

VINÍCIUS RODRIGUES TARANTO NUNES

AVALIAÇÃO DA MESALAZINA INCORPORADA A POLÍMERO
BIODEGRADÁVEL NO TRATAMENTO DA RETITE ACTÍNICA EM RATOS
POR MEIO DE MODELO ALTERNATIVO DE IRRADIAÇÃO GAMA

Belo Horizonte

Minas Gerais - Brasil

2018

VINÍCIUS RODRIGUES TARANTO NUNES

AVALIAÇÃO DA MESALAZINA INCORPORADA A POLÍMERO
BIODEGRADÁVEL NO TRATAMENTO DA RETITE ACTÍNICA EM RATOS
POR MEIO DE MODELO ALTERNATIVO DE IRRADIAÇÃO GAMA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Medicina.

Área de Concentração: Cicatrização

Linha de Pesquisa: Fatores Intervenientes na Cicatrização Tecidual

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araujo

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Calvão Barbuto

Faculdade de Medicina da UFMG
Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil

2018

VINÍCIUS RODRIGUES TARANTO NUNES

AVALIAÇÃO DA MESALAZINA INCORPORADA A POLÍMERO BIODEGRADÁVEL NO
TRATAMENTO DA RETITE ACTÍNICA EM RATOSPOR MEIO DE MODELO
ALTERNATIVO DE IRRADIAÇÃO GAMA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais e
defendida para obtenção grau de Doutor em Medicina, perante Comissão Examinadora
constituída pelos Professores:

Prof^a. Soraya Rodrigues de Almeida Sanches

Prof. Juliano Alves Figueiredo

Prof. Carlos Augusto Real Martinez

Prof. Rogério Saad Hosne

Orientadora: Prof^a. Ivana Duval de Araujo (Universidade Federal de Minas Gerais)

Co-orientador: Prof. Rafael Calvão Barbuto (Universidade Federal de Minas Gerais)

Aprovado em 26de Março de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

VICE-REITORA: Prof^a. Dr^a. Sandra Goulart Almeida

PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof^a. Dr^a. Denise Maria Trombert de Oliveira

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Prof. Dr. Ado Jorio de Vasconcelos

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

VICE-DIRETOR: Prof. Dr. Humberto José Alves

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Luiz Armando Cunha de Marco

SUBCOORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Selmo Geber

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA: Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA: Prof^a. Dr^a.

Ana Rosa Pimentel de Figueiredo

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À

CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA: Prof. Dr. Túlio Pinho Navarro

SUB-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À

CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA: Prof^a. Dr^a. Vivian Resende

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Prof. Dr. Túlio Pinho Navarro (Coordenador)

Prof^a. Dr^a. Vivian Resende (Subcoordenadora)

Prof. Dr. Marco Antônio Percope

Prof. Dr. Marcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto

Representante Discente: Taíse Miriam Cruz Mosso Ramos

À Vânia, Alvimar, Natália, Alice, Lívia e
Patrícia,
razões do meu viver.

AGRADECIMENTOS

Considero esta uma seção fundamental deste trabalho científico, pois sozinhos somos fracos, mas juntos, formamos uma corrente tão forte que se torna inabalável.

Agradeço a Deus, pela fonte de toda vida e de tudo o que temos a oportunidade de vivenciar diariamente.

À Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araujo, por todo conhecimento compartilhado, pela compreensão diante de momentos difíceis por mim vividos e pela oportunidade de crescimento constante, não apenas do ponto de vista intelectual, mas principalmente nas orientações pessoais.

Ao Prof. Dr. Rafael Calvão Barbuto, pela amizade, companheirismo durante a realização dos experimentos e pela empolgação constante em ensinar.

Ao Prof. Dr. Márcio Tadeu Pereira e Prof. Dr. Luís Carlos Duarte Ladeira, pela receptividade em receber um desconhecido buscando ajuda na procura de conhecimento e pela disponibilidade incondicional em todas as etapas da irradiação.

À Prof^a. Dr^a. Paula Vieira Teixeira Vidigal, pelo tempo despendido na avaliação de lâminas, e todo o trabalho de cooperação essencial à realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliarri e ao Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira, pela paciente ajuda e acompanhamento na análise histológica.

Ao Prof. Dr. André Augusto Gomes Faraco e sua aluna Aina Liz Alves Cesar, por toda colaboração e boa vontade em nos abrir as portas em todos os momentos.

À minha mãe, Vânia Rodrigues Nunes, pelo exemplo constante de trabalho, dedicação e amor ágape; ao meu pai, Alvimar Taranto Nunes, por me ensinar que mesmo o mais forte

pode um dia tombar, mas sem nunca perder a vontade de lutar (seu esforço nesses meses foi meu exemplo constante); à minha irmã, Natália Rodrigues Taranto Nunes, pela amizade e apoio incondicionais, mesmo distante, mas todos os dias tão próxima de mim; à Alice e Lívia Taranto, que, mesmo sem entenderem ainda, motivam nossos sorrisos e nossos esforços para melhorarmos a cada dia; ao Ricardo Gonçalves, por possibilitar a tranquilidade de quem fica longe, por sabermos que cuida tão bem de pessoas tão preciosas.

À Patrícia Taranto Sousa Lima, a mais nova Taranto da família, pelo que torna as nossas alianças tão especiais (o nosso amor incondicional), por cuidar de mim e da nossa casa com tanto carinho e por ser minha vida inteira.

À toda minha família, por estar do meu lado sempre e mostrar que a amizade e companheirismo nos levam até o amor.

À Ilmar Maria, pela ajuda na correção gramatical e pela amizade que une famílias.

Ao Mário Pastore, pela amizade e conversas estimulantes nessa árdua jornada.

À Tenente-Coronel Márcia Brugnara, por me ensinar tanto sobre como chefiar com respeito e austeridade e pelos diálogos animadores.

Aos colegas do Hospital Risoleta Tolentino Neves e do Hospital da Polícia Militar, pela convivência diária e ajuda diante das dificuldades.

Aos meus professores do Promove, da UFMG e da residência médica que me ensinaram a valorizar o estudo e a pesquisa.

Aos pacientes que humildemente me ensinaram que Medicina se faz com atenção, cuidado e compromisso com o outro.

A todos os meus familiares e amigos que estiveram ao meu lado.

Aos animais sujeitos desta pesquisa, meu respeito por perderem suas vidas em prol do conhecimento.

“Em tudo dai graças, porque esta é a vontade de Deus em Cristo Jesus para convosco.”

Apóstolo Paulo (Tessalonicenses 5:18)

RESUMO

INTRODUÇÃO: Um dos pilares fundamentais no tratamento de tumores pélvicos é constituído pela radioterapia. No entanto, ela pode induzir à retite actínica, uma lesão considerada irreversível. Uma das opções terapêuticas é a mesalazina, apesar de os resultados na literatura serem controversos. Uma nova formulação de mesalazina conjugada ao sulfato de condroitina foi recentemente patenteada. **OBJETIVO:** Testar esta nova droga e seus componentes isoladamente no tratamento da retite actínica em ratos. **MATERIAIS E MÉTODO:** Foram utilizados 47 ratos Wistar fêmeas, submetidos à irradiação pélvica por meio de modelo alternativo de irradiação gama utilizando uma fonte aberta de Cobalto-60. Depois de irradiados, os animais foram divididos em oito grupos: Controle 1—administração de placebo oral duas semanas após a irradiação, eutanásia três semanas após o tratamento; Mesalazina 1- mesalazina oral duas semanas após a irradiação, eutanásia três semanas após o tratamento; Condroitina 1- condroitina oral duas semanas após a irradiação, eutanásia três semanas após o tratamento; Conjugado 1 - conjugado de mesalazina oral duas semanas após a irradiação, eutanásia três semanas após o tratamento; Controle 2, Mesalazina 2, Condroitina 2 e Conjugado 2- administração das respectivas soluções oral da mesma forma, porém sacrifício seis semanas após o tratamento. Em seguida, o segmento de reto irradiado foi submetido à avaliação histológica para os seguintes parâmetros: infiltrado inflamatório na lâmina própria, erosão do epitélio de revestimento, necrose da mucosa, deposição de colágeno na lâmina própria. **RESULTADOS:** O infiltrado inflamatório foi mais intenso nos grupos Condroitina 1 ($p=0,002$) e Mesalazina 1 ($p=0,01$) quando comparados ao grupo Controle 1; no grupo Conjugado 2 quando comparado aos grupos Controle 2 ($p=0,002$), Condroitina 2 ($p=0,002$) e Mesalazina 2 ($p=0,01$). A fibroplasia foi menos intensa no grupo Condroitina 1 ($p=0,002$) e Mesalazina 1 ($p=0,01$) quando comparado ao grupo Controle 1; e mais intensa no grupo Controle 2 quando comparado aos grupos Condroitina 2 ($p=0,01$) e Mesalazina 2 ($p=0,002$). **CONCLUSÃO:** A mesalazina e a condroitina isoladamente retardaram a resposta inflamatória, induzindo a uma fibrose mais tardia. O conjugado foi capaz de induzir uma resposta inflamatória ainda mais tardia do que os componentes isoladamente. **PALAVRAS CHAVE:** Radioterapia. Retite Actínica. Mesalazina. Condroitina. Inflamação. Fibrose.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Radiotherapy is essential for the treatment of pelvic tumors; nonetheless it can induce actinic proctitis, an irreversible damage to the rectum that can be acute or chronic. One of the options of treatment for such condition is mesalazine, although with doubtful results in the literature. A new formulation of mesalazine linked to chondroitin sulfate (what increases the release time of the drug and enables reduction of the dose) was recently published. **OBJECTIVE:** The present study aimed at testing this new drug and its components alone in the treatment of actinic proctitis in rats. **METHODOLOGY:** Forty-seven female Wistar rats were submitted to pelvic radiation and divided into eight groups: Control A: placebo gavage two weeks after irradiation and sacrifice three weeks after oral treatment; Mesalazine A: mesalazine gavage and sacrifice the same manner; Chondroitin A: chondroitin gavage and sacrifice the same manner; Conjugate A: mesalazine polymeric conjugate gavage and sacrifice the same manner; Control C, Mesalazine C, Chondroitin C and Conjugate C: gavage the same way as for the A groups but sacrifice six weeks after oral treatment. After sacrifice, the rectum was submitted to histological characterization for each of the findings: inflammatory infiltrate in the lamina propria, epithelial degeneration, mucosal necrosis and collagen deposition to the lamina propria. **RESULTS:** The inflammatory infiltrate was more intense in the Chondroitin A group ($p=0,002$) and Mesalazine A group ($p=0,01$) compared to the Control A group; and was also more intense in the Conjugate C group compared to the Control C group ($p=0,002$), the Chondroitin C group ($p=0,002$) and the Mesalazine C group ($p=0,01$). The collagen deposition was less intense in the Chondroitin A group ($p=0,002$) and Mesalazine A group ($p=0,01$) compared to the Control A group; and was more intense in the Control C group compared to the Chondroitin C group ($p=0,01$) and Mesalazine C group ($p=0,002$). **CONCLUSION:** Mesalazine was efficacious in inducing a delayed inflammatory response, hence reducing the late fibrosis. Chondroitin alone had the same result as mesalazine, what is a new unexpected finding. The conjugate was able to induce an ever more delayed inflammatory response.

KEYWORDS: Radiotherapy. Actinic Proctitis. Mesalazine. Chondroitin. Inflammation. Fibrosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Croqui da instalação: nota-se o labirinto com paredes espessas de chumbo, levando a uma sala que possui no centro a fonte de Cobalto-60..... 20
- Figura 2- Fonte de Cobalto-60 localizada no centro da sala. A fonte encontra-se no subterrâneo e após o fechamento das portas e ativação do sistema, a fonte é içada por esta estrutura e irradia toda a sala..... 21
- Figura 3- Proteção de chumbo com abertura central que funciona como colimador dos raios gama..... 22
- Figura 4- Rato anestesiado posicionado em dispositivo de acrílico protegido por placas de chumbo. A porção posterior do animal não apresentava proteção de chumbo para dispersar a radiação e evitar o efeito de reflexo, o que poderia gerar danos às estruturas adjacentes..... 23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros histológicos cinco semanas após irradiação.....	61
Tabela 2 – Parâmetros histológicos oito semanas após irradiação.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ASA	Ácido 5-aminossalicílico
A	Acute - agudo
C	Chronic – crônico
CDTN	Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
e.g.	Exempli gratia – por exemplo
et al.	E outros
FDA	Food and Drug Administration
HE	Hematoxilina-Eosina
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
i.p.	Intraperitoneal
n	Número
N+	Presença de acometimento linfonodal
No.	Número
P	Nível de significância
T3	Extensão do tumor primário: invasão de mesorreto
T4	Extensão do tumor primário: invasão de órgãos adjacentes
TLD	Dosímetro termoluminescente
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
µm	Micrômetros
Bq	Becquerel
cm	Centímetros
g	Gramas
Gys	Grays
h	Horas
kg	Quilogramas
m	Metros
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	24
3 RELEVÂNCIA.....	25
4 PRIMEIRO ARTIGO.....	26
5 SEGUNDO ARTIGO.....	33
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÕES.....	55
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
APÊNDICE A - TABELAS DE HISTOLOGIA.....	61
APÊNDICE B - PLANILHA DE HISTOLOGIA POR ANIMAL.....	62
ANEXO A - CERTIFICADO DO CEUA.....	64
ANEXO B – FOLHA DE APROVAÇÃO.....	65

1 INTRODUÇÃO

A radioterapia tem um papel essencial no tratamento de cânceres pélvicos, especialmente os tumores de reto (lesões com estadiamento T3-T4 ou qualquer N+)^{1,2}. No entanto, seu uso também implica em danos graves aos órgãos adjacentes, e essas lesões acompanham os pacientes por toda a sua vida. A taxa de complicação após a realização de radioterapia chega até 10 a 15%³. À medida que mais pacientes são submetidos à radioterapia como parte do tratamento de suas neoplasias malignas, sobrevivendo a esses tumores e com aumento da sobrevida, a incidência de complicações e sequelas da radioterapia tende a aumentar⁴.

A irradiação na região pélvica, quando em contato com o reto e o cólon sigmóide distal, pode induzir à retite actínica, uma lesão capaz de gerar toxicidade gastrointestinal grave. A gravidade da injúria depende do tempo de exposição, do intervalo de tempo decorrido da irradiação, da dose total de radiação recebida, da dose fracionada de radiação, da taxa de dose de radiação e de alguns fatores individuais^{4,5,6}.

O diagnóstico formal da retite actínica depende da visão direta dos tecidos acometidos⁵. As alterações na mucosa sugestivas de lesão incluem a palidez, a friabilidade e a presença de telangiectasias. A realização de biópsias nem sempre é necessária, apesar de facilitar a exclusão de diagnósticos diferenciais, como doenças inflamatórias intestinais ou infecções intestinais, por exemplo⁵.

A retite actínica pode ser separada em duas categorias de lesão, aguda e crônica. Na fase inicial de injúria, durante a exposição à irradiação e algumas semanas após, a mucosa intestinal é a camada mais gravemente acometida, em uma fase denominada retite aguda⁷. Tal fase é caracterizada microscopicamente pela presença de erosão do epitélio de revestimento e infiltrado inflamatório na mucosa e submucosa^{6,8}. Passados alguns meses ou anos, todas as camadas do reto podem ser lesadas, o que determina uma retite crônica, caracterizada pela deposição excessiva de matriz extracelular, fibrose na lâmina própria, esclerose vascular e distrofia da camada muscular própria^{6,8}. Na fase crônica, não há processo inflamatório associado, e os achados histopatológicos decorrem da vasculopatia de

pequenos vasos⁵. A fase aguda usualmente evolui para uma fase crônica, mas por vezes esta pode ser menos sintomática, o que gera uma falsa impressão de cura da lesão. Por outro lado, a fase crônica pode se manifestar a partir de uma fase aguda latente e menos sintomática, o que também pode gerar uma errônea sensação de que não houve o processo inflamatório inicial⁵. A transição entre as fases aguda e crônica ocorre de forma gradual, e não há um período de tempo exato para se determinar essa progressão (cerca de dois a três meses, frequentemente). Portanto, algumas vezes, encontra-se alterações patológicas de associação entre inflamação e fibrose^{7,8}.

Em termos moleculares e de expressão de citocinas, a retite actínica se assemelha muito às Doenças Inflamatórias Intestinais. Indaram et al. publicaram um estudo no qual investigaram o perfil molecular de biópsias de pacientes com Doença de Crohn, Retocolite Ulcerativa Idiopática e Retite Actínica⁹. Concluíram que os níveis de IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 encontravam-se aumentados em pacientes com retite actínica aguda, semelhante ao que ocorreu nos pacientes com Doença Inflamatória Intestinal. Tal fato corrobora a eficácia de medicamentos semelhantes para o tratamento dessas doenças. Outros estudos também comprovaram que a irradiação abdominal e pélvica leva à elevação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IL-6 em órgãos submetidos à irradiação^{6,10}.

Cerca de 50% dos pacientes submetidos à radioterapia relatam que sua qualidade de vida é gravemente afetada por sintomas gastrointestinais, como sangramento nas fezes, urgência evacuatória, constipação, tenesmo, diarreia, dor retal, dentre outros¹¹. A melhor terapêutica disponível ainda é a prevenção, por meio de modalidades de radioterapia cada vez mais modernas e que focalizem a irradiação apenas à área necessária, minimizando o dano às estruturas adjacentes que não necessitem receber a irradiação¹.

No entanto, uma vez presente a retite actínica, por tratar-se de lesão irreversível e incurável, objetiva-se minimizar os sintomas e tratar o processo já estabelecido. Para isso, ainda não há na literatura nenhum tratamento validado. Porém, existem algumas opções medicamentosas, como o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) – mesalazina -, os corticosteróides, o sucralfato (oral ou enemas), a formalina, os probióticos, os antibióticos, os ácidos graxos de cadeia curta, dentre outros^{12,13}. Há, também, tratamentos endoscópicos disponíveis, como o laser, cauterização utilizando cautério bipolar, ablação por

radiofrequência, coagulação com plasma de argônio. Porém o uso destas terapias se limita à retite crônica, sobretudo quando evolui com complicações, como hemorragia e estenose, e, portanto não agem no processo inflamatório da fase aguda⁵. A oxigenioterapia hiperbárica também pode ser utilizada como uma terapia alternativa, apesar de seus resultados conflitantes¹⁴. Por fim, há a possibilidade de tratamento cirúrgico, como a confecção de uma ostomia, ou a ressecção de órgãos acometidos (proctectomia ou exenteração pélvica), que são abordagens mais invasivas, devendo ser reservadas a pacientes refratários a todos os tipos de tratamento ou com complicações (fístulas, estenoses, hemorragias, perfuração)⁵. Classicamente, a cirurgia foi uma das primeiras modalidades terapêuticas instituídas, e pouco mudou nas opções cirúrgicas desde as primeiras descrições^{15,16}. Todo esse arsenal terapêutico apresenta resultados controversos, e um tratamento padrão ainda não está definido. Dessa forma, a maior parte do que é feito na prática clínica advém de terapia empírica e experiência individual do médico.

Existem diversos estudos na literatura envolvendo a irradiação e seus efeitos em modelos experimentais animais, a maioria deles tentando determinar drogas capazes de prevenir e tratar o dano tecidual causado pela irradiação^{17,18,19}. Dentre as drogas disponíveis atualmente, a mesalazina é uma das mais estudadas, principalmente devido aos resultados favoráveis no tratamento das Doenças Inflamatórias Intestinais, como Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa Idiopática. A mesalazina inibe as enzimas ciclooxigenases, COX 1 e COX 2, inibindo assim a síntese de prostanóides inflamatórios. Ela pode ser utilizada na forma de enema, supositórios e também por via oral. Seo et al. publicaram estudo demonstrando a eficácia da mesalazina oral e retal no tratamento de pacientes com retite actínica²⁰. No entanto, trata-se de estudo prospectivo não randomizado (com apenas 23 pacientes), no qual os autores concluíram que se necessitam estudos randomizados e controlados para melhor comprovação da eficácia da mesalazina na retite actínica²⁰. Outros estudos, entretanto, provaram não haver efeito benéfico do uso da mesalazina para tal fim^{21,22,23}. Além disso, o esquema posológico complexo e fracionado, com várias tomadas de medicação diárias necessárias para efeito adequado da droga, dificulta a adesão ao tratamento, reduz a eficácia clínica real e torna os resultados de alguns estudos ainda mais questionáveis.

Recentemente, foi desenvolvida, publicada e patenteada uma nova formulação de mesalazina capaz de aumentar o tempo de liberação da droga ativa, o que permitiria uma redução na dose necessária para se obter o efeito terapêutico desejado²⁴. Cesar et al.²⁴ relataram o desenvolvimento e a caracterização de uma pró-droga polimérica obtida através de ligação entre o sulfato de condroitina e o 5-ASA, o que corresponde a uma nova molécula a partir da associação das duas outras. Testes *in vitro* provaram a eficácia da droga em aumentar o tempo de liberação e de sua ação no trato gastrointestinal²⁴.

O sulfato de condroitina, utilizado na criação da nova droga, é um glicosaminoglicano sulfatado que é biodegradável, biocompatível e mucoadesivo²⁵. A condroitina é aprovada para uso médico pelo FDA (Food and Drug Administration), agência responsável pela regulamentação de medicamentos nos Estados Unidos, e é amplamente utilizada como uma modalidade terapêutica coadjuvante para o tratamento da osteoartrite, por poupar o uso de anti-inflamatórios nesses pacientes²⁶.

De longa data, sabe-se que o modelo animal de retite actínica em ratos é bastante fidedigno ao que se encontra histologicamente em humanos, sendo, portanto muito utilizado nas pesquisas²⁷. Kang et al. descreveram um modelo de retite actínica induzida em ratos no qual relataram as alterações histológicas de acordo com a evolução temporal²⁸. Utilizando uma dose total de radiação de 17,5Grays (Gys), eles observaram que as alterações agudas na mucosa iniciaram a partir do quinto dia após a irradiação. Após quatro semanas de irradiados, os animais começaram a apresentar alterações crônicas, como fibrose e cicatrização. Com dois a três meses de irradiados, os animais já apresentavam a fibrose bem estabelecida na lâmina própria e um mínimo infiltrado inflamatório²⁸. Korkut et al. também estudaram a evolução temporal de achados histopatológicos da retite actínica em ratos²⁹. Concluíram que os achados agudos são encontrados predominantemente nas duas primeiras semanas após a irradiação, e, após isso, começa-se o processo de cicatrização da mucosa com sequelas crônicas, como a fibrose²⁹.

A maioria dos estudos disponíveis é baseada em irradiação fornecida por meio de máquinas de radioterapia. A partir da dificuldade em se conseguir parcerias para se realizar a irradiação dos animais utilizando-se máquinas de radioterapia, conseguiu-se contato com a equipe do Laboratório de Irradiação Gama no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia

Nuclear (CDTN), que cedeu o espaço e ajudou no desenvolvimento deste novo protocolo de irradiação³⁰. Por meio de uma fonte aberta de Cobalto radioativo (Cobalto-60) no centro de uma sala protegida, obteve-se a irradiação dos animais estudados no presente estudo (Figuras 1 e 2). Visando a similaridade com a irradiação fornecida pelas máquinas de radioterapia³¹, buscou-se desenvolver uma proteção de chumbo para o restante do corpo do animal, com abertura circular central de forma a concentrar os raios gama na região determinada (Figuras 3 e 4), assemelhando-se ao colimador utilizado na radioterapia convencional²⁸.

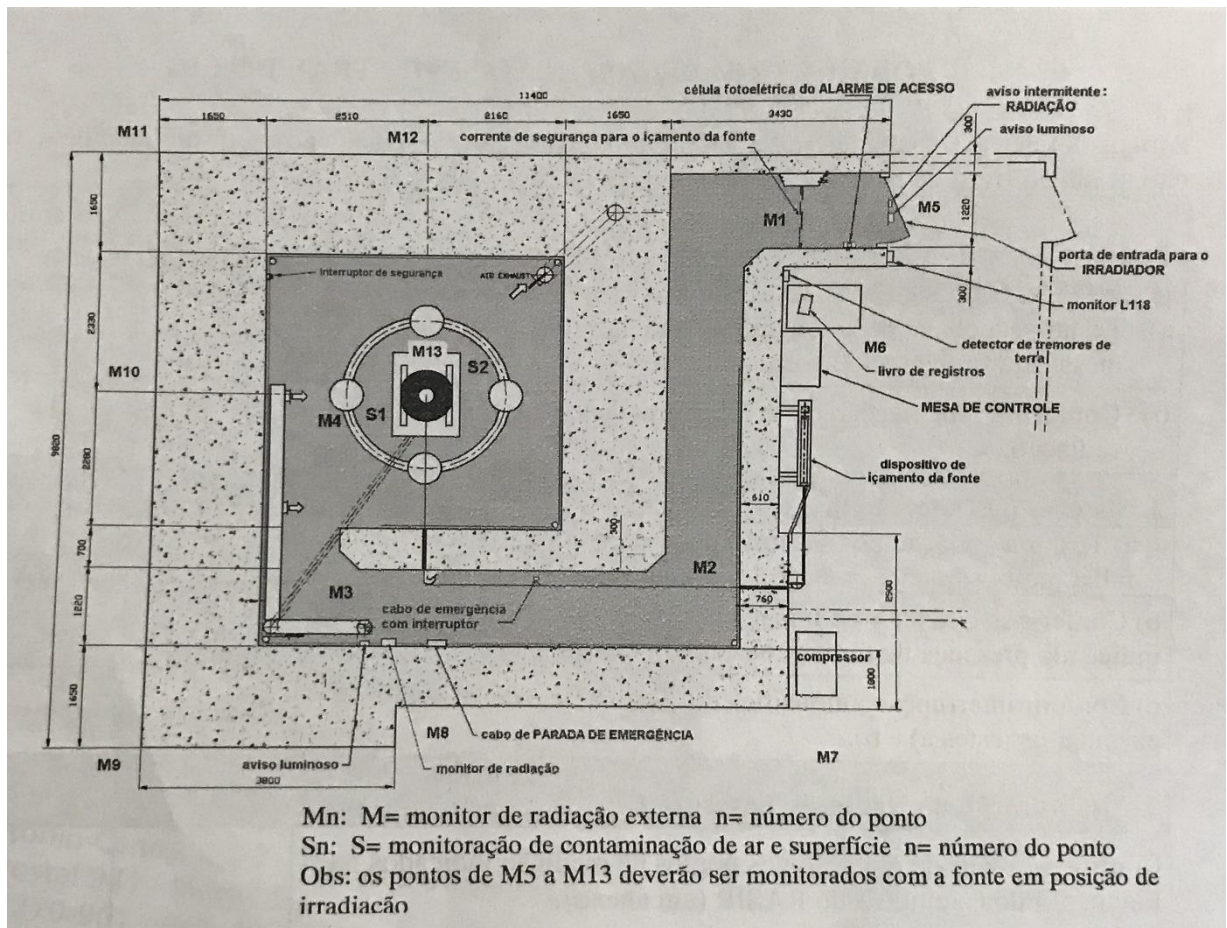


Figura 1- Croqui da instalação: nota-se o labirinto com paredes espessas de 1,90m de concreto, levando a uma sala que possui no centro a fonte de Cobalto-60.



Figura 2- Fonte de Cobalto-60 localizada no centro da sala. A fonte encontra-se no subterrâneo e após o fechamento das portas e ativação do sistema, a fonte é içada por esta estrutura e irradia toda a sala.



Figura 3- Proteção de chumbo com abertura central que funciona como colimador dos raios gama.



Figura 4- Rato anestesiado posicionado em dispositivo de acrílico protegido por placas de chumbo. A porção posterior do animal não apresentava proteção de chumbo para dispersar a radiação e evitar o efeito de reflexo, o que poderia gerar danos às estruturas adjacentes.

Previamente a este estudo, não se encontrou relatos na literatura da utilização desta técnica de irradiação para o desenvolvimento do modelo experimental da retite actínica. Também desconhecemos estudos investigando o uso *in vivo* e o uso clínico dessa nova droga para tratamento da retite actínica.

2 OBJETIVOS

1-Avaliar a eficácia e a reprodutibilidade de um novo método de indução de retite actínica experimental em ratos.

2- Avaliar a ação do ácido 5-aminossalicílico (mesalazina) na sua apresentação padrão e também incorporado a polímero biodegradável (sulfato de condroitina), administradas por via oral, nas lesões retais secundárias à radioterapia em ratos (retite actínica induzida), nas fases aguda e crônica de inflamação.

3 RELEVÂNCIA

Este estudo trará contribuições no entendimento da real eficácia da mesalazina no tratamento da retite actínica. Além disso, pretende avaliar a aplicabilidade e ação terapêutica de uma nova apresentação da mesalazina, que consiste em um polímero biodegradável capaz de incorporar o fármaco, aumentando a sua eficácia e tempo de liberação no trato gastrointestinal, o que permitiria uma diminuição da dose administrada, reduzindo os efeitos colaterais e facilitando sua administração. Este é o primeiro teste terapêutico em animais deste novo medicamento recentemente patenteado, para avaliar sua eficácia no tratamento da retite actínica, objetivando melhorar a qualidade de vida de pacientes com tumores pélvicos submetidos à radioterapia.

4PRIMEIRO ARTIGO



Development of a new model of actinic enteritis in rats using a cobalt-60 open source and a protection device as a collimator¹

Vinicius Rodrigues Taranto Nunes^I, Paula Vieira Teixeira Vidigal^{II}, Márcio Tadeu Pereira^{III}, Luís Carlos Duarte Ladeira^{III}, Rafael Calvão Barbuto^{IV}, Ivana Duval-Araujo^V

^IMS, Fellow PhD degree, Medical School, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte-MG, Brazil. Conception and design of the study, acquisition of data, manuscript writing.

^{II}PhD, Assistant Professor, Medical School, UFMG, Belo Horizonte-MG, Brazil. Acquisition of data, critical revision.

^{III}Nuclear Physicist, PhD, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), UFMG, Belo Horizonte-MG, Brazil. Acquisition of data, critical revision.

^{IV}PhD, Associate Professor, Medical School, UFMG, Belo Horizonte-MG, Brazil. Critical revision, final approval.

Abstract

Purpose: To describe a new model of actinic enteritis that does not use radiotherapy machines.

Methods: Sixteen Wistar rats were divided into four groups, consisting of four animals each: control (group A), two weeks after irradiation (group B), five weeks after irradiation (group C) and eight weeks after irradiation (group D). Animals were given a 10Gy radiation from a Cobalt-60 natural source in a nuclear technology research center. Protections of the surrounding tissues were obtained through the usage of plumb devices with a hole in the center, which served as a collimator. We obtained irradiated and non-irradiated colons from each animal.

Results: In group B we found an important inflammatory response in the irradiated colon, which appeared in a reduced way in group C and was minimal in group D, in which we found a relevant collagen submucosal deposition/fibrosis. In all groups, the non-irradiated colon had a lower pathological damage in comparison with the irradiated colon.

Conclusion: We thus described an efficient and feasible technique for obtaining an animal model of actinic enteritis.

Key words: Radiotherapy. Radiation. Enteritis. Inflammation. Fibrosis. Rats.

■ Introduction

Radiotherapy still plays a vital role in the management of pelvic malignancies. However, its usage also implies in several injuries in the surrounding organs and this damage accompanies patients throughout their lives. As more patients receive radiotherapy as part of their cancer treatment, and live longer, the incidence of radiotherapy complications continues to increase. Therefore, studies involving radiation and its effects in animals are vast in the literature, mostly trying to determine drugs and means of preventing the damage caused by radiation¹.

Although the radiation technique is standardized in humans, we observed that there is no consensus in the experimental animal technique in diverse studies and variables such as the dose rate, the total dose, the fractioning scheme and the source unit change according to the researcher's experience²⁻⁴. Most of the research available is based on radiation given by teletherapy machines. Those machines are used for the treatment of cancer patients and are usually unavailable (or of difficult access) for research purposes.

In order to try to find other means of studying radiotherapy, we delineated this study, which investigates the feasibility and reproducibility of an animal model of actinic enteritis using a natural source of radiation in a nuclear technology research center (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear) without the use of teletherapy industrialized machines that are used for treating patients with cancer.

■ Methods

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA UFMG Project No. 408/2015).

Sixteen female Wistar rats weighing

around 220-280g and aged 2-3 months were used in this study, obtained from the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). The rats were housed in polycarbonate cages (49×34×16cm), with n= 4/cage, under controlled conditions (temperature, humidity, air flux). Throughout the experimental period, all mice had access to food (Purina Lab Chow, Curitiba, Brazil) and filtered water *ad libitum*.

The rats were randomly distributed into four groups of four animals each: group A (control without irradiation); group B (single dose 10Gy irradiation and euthanized after two weeks); group C (single dose 10Gy irradiation and euthanized after five weeks); group D (single dose 10Gy irradiation and euthanized after eight weeks).

All experimental procedures were performed on anesthetized rats. Anesthesia was maintained with ketamine and xylazine (60mg/Kg and 8mg/Kg i.p.). After properly anesthetized, the rats were set in an acrylic cylindrical compartment (Figure 1). They were transferred into a protected room which has the MDS Nordion Cobalt-60 source in the center. This room has a complex protection mechanism that rises the source from an enclosed cage from under the ground only when it is fully locked and safe. We developed a covering device (15cm-thick plumb bricks with a 32mm round opening in the center to provide a collimator) to protect the rest of the animal's body from the radiation shade (Figure 2). This protective plumb device did not cover the back of the animal, in order to allow radiation to disperse after collimation and prevent it from reflecting and spreading in the surrounding tissues (Figure 3). A TLD dosimetry system was used in the pilot experiment so as to check the proper radiation dose in the irradiated field and it also proved that the dose outside the radiation beam was lower than 1% of the dose inside it. The beam axis was determined using a laser, in order to center and align the collimator to the source (Figure 4). The total radiation

single dose was 10Gy, which was defined after another pilot experiment in which we observed rectal wall necrosis after a 25Gy single dose radiation and no enteropathy after a 5Gy single dose. The animals were set in the device which was placed two meters away from the source. The radiation dose rate was 76.38Gy/h and the animals were irradiated for 7minutes and 51 seconds in order to achieve the 10Gy total dose. In the date of the irradiation, the source had an activity of 1.3×10^{15} Bq.



Figure 1 - Rat inside the acrylic cylindrical compartment.



Figure 2 - Covering device and collimator at a 2m distance from the source.



Figure 3 - Protection plumb device that did not cover the back of the animal.



Figure 4 - Laser used to determine the beam axis.

After irradiating groups B, C and D, the animals were maintained in the experimental surgery animal care facility and received tap water and rat chow *ad libitum* throughout the experiments. At the end of the observation period (according to each group), the animals were submitted to euthanasia by anesthetic overdose (intraperitoneal 200 mg/Kg ketamine + 25 mg/Kg xylazine), the rectum (irradiated colon) and transverse colon (non-irradiated colon) were obtained through laparotomy.

The rectum and transverse colon were fixed in 10% buffered formalin, dehydrated in successive solutions of alcohols and embedded in paraffin. The paraffin blocks were sectioned in a microtome, obtaining 4 μ m sections, which later were stained with hematoxylin/eosin (HE) and stained Gomori Trichrome for histopathological analysis. Slides were examined by the same pathologist under a light microscope (Nikon Eclipse E600), twice, in a blinded manner. Each specimen was graded as follows, according to Northway *et al.*⁵ and Kang *et al.*⁶:

0- Normal or minor alterations which cannot be correlated to radiation with certainty;

- 1- Slight radiation damage (mild inflammation and/or slight crypt change);
- 2- Mild damage (more significant inflammation and/or crypt damage);
- 3- Moderate damage (must have prominent loss of epithelium and/or variable degree of inflammation);
- 4- Severe damage (ulcer, necrosis).

■ Results

There were no deaths after irradiation, neither from anesthesia nor from the radiation effects.

No mucosal damage was noted in the group A (control) – score 0 for all animals. In group B (sacrifice after 2 weeks of irradiation),

the median score for the irradiated colon (rectum) was 3.5 and the median score for the non-irradiated colon (transverse colon) was 2.5 (Figure 5). In group C (sacrifice after 5 weeks of irradiation), we noted a median score for the irradiated colon (rectum) of 1.5 and the median score for the non-irradiated colon (transverse colon) was 1. In group D (sacrifice after 8 weeks of irradiation), the median score for the irradiated colon (rectum) was 1 and the median score for the non-irradiated colon (transverse colon) was 0.5. In the irradiated colon of group D, analyzing the Gomori trichrome slides, we observed intense collagen submucosal deposition in all four animals, which was not observed in the other groups (Figures 6 to 8).

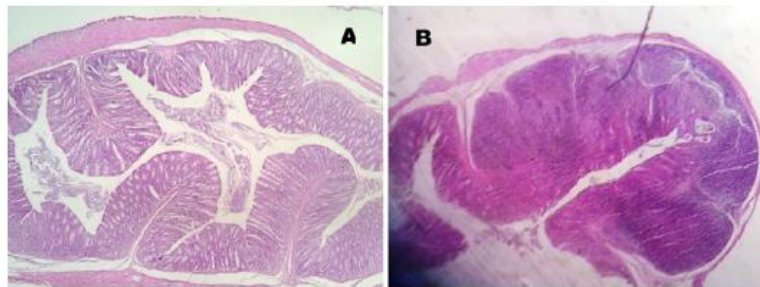


Figure 5 – Colon histology (Group B) – Hematoxylin/eosin. **A**- Non irradiated; **B**- Irradiated (Acute inflammatory phase).

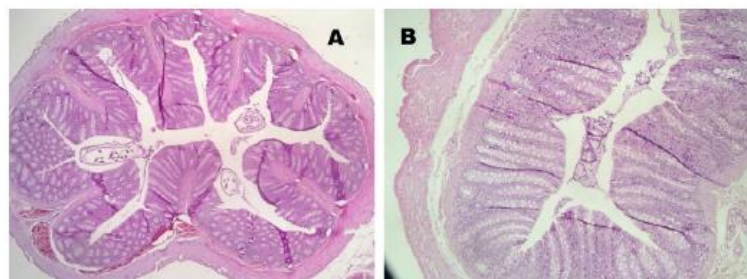


Figure 6 – Colon histology (Group D) – Hematoxylin/eosin. **A**- Non irradiated; **B**- Irradiated (Chronic fibrotic phase).

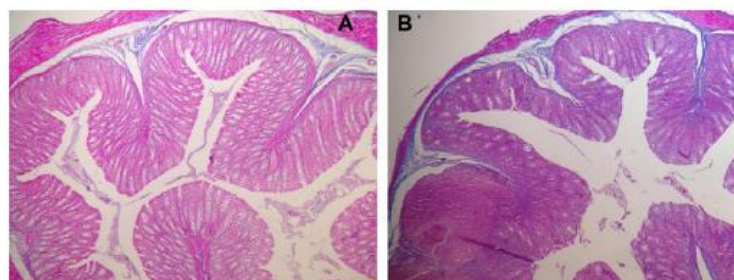


Figure 7 – Colon histology (Group B) – Gomory trichrome. **A**- Non irradiated; **B**- Irradiated.

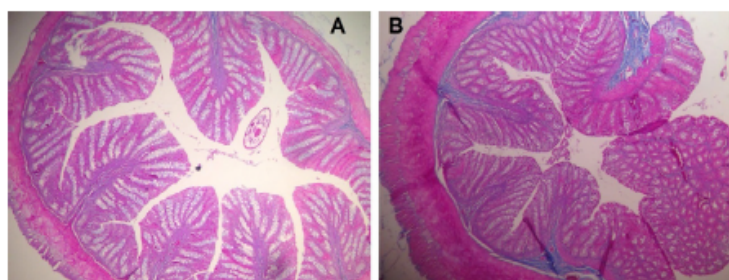


Figure 8 – Colon histology (Group D) – Gomory trichrome. **A**- Non irradiated; **B**- Irradiated.

■ Discussion

The pathological changes noted after applying radiation to the intestine can be divided into acute and chronic changes. The first pathological changes include a loss of lymphocytes in the lamina propria and microscopic damage to mucosal epithelial cells and vascular endothelial cells. These changes manifest as marked submucosal edema and villous blunting and a decrease in crypt regenerative cells. These chronic effects later manifest as progressive fibrosis leading to mucosal atrophy, stricture formation, and thrombosis, causing secondary ischemic damage. Radiation colitis in the chronic phase demonstrates a very significant crypt distortion, vascular telangiectasia, and fibrosis of the lamina propria. Progressive endarteritis appears to be the central mechanism by which the chronic effects occur⁵⁻⁷.

The results in our study are in accordance to the literature, as the acute changes (inflammatory damage) are observed in the irradiated colon of group B as it reached the highest score. In group D, as expected, we found a lower inflammatory score, once the chronic changes are more related to fibrosis (as noted by the submucosal collagen deposition). Group C demonstrated a transition from acute to chronic phase as it displayed intermediate values. The non-irradiated colon of groups B, C and D presented a lower score compared to the rectum of the same groups, which proves that the shield was effective in preventing surrounding tissues damage.

Many drugs are being tested as having

radio-protective effects, such as N-Acetyl-Cysteine, Amifostine, L-carnitine, with encouraging results⁸⁻¹⁰. The development of new effective radiation techniques is essential for the expansion of such research, and we described here an effective way of irradiating the pelvis without compromising machines used for cancer patients' treatment^{11,12}. Further studies are needed in order to validate this method and also try to determine the molecular changes that also occur in this irradiated colon^{13,14}.

■ Conclusion

In order to create new alternatives to investigate the effects of radiation in the organism, we have described a new model of radiation damage in rats without the usage of radiotherapy machines, which proved to be effective and feasible, as the changes found in intestines subjected to radiation exposure in this study were compatible with actinic enteritis.

■ References

1. Hogan NM, Kerin MJ, Joyce MR. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: medical and surgical management strategies. *Curr Probl Surg.* 2013;50(9):395-407. PMID: 23930906.
2. El-Malt M, Ceelen W, Boterberg T, Claeys G, de Hemptinne B, de Neve W, Pattyn P. Does the addition of glutamine to total parenteral nutrition have beneficial effect on the healing of colon anastomosis and bacterial translocation after preoperative

- radiotherapy? *Am J Clin Oncol.* 2003;26(3):e54-9. PMID: 12796616.
3. Bedirli A, Kerem M, Karahacioglu E, Ofluoglu E, Yilmaz TU, Pasaoglu H, Tater OP, Sakrak O, Pak Y. Effects of two conventional preoperative radiation schedules on anastomotic healing in the rat colon. *Eur Surg Res.* 2007;39(3):141-7. PMID: 17337891.
 4. Kerem M, Bedirli A, Karahacioglu E, Pasaoglu H, Sahin O, Bayraktar N, Yilmaz TU, Sakrak O, Goksel F, Oguz M. Effects of soluble fiber on matrix metalloproteinase-2 activity and healing of colon anastomosis in rats given radiotherapy. *Clin Nutr.* 2006;25(4):661-70. PMID: 16677740.
 5. Northway MG, Scobey MW, Geisinger KR. Radiation proctitis in the rat. Sequential changes and effects of anti-inflammatory agents. *Cancer.* 1988;62(9):1962-9. PMID: 3167809.
 6. Kang S, Chun M, Jin YM, Cho MS, Oh YT, Ahn BO, Oh TY. A rat model for radiation-induced proctitis. *J Korean Med Sci.* 2000;15(6):682-9. PMID: 11194195.
 7. Indaram AV, Visvalingam V, Locke M, Bank S. Mucosal cytokine production in radiation-induced proctosigmoiditis compared with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(5):1221-5. PMID: 10811331.
 8. Demir EO, Cakmak GK, Bakkal H, Turkcu UO, Kandemir N, Demir AS, Tascilar O. N-acetylcysteine improves anastomotic wound healing after radiotherapy in rats. *J Invest Surg.* 2011;24(4):151-8. PMID: 21675850.
 9. Ozdemir CS, Burgazli KM, Beken-Ozdemir E, Akdere H, Mericliler M, Ozelik MF. The effect of Amifostine (Ethyol) on intestinal anastomosis in rats with radiation enteritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(10):1351-9. PMID: 23740449.
 10. Caloglu M, Caloglu VY, Yalta T, Yalcin O, Uzal C. The histopathological comparison of L-carnitine with amifostine for protective efficacy on radiation-induced acute small intestinal toxicity. *J Cancer Res Ther.* 2012;8(2):260-5. PMID: 22842372.
 11. Simões Neto J, Reis Neto JA, Matos D. Effects of preoperative irradiation using fractionated electron beam on the healing process of colocolonic anastomosis in rats undergoing early and late surgical intervention. *Acta Cir Bras.* 2013;28(1):72-7. PMID: 23338117.
 12. Franca A, Ramalho FS, Ramalho LN, da Rocha JJ, Féres O. Effects of preoperative pelvic irradiation on colonic anastomosis healing. An experimental study in rats. *Acta Cir Bras.* 2008;23(Suppl 1):24-30. PMID: 18516444.
 13. Karliczek A, Zeebregts CJ, Benaron DA, Coppes RP, Wiggers T, van Dam GM. Preoperative irradiation with 5 x 5 Gy in a murine isolated colon loop model does not cause anastomotic weakening after colon resection. *Int J Colorectal Dis.* 2008;23(11):1115-24. PMID: 18629517.
 14. Kerem M, Bedirli A, Karahacioglu E, Pasaoglu H, Sahin O, Bayraktar N, Yilmaz TU, Sakrak O, Goksel F, Oguz M. Effects of soluble fiber on matrix metalloproteinase-2 activity and healing of colon anastomosis in rats given radiotherapy. *Clin Nutr.* 2006;25(4):661-70. PMID: 16677740.

Correspondence:

Vinícius Rodrigues Taranto Nunes
Faculdade de Medicina, UFMG
Avenida Professor Alfredo Balena, 190
30130-100 Belo Horizonte - MG Brasil
Tel.: (55 31)3409 9641
vivas1912@hotmail.com

Received: Dec 19, 2016

Review: Feb 16, 2017

Accepted: March 20, 2017

Conflict of interest: none

Financial source: CNPq

¹Research performed at Experimental Surgery Laboratory, Department of Surgery, Medical School, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte-MG, Brazil. Part of PhD degree thesis, Postgraduate Program in Surgery and Ophthalmology. Tutor: Ivana Duval-Araujo.

5SEGUNDO ARTIGO

EVALUATION OF MESALAZINE POLYMERIC CONJUGATE IN THE TREATMENT OF ACTINIC PROCTITIS IN RATS

Vinicius Rodrigues Taranto Nunes, Paula Vieira Teixeira Vidigal, Márcio Tadeu Pereira, Luís Carlos Duarte Ladeira, Marcelo Vidigal Caliari, Fabrício Marcus Silva Oliveira, Aina Liz Alves Cesar, André Augusto Gomes Faraco, Rafael Calvão Barbuto, Ivana Duval-Araujo.

Abstract:

Background and objectives: Radiotherapy is essential for the treatment of pelvic tumors; nonetheless it can induce actinic proctitis. One of the options of treatment for such condition is mesalazine. A new formulation of mesalazine linked to chondroitin sulfate was recently published. The present study aimed at testing this drug and its components alone in the treatment of actinic proctitis in rats.

Methods: 47 female Wistar rats were submitted to pelvic radiation and divided into 8 groups: Control A, Mesalazine A, Chondroitin A and Conjugate A: gavage of the according substance 2 weeks after irradiation and sacrifice 3 weeks after oral treatment; Control C, Mesalazine C, Chondroitin C and Conjugate C: sacrifice 6 weeks after oral treatment. The rectum was submitted to histological characterization for each of the findings: inflammatory infiltrate, epithelial degeneration, mucosal necrosis and fibrosis.

Results: The inflammatory infiltrate was more intense in Chondroitin A, Mesalazine A and Conjugate C. The collagen deposition was less intense in Chondroitin A and Mesalazine A; and was more intense in Control C.

Conclusions: Mesalazine and Chondroitin alone were efficacious in inducing a delayed inflammatory response, hence reducing the late fibrosis. The conjugate was able to induce an ever more delayed inflammatory response.

KEYWORDS: Radiotherapy. Actinic Proctitis. Mesalazine. Chondroitin. Inflammation.

Introduction:

Radiotherapy plays a vital role in the management of pelvic malignancies, especially in rectal tumors. However, its usage also implies in several injuries to the surrounding organs and this damage accompanies patients throughout their lives. As more patients receive radiotherapy as part of their cancer treatment, and live longer, the incidence of radiotherapy complications continues to increase¹.

Radiation to the pelvis, when in contact with the rectum and distal sigmoid colon, can induce actinic proctitis, an incurable injury which can lead to severe gastrointestinal toxicity.

The severity of the injury induced depends on the duration of exposure, the period of time from the radiation, the total radiation dose, the fractioned radiation dose, the radiation dose rate and also some individual factors. During radiotherapy treatment and a few weeks later, the intestinal mucosa is the layer which is most damaged, in a phase named acute proctitis². Such phase is characterized microscopically by epithelial ulceration and mucosal and submucosal inflammation³. After a few months or years, all the layers can be damaged, determining chronic proctitis, which is characterized by excessive extracellular matrix deposition, vascular sclerosis, and muscular dystrophy³.

About half the patients submitted to radiotherapy report that their quality of life is affected by gastrointestinal symptoms, which included rectal bleeding, urgency,

constipation, tenesmus, diarrhea and rectal pain⁴. In order to minimize those symptoms and treat actinic proctitis, there are some pharmacological options, such as 5-aminosalicylic acid (5-ASA) – mesalazine -, corticosteroids, sucralfate (oral and enemas), formalin, short-chain fatty acids, among others^{5,6}. This pharmacological arsenal presents in the literature with controversial results, and gold-standard treatment is not yet well defined.

Among the drugs available so far, mesalazine is one of the most studied, mainly due to favorable therapeutic response in inflammatory bowel diseases, such as Crohn's disease or ulcerative colitis. Mesalazine inhibits cyclooxygenases, COX 1 and 2, inhibiting therefore the synthesis of inflammatory prostanoids, and have been proven promising for treating actinic proctitis in some studies⁷. Nonetheless, its inconvenient dosing scheme impairs the adherence to treatment and makes results even more questionable.

The development of a new formulation of mesalazine that increases the release time of drug action was recently published and proven effective *in vitro*⁸. Cesar et al.⁸ reported the development and characterization of the polymeric prodrug obtained through the linkage of chondroitin sulfate with 5-ASA, corresponding to a novel molecule. Chondroitin sulfate is a sulfated glycosaminoglycan that is biodegradable, biocompatible and mucoadhesive⁹. It is approved by the FDA and widely used as a dietary supplement for osteoarthritis, with anti-inflammatory effect¹⁰.

Studies involving radiation and its effects in animal's experimental models are vast in the literature, mostly trying to determine drugs and means of preventing and treating the damage caused by radiation^{11,12,13}. Most of the research available is based on radiation given by teletherapy machines. Our research group previously described a new method for inducing experimental actinic proctitis using a natural source of radiation in a nuclear

technology research center (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear), which proved effective and feasible¹⁴.

In this work, we evaluated the efficacy of this new recently developed drug in the treatment of actinic proctitis in rats, as this is the first in vivo trial to determine its real effect.

Materials and Methods:

Subjects and experimental groups:

Forty-seven female Wistar rats weighing around 220-280g. and aged 2-3 months were used in this study, obtained from the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). The rats were housed in polycarbonate cages (49×34×16cm), with n= 4/cage, under controlled conditions (temperature, humidity, air flux). Throughout the experimental period, all mice had access to food (Purina Lab Chow, Curitiba, Brazil) and filtered water ad libitum. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA UFMG Project No. 139 / 2016).

The animals were divided into two periods of evaluation (A - Acute and C- Chronic) and four experimental groups for each of the period, as follows:

Control A (n=6), subjected to pelvic irradiation at time zero, placebo (saline 0,9% solution) gavage two weeks after irradiation and sacrifice three weeks after oral treatment.

Control C (n=5), subjected to pelvic irradiation at time zero, placebo (saline 0,9% solution) gavage two weeks after irradiation and sacrifice six weeks after oral treatment.

Mesalazine A (n=6), subjected to pelvic irradiation at time zero, mesalazine gavage two weeks after irradiation and sacrifice three weeks after oral treatment.

Mesalazine C (n=6), subjected to pelvic irradiation at time zero, mesalazine gavage two weeks after irradiation and sacrifice six weeks after oral treatment.

Conjugate A (n=6), subjected to pelvic irradiation at time zero, mesalazine polymeric conjugate gavage two weeks after irradiation and sacrifice three weeks after oral treatment.

Conjugate C (n=6), subjected to pelvic irradiation at time zero, mesalazine polymeric conjugate gavage two weeks after irradiation and sacrifice six weeks after oral treatment.

Chondroitin A (n=6), subjected to pelvic irradiation at time zero, chondroitin gavage two weeks after irradiation and sacrifice three weeks after oral treatment.

Chondroitin C (n=6), subjected to pelvic irradiation at time zero, chondroitin gavage two weeks after irradiation and sacrifice six weeks after oral treatment.

Pelvic Irradiation:

All experimental procedures were performed on anesthetized rats. Anesthesia was maintained with ketamine and xylazine (60mg/Kg and 8mg/Kg i.p.). After properly anesthetized, the rats were set in an acrylic cylindrical compartment (Fig.1). They were transferred into a protected room which has a Cobalt-60 source in the center. A covering device (15cm-thick plumb bricks with a 32mm round opening in the center to provide a collimator) was used to protect the rest of the animal's body from the radiation shade (Fig.2). The total radiation single dose was 10Gy. The animals were set in the device which was placed two meters away from the source (Fig.3). The radiation dose rate was 76,38Gy/h and the animals were irradiated for 7minutes and 51 seconds in order to achieve the 10Gy total dose. In the date of the irradiation, the source had an activity of $1,3 \times 10^{15}$ Bq.

Actinic Proctitis Treatment (Gavage):

In order to treat the induced actinic proctitis, four modalities of treatment were proposed: 0,9% saline solution (Groups Control A and C) daily for six consecutive days; mesalazine (Mesalazine A and C) daily for six consecutive days; mesalazine polymeric conjugate (Conjugate A and C) in three doses, every other day; chondroitin (Chondroitin A and C) in three doses, every other day. All substances were diluted for 1ml of the solution and were administered through gavage. The dose of the mesalazine administered was 88mg/Kg/dose. The dose of chondroitin was 1,05g/Kg/dose. The dose of the conjugate was 88mg/Kg/dose.

Necropsy:

At the end of the observation period (five or eight weeks, according to each group), the animals were submitted to euthanasia by anesthetic overdose (intraperitoneal 200 mg/kg ketamine + 25 mg/kg xylazine), and a 2cm-segment of the rectum just above the peritoneal reflection was obtained through laparotomy, and fixed in 10% buffered formalin.

Histological Analysis:

The rectum was fixed in 10% buffered formalin, dehydrated in successive solutions of alcohols and embedded in paraffin. The paraffin blocks were sectioned in a microtome, obtaining 5 µm sections, which later were stained with hematoxylin/eosin (HE) for histopathological analysis. Slides were examined by the same pathologist under a light microscope (Nikon Eclipse E600), twice, in a blinded manner. Each specimen was graded for each of the histological findings: inflammatory infiltrate in the lamina propria, epithelial degeneration, mucosal necrosis and collagen deposition to the lamina propria. For the

inflammatory infiltrate and epithelial degeneration, specimens were graded as (0) absent; (+) mild -mild thickening in the mucosa, mild glandular distortion and less mucosal inflammation with less infiltration of the crypt epithelia by the inflammatory cells-; (++) moderate -moderate inflammatory infiltrate in the lamina propria, moderate glandular distortion with marked crypt abscesses-, (+++) intense -severe mucosal inflammation infiltrating the crypt epithelia leading to cryptitis and severe crypt abscesses, with severe gland distortion; epithelial cells revealing severe reactive/regenerative atypia with nuclear widening, hyperchromasia, irregularity pleomorphism with prominent nucleoli and loss of cytoplasmic mucin-. As for the mucosal necrosis and collagen deposition, specimens were graded as (0) absent and (+) present.

Statistical Analysis:

Statistical analysis was performed using the Chi-Square test, with $p < 0.05$ accepted as statistically significant.

Results:

Five Weeks After Radiotherapy (Groups A):

No significant difference was observed in the epithelial degeneration and mucosal necrosis among groups. The inflammatory infiltrate was more intense in the Chondroitin A group ($p=0,002$) and Mesalazine A group ($p=0,01$) compared to the Control A group, but no difference was observed for the Conjugate A group. However, the collagen deposition was less intense in the Chondroitin A group ($p=0,002$) and Mesalazine A group ($p=0,01$) compared to the Control A group, and no difference was observed for the Conjugate A group (Table 1).

Eight Weeks After Radiotherapy (Groups C):

No significant difference was observed in the epithelial degeneration and mucosal necrosis among groups. The inflammatory infiltrate was more intense in the Conjugate C group compared to the Control C group ($p=0,002$), the Chondroitin C group ($p=0,002$) and the Mesalazine C group ($p=0,01$). The collagen deposition was more intense in the Control C group compared to the Chondroitin C group ($p=0,01$) and Mesalazine C group ($p=0,002$), and no difference was observed for the Conjugate C group (Table 2). When comparing the groups A to the groups C, no significant difference was observed to neither of the groups nor to any of the parameters analysed.

Discussion:

With the development of new modern therapies to cure cancer, more and more patients survive tumors and have to deal with the sequelae caused by the treatment¹⁵. Actinic proctitis is a major aftereffect of radiotherapy and usually impairs quality of life. Currently, patients are not only worried about their cure, but with their quality of life. Therefore, new modalities of radiotherapy (conformational and stereotactic body radiation therapy for instance) are in constant development in order to prevent secondary injuries¹⁶. Also, new therapeutic strategies are being tested so as to treat those injuries when they develop.

In order to test new modalities of treatment, animal models are widely used as they mimic human pathologies with a very reliable similarity¹⁷. We recently developed a new technique for pelvic radiation in rats¹⁴, and this was one of the first experiment in which this

novel approach was used. It proved efficacious as the expected histological parameters were determined in the rats as they would have been in humans with actinic proctitis.

The pathological changes noted after applying radiation to the intestine can be divided into acute and chronic changes. The first pathological changes include inflammatory infiltrate in the lamina propria, microscopic damage to mucosal epithelial cells and vascular endothelial cells. These changes manifest as marked submucosal edema and cryptitis or crypt abscesses, what characterizes acute actinic proctitis. The chronic effects manifest as progressive fibrosis leading to mucosal atrophy, stricture formation and thrombosis, causing secondary ischemic damage. Radiation proctitis in the chronic phase demonstrates a very significant crypt distortion, vascular telangiectasia, and fibrosis of the lamina propria. Progressive endarteritis appears to be the central mechanism by which the chronic actinic proctitis occur^{17,18,19}. We chose to evaluate the inflammatory infiltrate in the lamina propria, epithelial degeneration and mucosal necrosis as parameters of the acute proctitis and collagen deposition to the lamina propria as a parameter of the chronic proctitis as they are easier to evaluate and reproduce, what makes an examiner bias less likely.

Among the therapeutic arsenal for actinic proctitis, mesalazine is the most tested in experiments. Its main use is for inflammatory bowel disease but it is also studied (although with questionable results in literature) for actinic proctitis²⁰ and diverticular disease²¹. The 5-aminosalicylic acid (5-ASA) is a potent inhibitor of the synthesis and release of pro-inflammatory mediators (e.g., nitric oxide, leukotrienes, thromboxanes, and platelet activating factor) and also inhibits the function of several cells implicated in the acute inflammatory and immune response (e.g., natural killer cells, mast cells, neutrophils, mucosal lymphocytes, and macrophages)²². Literature is controversial as to mesalazine's

effect in radiation proctitis, some studies showing a beneficial improvement of symptoms⁷ and others revealing even worsening of the symptoms²³.

The new mesalamine polymeric conjugate for controlled release developed by Cesar *et al*⁸ is a novel promising drug that enables an increased bioavailability, a higher mucoadhesiveness, an easier dosing scheme and a higher treatment adherence. The mucoadhesiveness capacity allows the reduction of the dose required to obtain therapeutic effect²⁴. Consequently, this leads to the reduction of adverse effects, suggesting an increase in treatment adherence²⁵. Chondroitin was used in the linkage with 5-ASA in order to create this novel molecule, a polymeric prodrug. Although chondroitin's spread usage is as an adjuvant for the treatment of osteoarthritis, some studies have proven that it is also efficacious for the treatment of radiation cystitis²⁶. The exact mechanism is still unknown but it is clear that it repairs the defect in the glucosamino-glycane coat in the bladder²⁷.

In the five-week subgroups, which corresponded mostly to acute changes in the rectal wall, the results proven controversial to a careless observer, as the chondroitin and mesalazine groups presented with a higher intensity of inflammation and lower intensity of fibroplasia. No difference was noted in the conjugate group compared to the others. Nonetheless, such effect could be explained and understood as we examined the eight-week subgroups. In this period of observation, which equals mostly to chronic alterations in the rectum, a reverse result was noted in the inflammatory response, as the conjugate group presented with a higher inflammation as compared to the others. That indicates that the chondroitin and mesalazine induced a delayed inflammatory response as compared to the control group and the conjugate probably induced an even more delayed inflammatory peak when administered in this specific posology.

Among the works previously reported, and to the best of our knowledge, there is no report in the literature of a study using chondroitin in the treatment of actinic proctitis. As it is efficacious in the treatment of actinic cystitis²⁸, it may also be of value in the treatment of actinic proctitis, because it had the same response as mesalazine in all the parameters studied. Further studies are needed in the specific purpose of evaluating the effect of chondroitin in the treatment of actinic proctitis, along with the real mechanism related to this process.

Valid data particularly on the treatment of chronic radiation proctitis are lacking²⁹. Nonetheless, in our study mesalazine was effective (when administered in this specific posology) in the treatment of both acute and chronic proctitis. It retarded the inflammatory process (inducing a late inflammation peak when compared to control group) and reduced the fibrosis related to radiotherapy. Such benefit of 5-ASA was also proven by Linard *et al*³⁰ as they concluded that mesalazine prevented irradiation-induced inflammatory processes as well as the expression of many pro-inflammatory cytokines. Further studies evaluating the molecular events and cytokines expression when mesalazine is used for the treatment of actinic proctitis are needed.

In the eight-week subgroups, mostly related to chronic changes in the rectum, the chondroitin and mesalazine groups presented with a lower intensity of fibroplasia, what is also in accordance with the previous results in which a later reduction in fibroplasia is the desired final effect in the treatment of actinic proctitis.

The conjugate group was significantly different from others only in the inflammation parameter after eight-weeks of irradiation. It presented with higher intensity of inflammation in this period of evaluation, which determined that the conjugate in the dose used for this study could delay the inflammatory process even further than mesalazine

alone. No difference was found in the acute evaluation because at this period, the conjugate was able to restrain the inflammatory peak and also the fibrosis. In the chronic phase, the conjugate group could no longer restrain the inflammatory peak due to suspension of the drug and long-term effect of irradiation, so the peak was induced at this period. No difference was observed in terms of fibrosis after eight weeks of irradiation because the period of time of observation was probably not enough to observe this peak or because it really induced an overall reduction in fibroplasia. Further studies with longer periods of observation are needed to elucidate the real effect of the conjugate in long-term fibrosis of the rectal wall. Additional works with longer periods of treatment (longer than six-day gavage) are also needed to clarify if the conjugate could not only retard but also avoid an inflammatory peak when administered chronically and continuously.

This study has some limitations, as a consequence of being the first of a new developing line of research of our laboratory team. The experimental design of our study was in order to investigate a specific dose of some drugs into a specific period of observation. As we obtained the results discussed earlier, we thought that additional drugs posology, period of treatment and period of observation could be used. Some doubts that remained after the study will be cleared as we propose further studies in the subject. Moreover, we used a semi-quantitative analysis, what can be equivocal sometimes. And we did not try to identify the molecular pathways in which the drugs obtained the results revealed. In further tests, we will also try to identify molecular changes and cytokine pattern during each of the periods of examination. Although we did select a blinded evaluation by the pathologist, we could not rule out evaluator bias in the study. Nonetheless, the study brings many new possibilities of treatment and research, not only for the aimed drug

(conjugate), but also additional results concerning mesalazine and a new open field for researching chondroitin in the treatment of actinic proctitis.

Conclusions:

The present study demonstrated that mesalazine is efficacious in inducing a delayed inflammatory response, hence reducing the late fibrosis in the treatment of actinic proctitis in rats, using a new experimental model described previously. Moreover, it revealed that chondroitin alone had the same result for mesalazine, what is an original unexpected finding. Also, it proved that mesalazine polymeric conjugate was able to induce an ever more delayed inflammatory response, but during the period of study the conjugate did not differ from any of the other drugs in terms of fibroplasia.

References:

- 1 - Hogan NM, Kerin MJ, Joyce MR. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: medical and surgical management strategies. *Curr Probl Surg* 2013; 50(9):395-407.
- 2 – Ong ZY, Gibson RJ, Bowen JM, et al. Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Radiat Oncol* 2010;5:22.
- 3- Torres S, Thim L, Milliat F, et al. Glucagon-like peptide-2 improves both acute and late experimental radiation enteritis in the rat. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;69(5):1563-71.
- 4- Frazzoni L, La Marca M, Guido A, et al. Pelvic radiation disease: Updates on treatment options. *World J ClinOncol* 2015;6(6):272-80.

- 5- Hong JJ, Park W, Ehrenpreis ED. Review article: current therapeutic options for radiation proctopathy. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15(9):1253-62.
- 6- Odabasi M, Gokdemir S, Muftuoglu T, et al. Prophylactic and therapeutic effects of oral budesonide for acute radiation-induced enteritis and colitis in rats. *Int J ClinExp Med* 2014;7(4):940-6.
- 7- Seo EH, Kim TO, Kim TG, et al. The efficacy of the combination therapy with oral and topical mesalazine for patients with the first episode of radiation proctitis. *Dig Dis Sci* 2011;56(9):2672-7.
- 8- Cesar ALA, Abrantes FA, Farah L, et al. New mesalamine polymeric conjugate for controlled release: Preparation, characterization and biodistribution study. *Eur J Pharm Sci* 2018; 111(1): 57-64.
- 9- Li Y, Maciel D, Rodrigues J, et al. Biodegradable polymer nanogels for drug/nucleic acid delivery. *Chem Rev* 2015; 115 (16): 8564–8608.
- 10- Henrotin Y, Mathy M, Sanchez C, Lambert C. Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: from in vitro studies to clinical recommendations. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2010; 2 (6): 335–348.
- 11- El-Malt M, Ceelen W, Boterberg T, et al. Does the addition of glutamine to total parenteral nutrition have beneficial effect on the healing of colon anastomosis and bacterial translocation after preoperative radiotherapy? *Am J Clin Oncol* 2003; 26(3):e54-9. PMID: 12796616.

- 12 - Bedirli A, Kerem M, Karahacioglu E, et al. Effects of two conventional preoperative radiation schedules on anastomotic healing in the rat colon. *Eur Surg Res* 2007; 39(3): 141-7. PMID: 17337891.
- 13- Kerem M, Bedirli A, Karahacioglu E, et al. Effects of soluble fiber on matrix metalloproteinase-2 activity and healing of colon anastomosis in rats given radiotherapy. *Clin Nutr* 2006; 25(4): 661-70. PMID: 16677740.
- 14 – Nunes VRT, Vidigal PVT, Pereira MT, et al. Development of a new model of actinic enteritis in rats using a cobalt-60 open source and a protection device as a collimator. *Acta Cir Bras* 2017;32(4):319-324.
- 15 – Pinillos L, Pinto JA, Sarria G. History of the development of radiotherapy in Latin America. *Ecancermedicalscience* 2017;11:784.
- 16 - Huertas A, Marchal F, Peiffert D, Créhange G. Radiothérapie préopératoire des cancers du rectum : volumes cibles. *Cancer Radiother* 2013; 17(5-6): 477-85.
- 17- Kan S, Chun M, Jin YM, et al. A rat model for radiation-induced proctitis. *J Korean Med Sci* 2000;15(6):682-9.
- 18 - Indaram AV, Visvalingam V, Locke M, Bank S. Mucosal cytokine production in radiation-induced proctosigmoiditis compared with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95(5): 1221-5.
- 19 - Northway MG, Scobey MW, Geisinger KR. Radiation proctitis in the rat. Sequential changes and effects of anti-inflammatory agents. *Cancer* 1988; 62(9): 1962-9.

20- Fuccio L, Frazzoni L, Guido A. Prevention of pelvic radiation disease. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2015;6(1):1-9.

21 - Carter F, Alsayb M, Marshall JK, Yuan Y. Mesalamine (5-ASA) for the prevention of recurrent diverticulitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;10: CD009839.

22- Prakash A, Spencer CM. Balsalazide. *Drugs* 1998; 56: 83-89.

23- Baughan CA, Canney PA, Buchanan RB, Pickering RM. A randomized trial to assess the efficacy of 5-aminosalicylic acid for the prevention of radiation enteritis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1993; 5: 19-24.

24- Varum FJ, McConnell EL, Sousa JJ, et al. Mucoadhesion and the gastrointestinal tract. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2008; 25(3): 207–258.

25- Xu M, Sun M, Qiao H, et al. Preparation and evaluation of colon adhesive pellets of 5-aminosalicylic acid. *Int J Pharm* 2014; 468 (1–2): 165–171.

26 - Tornero JI, Olarte H, Escudero F, Gómez G. Experiencia a largo plazo con condroitín sulfato sódico em pacientes con síndrome de vejiga dolorosa. *Actas Urol Esp* 2013;37(8):523-6.

27 - Hazewinkel MH, Stalpers LJ, Dijkgraaf MG, Roovers JP. Prophylactic vesical instillations with 0.2% chondroitin sulfate may reduce symptoms of acute radiation cystitis in patients undergoing radiotherapy for gynecological malignancies. *Int Urogynecol J* 2011;22(6):725-30.

28 - Gacci M, Saleh O, Giannesi C, et al. Bladder Instillation Therapy With Hyaluronic Acid and Chondroitin Sulfate Improves Symptoms of Postradiation Cystitis: Prospective Pilot Study. *Clin Genitourin Cancer* 2016;14(5):444-449.

29- Zimmerer T, Böcker U, Wenz F, Singer MV. Medical prevention and treatment of acute and chronic radiation induced enteritis--is there any proven therapy? a short review. *Z Gastroenterol* 2008;46(5):441-8.

30- Linard C, Grémy O, Benderitter M. Reduction of peroxisome proliferation-activated receptor gamma expression by gamma-irradiation as a mechanism contributing to inflammatory response in rat colon: modulation by the 5-aminosalicylic acid agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324(3):911-20.

Figures:

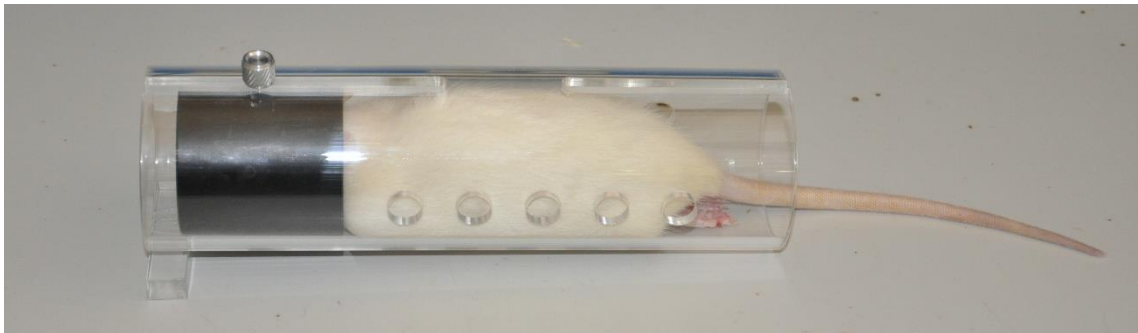


Figure 1 - Rat anesthetized placed in the acrylic cylindrical compartment.



Figure 2 - Protection plumb device and collimator around the source.



Figure 3 - Rat protected with a covering device at a 2m distance from the source.

Tables:

Table 1: Histological Parameters Five Weeks After Radiotherapy (Groups A):

	<i>Inflammation</i>		<i>Degeneration</i>		<i>Necrosis</i>		<i>Fibroplasia</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%
CONTROL A (n=6)	0	0 ^{a,b}	1	17	1	17	6	100 ^{c,d}
CHONDROITIN A (n=6)	6	100 ^a	5	83	4	67	0	0 ^c
MESALAZINE A (n=6)	5	83 ^b	4	67	4	67	1	17 ^d
CONJUGATE A (n=6)	2	33	2	33	2	33	3	50

^a: p=0,002

^b:p=0,01

^c: p=0,002

^d: p=0,01

Table 2: Histological Parameters Eight Weeks After Radiotherapy (Groups C):

	<i>Inflammation</i>		<i>Degeneration</i>		<i>Necrosis</i>		<i>Fibroplasia</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%
CONTROL C (n=5)	0	0 ^a	2	40	2	40	5	100 ^{d,e}
CHONDROITIN C (n=6)	3	50 ^b	5	83	4	67	1	17 ^d
MESALAZINE C(n=6)	1	17 ^c	4	67	3	50	0	0 ^e
CONJUGATE C (n=6)	6	100 ^{a,b,c}	5	83	5	83	3	50

^a: p=0,002

^b:p=0,002

^c: p=0,01

^d: p=0,01

^e: p=0,002

6 DISCUSSÃO:

O primeiro artigo foi publicado na revista *Acta Cirurgica Brasileira* em 2017, como resultado do desenvolvimento da metodologia deste estudo. Vários estudos pilotos foram realizados, utilizando-se dosímetros para se conseguir comprovar que a irradiação não atingia o restante do corpo do animal, evitando danos secundários sistêmicos (como na medula óssea, por exemplo) que poderiam se tornar um viés para avaliação futura. Estudos pilotos também foram realizados buscando determinar a melhor dose de radiação a ser fornecida à pelve, de forma a criar um modelo fidedigno de retite actínica. A dose de radiação necessária para gerar o dano tecidual, caracterizado como retite actínica, é diferente em ratos e seres humanos, e poderia ser diferente com o uso desta nova tecnologia. A taxa de dose (dose administrada em decorrência de um período de tempo) também é fundamental para se criar esse modelo²⁸, pois baixas taxas de dose possibilitariam o clareamento da radiação e, com isso, não gerariam o efeito desejado.

Na literatura, encontrou-se estudos utilizando várias doses totais de radiação, bem como diversas doses fracionadas para indução da retite actínica em ratos^{18,32,33}. Muitos desses estudos foram realizados com uma dose de 25Gys, fracionada em cinco dias consecutivos^{18,19,34}. Outros estudos utilizaram a dose de 17,5Gys em única dose como protocolo de irradiação^{28,29}. Caloglu et al. determinaram a dose única de 20Gys em seu protocolo de estudo³⁵, enquanto Demir et al. optaram por utilizar uma dose única de 10Gys³⁶. No presente estudo, optou-se por utilizar a dose única de 10Gys, pois, em uma avaliação preliminar de animais submetidos à menor dose de irradiação (5Gys), observou-se mínimas alterações na mucosa e com doses mais elevadas (25Gys) observou-se necrose da parede total do reto, o que inviabilizaria o estudo de qualquer forma de tratamento.

A análise dos segmentos de intestino nesse artigo inicial mostrou que o método foi eficaz em induzir o processo inflamatório inicialmente (na segunda semana após a irradiação e, em menor intensidade, nas quinta e oitava semanas) e induzir a fibrose na oitava semana, caracterizando a retite actínica e possibilitando o uso deste modelo para estudos tanto da fase aguda como da fase crônica da retite. Além disso, notou-se que segmentos intestinais não irradiados apresentavam alterações histológicas mais sutis, determinando a eficácia do colimador em focalizar o feixe de raios gama. Importante notar que nenhuma alteração

macroscópica do reto irradiado foi observada em nenhuma das doses de irradiação estudadas e em nenhum dos períodos de tempo avaliados.

A partir deste primeiro artigo, pôde-se estabelecer o protocolo e a metodologia de irradiação, de forma a permitir o prosseguimento do estudo. No segundo artigo, avaliou-se a mesalazina incorporada a polímero biodegradável no tratamento da retite actínica em ratos, por meio de análise histológica, utilizando os períodos de observação de cinco semanas (fase aguda) e oito semanas (fase crônica) da irradiação, conforme resultados obtidos na avaliação prévia³⁰.

Os parâmetros avaliados no estudo foram adaptados de Sezer et al.³ e graduados em 0, +, ++ e +++. Decidiu-se incluir as principais características do processo agudo observadas a partir de uma análise preliminar do material histológico (infiltrado inflamatório na lâmina própria, erosão do epitélio de revestimento, necrose da mucosa), além do principal achado do processo crônico (deposição de colágeno na lâmina própria).

O resultado encontrado na análise dos grupos de cinco semanas após a irradiação foi aparentemente controverso, uma vez que a condroitina e a mesalazina apresentaram uma maior intensidade de processo inflamatório e uma menor intensidade de fibrose. No entanto, tal resultado pode ser explicado e compreendido ao se examinar os grupos de oito semanas após a irradiação. Neste subgrupo, que corresponde predominantemente a alterações crônicas do processo, observou-se, em termos de resposta inflamatória, um resultado inverso, no qual a mesalazina e a condroitina apresentaram uma menor intensidade de inflamação. Isso indica que, na verdade, essas drogas utilizadas isoladamente induziram um pico inflamatório mais tardio quando comparado ao grupo controle. Tal fato pode ser corroborado pelo fato de a fibroplasia ter sido menos intensa após oito semanas de irradiação nos grupos mesalazina e condroitina. Sabe-se que o processo inflamatório agudo inicial é o que desencadeia a fibrose tardia, logo a redução da fibrose é o efeito desejado final do tratamento, o que comprova a eficácia de ambas as drogas. Já o conjugado apresentou um processo inflamatório mais intenso com oito semanas, o que indica que ele provavelmente induziu um pico inflamatório ainda mais tardio quando administrado nesta posologia específica deste estudo. O fato de não ter havido diferença significativa em relação ao conjugado no tempo de estudo de cinco semanas indica que até este período o conjugado conseguiu restringir o pico inflamatório e a fibrose. Com oito semanas, ele induziu

à inflamação ainda mais tardia (devido à suspensão do uso da droga e aos efeitos em longo prazo e cumulativos da radiação) e, provavelmente, a fibrose estaria presente em um período mais prolongado de estudo.

A mesalazina é uma das drogas mais testadas no tratamento da retite actínica. Seu principal uso é nas Doenças Inflamatórias Intestinais, mas há também estudos com resultados ainda controversos avaliando sua eficácia no tratamento da retite actínica³⁷ e da doença diverticular³⁸. É um potente inibidor da síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios (por exemplo, óxido nítrico, leucotrienos, tromboxanos e fator ativador plaquetário) e também inibe a função de diversas células implicadas na inflamação e na resposta imune (linfócitos natural killers, mastócitos, neutrófilos, macrófagos)³⁹. Apesar de a literatura ser controversa a respeito do benefício da mesalazina na retite actínica⁴⁰, com alguns estudos mostrando a melhora de sintomas²⁰ e outros mostrando até mesmo a piora da sintomatologia⁴¹, neste estudo o fármaco foi eficaz ao retardar o processo inflamatório e reduzir a fibrose no período estudado.

O conjugado polimérico de mesalazina recentemente publicado por Cesar et al.²⁴ é um medicamento promissor que permite maior biodisponibilidade, maior mucoadesividade, esquema posológico mais simples, com conseqüente maior adesão ao tratamento. A capacidade mucoadesiva permite uma redução na dose necessária para se obter o efeito terapêutico⁴². Conseqüentemente, há uma redução dos efeitos adversos e maior adesão ao tratamento⁴³.

O sulfato de condroitina foi conjugado ao 5-ASA, formando esse novo fármaco. Apesar do uso da condroitina ser amplamente empregado no tratamento da osteoartite, alguns estudos provaram que ela também é eficaz no tratamento da cistite actínica⁴⁴. O mecanismo exato pelo qual ocorre seu efeito ainda é desconhecido, mas sabe-se que a condroitina corrige a falha na cobertura de glicosaminoglicano da mucosa vesical⁴⁵. Por ser eficaz no tratamento da cistite actínica⁴⁶, a condroitina também pode ter seu valor no tratamento da retite actínica, uma vez que os resultados obtidos foram os mesmos que os da mesalazina em todos os parâmetros estudados. Não se encontrou na literatura estudos utilizando a condroitina no tratamento da retite actínica, portanto trata-se de um achado que pode vir a ser útil em estudos futuros.

7 CONCLUSÕES

1-O presente estudo possibilitou uma nova alternativa para se estudar a retite actínica experimental, ao descrever uma nova metodologia, que se provou eficaz, segura e reprodutível, de irradiação sem o uso de máquinas de radioterapia.

2- Com esse novo método, demonstrou-se que a mesalazina isolada foi eficaz ao induzir uma resposta inflamatória retardada, reduzindo, assim, a fibrose tardiana tratamento da retite actínica experimental em ratos. Além disso, provou-se que a condroitina isolada obteve os mesmos resultados que a mesalazina, sendo este um achado original inesperado. Por fim, comprovou-se que o conjugado de mesalazina polimérico foi capaz de induzir uma resposta inflamatória ainda mais retardada, porém, durante o período de estudo, não houve diferença em termos de fibroplasia.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo possibilitou ampliar um novo horizonte de investigação em relação a novos usos deste método alternativo de se induzir a retite actínica experimental, o que possibilitaria novas pesquisas buscando se definir alternativas terapêuticas tanto na prevenção quanto no tratamento dessa doença.

Além disso, o uso da mesalazina se mostrou promissor no tratamento da retite actínica, no entanto ainda há poucos estudos para se determinar seu real papel. Portanto, mais estudos são necessários, tanto em modelos animais quanto em humanos para corroborar ou refutar os resultados desta tese.

A condroitina se mostrou também como uma nova droga promissora, tendo sido este o primeiro estudo de nosso conhecimento que testou tal medicamento na retite actínica. Os resultados favoráveis são animadores para se ampliar o estudo desta droga na retite actínica, de forma a determinar a sua real eficácia e o mecanismo de ação.

Por fim, a mesalazina conjugada à condroitina, objeto principal deste estudo, apresentou resultados também favoráveis. No entanto, este foi um estudo inicial, no qual se optou por estudar a droga em uma dose, posologia e via de administração específicas, com intervalos de estudo já predeterminados. Diante dos resultados obtidos, gera-se um precedente para se estudar a droga em novas posologias (uso da droga mais precoce após a irradiação, uso mais prolongado e continuado da droga, por exemplo), novas doses de administração, novas vias de administração (enemas ou supositórios) e novos períodos de avaliação (mais tardiamente que oito semanas e mais precocemente que cinco semanas). A possibilidade de uso de tal medicamento na prevenção da retite, se utilizada previamente ou concomitantemente à irradiação, também pode ser realizada em estudos futuros. Por fim, necessita-se traçar o perfil farmacocinético desse medicamento e se avaliar o que ocorre em nível molecular (avaliação de citocinas por imunohistoquímica, por exemplo) no intestino irradiado após o uso da medicação.

REFERÊNCIAS

- 1- Huertas A, Marchal F, Peiffert D, Créhange G. Radiothérapie préopératoire des cancers du rectum : volumes cibles. *Cancer/Radiothérapie*. 2013; 17: 477–485.
- 2- Smith CA, Kachnic LA. Evolving Role of Radiotherapy in the Management of Rectal Carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2017; 26:455–466.
- 3- Sezer A, Usta U, Kocak Z, Yagci MA. The effect of a flavonoid fractions diosmin + hesperidin on radiation-induced acute proctitis in a rat model. *J Cancer Res Ther*. 2011;7(2):152-6.
- 4- Hogan NM, Kerin MJ, Joyce MR. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: medical and surgical management strategies. *Curr Probl Surg*. 2013; 50(9):395-407.
- 5- Weiner JP, Wong AT, Schwartz D, Martinez M, Aytaman A, Schreiber D. Endoscopic and non-endoscopic approaches for the management of radiation-induced rectal bleeding. *World J Gastroenterol*. 2016;22(31): 6972-86.
- 6- Reis, E. D.; Vine, A. J.; Heimann, T. Radiation damage to the rectum and anus: pathophysiology, clinical features and surgical implications. *Colorectal Dis*. 2002;4(1):2-12.
- 7- Ong ZY, Gibson RJ, Bowen JM, Stringer AM, Darby JM, Logan RM, Yeoh AS, Keefe DM. Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Radiat Oncol*. 2010;5:22.
- 8- Torres S, Thim L, Milliat F, Vozenin-Brotans MC, Olsen UB, Ahnfelt-Ronne I, Bourhis J, Benderitter M, François A. Glucagon-like peptide-2 improves both acute and late experimental radiation enteritis in the rat. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;69(5):1563-71.
- 9- Indaram AVK, Visvalingam V, Locke M, Bank S. Mucosal Cytokine Production in Radiation-Induced Proctosigmoiditis Compared With Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:1221–1225.
- 10- Linard C, Ropenga A, Vozenin-Brotans MC, Chapel A, Mathe D. Abdominal irradiation increases inflammatory cytokine expression and activates NF- κ B in rat ileal muscularis layer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003; 285: G556–G565.
- 11- Frazzoni L, La Marca M, Guido A, Morganti AG, Bazzoli F, Fuccio L. Pelvic radiation disease: Updates on treatment options. *World J ClinOncol*. 2015;6(6):272-80.
- 12- Hong JJ, Park W, Ehrenpreis ED. Review article: current therapeutic options for radiation proctopathy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001;15(9):1253-62.

- 13- Odabasi M, Gokdemir S, Muftuoglu T, Aktekin A, Saglam A, Aker F. Prophylactic and therapeutic effects of oral budesonide for acute radiation-induced enteritis and colitis in rats. *Int J ClinExp Med*. 2014;7(4):940-6.
- 14- Glover M, Smerdon GR, Andreyev HJ, Benton BE, Bothma P, Firth O, Gothard L, Harrison J, Ignatescu M, Laden G, Martin S, Maynard L, McCann D, Penny CE, Phillips S, Sharp G, Yarnold J. Hyperbaric oxygen for patients with chronic bowel dysfunction after pelvic radiotherapy (HOT2): a randomised, double-blind, sham-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016; 17: 224-233.
- 15- Jao SW, Beart RW, Gunderson LL. Surgical treatment of radiation injuries of the colon and rectum. *Am J Surg*. 1986; 151: 272-277.
- 16- Pricolo VE, Shellito PC. Surgery for radiation injury to the large intestine. Variables influencing outcome. *Dis Colon Rectum*. 1994; 37: 675-684.
- 17- El-Malt M, Ceelen W, Boterberg T, Claeys G, de Hemptinne B, de Neve W, Pattyn P. Does the addition of glutamine to total parenteral nutrition have beneficial effect on the healing of colon anastomosis and bacterial translocation after preoperative radiotherapy? *Am J Clin Oncol*. 2003; 26(3):e54-9.
- 18- Bedirli A, Kerem M, Karahacioglu E, Ofluoglu E, Yilmaz TU, Pasaoglu H, Tater OP, Sakrak O, Pak Y. Effects of two conventional preoperative radiation schedules on anastomotic healing in the rat colon. *Eur Surg Res*. 2007; 39(3): 141-7.
- 19- Kerem M, Bedirli A, Karahacioglu E, Pasaoglu H, Sahin O, Bayraktar N, Yilmaz TU, Sakrak O, Goksel F, Oguz M. Effects of soluble fiber on matrix metalloproteinase-2 activity and healing of colon anastomosis in rats given radiotherapy. *Clin Nutr*. 2006; 25(4): 661-70.
- 20- Seo EH, Kim TO, Kim TG, Joo HR, Park J, Park SH, Yang SY, Moon YS, Park MJ, Ryu DY, Song GA. The efficacy of the combination therapy with oral and topical mesalazine for patients with the first episode of radiation proctitis. *Dig Dis Sci*. 2011;56(9):2672-7.
- 21- Laterza L, Cecinato P, Guido A, Mussetto A, Fuccio L. Management of Radiation-Induced Rectal Bleeding. *Curr Gastroenterol Rep*. 2013; 15:355-361.
- 22- Andreyev HJ, Davidson SE, Gillespie C, Allum WH, Swarbrick E. Practice guidance on the management of acute and chronic gastrointestinal problems arising as a result of treatment for cancer. *Gut*. 2012; 61: 179-192.
- 23- Henson CC, Andreyev HJ, Symonds RP, Peel D, Swindell R, Davidson SE. Late-onset bowel dysfunction after pelvic radiotherapy: a national survey of current practice and opinions of clinical oncologists. *Clin Oncol*. 2011; 23: 552-557.

- 24- Cesar ALA, Abrantes FA, Farah L, Castilho RO, Cardoso V, Fernandes SO, Araújo ID, Faraco AGA. New mesalamine polymeric conjugate for controlled release: Preparation, characterization and biodistribution study. *Eur J Pharm Sci.* 2018; 111(1): 57-64.
- 25- Li, Y., Maciel, D., Rodrigues, J., Shi, X., Tomás, H. Biodegradable polymer nanogels for drug/nucleic acid delivery. *Chem Rev.* 2015; 115 (16): 8564–8608.
- 26- Henrotin, Y., Mathy, M., Sanchez, C., Lambert, C. Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: from in vitro studies to clinical recommendations. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2010; 2 (6): 335–348.
- 27- Northway MG, Scobey MW, Geisinger KR. Radiation proctitis in the rat. Sequential changes and effects of anti-inflammatory agents. *Cancer.* 1988;62(9):1962-9.
- 28- Kan S, Chun M, Jin YM, Cho MS, Oh YT, Ahn BO, Oh TY. A rat model for radiation-induced proctitis. *J Korean Med Sci.* 2000;15(6):682-9.
- 29- Korkut C, Asoglu O, Aksoy M, Kapran Y, Bilge H, Kiremit-Korkut N, Parlak M. Histopathological comparison of topical therapy modalities for acute radiation proctitis in an experimental rat model. *World J Gastroenterol.* 2006;12(30):4879-83.
- 30- Nunes VRT, Vidigal PVT, Pereira MT, Ladeira LCD, Barbuto RC, Duval-Araujo I. Development of a new model of actinic enteritis in rats using a cobalt-60 open source and a protection device as a collimator. *Acta Cir Bras.* 2017;32(4):319-324.
- 31- Ozdemir CS, Burgazli KM, Beken-Ozdemir E, Akdere H, Mericliler M, Ozcelik MF. The effect of Amifostine (Ethyol) on intestinal anastomosis in rats with radiation enteritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(10):1351-9.
- 32- Simões Neto J, Reis Neto JA, Matos D. Effects of preoperative irradiation using fractionated electron beam on the healing process of colocolonic anastomosis in rats undergoing early and late surgical intervention. *Acta Cir Bras.* 2013;28(1):72-7.
- 33- Franca A, Ramalho FS, Ramalho LN, da Rocha JJ, Féres O. Effects of preoperative pelvic irradiation on colonic anastomosis healing. An experimental study in rats. *Acta Cir Bras.* 2008;23(Suppl 1):24-30.
- 34- Karliczek A, Zeebregts CJ, Benaron DA, Coppes RP, Wiggers T, van Dam GM. Preoperative irradiation with 5x5 Gy in a murine isolated colon loop model does not cause anastomotic weakening after colon resection. *Int J Colorectal Dis.* 2008; 23:1115–1124.
- 35- Caloglu M, Caloglu VY, Yalta T, Yalcin O, Uzal C. The histopathological comparison of L-carnitine with amifostine for protective efficacy on radiation-induced acute small intestinal toxicity. *J Cancer Res Ther.* 2012;8(2):260-5.

- 36- Demir EO, Cakmak GK, Bakkal H, Turkcu UO, Kandemir N, Demir AS, Tascilar O. N-acetylcysteine improves anastomotic wound healing after radiotherapy in rats. *J Invest Surg.* 2011;24(4):151-8.
- 37- Fuccio L, Frazzoni L, Guido A. Prevention of pelvic radiation disease. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2015;6(1):1-9.
- 38- Carter F, Alsayb M, Marshall JK, Yuan Y. Mesalamine (5-ASA) for the prevention of recurrent diverticulitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;10: CD009839.
- 39- Prakash A, Spencer CM. Balsalazide. *Drugs.* 1998; 56: 83-89.
- 40- Zimmerer T, Böcker U, Wenz F, Singer MV. Medical prevention and treatment of acute and chronic radiation induced enteritis--is there any proven therapy? a short review. *Z Gastroenterol.* 2008;46(5):441-8.
- 41- Baughan CA, Canney PA, Buchanan RB, Pickering RM. A randomized trial to assess the efficacy of 5-aminosalicylic acid for the prevention of radiation enteritis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1993; 5: 19-24.
- 42- Varum FJ, McConnell EL, Sousa JJ, et al. Mucoadhesion and the gastrointestinal tract. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2008; 25(3): 207–258.
- 43- Xu, M., Sun, M., Qiao, H., Ping, Q., Elamin, E.S. Preparation and evaluation of colon adhesive pellets of 5-aminosalicylic acid. *Int. J. Pharm.* 2014; 468 (1–2): 165–171.
- 44- Tornero JI, Olarte H, Escudero F, Gómez G. Experiencia a largo plazo con condroitín sulfato sódico em pacientes con síndrome de vejiga dolorosa. *Actas Urol Esp.* 2013;37(8):523-6
- 45- Hazewinkel MH, Stalpers LJ, Dijkgraaf MG, Roovers JP. Prophylactic vesical instillations with 0.2% chondroitin sulfate may reduce symptoms of acute radiation cystitis in patients undergoing radiotherapy for gynecological malignancies. *Int Urogynecol J.* 2011;22(6):725-30.
- 46- Gacci M, Saleh O, Giannessi C, Chini T, Della Camera PA, Detti B, Livi L, Finazzi Agro E, Li Marzi V, Minervini A, Carini M, Oelke M, Gravas S, Serni S. Bladder Instillation Therapy With Hyaluronic Acid and Chondroitin Sulfate Improves Symptoms of Postradiation Cystitis: Prospective Pilot Study. *Clin Genitourin Cancer.* 2016;14(5):444-449.

APÊNDICE A - TABELAS DE HISTOLOGIA

Tabela 1 – Parâmetros histológicos cinco semanas após irradiação:

GRUPOS	<i>Inflamação</i>		<i>Degeneração</i>		<i>Necrose</i>		<i>Fibroplasia</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%
CONTROLE (n=6)	0	0 ^{a,b}	1	17	1	17	6	100 ^{c,d}
CONDROITINA(n=6)	6	100 ^a	5	83	4	67	0	0 ^c
MESALAZINA(n=6)	5	83 ^b	4	67	4	67	1	17 ^d
CONJUGADO(n=6)	2	33	2	33	2	33	3	50

^a: p=0,002

^b:p=0,01

^c: p=0,002

^d: p=0,01

Tabela 2 – Parâmetros histológicos oito semanas após irradiação:

GRUPOS	<i>Inflamação</i>		<i>Degeneração</i>		<i>Necrose</i>		<i>Fibroplasia</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%
CONTROLE(n=5)	0	0 ^a	2	40	2	40	5	100 ^{d,e}
CONDROITINA(n=6)	3	50 ^b	5	83	4	67	1	17 ^d
MESALAZINA(n=6)	1	17 ^c	4	67	3	50	0	0 ^e
CONJUGADO(n=6)	6	100 ^{a,b,c}	5	83	5	83	3	50

^a: p=0,002

^b:p=0,002

^c: p=0,01

^d: p=0,01

^e: p=0,002

APÊNDICE B—PLANILHA DE HISTOLOGIA POR ANIMAL

<i>Animal</i>	<i>Grupo</i>	<i>Infiltrado inflamatório</i>	<i>Degeneração epitelial</i>	<i>Necrose mucosa</i>	<i>Fibroplasia</i>
1	Cólon Irrradiado Mesalazina 5 semanas - 1	3	2	+	-
2	Cólon Irrradiado Mesalazina 5 semanas - 2	3	0	-	-
3	Cólon Irrradiado Mesalazina 5 semanas - 3	2	1	+	-
4	Cólon Irrradiado Condroitina 5 semanas - 1	2	1	+	-
5	Cólon Irrradiado Condroitina 5 semanas - 2	3	2	+	-
6	Cólon Irrradiado Condroitina 5 semanas - 3	2	1	+	-
7	Cólon Irrradiado Condroitina 5 semanas - 4	2	1	-	-
8	Cólon Irrradiado Condroitina 5 semanas - 5	2	2	+	-
9	Cólon Irrradiado Condroitina 5 semanas - 6	2	0	-	-
10	Cólon Irrradiado Mesalazina 8 semanas - 1	0	0	-	-
11	Cólon Irrradiado Mesalazina 8 semanas - 2	3	3	+	-
12	Cólon Irrradiado Mesalazina 8 semanas - 3	1	0	-	-
13	Cólon Irrradiado Mesalazina 8 semanas - 4	1	1	+	-
14	Cólon Irrradiado Mesalazina 8 semanas - 5	1	1	-	-
15	Cólon Irrradiado Mesalazina 8 semanas - 6	1	1	+	-
16	Cólon Irrradiado Condroitina 8 semanas - 1	0	0	-	-
17	Cólon Irrradiado Condroitina 8 semanas - 2	1	1	+	-
18	Cólon Irrradiado Condroitina 8 semanas - 3	1	1	+	-
19	Cólon Irrradiado Condroitina 8 semanas - 4	2	1	+	-
20	Cólon Irrradiado Condroitina 8 semanas - 5	3	2	-	+
21	Cólon Irrradiado Condroitina 8 semanas - 6	2	1	+	-
22	Cólon Irrradiado Mesalazina 5 semanas - 4	2	1	+	-
23	Cólon Irrradiado Mesalazina 5 semanas - 5	2	2	+	-
24	Cólon Irrradiado Mesalazina 5 semanas - 6	1	0	-	+
25	Cólon Irrradiado Conjugado 5 semanas - 1	0	0	-	+
26	Cólon Irrradiado Conjugado 5 semanas - 2	2	1	+	-
27	Cólon Irrradiado Conjugado 5 semanas - 3	0	0	-	+

28	Cólon Irradiado Conjugado 5 semanas - 4	1	0	-	+
29	Cólon Irradiado Conjugado 5 semanas - 5	0	0	-	-
30	Cólon Irradiado Conjugado 5 semanas - 6	2	3	+	-
31	Cólon Irradiado Conjugado 8 semanas - 1	2	0	-	+
32	Cólon Irradiado Conjugado 8 semanas - 2	2	1	+	+
33	Cólon Irradiado Conjugado 8 semanas - 3	2	1	+	-
34	Cólon Irradiado Conjugado 8 semanas - 4	3	2	+	-
35	Cólon Irradiado Conjugado 8 semanas - 5	3	3	+	-
36	Cólon Irradiado Conjugado 8 semanas - 6	2	2	+	+
37	Cólon Irradiado Controle 5 semanas – 1	1	0	-	+
38	Cólon Irradiado Controle 5 semanas – 2	1	0	-	+
39	Cólon Irradiado Controle 5 semanas – 3	1	0	-	+
40	Cólon Irradiado Controle 5 semanas – 4	1	1	+	+
41	Cólon Irradiado Controle 5 semanas – 5	1	0	-	+
42	Cólon Irradiado Controle 5 semanas – 6	1	0	-	+
43	Cólon Irradiado Controle 8 semanas – 1	1	0	-	+
44	Cólon Irradiado Controle 8 semanas – 2	1	0	-	+
45	Cólon Irradiado Controle 8 semanas – 3	1	0	-	+
46	Cólon Irradiado Controle 8 semanas – 4	1	1	+	+
47	Cólon Irradiado Controle 8 semanas – 5	1	1	+	+

ANEXO A - CERTIFICADO DO CETEA**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 139 / 2016, relativo ao projeto intitulado “AVALIAÇÃO DA MESALAZINA INCORPORADA A POLÍMERO BIODEGRADÁVEL NO TRATAMENTO DA RETITE ACTÍNICA EM RATOS”, que tem como responsável Rafael Calvão Barbuto, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 24/05/2016. Este certificado espira-se em 24/05/2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 139 / 2016, related to the Project entitled “EVALUATION OF MESALAZINE LINKED TO BIODEGRADABLE POLYMER IN THE TREATMENT OF ACTINIC PROCTITIS IN RATS”, under the supervision of Rafael Calvão Barbuto, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 24/05/2016. This certificate expires in 24/05/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 24/05/2016.



Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B – FOLHA DE APROVAÇÃO

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA	UFMG 
---	---	--

FOLHA DE APROVAÇÃO


AVALIAÇÃO DA MESALAZINA INCORPORADA A POLÍMERO BIODEGRADÁVEL NO TRATAMENTO DA RETITE ACTÍNICA EM RATOS POR MEIO DE MODELO ALTERNATIVO DE IRRADIAÇÃO GAMA

VINICIUS RODRIGUES TARANTO NUNES

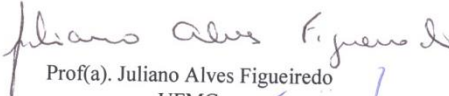
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração RESPOSTA INFLAMATÓRIA À AGRESSÃO TECIDUAL, linha de pesquisa Resposta Inflamatória nos Aloenxertos.

Aprovada em 26 de março de 2018, pela banca constituída pelos membros:


 Prof(a). Ivana Duval de Araujo - Orientador
 UFMG


 Prof(a). Rafael Calvão Barbuto
 UFMG


 Prof(a). Soraya Rodrigues de Almeida Sanches
 UFMG


 Prof(a). Juliano Alves Figueiredo
 UFMG


 Prof(a). Carlos Augusto Real Martinez
 UNICAMP


 Prof(a). Rogério Saad Hossne
 UNESP

Belo Horizonte, 26 de março de 2018.