (Controle) à microscopia de imunofluorescência com aumento de 200X.

4- RESULTADOS

4.1- Expressão de IFN- γ e STAT-1

As expressões de STAT-1 e IFN- γ foram significativamente maiores no Grupo RCUI em relação ao Grupo Controle ($p < 0,05$). A expressão de STAT-1 também foi significativamente maior no Grupo RCUI quando comparada ao Grupo PAF ($p < 0,05$). As bandas auto-radiografadas representativas das citocinas estão na Figura 12. A distribuição dos achados para cada citocina individualmente é mostrada nas Figuras 13 e 14, juntamente com as bandas auto-radiografadas quantificadas por densitometria óptica.

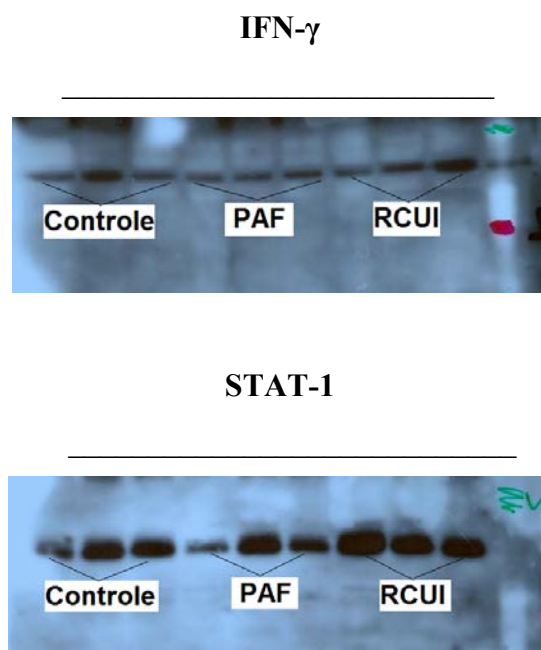


Figura 12- Bandas auto-radiografadas da expressão de IFN- γ e STAT-1 nos Grupos Controle, PAF e RCUI.

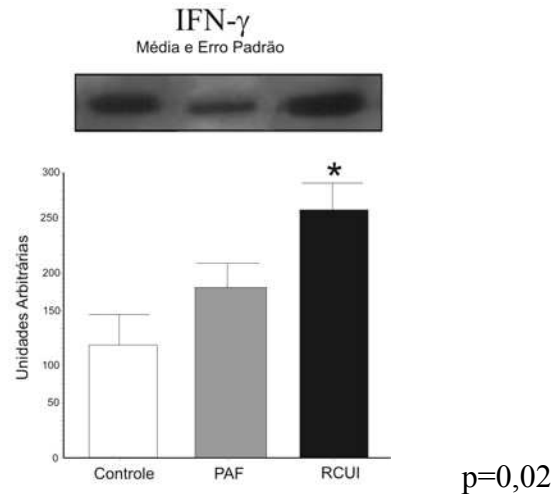


Figura 13- Determinação da expressão protéica de IFN- γ nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=09, *p<0.05 vs Controle; § p<0.05 vs PAF.

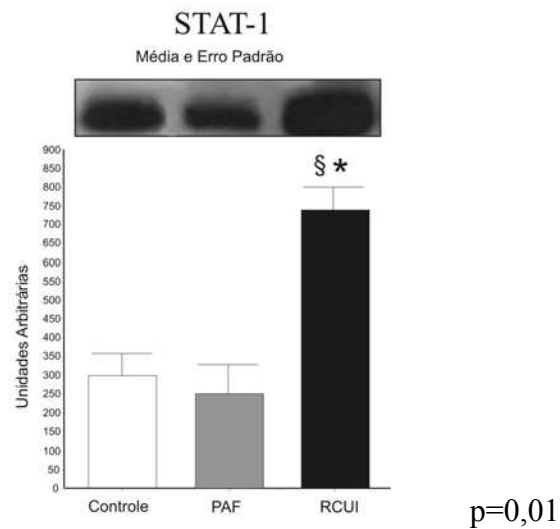
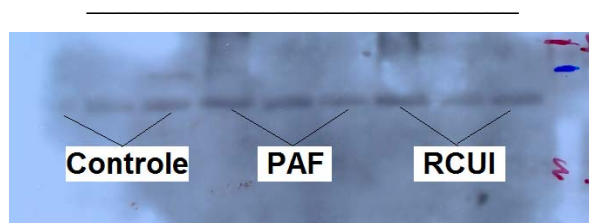


Figura 14- Determinação da expressão protéica de STAT-1 nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=09, *p<0.05 vs Controle; § p<0.05 vs PAF.

4.2- Expressão de IL-10 e SOCS-3

A análise mostrou níveis similares de IL-10 e SOCS-3 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 ($p>0,05$). As expressões de IL-10 e SOCS-3 são ilustradas nas Figuras 15,16 e 17.

IL-10



SOCS-3

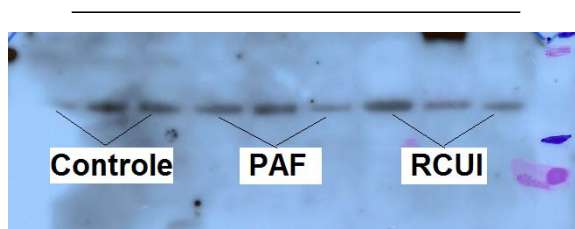


Figura 15- Bandas auto-radiografadas da expressão de IL-10 e SOCS-3 nos Grupos Controle, PAF e RCUI.

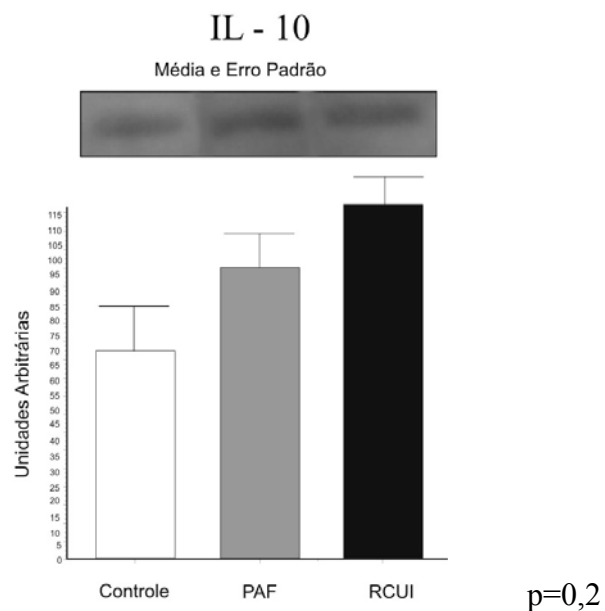


Figura 16- Expressão de IL-10 em RI nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=09, *p<0.05 vs Controle; § p<0.05 vs PAF.

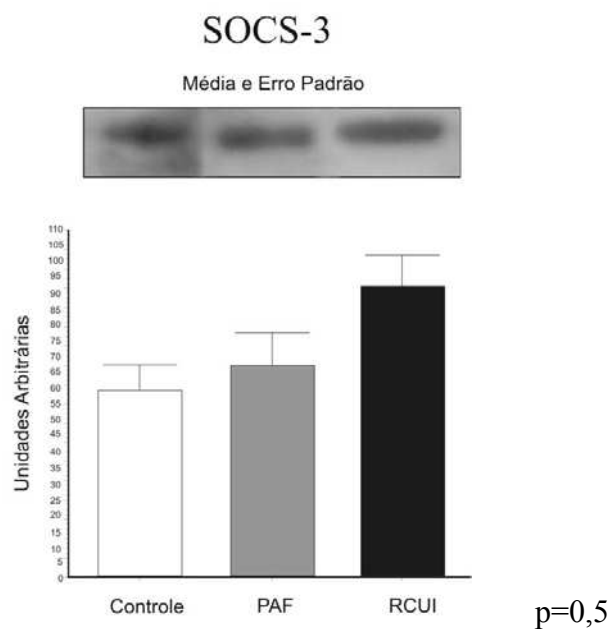


Figura 17- Expressão de SOCS-3 em RI nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=09, *p<0.05 vs Controle; § p<0.05 vs PAF.

4.3- Expressão da proteína pró-apoptótica Bax

A expressão da proteína pró-apoptótica Bax 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 ($p > 0,05$) (Figuras 18 e 19).

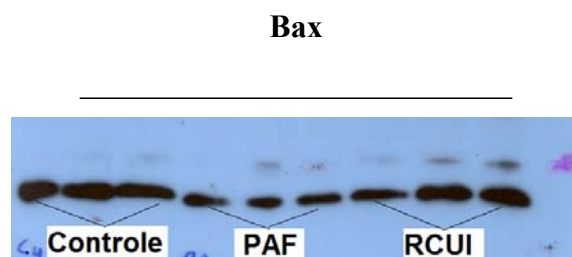


Figura 18- Bandas auto-radiografadas da expressão de Bax nos Grupos Controle, PAF e RCUI.

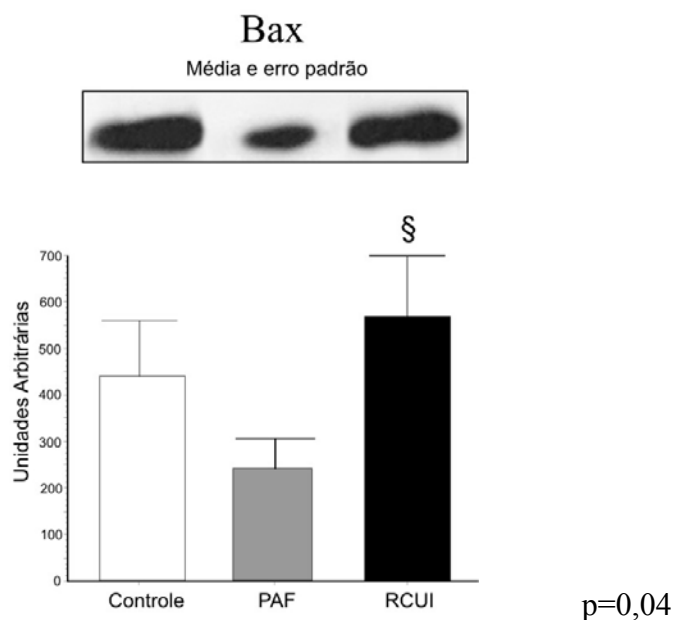


Figura 19- Determinação da expressão protéica de Bax nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, $n = 09$, * $p < 0,05$ vs Controle; § $p < 0,05$ vs PAF.

4.4- Expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2

Não houve diferença significativa da expressão de Bcl-2 entre os Grupos RCUI, PAF e Controle, ($p>0,05$) (Figuras 20 e 21).

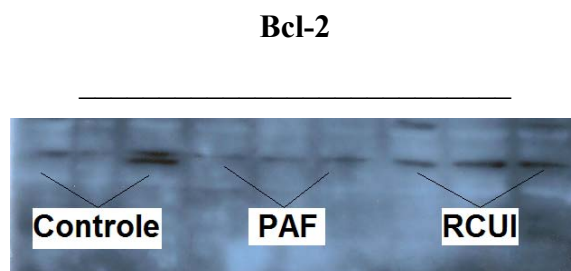


Figura 20- Bandas auto-radiografadas da expressão de Bcl-2 nos Grupos Controle, PAF e RCUI.

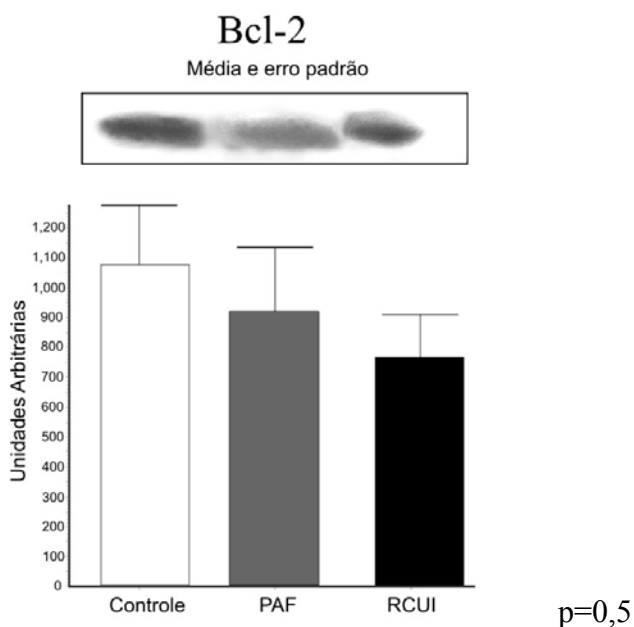


Figura 21- Determinação da expressão protéica de Bcl-2 nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, $n=09$, $*p<0.05$ vs Controle; $\S p<0.05$ vs PAF.

4.5- Razão Bax/Bcl-2

Não houve diferença significativa da razão Bax/Bcl-2 entre os Grupos RCUI, PAF e Controle, ($p>0,05$) (Figura 22).

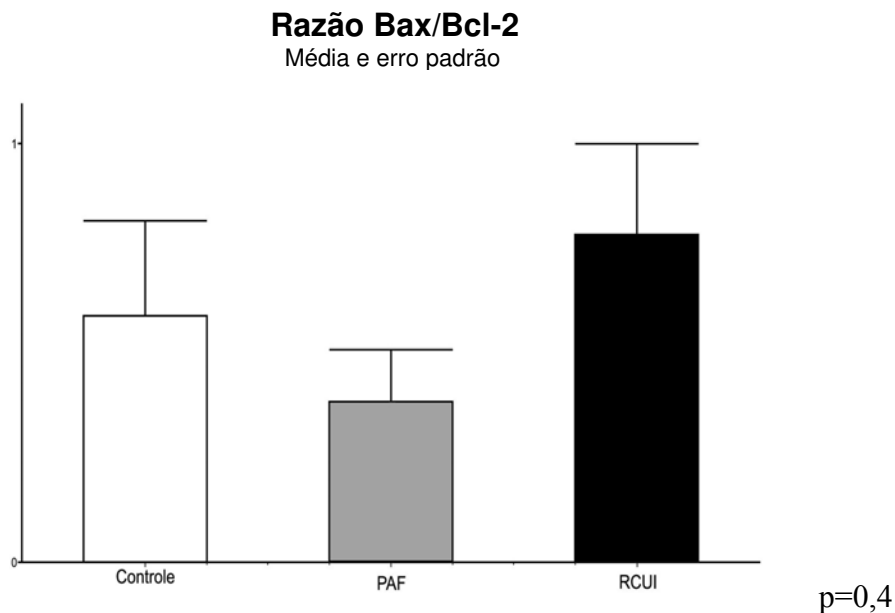


Figura 22- Razão da expressão Bax/Bcl-2 nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, $n=09$, $*p<0.05$ vs Controle; $\S p<0.05$ vs PAF.

4.6- Expressão de proteínas da via extrínseca da apoptose celular

Não houve diferença significativa da expressão de FADD e Caspase-8 entre os Grupos RCUI, PAF e Controle, ($p>0,05$) (Figuras 23 e 24).

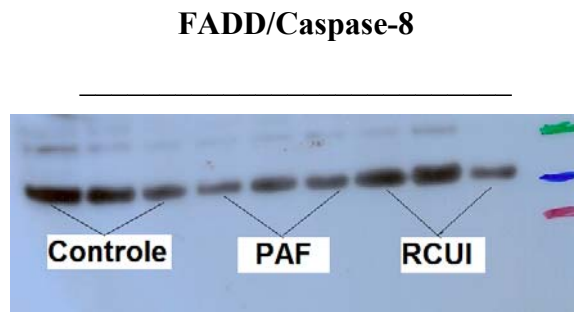


Figura 23- Bandas auto-radiografadas da expressão de FADD/Caspase-8 nos Grupos Controle, PAF e RCUI.

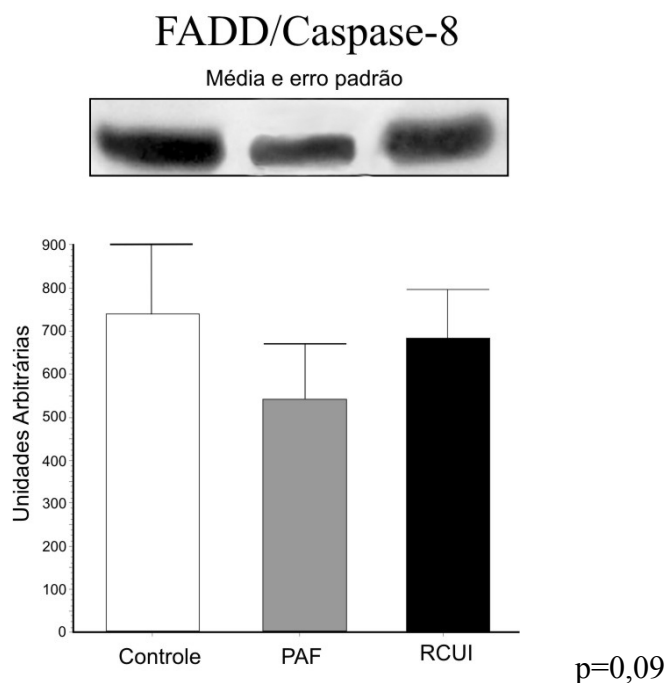


Figura 24- Determinação da expressão protéica de FADD/Caspase-8 nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=09, *p<0.05 vs Controle; § p<0.05 vs PAF.

4.7- Expressão de proteínas da via intrínseca da apoptose celular

As expressões das proteínas APAF-1 e Caspase-9 foram significativamente maiores no Grupo RCUI em relação ao Grupo PAF (p<0,05). Não houve diferença significativa da expressão das proteínas no Grupo Controle, quando comparada aos demais grupos (p>0,05) (Figuras 25 e 26).

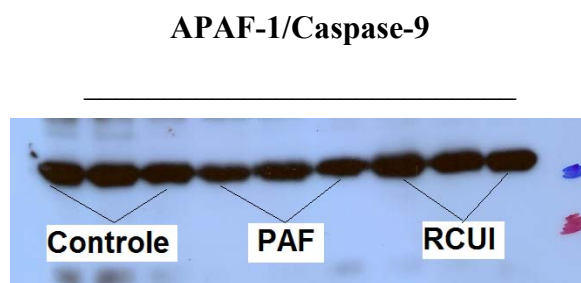


Figura 25- Bandas auto-radiografadas da expressão de APAF-1/Caspase-9 nos Grupos Controle, PAF e RCUI.

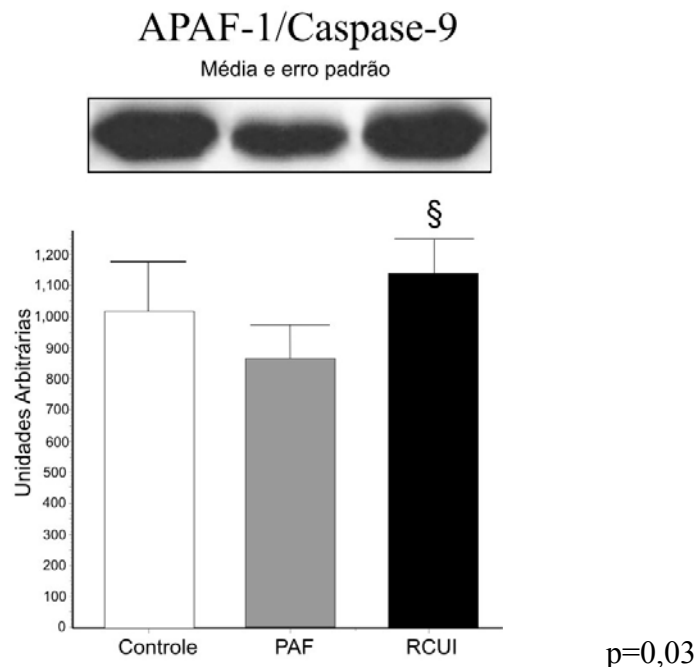
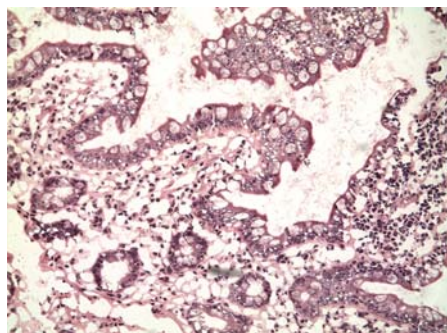


Figura 26- Determinação da expressão protéica de APAF-1/Caspase-9 nos Grupos RCUI, PAF e Controle. Para todas as condições, n=09, *p<0.05 vs Controle; § p<0.05 vs PAF.

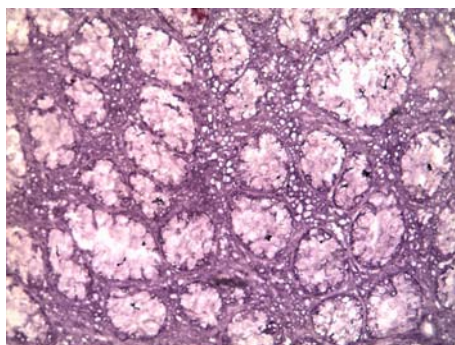
4.8- Aspecto histológico por meio da coloração com Hematoxilina e Eosina

A análise histológica por meio da coloração de Hematoxilina e Eosina à microscopia óptica evidenciou presença de poucos polimorfonucleares neutrófilos na lâmina própria, sem evidências de agressão epitelial, como demonstrado nos Anexos 8.4 e 8.5. Não foram observadas lesões ulceradas ou abscessos em cripta. A Figura 27 ilustra estes achados nos diferentes Grupos estudados.

Controle



PAF



RCUI

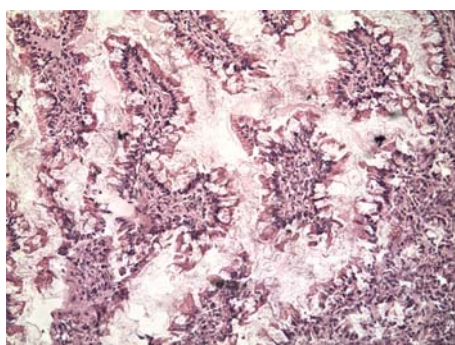


Figura 27- Aspecto histológico à coloração com Hematoxilina e Eosina nos Grupos Controle, PAF e RCUI. Aumento de 200X.

4.9- Imunoistoquímica com marcação para Bax e Bcl-2

Houve marcação positiva para Bax e Bcl-2 nos cortes histológicos dos diferentes Grupos estudados. A positividade para a proteína Bax apresentou predomínio de padrão granular e citoplasmático em células da superfície da mucosa ileal. A imunopositividade para Bcl-2 apresentou padrão citoplasmático granular em células estromais da lâmina própria. Os cortes histológicos representativos da imunoistoquímica para Bax e Bcl-2 estão demonstrados na Figura 28.

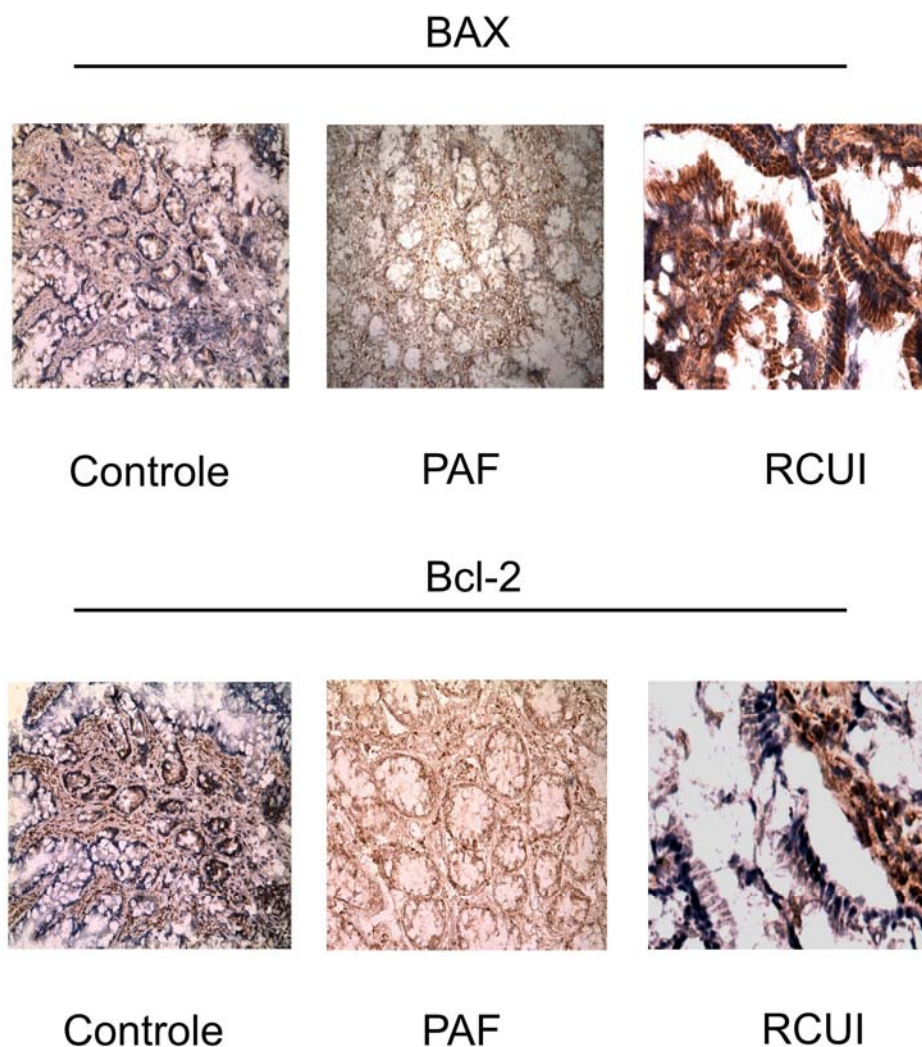


Figura 28- Aspecto histológico de imunoistoquímica para Bax e Bcl-2 nos Grupos Controle, PAF e RCUI. Aumentos de 100 e 200X.

4.10- Imunofluorescência com Anexina V

A análise qualitativa com Anexina V-FITC mostrou positividade em todos os Grupos, com maior tendência de apoptose em mucosa de RI de portadores de RCUI.

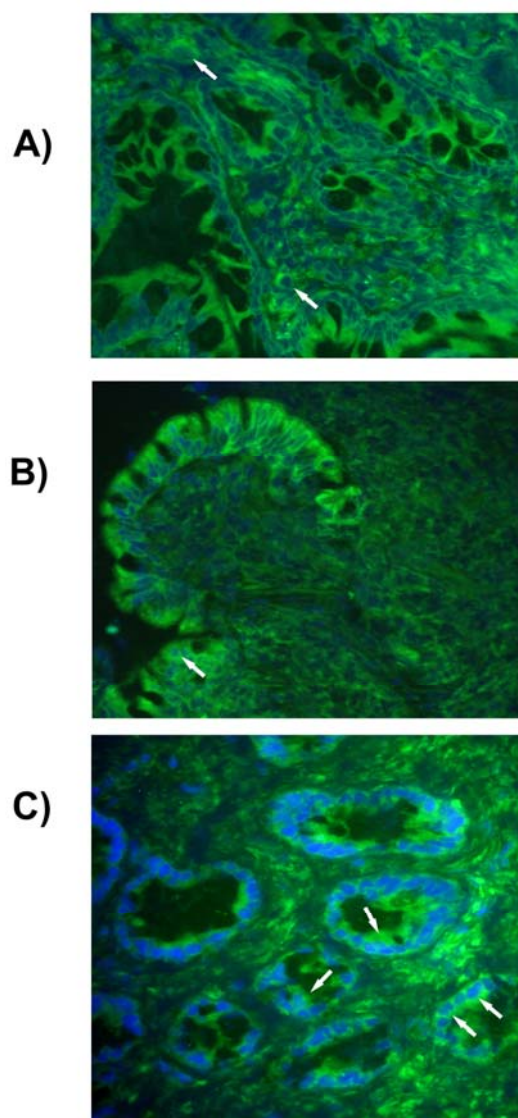


Figura 29- Aspecto histológico para marcação com Anexina V-FITC nos Grupos Controle (A), PAF (B) e RCUI (C). Aumento de 200X.

4.11- Resumo dos resultados do Imunoblot, Imunoprecipitado e razão Bax/Bcl-2

Marcadores pró-inflamatórios	Valor de <i>p</i>
IFN- γ	0,02*
STAT-1	0,01*

Marcadores anti-inflamatórios	Valor de <i>p</i>
IL-10	0,2
SOCS-3	0,4

Marcadores pró-apoptóticos	Valor de <i>p</i>
Bax	0,04*
FADD/Caspase-8 (via extrínseca)	0,09
Apaf-1/Caspase-9 (via intrínseca)	0,03*
Razão Bax/Bcl-2	0,4

Marcadores anti-apoptóticos	Valor de <i>p</i>
Bcl-2	0,5

*Significante estatisticamente ($p < 0,05$).

5- DISCUSSÃO

5.1- Reservatório ileal e vias inflamatórias

A etiologia da ileíte do RI primária, principal complicação após a cirurgia de retocolectomia total com confecção do RI, não está totalmente esclarecida. A maioria das teorias não explica a maior ocorrência desta complicação nos portadores de RCUI operados. Permanece um tópico de discussão; autores mencionam se a inflamação do RI representa a recorrência da RCUI no reservatório ou uma nova forma de doença inflamatória intestinal (KUHBAKER et al., 1998; TULCHINSKY et al., 2003).

De qualquer maneira, poucos estudos explicam a diferença da incidência desta complicação entre os doentes com RCUI e PAF, por meio da análise das citocinas pró-inflamatórias e suas vias na mucosa do RI com ileíte.

Gionchetti et al. (1994), Patel et al. (1995), Balzano et al. (1998), Evgenikos et al. (2002), Helwig et al. (2004) demonstraram aumento de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α em mucosa de RI com ileíte em portadores de RCUI. Kiehne et al. (2006) correlacionaram o aumento de TNF- α e IL-1 β com a diminuição de algumas defensinas, em mucosa do RI na condição de ileíte em RCUI. As α e β defensinas são peptídeos presentes na mucosa intestinal normal, apresentando importante papel na homeostase microbiológica e defesa intestinal primária contra vários microorganismos (WEHKAMP et al., 2002; WEHKAMP et al., 2003). Lammers et al. (2005) notaram diminuição de IL-1 β , IL-8 e IFN- γ após tratamento com probióticos de doentes portadores de ileíte do RI.

Goldberg et al. (1996) não mostraram diferenças na expressão de TNF- α , IL-6 e IFN- γ na lâmina própria da mucosa de RI normais de PAF e RCUI. Inversamente, o estudo realizado por Leal et al. (2008b) em doentes sem ileíte, segundo critérios histológicos, clínicos e endoscópicos descritos por Sandborn et al. (1994b), demonstraram expressão maior de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-1 β em mucosa do RI de RCUI quando comparado à PAF, mesmo na condição de doentes assintomáticos, revelando a tendência inflamatória em RCUI. Além disso, Stallmach et al. (1998) já haviam demonstrado produção elevada de IFN- γ em mucosa de RI com inflamação inespecífica primária do reservatório em portadores de RCUI com Índice de Atividade de Ileíte do Reservatório (SANDBORN et al., 1994b), maior ou igual a sete. No entanto, não houve comparação com controle de íleo

terminal normal. Boerr et al. (1998) detectaram expressão aumentada de IFN- γ em mucosa de RI de RCUI com ileíte, quando comparados àqueles assintomáticos, porém não estudaram em portadores de PAF.

Desta forma, dados da literatura inferem que a ileíte do RI reflete um processo inflamatório que é quantitativamente diferente quando comparado em portadores de RCUI e PAF, pela maior expressão de citocinas pró-inflamatórias no RI na RCUI. Schmidt et al. (2006) mostraram importante correlação entre o grau de inflamação no RI e a expressão de IL-8, mencionando que o aumento das citocinas refletiria o grau da inflamação e pouco, a etiologia do processo.

No entanto, com o aparecimento de estudos mais específicos das vias inflamatórias e de transcrição nuclear na doença inflamatória intestinal e nas condições de ileíte, pode-se observar uma relação estreita entre as vias de ativação da transcrição nuclear do TNF- α na RCUI ativa e aquelas verificadas na mucosa do RI com inflamação. Assim, Schreiber et al. (1997a) demonstraram serem o TNF- α na doença de Crohn e o IFN- γ na RCUI, as principais citocinas desencadeadoras do processo inflamatório nestas doenças. Posteriormente, Schreiber et al. (2002) notaram que a expressão e ativação de STAT-1, importante fator de transcrição nuclear do TNF- α , estavam predominantemente aumentados na mucosa cólica de portadores de RCUI, constituindo notável aspecto na fisiopatologia da inflamação do cólon nesta afecção.

A análise da expressão de STAT-1, que é ativado pelo IFN- γ , em RI foi verificado em poucos estudos. Schreiber et al. (1997b) observaram aumento da expressão de STAT-1 em mucosa de RI de doentes com ileíte do reservatório quando comparados àqueles sem inflamação e em íleo terminal normal, no entanto, não avaliaram STAT-1 em RI de PAF. Kuhbacher et al. (2001) correlacionaram STAT-1 com a atividade clínica da ileíte do RI em portadores de RCUI, porém não estudaram em PAF isoladamente.

As expressões aumentadas de IFN- γ e STAT-1 em mucosa de RI no Grupo RCUI verificadas no presente estudo, demonstra que mesmo em doentes assintomáticos há uma tendência inflamatória nos portadores de RCUI, e esta é caracterizada por uma via semelhante à doença de base em questão, RCUI. Este achado é corroborado por Leal et al. (2006) que não evidenciaram diferença significativa na ativação do NF-KB, outro

importante fator de transcrição nuclear do TNF- α , em mucosa de RI de RCUI e PAF assintomáticos. Isto deva ocorrer provavelmente porque a ativação do NF-KB não é a principal via de ativação TNF- α em RCUI.

Desta maneira, apesar do TNF- α ser importante integrante das vias inflamatórias em doenças inflamatórias intestinais, o IFN- γ parece ser uma das principais citocinas iniciadoras do processo inflamatório em RCUI, recrutando e ativando macrófagos, além de induzir a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, como o próprio TNF- α .

O fato de não haver diferença estatística da expressão de IFN- γ entre os Grupos RCUI e PAF, pode ser explicado pelos doentes serem assintomáticos e a diferença na expressão da citocina possa não ser detectada na ausência de inflamação endoscópica e histológica.

Da mesma maneira, a avaliação da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 e do fator supressor de sinalização SOCS-3 entre os Grupos RCUI, PAF e Controle não demonstrou diferença estatística, provavelmente porque os doentes estão sem ileíte do reservatório e não haja necessidade de bloqueio das vias inflamatórias, existindo um balanço entre as vias pró e anti-inflamatórias. O aumento da IL-10 em mucosa de RI foi verificado por Ulisse et al. (2001) nas condições de doentes com ileíte do RI tratados com probióticos, além de observarem diminuição do INF- γ após o tratamento. Recentemente, Franke et al. (2008) demonstraram alteração no gene da IL-10 localizado no cromossomo 1q32, em portadores de RCUI, sugerindo que uma possível deficiência na função da IL-10 poderia estar relacionada à etiologia da doença. Desta forma, justifica-se o estudo da IL-10 em mucosa de RI de doentes operados por RCUI, não somente por se tratar de um mecanismo anti-inflamatório do organismo, como também pelo fato desta via poder estar alterada na RCUI.

5.2- Reservatório ileal e vias da apoptose celular

Os mecanismos de inflamação e apoptose celular estão interligados e algumas citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , estão envolvidas na regulação da sobrevivência e morte celular. Há poucos estudos na literatura avaliando estes aspectos em RI. A expressão

elevada de FasL, antes denominada proteína CD95L, membro da família TNF- α pró-apoptótico, foi reportado em mucosa de RI de doentes com RCUI, com ileíte do reservatório. Além disso, correlacionaram este achado com o alto potencial de renovação celular e certa atrofia da mucosa verificada nos casos de ileíte do RI nos portadores de RCUI (COFFEY et al., 2001), porém este estudo não avaliou a mucosa de RI de PAF. Kiss et al. (1994) estudando 13 doentes operados por RCUI e dois por PAF, assintomáticos, também observaram atrofia da mucosa do RI, no entanto, utilizando-se microscopia eletrônica.

Leal et al. (2008b) encontraram níveis elevados da expressão da proteína pró-apoptótica Bad em mucosa de RI de doentes portadores de RCUI assintomáticos quando comparados àqueles com PAF. Da mesma forma, no presente estudo, avaliou-se doentes operados por RCUI e PAF sem ileíte do RI, porém estudou-se mais especificamente a expressão de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (GROSS et al., 1999; KUWANA et al., 2003; FESTJENS et al., 2004) e da família das Caspases intracelulares (WIDMANN et al., 1998; VERMEULEN et al., 2005), mapeando as vias intrínseca e extrínseca da apoptose celular na mucosa do RI.

Mesmo em condições clínicas, endoscópicas e histológicas favoráveis, os níveis locais de proteínas pró-apoptóticas foram maiores no Grupo RCUI. As expressões de Bax, Apaf-1 e Caspase-9 foram maiores nos portadores de RCUI quando comparadas ao Grupo PAF. Além disso, FADD e Caspase-8 apresentaram uma discreta tendência de estarem mais expressas no Grupo RCUI, porém sem significância estatística. Estes achados são interessantes, uma vez que mostram a tendência de apoptose celular na mucosa do RI em RCUI, que pode ser conseqüente ao processo inflamatório subjacente.

Além disso, a principal via de apoptose observada foi a intrínseca, caracterizada pelas expressões aumentadas de Apaf-1, Caspase-9 e Bax no Grupo RCUI, estando de acordo com o estudo da proteína Bad, também da família Bcl-2, em RI (LEAL et al., 2008b). A proteína Bax foi evidenciada em todos os Grupos, com padrão granular no citoplasma das células epiteliais da mucosa do RI à imunoistoquímica.

A razão Bax/Bcl-2 e expressão de Bcl-2 foram similares nos Grupos analisados; estes resultados podem ser explicados pelo fato de serem doentes assintomáticos e o mecanismo de sobrevivência da célula esteja atuante tanto na PAF quanto na RCUI. Além disso, a expressão de Bcl-2 à imunohistoquímica, demonstrou que a mesma encontra-se principalmente no citoplasma das células estromais da lâmina própria da mucosa, tendendo a uma distribuição mais próxima à base das criptas, o que pode indicar que estas células tenham menor potencial de apoptose em comparação às células da superfície luminal.

Deve-se ressaltar que a utilização neste estudo de três métodos de detecção da apoptose celular permitiu detalhada avaliação do processo de morte e sobrevivência celular na mucosa do reservatório ileal. O emprego de técnica de imunofluorescência com Anexina V, tem sido utilizado para a marcação de células em apoptose. Esta proteína faz parte da família das Anexinas, dependentes de cálcio (Ca^{2+}) capazes de se ligarem a superfícies de membrana com fosfolípidos. Isto ocorre devido à modificação que ocorre na membrana quando a célula está iniciando ou em processo de morte celular. A anexina V é capaz de se ligar ao fosfolípido denominado fosfatidilserina, pelo qual tem grande afinidade, presente no interior da membrana bilipídica, que em processo de apoptose exterioriza-se. Este mecanismo ocorre como uma forma de sinalização ao meio externo do processo apoptótico (HAYES e MOSS, 2004; BOERSMA et al., 2005; HUERTA et al., 2007). Assim, detectaram-se células em apoptose por meio de imunofluorescência com Anexina V-FITC nos Grupos RCUI, PAF e Controle, demonstrando através de análise qualitativa, tendência maior de apoptose em mucosa de RI nos portadores de RCUI quando comparada à PAF.

Se por um lado observou-se maior expressão de proteínas pró-apoptóticas no Grupo RCUI, por outro, deve-se destacar a menor expressão destas proteínas na PAF, portanto menor potencial de renovação celular, que presuntivamente deva ter correlação com a própria doença de base e seu potencial de transformação maligna. Alguns autores têm relatado aparecimento de adenomas na mucosa do RI de portadores de PAF mais comumente que em RCUI (PARC et al., 2001; KARTHEUSER et al., 2006; NILUBOL et al., 2007; SCHAUS et al., 2007).

Deste modo, o conhecimento das vias inflamatórias e de apoptose celular no RI normal pode levar ao melhor entendimento do mecanismo biológico na ileíte do reservatório. Evidencia-se neste estudo, que mecanismos subclínicos de base podem ocorrer no RI diferenciando PAF de RCUI. Quando o RI está inflamado todas as vias estão deflagradas, tanto na RCUI quanto na PAF, não se podendo constatar diferenças pertinentes que justifiquem a maior ocorrência desta complicação nos portadores de RCUI.

A maior expressão de citocinas pró-inflamatórias em RCUI quando comparada aos RI de portadores de PAF verificados na literatura e neste estudo, sugere que o defeito primário na regulação da ativação de macrófagos e linfócitos podem coincidir com a alteração na regulação da apoptose celular, sendo importante no desenvolvimento e perpetuação da inflamação local nos RI em RCUI.

6- CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, demonstrou-se que:

1. As expressões de IFN- γ e STAT-1 foram maiores no Grupo RCUI em relação ao Grupo Controle.
2. A expressão de STAT-1 foi maior no Grupo RCUI do que no Grupo PAF.
3. As expressões de IL-10 e SOCS-3 foram semelhantes nos três Grupos.
4. As expressões de Bax, Apaf-1/Caspase-9 foram maiores no Grupo RCUI em comparação com o Grupo Controle, corroborado pelo estudo imunoistoquímico para Bax e Bcl2 e imunofluorescência para Anexina V.
5. Não houve diferença das expressões de Bcl-2, FADD/Caspase-8 entre os diferentes Grupos estudados.
6. Não se detectou processo inflamatório histológico com úlceras ou abscessos em cripta nos Grupos PAF, RCUI e Controle, por meio do estudo com hematoxilina e eosina.

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.

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

Allen TC. Hematoxilina y Eosina. In: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. *Métodos Histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP)*. Washington: Registro de Patología de los Estados Unidos da América (ARP), 1995. p. 55-59.

Almeida MG, Kiss DR, Zilberstein B, Quintanilha AG, Teixeira MG, Habr-Gama A. Intestinal mucosa-associated microflora in ulcerative colitis patients before and after restorative proctocolectomy with an ileoanal pouch. *Dis Colon Rectum* 2008;51: 1113-1119.

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 resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. *Endocrinology* 2005;146:1428-1437.

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

Ayrizono MLS, Meirelles LR, Leal RF, Coy CSR, Fagundes JJ, Góes JRN. Long-term outcomes of ileal pouch after secondary diagnosis of Crohn's disease. *Arq Gastroenterol* 2008; 45:204-207.

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-inflammatory 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.

Beenken SW, Bland KI. Biomarkers for breast cancer. *Minerva Chir* 2002;57:437-48.

Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. Altered expression of Fas ligand by colonic epithelium in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1998;114:A929.

Boerr L, Sambuelli A, Sugay E, Felstiner D, Negreira S, Gil A, et al. Serum TGF- β 1 and Interferon- γ levels in ileal pouch-anal anastomosis in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1998;114:A936.

Boersma HH, Kietselaer BLJH, Stolk LML, Bennaghmouch A, Hofstra L, Narula J, et al. Past, present, and future of Annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med* 2005;46:2035-2050.

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- κ B. *Nature Reviews* 2004;5:392-401.

Chipuk JE, Green DR. Cytoplasmic p53. Bax and Forward. *Cell Cycle* 2004;3(4):429-3-431.

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 epithelial apoptosis – a putative role in pouchitis? *J Surg Res* 2001;98:27-32.

Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol* 1997;21(1):88-101.

Deveraux QL, Schendel SL, Reed JC. Antiapoptotic proteins. The Bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. *Card Clin* 2001;19(1):57-74.

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 1 β 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.

Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* 2008;40(11):1319-1323.

Friederich P, Berkhout M, Roelofs HMJ, van Goor H, van Krieken JHJM, Peters WHM, et al. Decreased levels of mucosal detoxification enzymes in the pouch of patients with familial adenomatous polyposis. *Br J Surg* 2006;93(9):1108-1114.

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. Retocollectomia 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. Retocollectomia total, anastomose íleo-anal com reservatório ileal e ocorrência de obstrução intestinal. *Rev bras Coloproct* 2004;24(4):329-333.

Goldberg PA, Herbst F, Beckett CG, Martelli B, Kontakou M, Talbot IC, et al. Leucocyte typing, cytokine expression and epithelial turnover in the ileal pouch in patients with ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis. *Gut* 1996;38(4):549-553.

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.

Hayes MJ, Moss SE. Annexins and disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322:1166-1170.

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 G, Leowardi C, Hinz U, Autschbach F, Stallmach A, Herfarth C, et al. Differential expression of toll-like receptor 3 and 5 in ileal pouch mucosa of ulcerative colitis patients. *Int J Colorectal Dis* 2007;22:293-301.

Heuschen UA, Autschbach F, Allemeyer EH, Zollinger AM, Heuschen G, Uehlein T, et al. Long-term follow-up after ileoanal pouch procedure: algorithm for diagnosis, classification, and management of pouchitis. *Dis Colon Rectum* 2001;44:487-499.

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.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A comparison between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29(4):577-580.

Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 2007;139:143-156.

Ito S, Ansari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly P, et al. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha and interferon gamma-induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT-1. *Blood* 1999;93(5):1456-63.

John T, Muller RD, Oberholzer A, Zreiqat H, Kohl B, Ertel W, et al. Interleukin-10 modulates pro-apoptotic effects of TNF- α in human articular chondrocytes in vitro. *Cytokine* 2007;40:226-234.

Kartheuser A, Stangherlin P, Brandt D, Remue C, Sempoux C. Restorative proctocolectomy and ileal pouch-anal anastomosis for familial adenomatous polyposis revisited. *Familial Cancer* 2006;5:241-260.

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.

Kerr Jf, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.

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.

Kienle P, Weitz J, Reinshagen S, Magener A, Autschbach F, Benner A, et al. Association of decreased perfusion of the ileoanal pouch mucosa with early postoperative pouchitis and local septic complications. *Arch Surg* 2001;136:1124-1130.

Kiss DR, Habr-Gama A, Freymuller E, Smith RL, Pinotti HW. Microscopia eletrônica de varredura da superfície epitelial do íleo em reservatórios ileais pélvicos e após anastomose ileorretal. *Rev bras Coloproct* 1994;14(2):81-88.

Klampfer L, Huang J, Sasazuki T, Shirasawa S, Augenlicht L. Inhibition of Interferon γ signaling by the short chain fatty acid butyrate. *Mol Cancer Res* 2003;1:855-862.

Kock NG. Present status of the continent ileostomy: surgical revision of the malfunctioning ileostomy. *Dis Colon Rectum* 1976;19(3):200-212.

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

Kuhbacher T, Gionchetti P, Hampe J, Helwig U, Rosenstiel P, Campieri M, et al. Activation of signal-transducer and activator of transcription 1 (STAT 1) in pouchitis. *Clin Exp Immunol* 2001;123:395-401.

Kuhbacher 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.

Kühn K, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-74.

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-configured ileal-pouch-anal-anastomosis. *Scand J Gastroenterol* 2004;12:1230-1235.

Laake KO, Bjornekleit A, Aamodt G, Aabakken L, Jacobsen M, Bakka A, et al. Outcome of four weeks' intervention with probiotics on symptoms and endoscopic appearance after surgical reconstruction with a J-configured 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-1 β , 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.
- Leal RF, Coy CSR, Velloso LA, Ayrizono MLS, Fagundes JJ, Milanski M, Coope A, Góes JRN. Atividade inflamatória em mucosa de reservatório ileal na polipose adenomatosa familiar e retocolite ulcerativa inespecífica. Avaliação da expressão de TNF- α e IL-1 β , e da ativação do NF- κ B. *Rev bras Coloproct* 2006;26(4):399-405.
- Leal RF, Ayrizono MLS, Coy CSR, Fagundes JJ, Góes JRN. Short-term and long-term postoperative complications after ileal pouch-anal anastomosis in familial adenomatous polyposis. *Arq Gastroenterol* 2008a;45(2):106-110.
- Leal RF, Coy CSR, Ayrizono MLS, Fagundes JJ, Milanski M, Saad MJ, Velloso LA, Góes JRN. Differential expression of pro-inflammatory cytokines and a pro-apoptotic protein in pelvic ileal pouches for ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis. *Tech Coloproctol* 2008b;12(1):33-38.
- 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.
- Lim M, Sagar P, Finan P, Burke D, Schuster H. Dysbiosis and pouchitis. *Br J Surg* 2006;93(11):1325-1334.
- 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.
- Lustosa SAS, Logullo A, Artigiani R, Saad SS, Goldenberg A, Matos D. Analysis of the correlation between p53 and bcl-2 expression with staging and prognosis of the colorectal adenocarcinoma. *Acta Cir Bras* 2005;20(5):353-357.
- 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.

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.

Martin DA, Elkon KB. Mechanisms of apoptosis. *Rheum Dis Clin N Am* 2004;30:441-454.

Martin LW, LeCoultré C, Schubert WK. Total colectomy and mucosal proctectomy with preservation of continence in ulcerative colitis. *Ann Surg* 1977;186:477-480.

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

McGuire BB, Brannigan AE, O'Connell PR. Ileal pouch-anal anastomosis. *Br J Surg* 2007;94:812-823.

Meagher AP, Farouk R, Dozois RR, Kelly KA, Pemberton JH. J ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis: complications and long-term outcome in 1310 patients. *Br J Surg* 1998;85:800-803.

Merrett MN, Mortensen N, Kettlewell M, Jewell DO. Smoking may prevent pouchitis in patients with restorative proctocolectomy for ulcerative colitis. *Gut* 1996;38:362-364.

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.

Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995;80:293-299.

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, Moskovitz RL, Shepard NA. Restorative proctocolectomy with ileal reservoir. *Br J Surg* 1985a;72:76-79.
- 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* 1985b;72:470-474.
- Nicholls RJ. Restorative proctocolectomy with various types of reservoir. *World J Surg* 1987;11:751-762.
- Nicholls RJ, Banerjee AK. Pouchitis: risk factors, etiology, and treatment. *World J Surg* 1998;22:347-356.
- Nilubol N, Scherl E, Bub DS, Gorfine SR, Marion J, Harris MT, et al. Mucosal dysplasia in ileal pelvic pouches after restorative proctocolectomy. *Dis Colon Rectum* 2007;50:825-831.
- Nissen R. Demonstrationen aus der operativen Chirurgie zunächst einige Beobachtungen aus der plastischen Chirurgie. *Zentralbl Chir* 1933;60:883.
- 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.
- Parc YR, Olschwang S, Desaint B, Schmitt G, Parc RG, Tiret E. Familial adenomatous polyposis: prevalence of adenomas in the ileal pouch after restorative proctocolectomy. *Ann Surg* 2001;233(3):360-364.
- 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.

Penna C, Dozois R, Tremaine W, Sandborn W, LaRusso N, Schleck C, et al. Pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis occurs with increased frequency in patients with associated primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1996;38:234-239.

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.

Ravitch M, Sabiston DC. Anal ileostomy with preservation of the sphincter. *Surg Gynecol Obstet* 1947;84:1095-1099.

Ravitch M. Anal ileostomy with sphincter preservation in patients requiring total colectomy for benign conditions. *Surgery* 1948;24:170-187.

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.

Sabatino AD, Ciccocioppo R, Luinetti O, Ricevuti L, Morera R, Cifone MG, et al. Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2003;46(11):1498-1507.

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.

Sasaki A, Yasukawa H, Susuki A, Kamizono S, Syoda T, Kinjyo I, et al. Cytokine-inducible SH2 protein-3(CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* 1999;4:339-351.

Schafer ZT, Kornbluth S. The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Dev Cell* 2006;10:549-561.

Schaus B J, Fazio VW, Remzi FH, Bennett AE, Lashner BA, Shen B. Clinical features of ileal pouch polyps in patients with underlying ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum* 2007;50:832-838.

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.

Schreiber S, Hampe J, Nikolaus S, Koop I, Ortner M, Weber J, et al. Patterns of cytokine transcription factor activation are different in Crohn's disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC). *Gastroenterology* 1997a;112:A1086.

Schreiber S, Gionchetti P, Hampe J, Rizzello F, Nikolaus S, Peruzzo S, et al. Pouchitis shares similarities with ulcerative colitis in the pattern of cytokine transcription factor activation. *Gastroenterology* 1997b;112:A1086.

Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor Kappa B in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42:477-484.

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.

Silva HJ, Angelis CP, Soper N, Kettlewell MGW, McC Mortensen NJ, Jewell DP . Clinical and functional outcome after restorative proctocolectomy. *Br J Surg* 1991;78:1039-1044.

Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, et al. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 1999;284:156-159.

Stallmach A, Schafer F, Hoffmann S, Weber S, Muller-Molaian I, Schneider T, et al. Increased state of activation of CD4 positive T cells and elevated interferon- γ production in pouchitis. *Gut* 1998;43:499-505.

Starr R, Wilson TA, Viney EM, Murray LJL, Rayner JR, Jenkins BJ, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. *Nature* 1997;387:917-921.

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

Teixeira WG, da Silva JH, Teixeira MG, Almeida M, Calache JE, Habr-Gama A. Pouchitis: extracolonic manifestation of ulcerative colitis? *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 1999;54(5):155-158.

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 São 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, Kiyahara 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.

Ulissee S, Gionchetti P, D'Alo S, Russo FP, Pesce I, Ricci G, et al. Expression of cytokines, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinases in pouchitis: effects of probiotic treatment. *Am J Gastroenterol* 2001;96(9):2691-2699.

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.

Valient MA, Bacon HE. Construction of pouch using pantaloon technic for pull-through of ileum following total colectomy; report of experimental work and results. *Am J Surg* 1955;90:742-750.

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.

Yamamoto T, Umegae S, Kitagawa T, Matsumoto K. The impact of the fecal stream and stasis on immunologic reactions in ileal pouch after restorative proctocolectomy for ulcerative colitis: a prospective, pilot study. *Am J Gastroenterol* 2005;100(10):2248-2253.

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.

Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 2004;19:124-128.

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

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

8.3- Grupo Controle

Doentes	Idade	Sexo
1 – MC	58	F
2 – RCSS	28	F
3 – LSF	41	F
4 – CCL	29	F
5 – LMSG	42	M
6 – VCS	40	M
7 – VA	56	M
8 – RJS	26	M
9 – EFFS	48	F

8.4- Mensuração do Índice de Atividade da Ileíte do Reservatório no Grupo RCUI

		Doentes - Pontuação									
CRITÉRIOS		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Clínico: Hábito intestinal		0	1	0	0	1	0	1	0	1	
	Sangramento retal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Urgência fecal ou cólica abdominal	0	0	0	0	1	1	0	1	1	
	Febre (Temperatura >37,8°C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Endoscópico: Edema		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Granularidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Friabilidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Perda do padrão vascular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Exsudato mucoso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Ulceração	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Histológico: Infiltração polimorfonuclear		1	1	1	0	0	1	1	0	0	
	Ulceração por campo de pequeno aumento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total		1	2	1	0	2	2	2	1	2	

8.5- Mensuração do Índice de Atividade da Ileíte do Reservatório no Grupo PAF

		Doentes - Pontuação									
CRITÉRIOS		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Clínico: Hábito intestinal		0	0	1	0	0	1	0	0	0	
	Sangramento retal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Urgência fecal ou cólica abdominal	0	1	0	1	0	1	0	0	0	
	Febre (Temperatura >37,8°C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Endoscópico: Edema		0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Granularidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Friabilidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Perda do padrão vascular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Exsudato mucoso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Ulceração	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Histológico: Infiltração polimorfonuclear		1	1	0	1	1	0	0	1	0	
	Ulceração por campo de pequeno aumento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total		1	2	1	2	1	2	0	1	0	

8.6- 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 frequentes

() perdas eventuais

8.7- Hábito intestinal e continência fecal - Grupo RCUI

RCUI

Doente	Número de evacuações	<i>Continência Fecal</i>
1	3	Presente
2	10	Presente
3	3	Presente
4	4	Presente
5	10	*
6	7	*
7	12	Presente
8	4	*
9	10	*
Média	7,0 (3-12)	

* perda noturna eventual

8.8- Hábito intestinal e continência fecal - Grupo PAF

PAF		
Doente	Número de evacuações	<i>Continência Fecal</i>
1	8	Presente
2	6	*
3	10	Presente
4	7	*
5	5	Presente
6	10	*
7	6	Presente
8	4	Presente
9	5	Presente
Média	6,8 (4-10)	

* perda noturna eventual

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



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

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

PARECER PROJETO: Nº 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 portadores 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 reservatarioscopia, 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.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



CEP: 22/05/07.
(PARECER CEP: Nº 543/2005)

PARECER

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 RETOCOLITE ULCERATIVA”

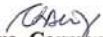
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Raquel Franco Leal

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Adendo que inclui o projeto de pesquisa intitulado “ESTUDO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E APOPTOSE CELULAR EM RESERVATÓRIOS ILEAIS DE DOENTES OPERADOS POR POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAR E RETOCOLITE ULCERATIVA INESPECÍFICA”, com finalidade de tese de doutorado, referente ao 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.

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de maio de 2007.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

Página 1 de 1

8.10- 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: 35217615 (ambulatório proctologia).

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa local: 35218936.

8.11- 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: 35217615 (ambulatório proctologia).

Telefone do Comitê de Ética e Pesquisa local: 35218936.