

ÂNGELA APARECIDA BARRA

5 ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL DE RATOS, ANTES
E APÓS DA RETIRADA DA VALVA ILEOCECAL E
RESTABELECIMENTO DO TRÂNSITO COM CRIAÇÃO DE
“ESFÍNCTER ARTIFICIAL”

10

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 à obtenção do grau de Doutor em Medicina.

15

Área de Concentração: Anatomofisiopatogenia cirúrgica

Orientador: Prof. Alcino Lázaro da Silva

20

Belo Horizonte

25

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

2012

5

10 ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL DE RATOS, ANTES E APÓS DA
RETIRADA DA VALVA ILEOCECAL E RESTABELECIMENTO DO TRÂNSITO COM
CRIAÇÃO DE “ESFÍNCTER ARTIFICIAL”

15

Tese de Doutorado apresentada para defesa perante a Comissão Examinadora constituída pelos Professores Doutores:

Professora: Maria de Lourdes Pessole Biondo Simões

20

Professor: João Baptista Rezenda Neto

Professor: José Eduardo Ferreira Manso

25

Professor: Denis Pajecki

Professor: Alcino Lázaro da Silva (Orientador)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-reitor: Prof^a. Rocksane de Carvalho Norton

5 Pró-reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomes

Pró-reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima dos Santos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Francisco José Pena

10 Vice-Diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Manuel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Tereza Cristina de Abreu Ferrari

Chefe do Departamento de Cirurgia: Prof. Marcelo Eller Miranda

15 Chefe do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia: Prof. Roberto Santos Eustáquio Guimarães

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

20 Prof. Marcelo Dias Sanchez

Prof^a. Ivana Duval de Araújo

Prof. Edson Samesima Tatsuo

Prof. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

25 Prof. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Marco Aurélio Lana Peixoto

Eduardo Ângelo Braga – Representante Discente Titular

Nilce Maria de Carvalho Nogueira – Representante Discente Suplente

5

10

15

A Deus,

20

aos meus pais, Afonso (*im*) e Lili,

aos meus irmãos, Aluízio e Adriana

e à minha filha, Maria Antônia

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho foi possível com o incentivo e colaboração de muitos, aos quais, hoje eu devo dizer: muito obrigado!

5 À Deus, que me fez passar por tantas provações e ao mesmo tempo esteve ao meu lado, dando forças para seguir em frente.

Ao Professor Dr. Alcino Lázaro da Silva, um exemplo a ser seguido, pela confiança e orientação durante a elaboração desse trabalho.

Ao Dr. Cícero de Lima Rena, pelo incentivo para o início dessa jornada, pelo estímulo e apoio durante a realização dos trabalhos.

10 À Dra. Maria Cristina Vasconcelos Furtado, amiga e conselheira dedicada, pelas sugestões e críticas na elaboração deste trabalho.

15 À Universidade Federal de Minas de Gerais (UFMG) e aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação de Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia, pela oportunidade de adquirir conhecimentos na pesquisa e pela convivência durante todo o período.

20 À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e aos profissionais do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), onde foram realizados os procedimentos cirúrgicos do experimento: Velise Rocha de Souza Almeida (bióloga especialista em fármacos), Paulo Sérgio do Carmo (biotecnista), Luiz Carlos Franco (técnico em laboratório), e a acadêmica Lorena Ribeiro Silva, auxílio imprescindível no cuidado dos animais e durante as operações. À Professora Vera Maria Peters, Bióloga, Doutora em Embriologia Animal, Mestre em Histologia e Embriologia. À Professora Martha de Oliveira Guerra, Médica, Doutora em Morfologia.

25 Ao Departamento de Microbiologia Industrial (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa onde foi realizada a análise de biologia molecular pela técnica de PCR-DGGE. Aos profissionais que auxiliaram no projeto, pelo acolhimento e pela oportunidade de aquisição de novos conhecimentos. À professora Célia Alencar de Moraes, Professora Adjunta (Microbiologia Industrial/Microbiologia dos Alimentos), pela gentileza e oportunidade de me apresentar uma nova perspectiva de pesquisa.

30 À Alessandra Barbosa Ferreira, Doutora em Microbiologia Agrícola do Departamento de Microbiologia da UFV, pela paciência e disponibilidade de dividir conhecimentos.

Ao Marcelo Nagen, doutorando em Microbiologia Agrícola do Departamento de Microbiologia da UFV. À Fernanda de Souza Freitas, graduanda em Bioquímica pela UFV, que contribuíram para realização do trabalho com dedicação e paciência, esclarecendo as dúvidas referentes a todo o processo.

5 Aos colegas e funcionários, “novos amigos”, do Departamento de Medicina e Enfermagem da UFV. Que tenhamos longo período de convivência e crescimento juntos.

 Ao amigo e Professor Nélio Andrade, a “irmã do coração” Maria Eliza por estarem presentes nos momentos de ansiedade do desenvolvimento desse trabalho
10 e me tranquilizarem sempre.

 A Professora Jane Azevedo da Silva doutora em Bioestatística e Adjunta do Departamento de Estatística da Escola de Engenharia da UFJF.

 À amiga Tereza Cristina Cardozo pela revisão das referências.

 À Senhora Cássia Segregio pela revisão do texto em português.

15 Aos Professores e colegas que contribuíram para a minha formação profissional.

 À minha família, Afonso (*im*), Lili, Aluizio, Adriana, Cláudia, Francisco, Maria, Luiza, Isabela, Mariana, meus tios e primos, por tudo que representam em minha vida.

20 À Maria Antônia, não existem palavras para expressar os meus sentimentos em relação a você.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fotografia digital da confecção de “esfíncter artificial” em humanos. A - incisão da camada seromuscular. B - primeira seromiectomia distal (SD) e anastomose ileocólica (A). C - seromiectomia proximal (SP). D - seromiectomias distal (SD) e proximal (SP).....	27
Figura 2	Confecção do esfíncter artificial - A, B e C: sutura da borda distal da seromiectomia distal (SD) à borda proximal da seromiectomia proximal (SP). D - aspecto final - esfíncter artificial constituído (EA) e anastomose (A). Trajeto pérvio da luz intestinal confirmado pelo instrumental cirúrgico que ultrapassa anel muscular sepultado.....	28
Figura 3	Região ileocecológica do rato. Local onde foi realizada a colheita do conteúdo intestinal indicado pelas setas.....	29
Figura 4	Fotografia do experimento cirúrgico em rato demonstrando a anastomose ileocólica término-terminal. Confecção do primeiro ponto da sutura.....	30
Figura 5	Fotografia digital ampliada do experimento com marcação do local da seromiectomia com fio de seda. Anastomose ileocólica.....	31
Figura 6	Fotografia da operação em ratos demonstrando as seromiectomias: seromiectomia proximal (SP) e seromiectomia distal (SD).....	31
Figura 7	Fotografia da operação em ratos demonstrando a aproximação das seromiectomias com pontos separados. APS anel de parede seromuscular interposto entre as seromiectomias.....	32
Figura 8	Fotografia da operação em ratos demonstrando o término da aproximação das seromiectomias - anastomose ileocólica; esfíncter artificial	32
Figura 9	Fotografia da segunda operação demonstrando os segmentos intestinais onde foi colhido conteúdo intestinal no pós-operatório do grupo A e no grupo B - esfíncter artificial; anastomose ileocólica.....	34

Figura 10	Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S de bactérias totais nas amostras dos segmentos intestinais de todos os animais. Amostras em destaque de negrito foram as que se agruparam com similaridade acima de 70%.....	70
Figura 11	Gráfico com os valores da diversidade comparada entre as amostras do íleo e do colo e as amostras controle do grupo A.....	43
Figura 12	Gráfico com os valores da diversidade comparada entre as amostras do íleo e do colo e as amostras controle do grupo B.....	44
Figura 13	Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S de bactérias totais nas amostras dos segmentos ileais e colônicos dos animais 5, 3, 4 e controle do grupo A.....	45
Figura 14	Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S de bactérias totais nas amostras dos segmentos ileais, intermediário e colônicos dos animais 9, 7, 5, e controle do grupo B.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peso pré-operatório, em gramas, dos animais dos grupos A e B na primeira intervenção.....	69
Tabela 2	Peso pré-operatório, em gramas, dos animais na segunda intervenção.....	69
Tabela 3	Correlação entre os animais e as amostras para a extração do DNA do grupo A.....	35
Tabela 4	Correlação entre os animais e as amostras da extração do DNA do grupo B.....	36
Tabela 5	<i>Primers</i> utilizados para amplificação da região dos genes rDNA 16S 1392R 27Fe para realização da reação de DGGE <i>primers</i> 984 e 1378R de bactérias totais.....	37
Tabela 6	Valores das variáveis nas amostras do grupo A para todos os animais e segmentos.....	42
Tabela 7	Valores das variáveis nas amostras do grupo B para todos os animais e segmentos.....	43
Tabela 8	Comparação da diversidade da amostras-controle com as demais amostras pelo Teste T de Student.....	44
Tabela 9	Valores encontrados para as variáveis (atributos) diversidade, equitabilidade e riqueza das amostras comparáveis do grupo A.....	48
Tabela 10	Valores encontrados para as variáveis (atributos) diversidade, equitabilidade e riqueza das amostras comparáveis do grupo B.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância.
APS	Anel Parede Seromuscular.
BSA	Bovine Serum Albumin
BIOAGRO	Instituto de Biotecnologia Aplicada e á Agropecuária.
CBR	Centro de Biologia da Reprodução.
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.
DC	Doença de Crohn.
DII	Doença Inflamatória Intestinal.
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid.</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic Acid.</i>
EA	Esfíncter Artificial.
GC	Guanina – Citosina.
MilliQ	Água deionizada- esterilizada pela <i>Millipore Corporation.</i>
<i>ni</i>	Massa da banda do DNA.
pb	Pares de bases.
PCR	<i>Polymerase Chain Reactio.</i>
PCR-DGGE	<i>Polymerase Chain Reaction– Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis.</i>
p/v	Parte por volume.
rDNA	<i>Ribossomal Deoxyribonucleic Acid.</i>
rRNAs	<i>Ribossomal Ribonucleic Acid subunit.</i>
SIBO	<i>Small Intestinal Bacterial Overgrowth.</i>
SIC	Síndrome do Intestino Curto.
SD	Seromiotomia Distal.
SP	Seromiotomia Proximal.
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Science.</i>
TAE	Tri-Acetato EDTA.
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora.
UFV	Universidade Federal de Viçosa.
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithimetic.</i>
UTO	Unidade taxonômica Operacional.
v/v	Volume por volume.

RESUMO

Várias técnicas têm sido empregadas para a criação de esfíncteres artificiais no intestino para controle da velocidade do trânsito intestinal e prevenção de refluxo coloileal. A realização de seromiotomias duplas circunferenciais para substituir a

5 valva ileocecal foi realizada por Rena *et al.* em 20 pacientes e mostrou resultados clínicos satisfatórios. A proposta deste trabalho experimental é analisar, por meio de biologia molecular, a diversidade microbiota da região do íleo terminal e do colo proximal de ratos antes e depois da ressecção da válvula ileocecal com a

10 reconstrução do trânsito com anastomose ileocólica término-terminal isolada ou associada à criação de esfíncter artificial pela técnica de Rena. Quatorze ratos foram operados e colhidos conteúdo do íleo e do colo processadas como amostras controle. Após a ressecção da junção ileocecólica, o trânsito foi reconstruído com anastomose ileocólica término-terminal. Em sete animais acrescentou-se a criação

15 um esfíncter artificial a montante da anastomose. Os animais foram assistidos por 20 dias e reoperados para colheita de conteúdo intraluminal do íleo e do colo e processamento de novas amostras. Das amostras foi extraído o ácido desoxirribonucléico (DNA) para Reação em Cadeia da Polimerase e Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (PCR-DGGE). O gel com os padrões de bandas eletroforéticas geradas das amostras de DNA de bactérias totais foram

20 submetidos ao programa BIONUMERICS para análise da similaridade pelo coeficiente de “Dice” e da diversidade da microbiota pelo Índice de Shannon-Weaver. O dendograma do coeficiente de “Dice” de todas as amostras não estabeleceu correlação para segmentos ileais ou colônicos e as amostras-controle dos respectivos animais. Os valores do índice de Shannon-Weaver ficou limitado entre

25 2,11 e 2,93, com variações para os diversos segmentos nos dois grupos. A média deste índice foi maior no segmento ileal (2,61) e do colo (2,57) dos animais com a criação do esfíncter artificial e do colo (2,63) nos animais sem criação de esfíncter artificial em relação à amostra controle (2,38, 2,39 e 2,36, respectivamente). Um número maior de amostras ileais apresentou valores mais elevados

30 comparativamente com amostras do colo a despeito do fato de a concentração microbiana ser descrita e considerada maior no colo. A ausência da junção ileocecal influenciou as variações da diversidade em todos os segmentos. Com a criação de novo esfíncter a diversidade aumentou nos segmentos tanto ileal quanto do colo. As variações encontradas podem se justificar em função de o comportamento da

distribuição da microbiota no trato digestório ter características peculiares e receber influência de fatores locais e sistêmicos determinando a continuidade do presente estudo em relação à quantificação e especificidade de bactérias.

- 5 Descritores: Junção ileocecal. Esfíncter artificial. PCR-DGGE. Microbiota intestinal.

ABSTRACT

Several techniques have been employed for the creation of artificial bowel sphincters to control the speed of intestinal transit and prevent coloileal reflux. Dual circumferential seromyotomy to replace the ileocecal valve was performed by Rena
5 *at al.* in 20 patients and showed satisfactory clinical results. The purpose of this experimental work is to analyze, through molecular biology, the microbial diversity in the terminal ileum and proximal colon of rats before and after resection of the ileocecal valve. Then, the reconstruction of end to end ileocolic anastomosis was conducted in one group while an artificial sphincter was added in the other group,
10 using the technique developed by Rena. Fourteen rats were operated and samples of their ileum and colon contents were collected and processed as controls. After resection of the ileocecolic junction, transit was reconstructed by end to end ileocolic anastomosis. In seven animals, an artificial sphincter was created upstream of the anastomosis. The animals were monitored for 20 days and reoperated to allow
15 the collection of intraluminal content of the ileum and colon and processing of new samples. Deoxyribonucleic Acid (DNA) was extracted from the samples for Polymerase Chain Reaction and Gel Electrophoresis with Denaturing Gradient PCR-DGGE. The electrophoretic band patterns generated from DNA samples of total bacteria were submitted to the BIONUMERICS software system for similarity analysis using "Dice" coefficient and diversity analysis of the microbiota by Shannon-Weaver
20 Index. The dendrogram generated from the "Dice" coefficient of all samples did not establish a correlation for ileal or colonic segments and samples of the respective control animals. The values of the Shannon-Weaver index was limited to between 2.11 and 2.93, with variations for different segments in both groups. The average of the index was higher in the ileum segment (2.61) and colon (2.57) in animals with an
25 artificial sphincter and in the colon (2.63) in animals without an artificial sphincter, compared to the control sample (2.38, 2.39 and 2.36, respectively). A larger amount of samples showed higher diversity values compared with colon samples, although microbial concentration is described and considered to be greater in the colon. The
30 absence of the ileocecal junction affected diversity changes in all segments. With the creation of a new sphincter, diversity increased in both segments (ileum and colon). The observed variations can be explained by the peculiar characteristics of the distribution behavior of the microflora in the digestive tract and the effect of local and

systemic factors, which requires the continuity of this study focusing on quantification and specificity of bacteria.

Descriptors: ileocecal junction; Artificial sphincter; PCR-DGGE; Intestinal microbiota.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Relevância.....	22
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Manutenção e manejo dos animais.....	26
3.2. Formação dos grupos.....	26
3.3. Experimento cirúrgico.....	28
3.3.1 Pré-operatório e ato anestésico.....	28
3.3.2 Primeiro ato operatório.....	29
3.3.3 Cuidados pós-operatórios.....	33
3.3.4 Segundo ato operatório.....	33
3.4. Processamento do material colhido.....	34
3.4.1. Amostras controle.....	34
3.4.2. Amostra dos grupos após intervenção.....	35
3.5. Análise da microbiota.....	36
3.5.1. Extração e quantificação de DNA das amostras entéricas.....	36
3.5.2.. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante.....	37
3.6. Análise estatística.....	38
4. RESULTADOS	41

4.1. Coeficiente de “Dice” e Índice de Shannon-Weaver das amostras.....	42
4.1.1. Análise do grupo A.....	42
4.1.2. Análise do grupo B.....	43
4.1.3. Análise das médias.....	44
4.2. Coeficiente de Similaridade com amostras comparáveis.....	45
4.2.1. Análise do índice de “Shannon Weaver”	46
4.2.2. Análise da equitabilidade.....	47
4.2.3. Análise da riqueza.....	47
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÕES.....	55
6.1. Geral.....	56
6.2. Específicas.....	56
7. REFERÊNCIAS.....	57
8. APÊNDICE.....	68
9. ANEXO.....	71

5

10

1 INTRODUÇÃO

15

20

A valva ileocecal foi descrita por Varolius em 1573 como uma estrutura anatômica denominada “*operculun illi*” - opérculo do íleo. Recebeu várias denominações dos seus descritores como “*valvula ileocaecalis*” por Bahuin, “válvula de Posthius”, “válvula de Vidius”, entre outras. Di Dio define a *papila ileal* contendo dispositivo muscular descrito como “piloro ileocecólico” (DI DIO, 1952, 2000). Atualmente, descrita como junção ileocecal, é uma estrutura muscular que divide, anatomicamente, o intestino delgado do intestino grosso. Não se apresenta como uma válvula, mas como mecanismo esfinteriano semelhante ao piloro (BACELAR *et al.*, 2003).

Dentre as funções que o piloro exerce há um mecanismo de controle do fluxo do conteúdo ileal para o colo, que contribui para o processo absorptivo (AWAPITTAYA *et al.*, 2007; FOLARANMI, 2011; VANDERHOOF; LANGNAS, 1997). A função de regulação do trânsito ileocólico sustenta-se, principalmente, nos casos de ressecções intestinais extensas que culminam com a Síndrome do Intestino Curto (SIC). Nesta condição, a permanência do mecanismo esfinteriano da junção ileocecólico permite a manutenção de condições clínicas mais favoráveis (BALLESTEROS POMAR; VIDAL CASARIEGO, 2007; DUDRICH; LATIFI; FOSNOCHI, 1991).

Além da regulação do tempo de trânsito do intestino delgado para o intestino grosso, outra função investigada da região ileocecal é a de impedir o refluxo do conteúdo colônico para o íleo (GLASMANN, 1942; KHOLOUSSY *et al.*, 1986; RICHARDSON; GRIFFEEN, 1972). Rendleman *et al.*, (1958), demonstraram a capacidade antirrefluxo da valva por fluoroscopia com enema baritado e aferição de pressão no reto em uma série de pacientes. Em estudo experimental com cães, por manometria verificaram que a pressão de refluxo do colo para o íleo é de 13,4 cmH₂O a 19 cmH₂O (RENDLEMAN *et al.*, 1958). Em uma revisão de resultados de enema opaco de 715 pacientes, Machado e Morceli (2006), publicaram que a prevalência de refluxo colo ileal de moderado a grave é de 25%, independentemente de idade e gênero. Neste trabalho questiona-se sobre a necessidade de investigar as consequências dessa alteração, reconhecendo, entretanto, as dificuldades de abordagem ou acesso da região (MACHADO; MORCELI, 2006).

O refluxo colo ileal é citado como uma das causas de agressão à mucosa do intestino delgado e de promover uma reação inflamatória. Alterações inflamatórias da mucosa do colo e do íleo estão presentes em portadores de doença inflamatória intestinal (DII) como a doença de Crohn (DC). A distribuição e atividade da microbiota intestinal na síndrome do colo irritável (SCI) também tem sido objeto de estudos, encontrando uma correlação que justifica os sintomas dessa doença. A perda funcional ou anatômica da junção ileocecal permite o refluxo do conteúdo colônico para o íleo, favorecendo a colonização de segmentos proximais do sistema digestório e levando à ocorrência de supercrescimento bacteriano – SIBO, caracterizando disbiose intestinal (BALLESTEROS POMAR; VIDAL CASARIEGO, 2007; BURES *et al.*, 2010; QUERA; QUIGLEY; MADRID, 2005). A disbiose intestinal é, por conceito, o crescimento bacteriano de espécies fora do seu sítio natural. As populações bacterianas no interior do sistema digestório estão adaptadas para que o seu crescimento ocorra em cada nicho próprio. O distúrbio decorrente do desequilíbrio entre a microbiota indígena com patógenos nocivos, presentes no intestino, interfere nas funções de digestão e de absorção intestinal dos alimentos com manifestações clínicas variadas (ALMEIDA *et al.*, 2009; FRANK *et al.*, 2011).

O complexo ecossistema residente no intestino denominado microbiota intestinal, é composto por uma variedade de bactérias que compreendem 1.800 gêneros e de 15.000 a 36.000 espécies, sendo mais de 60% delas não cultiváveis fora do ambiente intestinal (TANNOCK, 2001). A microbiota intestinal humana contém 150 vezes mais genes que o genoma humano (MONTALTO *et al.*, 2009; SEKIROV *et al.*, 2010). Com o avanço tecnológico, na área da biologia molecular, verifica-se uma expansão do conhecimento sobre a importância da microbiota intestinal para o hospedeiro (KINROSS; DARZI; NICHOLSON, 2011). Recentemente, por meio do emprego de técnicas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia de Polimerase - PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tem-se demonstrado sucesso na caracterização de microrganismos, principalmente, os não cultiváveis ou os que não sobrevivem às técnicas de transporte e de estocagem. O método de PCR apresenta rapidez de resultados e de reprodutibilidade (BENNO, 2002; COTTER, 2011; HAYASHI; SAKAMOTO;). A técnica da PCR foi desenvolvida nos anos 1980 por Kary Mullis e possibilita obtenção e amplificação exponencial, a partir de fragmentos de DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) por reação enzimática do

fragmento com iniciadores ou *primers* “*in vitro*”. Os iniciadores definem o alvo e a sequência a ser replicada. O resultado obtido gera milhões de cópias (SAIKI *et al.*, 1988). O estudo do complexo sistema microbiano intestinal por meio desse recurso tem encontrado resultados inovadores e desafiantes. Situações clínicas que definem a influência do comportamento da microbiota como câncer colorretal, DII, obesidade e doença celíaca estão sendo, amplamente, pesquisadas utilizando o método de PCR em amostras fecais e do conteúdo intestinal. O emprego de probióticos e prebióticos no tratamento das situações clínicas citadas, em busca da eubiose tem mostrado resultados satisfatórios, com alteração do perfil da microbiota por análise de biologia molecular (ANTUNES *et al.*, 2007; COTTER, 2011; SAAD, 2006; SANTOS, 2010).

O DNA extraído de bactérias contendo o gene 16SrRNA de amostras fecais ou do conteúdo entérico é amplificado por PCR. O gene 16S ribossomal (16rRNA) é um dos marcadores moleculares mais utilizados em ecologia microbiana em função de propriedades evolucionárias, de ubiquidade e ações no metabolismo celular (CASE, 2007 *apud* DUARTE, 2010). O produto amplificado da extração é identificado por meio de eletroforese com alta especificidade e sensibilidade para o alvo a ser estudado. Dentre as técnicas de impressão digital (*fingerprinting*) genético, a PCR-DGGE tem sido aplicada por apresentar uma estimativa mais real da diversidade microbiana. A técnica consiste na separação eletroforética por desnaturação de pares de bases e discrimina sequências de DNA de fragmentos do mesmo tamanho que diferem em apenas um par de nucleotídeos. A corrida no gel de poliacrilamida gera um padrão de bandas variáveis de acordo com a estrutura do DNA extraído das bactérias de diferentes amostras (MUYZER; DE WALL; UITTERLINDEN, 1993).

As indicações cirúrgicas de ressecção da junção ileocecal estão ligadas às afecções que provocam SIC ou às ressecções do colo direito por lesões benignas ou tumores malignos. Nos casos de ressecção do íleo distal, particularmente, com remoção da valva ileocecal, mesmo de segmentos menores, podem resultar em má-absorção pelo mecanismo anteriormente descrito de disbiose. A preocupação com a tendência de aumento de tumores do hemicolo direito tem estabelecido protocolos de controle dos pacientes de grupo de risco com investigação e controle por colonoscopia. No entanto, para os pacientes que apresentam doença neoplásica

avançada há indicação para a cirurgia de ileocectomia direita sendo nesta condição, inevitável a perda da junção ileocecal. Existem opções de substituição do piloro ileocecal com variadas técnicas de criação de mecanismo esfínteriano eficiente. Entre elas, a confecção de esfínteres por meio de miectomias, intussuscepção, tunelização submucosa, reversão de segmentos e seromiotomias têm sido descritas para auxílio da regulação do trânsito nas ressecções extensas ou na substituição da papila ileal (BENAVIDES-BLANCO; NIÑO, 1994; FISCH *et al.*, 1994; LÁZARO DA SILVA, 1974; RENA *et al.*, 1996; RICOTTA *et al.*, 1981; SENCAN *et al.*, 2002; SCHILLER; DI DIO; ANDERSON, 1967) A redução da velocidade do trânsito intestinal, melhora a capacidade absorptiva de alimentos e controla os episódios diarreicos. Além desses resultados, os autores avaliaram a colonização a montante do sistema digestório e mostraram a eficácia de algumas técnicas em detrimento de outras, ou não atingiram o objetivo (GAZET; KOPP, 1964; KHOLOUSSY *et al.*, 1986; MAEGAWA *et al.*, 2005; MYRVOLD *et al.*, 1984; RICHARDSON; GRIFFEN, 1972; ZURITA *et al.*, 2004).

A técnica de criação de piloro artificial descrita por Lázaro da Silva por meio de uma seromiotomia extramucosa promoveu o controle dos sintomas da síndrome de “Dumping” assim como possibilitou a realização de colostomia perineal continente (LÁZARO DA SILVA, 1974; 1991).

Rena *et al.* propuseram uma modificação a partir dessa técnica, para a confecção de esfínter artificial, por meio de duas seromiotomias com sepultamento de anel seromuscular visando reduzir a velocidade do trânsito intestinal no tratamento de SIC, cujo êxito foi constatado em sua execução e resultado clínico. No primeiro caso em que realizaram o procedimento a clínica do paciente era compatível com SIBO por colonização ileal devido à ileocectomia direita, consequente de apendicite aguda complicada. O resultado da intervenção levou à normalização da velocidade do trânsito intestinal, redução dos episódios de diarreia e recuperação nutricional do paciente. A resposta clínica satisfatória do paciente gerou uma indagação quanto à capacidade desse mecanismo esfínteriano de atuar como barreira antirrefluxo impedindo a colonização a montante, além, de diminuir a velocidade do trânsito. Outros casos se beneficiaram da criação do esfínter com a técnica empregada e não houve complicações decorrentes da sua realização (RENA *et al.*, 1996). Os resultados clínicos com o emprego do esfínter artificial proposto

por Rena *et al.* motivaram uma linha de pesquisa experimental. A criação de esfíncteres artificiais em animais promoveu alterações morfológicas e histológicas na parede intestinal tanto dos vilos quanto da musculatura, além de provocar dilatação do segmento intestinal à montante sem causar obstrução (BARRA *et al.*, 5 2008; DEOTI *et al.*, 2008; FURTADO *et al.*, 2008; RENA *et al.*, 2007; SIQUEIRA, 2006). As alterações morfológicas da parede intestinal foram semelhantes às da adaptação intestinal. A dilatação a montante do esfíncter artificial sem ocorrência de obstrução mostrou ser factível para substituir a valva ileocecal. Manteve-se, entretanto, uma questão a ser investigada: “A ressecção da valva ileocecal e a 10 verificação da capacidade do mecanismo artificial criado pelas seromiotomias de impedir o refluxo bacteriano do colo também precisam ser avaliadas” (FURTADO, 2008).

15 1.1 Relevância

A criação de esfíncter artificial por meio de seromiotomias descrito na técnica de Rena *et al.* para substituir a valva ileocecal ou para reduzir das manifestações da SIC revelou tratar-se de um procedimento de fácil execução. Há 20 que se ressaltar uma vantagem em sua elaboração, qual seja, não implicar em abertura do lúmen do intestino com ruptura da integridade da mucosa. O mecanismo de contração do anel seromuscular sepultado controla a velocidade do trânsito sem causar obstrução embora ocorra uma dilatação a montante do esfíncter artificial. Diante desses fatos e da possibilidade de o esfíncter artificial atuar como barreira à 25 colonização, faz-se necessário verificar as condições do microambiente e a resposta da microbiota a fim de indicar com mais segurança o seu emprego.

5

10

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

5 Avaliar a diversidade da microbiota do conteúdo intraluminal do íleo e do colo de ratos por PCR-DGGE.

2.2. Objetivos específicos

10 Avaliar a diversidade da microbiota do íleo e do colo de ratos após a ressecção da válvula ileocecal.

15 Avaliar a diversidade da microbiota do íleo e do colo de ratos após a substituição da válvula ileocecal por “esfíncter artificial”.

20 Comparar a similaridade da microbiota das amostras de conteúdo intraluminal do íleo e do colo de ratos antes da ressecção da válvula ileocecal e após o restabelecimento do trânsito com e sem a criação cirúrgica de “esfíncter artificial”.

25

30

5

10

3 MATERIAL E MÉTODOS

15

O projeto foi previamente apresentado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e aprovado sob o protocolo 021/2010 em 16-06-2010 (Anexo)

5 Dezoito ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos com seis meses de vida, oriundos da colônia do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), (UFJF-MG) foram usados no experimento. No CBR foram realizados também os procedimentos cirúrgicos, no período de julho e agosto de 2010. O CBR é cadastrado no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

10 3.1. Manutenção e manejo dos animais

Os animais foram alojados, individualmente, em gaiolas de polipropileno, com maravalhas selecionadas, mamadeira para água e cocho para ração. As gaiolas ficaram em armários climatizados, com controle de temperatura, umidade e
15 troca de ar programado, no biotério do CBR.

As instalações contavam com janelas teladas e lacradas e sistema de iluminação mista (luz natural e lâmpadas incandescentes). As lâmpadas incandescentes eram acesas às seis horas e apagadas às 18 horas, o que proporcionava um fotoperíodo de 12 horas de luminosidade e de 12 horas de
20 escuridão, em acordo com o preconizado. A água era oferecida *ad libitum* e a ração, balanceada, do tipo peletizada, na proporção média de 10 g de ração/100 g de peso corporal por dia, para cada animal (ANDERSEN *et al.*, 2004).

3.2. Formação dos grupos

25

Os 18 animais foram pesados e distribuídos em dois (2) grupos, aleatoriamente, ressaltando-se que dois animais de cada grupo morreram após a primeira intervenção nas primeiras 24 horas do pós-operatório (TAB. 1 – APÊNDICE)

Grupo A: (n - 7) Ressecção da valva ileocecal e anastomose ileocólica término-terminal em plano único.

Grupo B: (n - 7) ressecção da valva ileocecal e anastomose ileocólica término-terminal em plano único e confecção do esfíncter artificial pela técnica de Rena (RENA *et al.*, 1996).

Esta técnica consiste em realizar duas seromiotomias circunferenciais no íleo a 2,5 cm e 4,5 cm a montante da anastomose com o colo, separadas por um anel muscular íntegro de 2,0 cm de extensão. A borda cruenta proximal da seromiotomia cranial é suturada à borda cruenta distal da seromiotomia caudal. Isso leva ao sepultamento do anel seromuscular intermediário, constituindo-se dessa forma um piloro com inervação intrínseca preservada (FIG. 1 e 2).

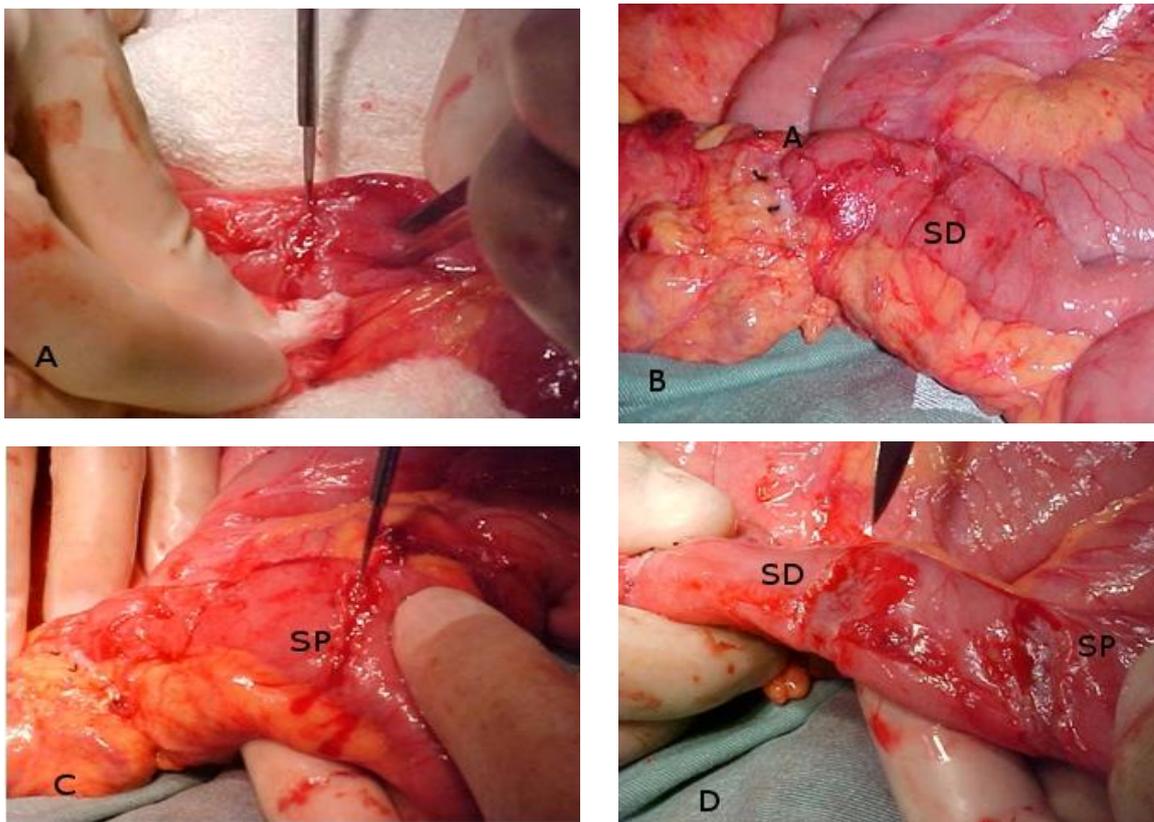


Figura 1 - Fotografia digital da confecção de “esfíncter artificial” em humanos - A - incisão da camada seromuscular. B - primeira seromiotomia distal (SD) e anastomose ileocólica (A). C - seromiotomia proximal (SP). D - seromiotomias distal (SD) e proximal (SP) (arquivo pessoal dos autores).

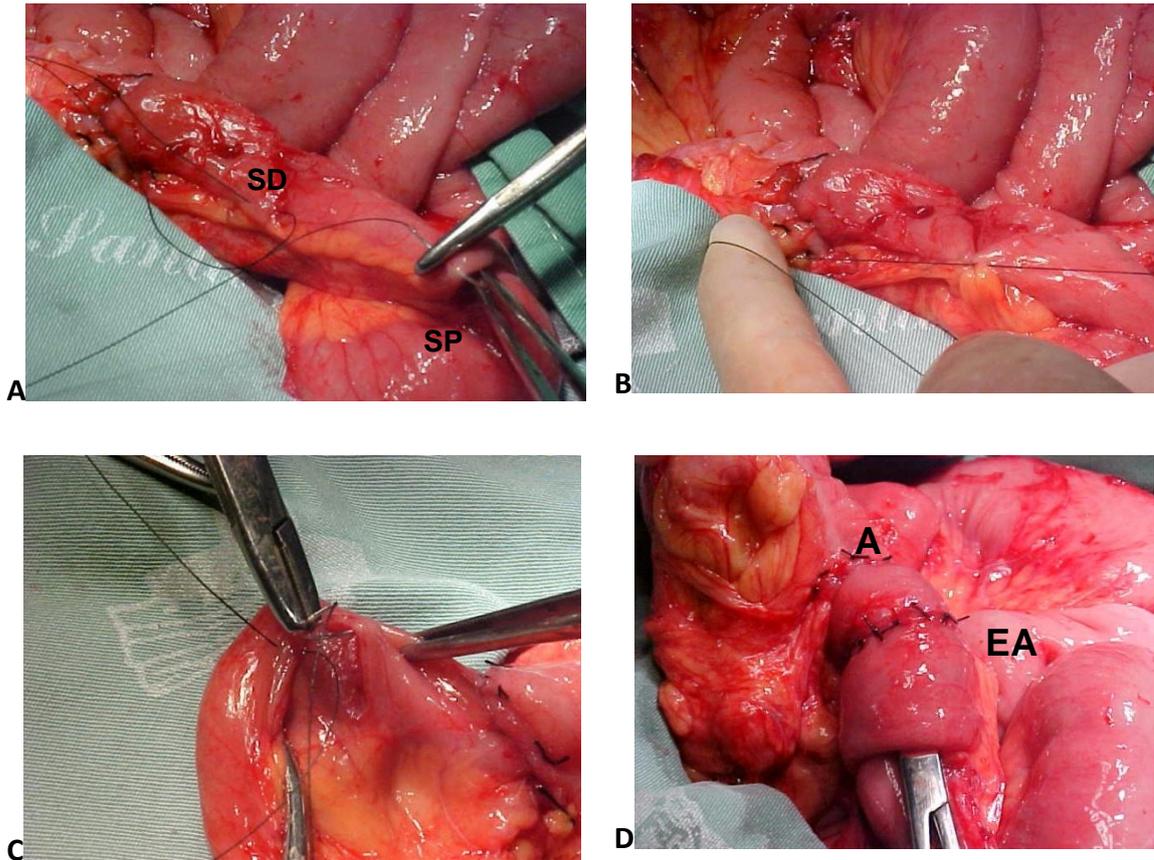


Figura 2 - Confeção do “esfincter artificial”. - A, B e C: sutura da borda distal da seromiotomia distal (SD) à borda proximal da seromiotomia proximal (SP). D - aspecto final - esfincter artificial constituído (EA) e anastomose ileocólica (A). Trajeto pérvio da luz intestinal confirmado pelo instrumental cirúrgico que ultrapassa anel muscular sepultado (arquivo pessoal dos autores).

5

3.3. Experimento cirúrgico.

3.3.1. Pré-operatório e ato anestésico.

10

No pré-operatório os animais permaneciam em jejum de seis horas para sólidos, porém era oferecida água com açúcar (5 g/100 mL de água), *ad libitum*. Após pesados, os animais eram anestesiados.

A técnica anestésica, idêntica entre os grupos, constituiu-se de injeção intraperitoneal de 10 mg/kg de xilazina associada a 90 mg/kg de quetamina (DAMY *et al.*, 2000).

15

3.3.2. Primeiro ato operatório

Certificado o plano anestésico, por meio de compressão das patas traseiras, realizou-se a tosquia da parede da ventral abdominal. O animal era posicionado em decúbito dorsal em suporte com aquecimento para manutenção da temperatura e promovia-se a antissepsia da área do abdome com álcool 70%. Executava-se uma incisão longitudinal mediana, de 3,0 cm, abrangendo os planos da pele, tela subcutânea e musculatura da parede abdominal para acesso da cavidade peritoneal. O segmento ileocólico identificado era exteriorizado da cavidade peritoneal (FIG. 3).

10

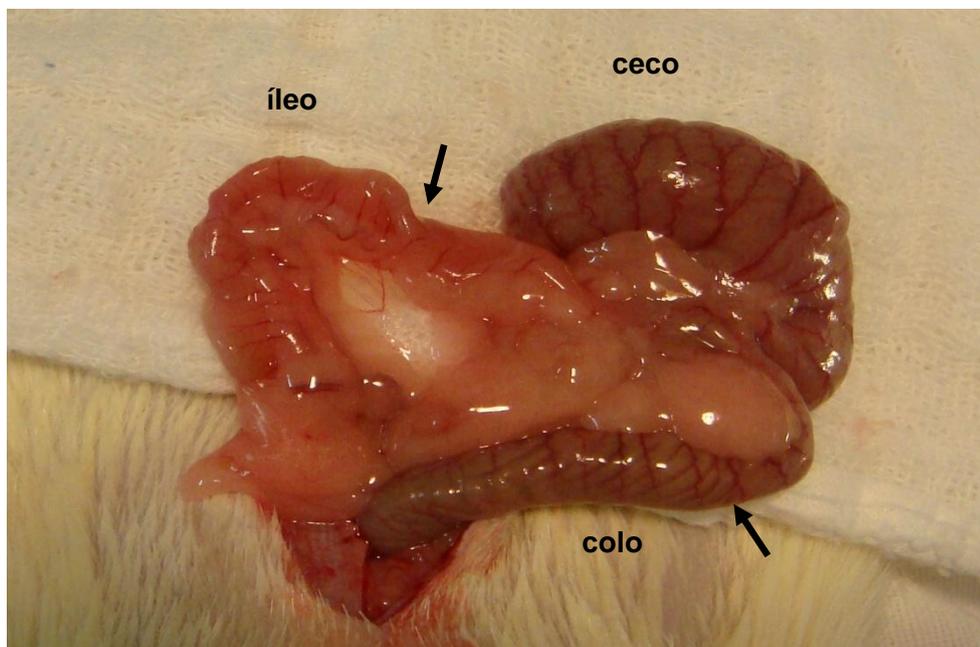


Figura 3 - Região ileocecocólica do rato. Local onde foi realizada a colheita do conteúdo intestinal indicado pelas setas.

Procedia-se à ligadura do suprimento vascular ileocecocólico, com fio inabsorvível monofilamentar número 4-0, junto à face mesentérica e imediatamente, realizava-se a transecção do íleo terminal, a 2,0 cm da válvula, para colheita do conteúdo intraluminal em tubo de ensaio esterilizado de 2 mL. A quantidade colhida dependia do volume que ali se encontrava realizando-se a expressão do conteúdo do segmento ileal para o tubo. A seguir ressecava-se segmento do íleo demarcado pela isquemia, o ceco e 2,0 cm proximais do colo proximal. Da extremidade do colo era colhido conteúdo intraluminal com a utilização de espátula estéril, em volume

aproximado ao que foi colhido do íleo, e transferido para outro tubo estéril, ambos devidamente identificados. Os frascos preenchidos com água estéril foram congelados a 4°C negativos.

Nos animais do grupo A, após a ressecção da junção ileocecólica procedia-se à anastomose ileocólica término-terminal realizada por meio de sutura com pontos separados com fio de poligalactina 910 número 6-0 (FIG. 4). Verificava-se o fluxo pérvio no lúmen, a integridade da anastomose e a hemostasia do segmento operado. A seguir promovia a instilação intraperitoneal de 5,0 mL de solução salina e laparorráfia em dois planos, muscular e pele com fio de monofilamentar número 4-0.

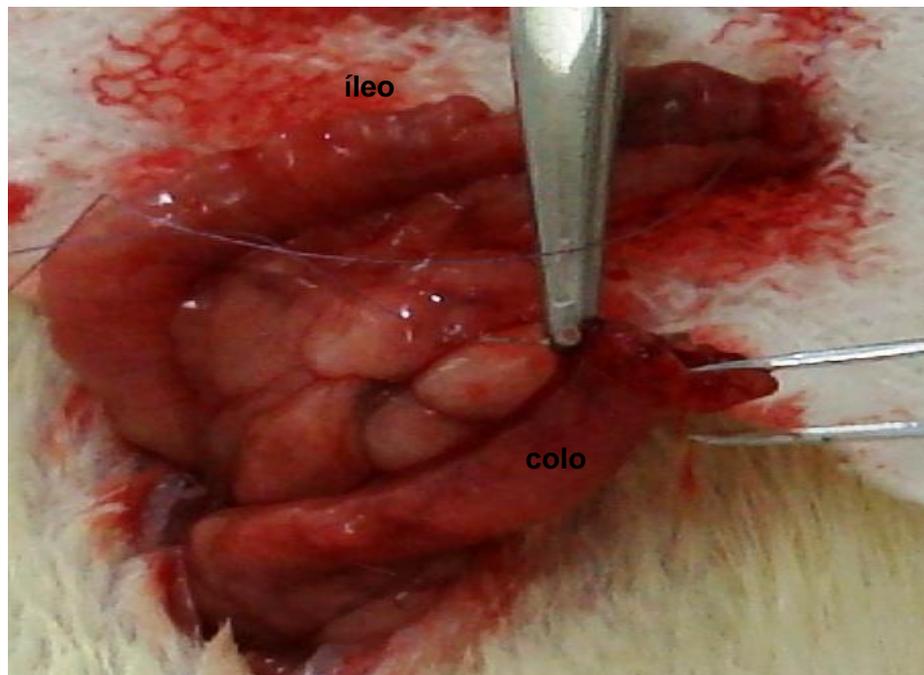


Figura 4 - Fotografia do experimento cirúrgico em rato demonstrando a anastomose ileocólica término-terminal. Confecção do primeiro ponto da sutura.

Nos animais do grupo B, após o término da anastomose ileocólica para restabelecimento do trânsito, demarcava-se com fio de seda de 5,0 cm de comprimento à montante da linha de sutura da anastomose ponto para a confecção de um esfíncter artificial por meio de seromiótomia dupla circunferencial, conforme a técnica desenvolvida por Rena *et al.* (FIG. 5).



Figura 5 - Fotografia digital ampliada do experimento com a marcação do local da seromiotomia com fio de seda. Anastomose ileocólica (seta).

5

Em cada seromiotomia, as camadas serosa e muscular eram incisadas, em quase toda a circunferência da alça, exceto na face mesentérica, mantendo-se íntegra a camada mucosa (FIG. 6). Entre as seromiotomias, permaneciam 2,0 mm de parede intestinal íntegra, configurando um anel muscular.

10

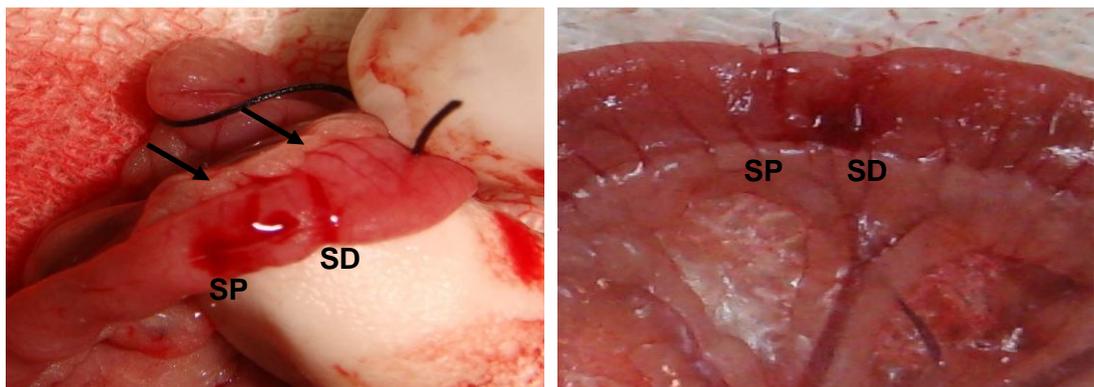


Figura 6 - Fotografia da operação em ratos demonstrando as seromiotomias (setas): SP seromiotomia proximal e SD seromiotomia distal.

A borda cruenta proximal da seromiotomia cranial era suturada à borda cruenta distal da seromiotomia caudal, com pontos separados de fio de poligalactina 910 número 6.0, sepultando o anel seromuscular. Assim, constituía-se um esfíncter de 2,0mm de largura a 5,0 cm, a montante da anastomose ileocólica (FIG. 7 e 8).

15

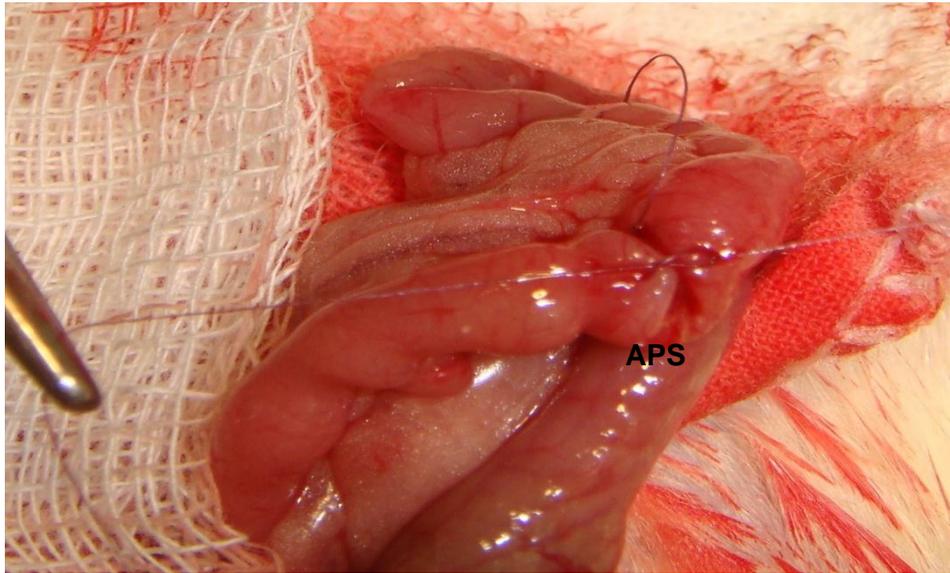


Figura 7 - Fotografia da operação em ratos demonstrando a aproximação das sermiotomias com pontos separados. APS - anel de parede seromuscular entre as sermiotomias.

5

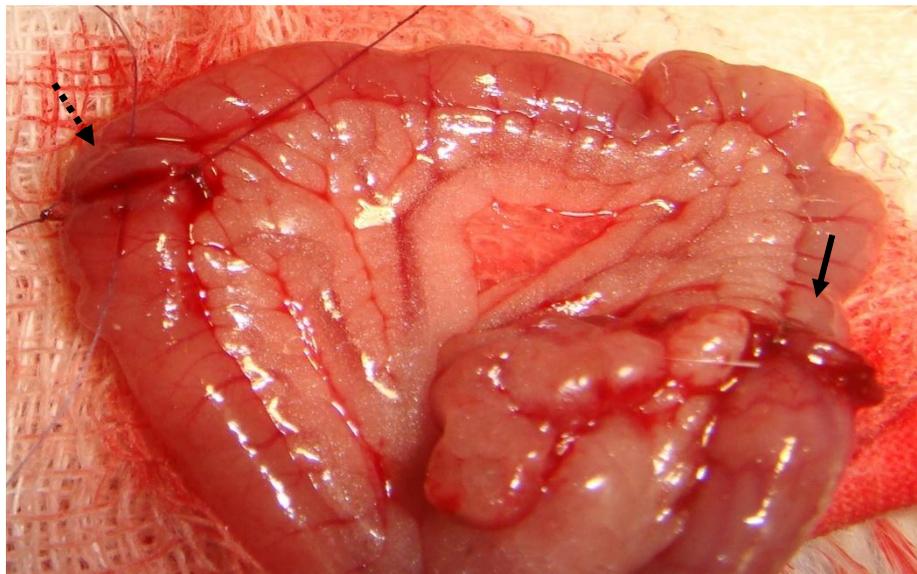


Figura 8 - Fotografia ampliada da operação em ratos demonstrando o término da aproximação das sermiotomias - anastomose ileocólica (seta); esfíncter artificial (seta tracejada).

10

A seguir verificava-se a hemostasia, a permeabilidade e a integridade da anastomose e do esfíncter artificial. Procedia-se o fechamento nas mesmas condições do grupo A.

15

O tempo cirúrgico dos animais do grupo A foi de 30 minutos e o do grupo B de 35 minutos.

3.3.3 Cuidados pós-operatórios.

No pós operatório imediato, os animais receberam morfina via subcutânea, na dose de 2,5 mg/kg para analgesia. Para o pós-operatório mediato o paracetamol era dissolvido em água 1-2 mg/ml e oferecido *ad libitum* (DAMY *et al.*,
5 2010).

Durante o período pós-operatório, os animais eram mantidos em armários e gaiolas individuais com finalidade de evitar a hipotermia e a aspiração de pó proveniente das maravalhas.

Os animais recebiam água no primeiro dia de pós-operatório. Nos dois
10 dias seguintes, recebiam ração triturada e umedecida em água. No quarto dia a alimentação pastosa era substituída por ração peletizada.

Os animais foram acompanhados por um período de 20 dias, sendo então pesados (TAB. 2 - APÊNDICE) e submetidos a nova operação para colheita do conteúdo intraluminal do segmento intestinal ileal e colônico.

15

3.3.4. Segundo ato operatório.

Os animais foram anestesiados com a mesma técnica do primeiro ato e posicionados para intervenção. Após abertura da parede abdominal com incisão extensa para exposição da cavidade peritoneal e liberação de aderências frouxas na
20 região anteriormente operada foi identificada a região da anastomose ileocólica e do esfíncter artificial. Observou-se dilatação das alças intestinais em todos os animais. Realizada enterotomia para colheita de conteúdo intraluminal com o emprego de espátula estéril individual. Em função da dilatação intraluminal das alças colheu-se maior volume dos segmentos do íleo e do colo em relação ao primeiro ato operatório
25 do segmento do íleo e do colo no grupo A. No grupo B, o conteúdo intraluminal foi colhido no segmento ileal antes e depois do esfíncter artificial, neste momento, rotulado como intermediário, e no segmento do colo após a anastomose (FIG. 9 A e B).

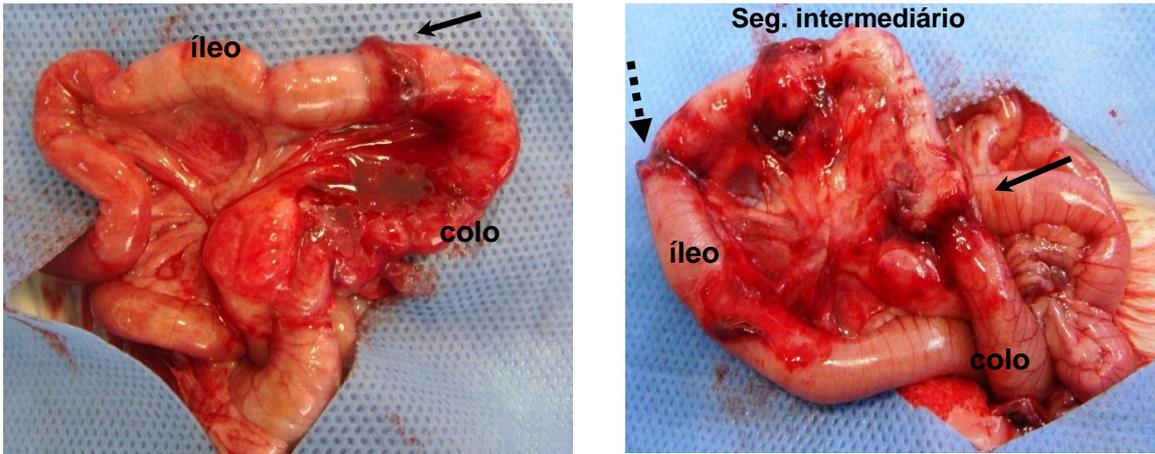


Figura 9 - Fotografia da segunda operação demonstrando os segmentos intestinais onde foi colhido conteúdo intraluminal no grupo A e no grupo B - esfíncter artificial (seta tracejada); anastomose ileocólica (seta contínua).

- 5 Os tubos estéreis com o conteúdo intraluminal foram devidamente identificados e armazenados sob as mesmas condições da primeira intervenção. A seguir os animais foram submetidos à eutanásia.

3.4. Processamento do material colhido.

10

Os tubos, devidamente rotulados com o conteúdo entérico colhido e conservados a 4°C negativos dos segmentos dos 14 animais, foram, adequadamente, transferidos para o Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) para realização da análise molecular da microbiota pelo método PCR – DGGE.

15

3.4.1. Amostras controle.

No primeiro ato operatório estavam catalogados 28 tubos de conteúdo intraluminal com volume reduzido que correspondia aos segmentos do íleo e do colo. Desses tubos foi retirado, separadamente e aproximadamente, 0,02 g referente

20

a cada segmento ileal e colônico dos animais do grupo A e do grupo B. O volume de 0,02 g de cada segmento ileal dos sete animais do grupo A foi transferido, adicionado e misturado em outro microtubo, gerando uma amostra de 0,150 g. O mesmo procedimento foi realizado para os outros segmentos: colo do grupo A, íleo e colo do grupo B, totalizando quatro amostras definidas com amostras controle.

3.4.2. Amostras do grupo após a intervenção.

No segundo ato operatório foram catalogados 35 tubos com conteúdo intraluminal colhido dos segmentos ileais e colônicos dos sete animais do grupo A e dos segmentos ileais, intermediários e colônicos dos sete animais do grupo B. Esses tubos continham maior volume em relação aos tubos da primeira intervenção. De cada tubo, foi retirado 0,150 g, que transferido para outros microtubos, individualmente, formando 35 amostras. Dessa forma, foram obtidas 39 amostras para extração do DNA, distribuídas conforme os grupos, os segmentos e os animais (TAB. 3 e 4).

TABELA 3 - Correlação entre os animais e as amostras para a extração do DNA do grupo A

Nº do animal	Amostras	
1ª intervenção	Controle A íleo	Controle A colo
1 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8		
1	1A-íleo	1A colo
3	3A íleo	3A colo
4	4A íleo	4A colo
5	5A íleo	5A colo
2ª intervenção		
6	6A íleo	6A colo
7	7A íleo	7A colo
8	8A íleo	8A colo

TABELA 4 - Correlação entre os animais e as amostras da extração do DNA do grupo B

Nº do Animal		Amostras		
1ª intervenção		Controle B íleo	-----	Controle B colo
	3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 -9			
	3	3B íleo	3B interm.	3B colo
	4	4B íleo	4B interm.	4B colo
	5	5B íleo	5B interm.	5B colo
	6	6B íleo	6B interm.	6B colo
2ª intervenção	7	7B íleo	7B interm.	7B colo
	8	8B íleo	8B interm.	8B colo
	9	9B íleo	9B interm.	9B colo

5 3.5. Análise da microbiota.

3.5.1. Extração e quantificação de DNA bacteriano das amostras entéricas.

O DNA bacteriano total foi extraído das 39 amostras, utilizando *QIAamp DNA Stool Mini kit* (QIAGEN®), segundo as recomendações do fabricante. As amostras de DNA extraídas foram analisadas em gel de agarose (Sigma-Aldrich®) 0,8% em tampão TAE 1X [Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1mM (pH 8,3)]. Após a eletroforese, o gel foi mantido sob agitação em solução de brometo de etídio (0,25 µg mL⁻¹) (SAMBROOK; FRITSH; MANIATIS, 1989). A quantificação foi realizada em Nanodrop 2000 Spectrophotometer Thecno Scientific. O DNA extraído foi submetido à visibilização no sistema de digitalização de imagem “Eagle Eye™” (Stratagene®).

3.5.2. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante.

Para a análise da diversidade da microbiota intestinal empregou-se a técnica de PCR - DGGE (MUYZER; DE WALL; UITTERLINDEN, 1993). Fragmentos do gene codificador dos rRNAs 16S de bactérias totais foram amplificados pela PCR, utilizando-se DNA extraído das amostras.

Para amplificar a região dos genes rDNA 16S de bactérias totais foram utilizados os *primers* específicos 1392R e 27F. As condições da reação foram 30 ciclos de um minuto a 94°C para a desnaturação, um minuto a 54° C para o anelamento e um minuto e 30 segundos a 72°C para a extensão. Para a realização do PCR-DGGE foram utilizados os *primers* 1378R e 984 que contêm o grampo GC (TAB. 5).

TABELA 5 - *Primers* utilizados para amplificação da região dos genes rDNA 16S 1392R 27F e para a reação de PCR-DGGE 984 e 1378R de bactérias totais.

<i>Primer</i>	Domínio	Sequenciamento DNA	Referência
1392R	Eubactéria	5'-ACGGGCGGTGTGTAC3'	MUYZER <i>et al.</i> , 1993
27F	Eubactéria	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'	
F984GC	Eubactéria	5'CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGG GCGGGGGCACGGGGGGAACGCGAAG AACCTTAC3'	HEUER <i>et al.</i> , 1997
R1378	Eubactéria	5'CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG3'	

A PCR-DGGE foi realizada em tubos de 200 µL para um volume final de 25 µl. A mistura de reação foi preparada com 5 µl de tampão GoTaq® Reaction Buffer (Promega, Madison, EUA), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Promega,

Madison, EUA), 200 μM de desoxirribonucleotídeo trifosfatados, 0,2 μM de cada oligonucleotídeo iniciador, 5 μg de albumina sérica bovina (BSA)[®] (Invitrogen), 2% (v/v) de formamida desionizada, 1,5 U de Taq DNA polimerase[®] (Promega, Madison, EUA), 20 ng de DNA total e água desionizada (MilliQ) esterilizada para completar o
5 volume final. A realização da PCR ocorreu sob condições de temperatura inicial a 95° por três minutos e 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para a desnaturação, 30 segundos à 57°C para o anelamento e um minuto e 30 segundos à 72°C para a extensão. A extensão final foi 72°C por sete minutos. O termociclador utilizado foi Techne TC – 512[®].

10 Os *amplicons*, fragmentos resultantes da amplificação do DNA por PCR, foram analisados em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 1,2% tampão TAE (Trisacetato 40 mM e EDTA 1 mM). Após a eletroforese, o gel foi mantido sob agitação em solução de brometo de etídio (0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Marcador de tamanho 100 pb DNA Ladder (Promega, Madison, EUA) foi
15 utilizado para estimativa dos tamanhos dos diferentes *amplicons*.

Para a separação dos diferentes *amplicons* em DGGE foram aplicados 18 μL dos produtos da PCR, em gel de poliacrilamida vertical em tampão TAE, sendo o gradiente de ureia/formamida de 40% a 60%. Para a separação dos *amplicons* obtidos na primeira reação da PCR foi utilizado gel de poliacrilamida a 6% (p/v), e
20 para os *amplicons* da segunda reação gel de poliacrilamida a 8% (p/v). A eletroforese foi conduzida em temperatura de 60°C e voltagem constante de 60 V durante 16 horas, e o gel, corado com SYBR[®] Gold (Invitrogen). As eletroforeses foram feitas em um equipamento “DCode™ Universal Mutation Detection System” (Bio-Rad – Califórnia EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

25

3.6. Análise estatística.

A estrutura da comunidade microbiana foi avaliada com base no coeficiente de similaridade de “Dice” e no método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*) para análise dos agrupamentos. Essa análise
30 obedeceu a critérios rigorosos considerando diferentes as bandas com desvios de menos 1% de semelhança. O critério usado na análise estabelece um algoritmo que

busca organizar e classificar taxonomicamente os dados observados com características comuns. Este método é empregado quando não se tem hipótese sobre a estrutura. Os resultados encontrados são o princípio podendo não imputar significância.

5 A comparação estatística dos perfis de bandas dos géis das 39 amostras obtidas após a PCR-DGGE foi realizada utilizando o programa BIONUMERICS (“Applied Maths, Kortrijk, Belgium”). A variável analisada, bactérias totais, foi estimada com base em uma matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO), foi codificada como
10 um (1) e ausência como zero (0).

Os dados obtidos com o auxílio do programa BIONUMERICS, foram utilizados para calcular os atributos riqueza, índice de diversidade Shannon-Weaver (H), e equitabilidade (E).

A riqueza representa o número de bandas do *fingerprint* genético no gel
15 do PCR-DGGE referidas como UTOs. A banda é a imagem, em densidade ótica, capturada no gel no momento da desnaturação nos pares de bases G+C durante a mobilidade eletroforética.

O índice de diversidade (H) é calculado como:

$H = 2,3 / N (N \log N - \sum ni \log ni)$ sendo N= soma da massa de todas as bandas
20 de DNA; ni= massa da banda de DNA.

A diversidade “Shannon-Weaver” é o índice de diversidade geral que aumenta com o número de espécies e é maior quando a massa de bandas é distribuída mais uniformemente entre as espécies. O índice de “Shannon Weaver” é apropriado para medir a diversidade de amostras aleatórias de espécies da
25 comunidade de interesse que não podem ser inventariadas. Este índice revela a variabilidade das categorias biológicas no local combinando dois atributos, a riqueza e a abundância das espécies existentes na comunidade. Trata-se de uma análise multivariada que independe de parâmetros de distribuição e estes atributos têm peso intermediário. No seu cálculo considera-se a proporção da espécie em relação ao
30 número total de indivíduos de cada espécie.

A equitabilidade (E) é expressa como:

$E=H/\log R$, em que H é o índice de diversidade e R representa o número de bandas.

5 A equitabilidade refere-se ao padrão de distribuição de bandas e é proporcional à diversidade, exceto se houver dominância de uma banda. Ela revela a distribuição homogênea dos indivíduos entre todas as espécies e caso todas as espécies tenham a mesma representatividade, a equitabilidade é considerada máxima.

10 Os valores de diversidade, equitabilidade e riqueza foram categorizados de acordo com o segmento e o grupo a que pertenciam (íleo A, colo A, íleo B, colo B) para a realização do teste estatístico ANOVA e teste T de Student no programa Statistical Package for the Social Sciences- SPSS. Ressalta-se que para a realização desse teste foram verificadas a homocedasticidade e normalidade por
15 meio dos testes de Levene e Shapiro Wilk, respectivamente.

5

10

4 RESULTADOS

4.1. Coeficiente de “Dice” e Índice de Shannon-Weaver das amostras.

A análise simultânea da comunidade bacteriana para o domínio de bactérias totais disposta no dendograma de coeficiente de similaridade de “Dice” apresentou uma distribuição do agrupamento pelo perfil de banda o qual não estabeleceu uma correspondência entre o animal e o segmento de onde foi realizada a colheita da amostra. A maior similaridade encontrada foi de 80% e os segmentos semelhantes pertenciam a segmentos intestinais de animais diferentes (FIG. 10 – APÊNDICE). Dessa forma, não foi possível identificar no dendograma uma análise comparativa da similaridade do conjunto de 39 amostras. Após nova análise no BIONUMÉRICS, foi possível estabelecer parâmetros de comparação em amostras dos segmentos de íleo e do colo com as amostras controle em três animais de cada grupo.

4.1.1. Análise do grupo A.

A média do índice de Shannon-Weaver comparada entre as amostras nos segmentos ileais e a amostra controle revelou uma redução da diversidade. A comparação das amostras do colo desse grupo mostrou um aumento da diversidade em relação à amostra controle (TAB. 6 FIG 11).

Tabela 6 - Valores das variáveis nas amostras do grupo A para todos os animais e segmentos

Amostras	H' Índice “Shannon Weaver”		Equitabilidade		Riqueza	
	Íleo A	Colo A	Íleo	Colo	Íleo	Colo
controle A	2,65	2,36	2,45	2,47	12	9
1A	2,57	2,67	2,31	2,33	13	14
3A	2,50	2,34	2,40	2,46	11	9
4A	2,71	2,49	2,51	2,94	12	7
5A	2,68	2,66	2,40	2,39	13	13
6A	2,77	2,93	2,30	2,44	16	16
7A	2,19	2,59	2,59	2,87	7	8
8A	2,70	2,71	2,43	2,37	13	14
Média/SD	2,59/0,19	2,63/0,18	2,42/0,10	2,54/0,25	12,14/2,73	11,57/3,50

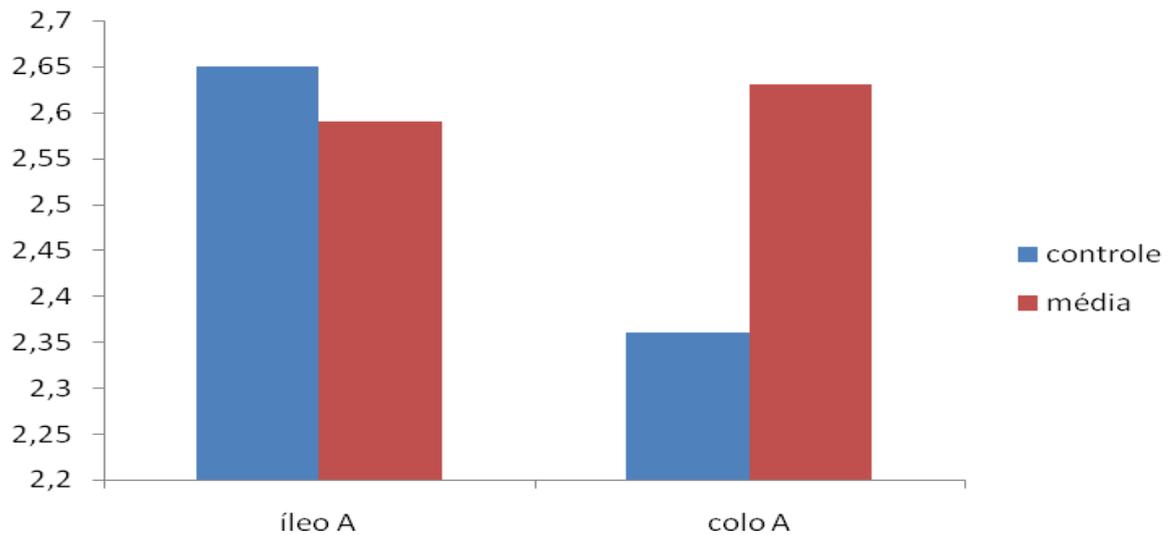


Figura 11 - Gráfico com os valores da diversidade comparada entre as amostras do íleo e do colo e as amostras controle do grupo A

5

4.1.2. Análise do grupo B.

A média da diversidade das amostras ileais e do colo foram maiores em relação à amostra controle dos respectivos segmentos (TAB. 7 FIG. 12).

Tabela 7 - Valores das variáveis nas amostras do grupo B para todos os animais e segmentos

10

Amostras	H' Índice de Shannon Weaver		Equitabilidade		Riqueza	
	Íleo	Colo	Íleo	Colo	Íleo	Colo
Controle B	2,38	2,39	2,50	2,50	9	9
3B	2,64	2,54	2,37	2,44	13	11
4B	2,63	2,61	2,44	2,50	12	11
5B	2,89	2,69	2,35	2,49	17	12
6B	2,69	2,92	2,42	2,37	13	17
7B	2,62	2,82	2,23	2,25	15	18
8B	2,40	2,30	2,84	2,55	7	8
9B	2,37	2,11	2,49	2,72	9	6
Média/SD	2,61/0,17	2,57/0,28	2,45/0,25	2,47/0,14	12,28/3,4	11,85/4,37

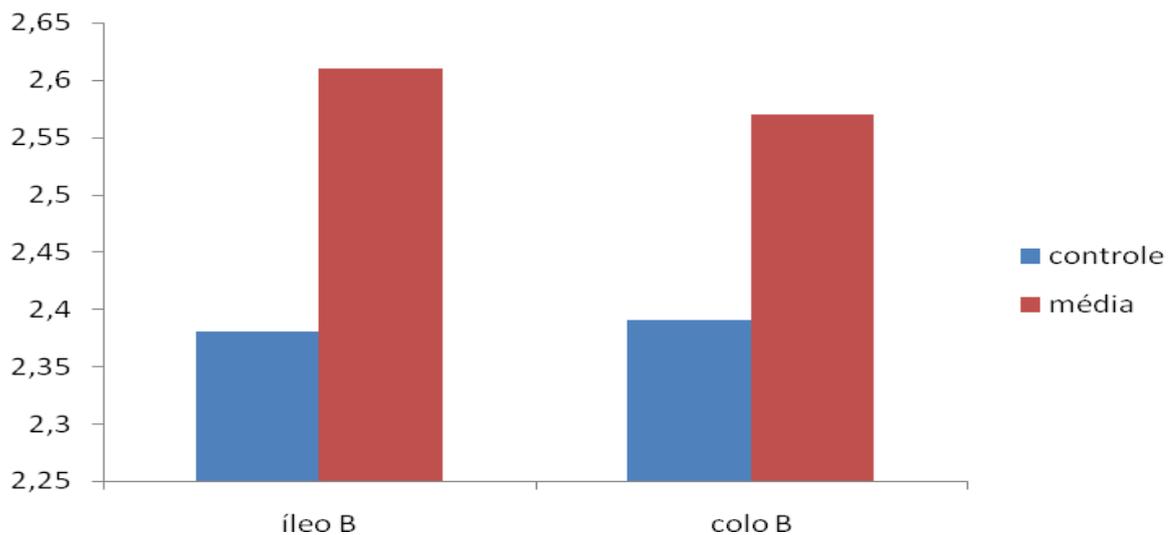


Figura 12 - Gráfico com os valores da diversidade comparada entre as amostras do íleo e do colo e as amostras controle do grupo B

5 4.1.3. Análise das médias.

O teste T de Student comparou as médias das amostras dos segmentos do pós-operatório com os valores obtidos das amostras controle dos respectivos segmentos. Na amostra do íleo do grupo B o valor da diversidade em relação à amostra controle foi significativo para $\alpha = 1\%$ ($p = 0,016$) (TAB. 8). Os resultados do colo A versus controle do colo A ($p = 0,009$) e colo B versus controle do colo B ($p = 0,043$) apresentaram o intervalo de confiança alargado portanto sem estabelecer significância.

Tabela 8 - Comparação da diversidade da amostras-controle com as demais amostras pelo Teste T de Student

Amostras	Íleo A	Íleo B	Colo A	Colo B
Controle íleo A	0,483			
Controle íleo B		0,016		
Controle colo A			0,009	
Controle colo B				0,043

4.2. Coeficiente de Similaridade com amostras comparáveis.

Os dendogramas gerados pela nova análise dos dados do BIONUMÉRICS para os três animais de cada grupo revelaram um agrupamento de perfis de bandas e formação de pares dos segmentos intestinais na eletroforese assim distribuída:

No grupo A, as amostras dos segmentos ileais e do colo dos animais 3, 4 e 5 se agruparam comparativamente com as amostras controle dos segmentos também agrupadas desse grupo. A similaridade para os segmentos ileal e colônico analisada foi de 55%, 75% e 85% nos animais 5, 4, e 3, respectivamente. Em relação às amostras controle a similaridade foi de 45% e ficaram externas aos agrupamentos dos três animais do grupo A (Figura 13).

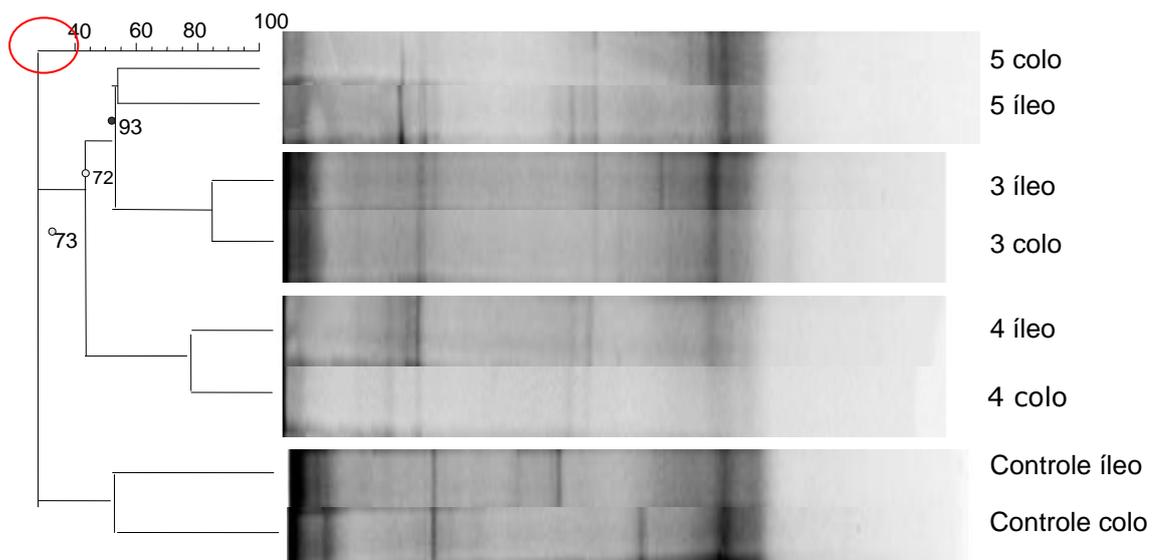
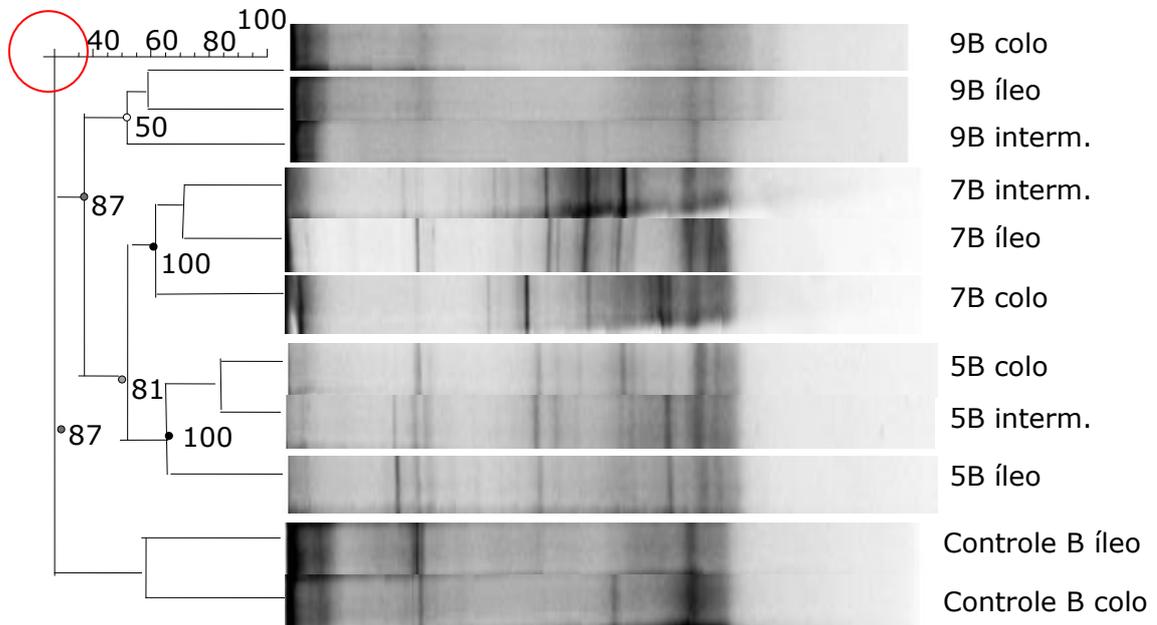


Figura 13 - Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S de bactérias totais nas amostras dos segmentos ileais e colônicos dos animais 5, 3, 4 e controle do grupo A.

No grupo B as amostras dos animais 5, 7 e 9 agruparam-se permitindo análise comparativa com o agrupamento dos segmentos das amostras controle. O índice de similaridade nas amostras do grupo B teve o acréscimo do segmento intermediário no agrupamento de bandas. A similaridade considerada por animal foi de 85% entre os segmentos colo e intermediário do animal 5. No animal 7 foi de 70% para o segmento íleo e intermediário. No animal 9 foi de 55% entre os

segmentos colo e íleo. Em relação ao controle a similaridade dos segmentos foi de 55% e esta também ficou a parte dos das amostras outros animais (FIG. 14).



5 **Figura 14** - Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S de bactérias totais nas amostras dos segmentos ileais, intermediário e colônicos dos animais 9, 7, 5, e controle do grupo B.

10 As variáveis riqueza, equitabilidade e o índice de diversidade do grupo A e do Grupo B que possibilitaram comparações do coeficiente de similaridade estão discriminados na TAB. 9 e 10.

4.2.1. Análise do índice de “Shannon Weaver”.

15 Os valores da diversidade variaram de 2,34 a 2,71 sendo a média das amostras ileais de 2,63 próxima do valor da amostra controle no grupo A de 2,65. Nas amostras colônicas a média foi de 2,6 em relação à amostra controle, de 2,36.

No grupo B a diversidade variou de 2,11 a 2,89 após a intervenção e a média das amostras ileais foi de 2,46 versus 2,38 da amostra controle. Para as amostras colônicas a média foi de 2,54 versus 2,39 da amostra controle. Nesses

dados não foram realizados o teste t de Student. A diversidade no pós-operatório aumentou nas amostras de vários segmentos exceto no segmento ileal do grupo A.

4.2.2. Análise da equitabilidade.

5

Esse atributo apresentou valores que variaram de 2,39 a 2,94 nas amostras do grupo A e de 2,23 a 2,72 nas amostras do Grupo B. A média nas amostras pós intervenção foi maior apenas para as amostras colônicas do grupo A em relação à amostra controle. Nas demais comparações as médias foram menores porém com valores próximos às amostras controle.

10

4.2.3. Análise da riqueza.

Foram encontrados valores da riqueza variando de 7 a 13 UTOs no grupo A e de 6 a 18 UTOs no grupo B no pós intervenção. Na amostra controle do íleo no grupo A a riqueza foi de 12 UTOs, nas demais amostras controle foi de 9 UTOs-

15

Tabela 9 - Valores encontrados para as variáveis (atributos) diversidade, equitabilidade e riqueza das amostras comparáveis do grupo A

	H Índice de Diversidade	Equitabilidade	Riqueza
controle íleo	<u>2,65</u>	2,45	12
controle colo	2,36	2,47	9
3A íleo	<u>2,50</u>	2,40	11
3A colo	2,34	2,46	9
4A íleo	<u>2,71</u>	2,51	12
4A colo	2,49	<u>2,94</u>	7
5A íleo	2,66	<u>2,39</u>	13
5A colo	2,68	2,40	13

Tabela 10 - Valores encontrados para as variáveis (atributos) diversidade, equitabilidade e riqueza das amostras comparáveis do grupo B.

5

Amostras	H Índice		
	de Diversidade	Equitabilidade	Riqueza
controle íleo	2,38	2,50	9
controle colo	2,39	2,50	9
9B colo	<u>2,11</u>	<u>2,72</u>	6
9B íleo	2,37	2,49	9
5B colo	2,69	2,49	12
5B íleo	<u>2,89</u>	2,35	17
7B colo	2,82	2,25	18
7B íleo	2,62	<u>2,23</u>	15

Valores maiores e menores sublinhados. Valores das amostras ileais em negrito

5

10

5

DISCUSSÃO

O número de animais selecionados se baseou no princípio dos três “Rs” de Russel (RUSSEL; BURCH 1959 *apud* DAMY *et al.*, 2010). Embora tenhamos usado sete animais, apenas em três animais de cada grupo houve agrupamento das bandas nos géis do DGGE passível de comparação do coeficiente de similaridade entre as amostras dos segmentos pré e pós intervenção. As amostras-controle foram diferentes em mais de 50% em relação às amostras dos outros animais, levando a pensar que a intervenção possa ter causado alguma modificação. O método empregado poderá ser reproduzido e permite a ampliação do estudo para análise da microbiota nos diversos micro ambientes, tanto nos de distribuição longitudinal com mais segmentos explorados, quanto nos de distribuição transversal contida na camada mucosa da parede intestinal. (BARBOSA *et al.*, 2010; KIM; KIM; CERNIGLIA, 2011)

A criação de mecanismos esfinterianos no intestino delgado é relacionada com o controle da velocidade de trânsito intestinal, principalmente nas ressecções extensas do intestino. Estudos em ratos, cães e em humanos mostraram que as válvulas artificiais tornam o trânsito intestinal mais lento e promovem ganho ponderal após ressecções intestinais (FURTADO *et al.*, 2008; RENA *et al.*, 1996; STACCHINI *et al.*, 1986). Aliado a esses resultados, algumas técnicas descritas, mostraram a redução da colonização dos segmentos proximais do intestino delgado, analisadas por método de cultivo em meios seletivos ou com testes respiratórios com glicose –H₂ (MYRVOLD *et al.*, 1984; ZURITA *et al.*, 2004). Os primeiros possuem a desvantagem de não abrangerem o universo da microbiota intestinal, pois as espécies cultiváveis representam 40% das existentes no intestino. Para as bactérias cultiváveis existem limitações na execução do método pela dependência de meios seletivos de cultura, assim como pela necessidade de sobrevivência dessas bactérias nos meios de transporte e de estocagem (HAYASHI; SAKAMOTO; BENNO, 2002).

Outra forma de avaliação do comportamento da população de bactérias intestinais está no emprego de testes respiratórios de H₂. Trata-se de um teste funcional que caracteriza o supercrescimento bacteriano, sem identificação das espécies (BALLESTEROS POMAR; VIDAL CASARIEGO, 2007).

O emprego de método de biologia molecular com maior especificidade e sensibilidade tem revelado mais informações sobre esse ecossistema (COTTER, 2011; FURRIE, 2010; MARCHESI; SHANAHAN, 2007). O experimento em questão obteve sucesso na extração do DNA das amostras de conteúdo intestinal. Em razão
5 de as condições dos animais e da colheita no primeiro ato operatório obedecerem a uma padronização, a agregação proporcional do volume das amostras colhidas por segmentos levou a formação de uma amostra controle com uma mistura de representação da diversidade da microbiota do íleo e do colo de todos os animais. No segundo ato operatório, a dilatação presente no íleo e no colo facilitou a retirada
10 de um volume maior de conteúdo intraluminal para a análise, além de a resposta ao trauma de cada animal ao ato operatório ter sido considerada um fator de impacto para a análise individual das amostras. O uso do “Mini Kit” escolhido resultou na extração de DNA bem sucedida e a ampliação dos fragmentos genéticos foi realizada com a reação de PCR-DGGE para estabelecer a diversidade da microbiota
15 nas diversas amostras (ARIEFDJOHAN; SAVAIANO; NAKATSU, 2010).

O método de PCR-DGGE é uma técnica utilizada nos estudos de ecologia microbiana com resultados representativos na identificação da riqueza e abundância de diferentes filotipos das amostras e possibilita estimativas reais da diversidade microbiana (HUYS; VANHOUTTE; VANDAMME, 2008; POSSEMIERS *et al.*, 2004;
20 YANG *et al.*, 2009).

A diversidade da microbiota ileal encontrada foi igual ou maior que a do colo nas amostras controle. Esse resultado pode significar que os dados até o momento encontrados na literatura podem subestimar a diversidade da microbiota ileal. Ou o resultado encontrado justifica-se no fato de a variedade de espécies
25 encontradas no íleo serem diferentes daquelas do colo, que possui uma concentração maior, porém com menor variedade (MACFARLANE; MACFARLANE, 1997).

O *primer* universal empregado no estudo para o domínio eubactéria determinou uma especificidade ampla do resultado. A utilização do grampo GC
30 aumenta a sensibilidade do método em aproximadamente 100% (MUYZER; DE WALL; UITTERLANDEN, 1993). A composição filogenética da microbiota intestinal é representada por três domínios *Eukaria*, *Archaea* e *Eubacteria* (bactéria), com cerca

de 36.000 espécies (COTTER, 2011). A opção de extrair o DNA do domínio de eubactérias e analisar sua diversidade foi em função da possibilidade de ampliação e individualização do estudo para espécies representantes do domínio, como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococos*, *Escherichia coli* e *Clostridium*.

5 A dificuldade de obtenção de material do sistema digestório para identificação do perfil bacteriano está no acesso aos segmentos do intestino delgado. Machado *et al.* estudaram em pacientes com refluxo coloileal a ocorrência de supercrescimento bacteriano por meio de análise de teste respiratório com D-xilose associado à biossusceptometria de corrente alternada e descreveram que os
10 dados encontrados não foram definitivos para estabelecer comparação entre o supercrescimento e a incompetência da junção (MACHADO *et al.*, 2008). Zilberstein *et al.*, (2007) realizaram a colheita de secreções intraluminal do tubo digestório de pacientes saudáveis por meio de introdução de uma sonda Probe guiada por radioscopia com acesso aos segmentos do intestino delgado proximal. Nos
15 segmentos distais do íleo a colheita foi realizada por via colonoscópica. A amostra colhida foi submetida à cultura de meios seletivos para bactérias anaeróbias e aeróbias com concentrações diferentes para os vários segmentos com representatividade de muitas espécies (DAVE *et al.*, 2011; ZILBERSTEIN *et al.* 2007). Corroborando a dificuldade de acesso a essa porção do sistema digestório,
20 mesmo sob intervenção direta na região ileocecal, o volume do conteúdo intraluminal do segmento ileal colhido foi aquém do preconizado para a extração do DNA.

A opção pelo trabalho experimental, ainda que não possa ser transferido para o humano, permitiu a colheita de material de uma região de transição do
25 sistema digestório considerada rica, do ponto de vista microbiológico e possuidora de uma barreira anatômica, para ascensão de bactérias, como a válvula ileocecal. As amostras controle representam a estrutura da microbiota habitual de animais saudáveis criando um padrão para a comparação com o perfil microbiano na ausência da válvula ileocecal e perda do efeito de barreira à colonização
30 (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005).

A alta concentração bacteriana no colo encontra justificativa principalmente na peristalse reduzida associada ao baixo potencial de oxirredução

(BARBOSA *et al.*, 2010; ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004). A criação de esfíncteres com técnicas diferentes da empregada é defendida em trabalhos que demonstraram a redução da colonização de segmentos proximais do intestino delgado, porém utilizando-se de comprovação da colonização por meio de métodos
5 funcionais ou de meio de cultura. Com o método de PCR-DGGE não foram encontrados relatos que corroborem esse fato. A criação do esfíncter artificial causa dilatação e redução da velocidade do trânsito intestinal. Os resultados com aumento discreto da riqueza e diversidade do grupo B em relação ao grupo A encontrados no presente trabalho podem decorrer dessa lentificação de trânsito. Importante ressaltar
10 que o único segmento que apresentou aumento significativo da diversidade em relação ao controle foi o das amostras ileais do grupo com a criação do esfíncter artificial.

Embora existam evidências de que a construção de esfíncteres previna o refluxo coloileal, os trabalhos que as descrevem utilizam-se de métodos de cultura
15 seletivo para comprovar ou não a redução da colonização do intestino delgado (KHOLOUSSY *et al.*, 1986; RICHARDSON; GRIFFEN, 1972, RICOTTA *et al.*, 1981; ZURITA *et al.*, 2004). Nesse experimento, pelo método de PCR-DGGE, não ficou evidente que a criação do esfíncter interferiu na distribuição da diversidade da microbiota, uma vez que não foi identificado um padrão de comportamento que
20 permitisse estabelecer uma comparação entre os grupos com e sem a válvula. A reprodução do procedimento cirúrgico com desenho ampliado para estudar a microbiota da mucosa intestinal poderá gerar um estudo que compare as amostras de um único animal, pois o emprego da biologia molecular aliado a esse tipo de análise estatística tem a vantagem de não necessitar de grande tamanho amostral
25 (MELO, 2008).

Os resultados encontrados pela análise multivariada realizada neste trabalho mostraram valores diversos dos atributos que não obedeceram a um padrão regular. Ora as amostras do segmento ileal, ora as do segmento do colo apresentavam valores para a riqueza, diversidade e equitabilidade,
30 independentemente do animal ou do grupo a que pertencia. Esses dados podem ser explicados pelo próprio comportamento da microbiota que sofre influências das condições do meio com variações dependentes de fatores do micro habitat como pH, concentração de O₂, disponibilidade de nutrientes e motilidade dos segmentos

intestinais, assim como do hospedeiro que se encontram sob situação de estresse (SIMON; GORBACH, 1986; SUCHODOLSK *et al.*, 2004).

O critério de escolha da análise multivariada contribuiu para a análise da estrutura comunitária a ser investigada com mais propriedade. No entanto, é importante a continuação da pesquisa individualizando as espécies por meio de outras reações de PCR com *primers* específicos. Outra proposta é a quantificação de fragmentos das várias espécies que compõem o domínio de bactérias totais pelo método de PCR em tempo real (*Real Time PCR*) (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004; TEIXEIRA, 2008).

5

10

6 CONCLUSÕES

6.1 – Geral.

A diversidade da microbiota intestinal foi maior nas amostras do segmento ileal do que nas do segmento do colo na presença anatômica e fisiológica da valva ileocecal.

6.2 – Específicas.

A diversidade da microbiota das amostras dos segmentos do íleo reduziu após a retirada da valva ileocecal. Na amostras dos segmentos do colo houve um aumento.

Após a criação do “esfíncter artificial” a diversidade das amostras tanto dos segmentos do íleo quanto dos segmentos do colo aumentou, com significância apenas para as do íleo.

A similaridade de agrupamento eletroforético, das amostras passíveis de comparação, revelou que as amostras controle do íleo e do colo se agruparam sem semelhança com as amostras pós-intervenção nos dois grupos.

5

10

7. REFERÊNCIAS

15

ALMEIDA, L..B. *et al.* Disbiose intestinal. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, Porto Alegre, v.24, n.1, p.58-65, jan. 2009.

5 ANDERSEN, M. L. *et al.* **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo. 2004. 68p.

ANTUNES, A. E. C. *et al.* Probióticos: agentes promotores de saúde. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.**, São Paulo, v.32, n.3, p.103-122, dez. 2007.

10

ARIEFDJOHAN, M. W.; SAVAIANO, D. A.; NAKATSU, C. H. Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. **Nutr. J.**, West Lafayette, v.9, p.23, maio 2010.

15 AWAPITTAYA, B. *et al.* New concept of ileocecal junction: intussusception of the terminal ileum into cecum. **World J. Gastroenterol.**, Beijing v.13, n.20, p.2855-2857 maio 2007.

20 BACELAR, S. *et al.* Expressões médicas: falhas e acertos. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, São José do Rio Preto, v.18, n.3, p.III-XII, jul./set. 2003.

BALLESTEROS POMAR, M. D.; VIDAL CASARIEGO, A. Síndrome de intestino corto: definición, causas, adaptacion intestinal y sobrecrecimiento bacteriano. **Nut. Hosp.**, Madrid, v.22, p.74-85, fev. 2007. Supl. 2.

25

BARBOSA, F. H. F. *et al.* Microbiota indígena do trato gastrointestinal. **Revista Biol Ciênc Terra**, João Pessoa, v. 10, n.1, p.78-93, 1º semestre, 2010.

BARRA, A. A. *et al.* Estudo morfológico do intestino de ratos após a criação cirúrgica de esfínteres artificiais. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v.35, n.2, p.109-113, mar./abr. 2008.

- 5 BLANCO-BENEVIDES, R.; NIÑO, J. Construction of a new intestinal valve. **Dis. Colon Rectum**, Mexico City, v.37, n.6, p.606-609, jun. 1994.

BURES, J. *et al.* Small intestinal bacterial overgrowth syndrome. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v.16, n.24, p.2978-2990, jun. 2010.

10

COTTER, P. D. Small intestine and microbiota. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, Philadelphia, v.27, n.2, p.99-105, mar. 2011.

- DAMY, S. B. *et al.* Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em
15 cirurgia experimental. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v.56, n.1, p.103-11, jun. 2010.

- DAVE, M. *et al.* A randomised trial of sheathed versus standard forceps for obtaining
uncontaminated biopsy specimens of microbiota from the terminal ileum. **Gut.**,
20 London, v.60, n.8, p.1043-1049, fev. 2011.

DEOTI, B. *et al.* Histological study of the left colon of rats after extra-mucosal seromyotomy (continent valves). Evaluation of colonic emptying. **Act. Cir. Bras.**, São Paulo, v.23, n.3, p.230-236, maio/jun. 2008

25

DI DIO, L. J. A. **Dados anatômicos sobre o “piloro” íleoceco cólico (com observação direta in vivo de “papila” ileo-ceco-cólica).** 1952. 241f. Tese (Docência Livre), - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, 1952.

- 5 DI DIO, L. J. A. Lançamento oficial da *Terminologia Anatomica* em São Paulo: um marco histórico para a medicina brasileira. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v.46, n.3, 191-193, jul./set. 2000.

10 DUARTE, R. T. D. **Microorganismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras e permafrosts polares.** 2010. 202f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, SP, 2010.

15 DUDRICK, S.J.; LATIF, I. R.; FOSNOCHT, D. E. Management of the short-bowel syndrome. **Surg Clin North Am.** Philadelphia, v.71, n.3, p.62-9, jun. 1991.

FERREIRA, L. M. ; HOCHMAN, B. ; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. **Act. Cir. Bras.**, São Paulo v.20, p.28-34, 2005 Supl. 2.

20 FISCH, M. *et al.* Ileocecal valve reconstruction during continent urinary diversion. **J. Urol.**, Baltimore, v.151, n.4, p.861-865, abr., 1994.

FOLARANMI, S. *et al.* Ileocecal valve: how important is it? **Pediatr. Surg. Int.**, Manchester, v.27, p.613-615, jan. 2011.

25

FRANK, D. N. *et al.* Investigating the biological and clinical significance of human dysbioses. **Trends in Microbiol.**, Cambridge, v.19, n.9, p.427-434, jul. 2011.

FURRIE, E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. **Gut.**, London, v.55, n.2, p.141-143, fev. 2006.

5 FURTADO, M. C. V. **Morfometria dos vilos intestinais de ratos submetidos à ressecção intestinal e à criação cirúrgica de válvulas artificiais.** 2008 112f. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008

10 FURTADO, M. C. V. *et al.* Influência de válvulas artificiais sobre a morfometria intestinal de ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v.35, n.5, p.315-322, set./out. 2008.

GAZET, J.C.; KOPP, J. The surgical significance of the ileocecal junction. **Surgery**, St. Louis, v.56, n.3, p.565-573, set. 1964.

15

GLASSMAN, J. A. An artificial ileocecal valve. **Surg Gynecol Obst** , Chicago, v.74, p.92-8, 1942.

20 HAYASHI, H.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. **Microbiol. Immunol.** Saitama, v. 46, n.8 p.535-548, maio 2002.

25 HEUER, H. *et al.* Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Appl. Environ. Microbiol.**, Braunschweig, v.63, p. 3233-3241, ago.1997.

HUYS, G.; VANHOUTTE, T.; VANDAMME, P. Application of sequence-dependent electrophoresis fingerprinting in exploring biodiversity and population dynamics of human intestinal microbiota: what can be revealed? **Interdiscip. Perspect Inf. Dis.** Ghent, v.2008, p.1-26, set. 2008.

5

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Prat. Res. Clin. Gastroenterol.**, London, v.18, n.2, p. 299-313, abr. 2004.

10 KHOLOUSSY, A. M. *et al.* The competence and bacteriologic effect of the telescoped intestinal valve after small bowel resection. **Am. Surg.**, Atlanta, v.52, n.10.p.555 - 559, out. 1986.

15 KIM, Bong-Soo; KIM, J. N.; CERNIGLIA, C. E. In vitro culture conditions for maintaining a complex population of human gastrointestinal tract microbiota. **J. Biomed. Biotechnol.**, Jefferson, v.2011 p.838-40. jan. 2011.

KINROSS, J. M.; DARZI, A. W.; NICHOLSON, J. K. Gut microbiome-host interactions in health and disease. **Genome Med.**, London, v.3, n.14, p.2-12, mar. 2011.

20 LÁZARO DA SILVA, A. Tentativa de tratamento do “dumping” através de um “esfíncter” ileal. **Rev Assoc Med. Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 25, n. 1, p. 32-3, 1974.

25 LÁZARO DA SILVA, A. Amputação abdômino-perineal com colostomia perineal. **Rev Bras Colo Proct.**, Rio de Janeiro, v. 11, n.3, p.105-8, out/dez. 1991.

MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. **Scand. J. Gastroenterol. Suppl.**, Cambridge, v.222, p.3-9, 1997.

- 5 MACHADO, W. M.; MORCELI, J. Prevalência, classificação e características do refluxo cecoileal diagnosticado pelo enema opaco. **Radiol Bras.**, São Paulo, v.39, n.2, p.107-111, mar./abr. 2006.

- MACHADO, W. M. *et al.* The small bowel flora in individuals with cecoileal reflux. **Arq. Gastroenterol.**, São Paulo, v.45, n.3, p.212-218, jul /set. 2008.

MAEGAWA, F. A. B. *et al.* Reconstituição da válvula ileocecal em cães. **Act. Cir. Bras.**, São Paulo, v.20, n.1, p.55-63, jan./fev. 2005.

- 15 MARCHESI, J.; SHANAHAN, F. The normal intestinal microbiota. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, London, v. 20, n.5, p.508-513, out. 2007.

MELO, A. S. O que ganhamos 'confundindo' riqueza de espécies e equalibilidade em um índice de diversidade? **Biota neotrop.**, São Paulo, v.8, p.21-27 n.3, jul /set. 2008.

20

MONTALTO, M. *et al.* Intestinal microbiota and its functions. **Dig Liver Dis Suppl.**, Rome. v. 3, n.2, p. 30–4, jul. 2009.

- MYRVOLD, H. *et al.* The nipple valve as a sphincter substitute for the ileocecal valve; prevention of bacterial overgrowth in the small bowel. **Surgery**, St. Louis, v.96, n.1, p.42-47, jul. 1984.

25

- MUYZER, G.; DE WALL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient electrophoresis analysis of polymerase chain reaction- amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, Leiden, 5 p.695-700, mar. 1993.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). **Rev. Biotecnol. Cienc. Desenvol.**, São Paulo, v.33, p.10-13, jul./dez. 2004.
- 10
- POSSEMIERS, S. *et al.* PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS Microbiol. Ecol.**, Ghent, v.49, n.3, p.495-507, maio 2004.
- 15
- QUERA, R. P.; QUIGLEY, E. M. M.; MADRID S. A. M. Sobrecrecimento bacteriano intestinal. **Rev. Med. Chile**, Santiago, v.133, p.1361-1370, nov. 2005.
- RENA, C. L. *et al.* Seromiotomia dupla no intestino delgado: tentativa de criação de um piloro. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 23, n.3, p.143-147, fev.1996.
- 20
- RENA, C. L. *et al.* Alterações morfométricas da musculatura dos músculos longitudinal e circular de retos submetidos à criação de piloros no intestino delgado. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro v. 34, n.1, p.41-47, jan./fev. 2007.
- 25
- RENDLEMAN, D. F. *et al.* Reflux pressure studies on the ileocecal valve of dogs and humans. **Surgery**, St. Louis, v.44, n.4, p.640-643, out. 1958.

RICHARDSON, J. D.; GRIFFEN, W. O. Ileocecal valve substitutes as bacteriologic barriers. **Am. J. Surg.**, New York, v.123, n.2, p.149-153, fev.1972.

5 RICOTTA, J. *et al.* Construction of an ileocecal valve and its role in massive resection of the small intestine. **Surg. Gynecol. Obstet.**, Chicago, v.152, n.3, p.310-314, mar. 1981.

SAAD, S. M. I. Pró-biótico e pré-bióticos: o estado da arte. **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo. v. 42, n. 1, p. 1-16, jan./mar. 2006.

10

SAIKI, R. K. D. H. *et al.* Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, Emeryville. v. 239, p.487-491, jan. 1988.

15 SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2ª edição. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989.

SANTOS, A. C. A. L. **Uso de probióticos na recuperação da flora intestinal**. 2010. 39f. Trabalho de conclusão de Curso (Especialização) quesito parcial para obtenção do título de especialista em terapia nutricional – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição, Rio de Janeiro, 2010.

25

SCHILLER, W.R.; DI DIO, L.J.A; ANDERSON, M.C. Production of artificial sphincters. Ablation of the longitudinal layer of the intestine. **Arch Surg.**, Chicago, v. 95, n.3, p.436-42, set. 1967.

SEKIROV I, *et al.* Gut microbiota in health and disease. **Physiol Rev.**, Bethesda, v. 90, n.3, p.859-904, jul. 2010.

SENCAN, A. *et al.* Does ileal reverse segment in rats with short bowel syndrome change intestinal morphology? **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, New York, v.34, n.2, p.165-168, fev. 2002.

- 5 SIMON, G. L.; GORBACH, S. L. The human intestinal microflora. **Digestive Dis. Sci.**, New York, v.3, sup.9, p.147s-162s, set. 1986.

- SIQUEIRA, S. L. *et al.* Estudo de válvulas artificiais no cólon esquerdo após amputação abdominoperineal parcial do reto mais colostomia perineal, em cães. **Arq Gastroenterol.**, São Paulo, v.43, n.2, abr./jun. 2006.

STACCHINI A., *et al.* Intestinal transit time is delayed by artificial sphincters after massive enterectomy in dogs. **Am J Surg.**, New York, v.151, n.4, p.480-3, abr. 1986.

- 15 SUCHODOLSKI, J. S. *et al.* Application of molecular fingerprinting for qualitative assessment of small-intestinal bacterial diversity in dogs. **J. Clinic. Microbiol.**, Washington, v.42, n.10, p.4702-4708, out. 2004.

- TANNOCK, G.W. Molecular assessment of intestinal microflora. **Am J Clin Nutr.**, Bethesda, v.73, p.410s-414s, fev. 2001.

- TEIXEIRA, R. E. **Avaliação da microbiota indígena do intestino de seres humanos por método dependente de cultivo e por PCR em Tempo Real.** 120f. Tese (Doutor em Microbiologia) Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), 2008.

VANDERHOOF, J.A.; LANGNAS, A. N. Short-bowel syndrome in children and adults. **Gastroenterology**, Baltimore, v.113, n.5, p.1767-78, nov. 1997.

5 YANG, Jin-Long *et al.* New strategies for electrophoresis analysis of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR in animal intestinal microflora. **J. Microbiol. Meth.**, Amsterdam v.77, n.1, p.63-66, abr. 2009.

ZILBERSTEIN, B. *et al.* Digestive tract microbiota in healthy volunteers. **Clinico**, São Paulo, v.62, n.1, p.47-54, fev. 2007.

10

ZURITA, M. *et al.* Nuevo tipo de neoválvula em la cirugía del intestino corto. **Rev. Esp. Enferm. Dig.**, Madrid, v. 96, n.2, p.110-118, fev. 2004.

15

20

** ABNT-

FRANÇA, J. L.; VASCONCELOS, A. C. de. **Manual para normalização de publicações técnico-científicas**. 8. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG. 2008. 255 p.

5

10

8. APÊNDICE

TABELA 1 - Peso pré-operatório, em gramas, dos animais dos grupos A e B na primeira intervenção

Animal	A	Animal	B
1	336,67	3	312
3	354	4	346
4	305	5	291
5	337,5	6	350
6	297,4	7	299,1
7	324	8	337,78
8	353	9	349
Mínimo	297,4		291
Máximo	353		350
M ± DPM	329,65 ± 22,09		326,41 ± 25,12

5 **TABELA 2** - Peso pré-operatório, em gramas, dos animais na segunda intervenção.

Animal	A	Animal	B
1	347,7	3	307
3	332	4	302
4	306	5	286
5	324	6	330
6	231	7	291
7	325	8	284,45
8	290	9	332
Mínimo	231		286
Máximo	347,7		332
M ± DPM	307,95 ± 38,63		304,63 ± 19,77

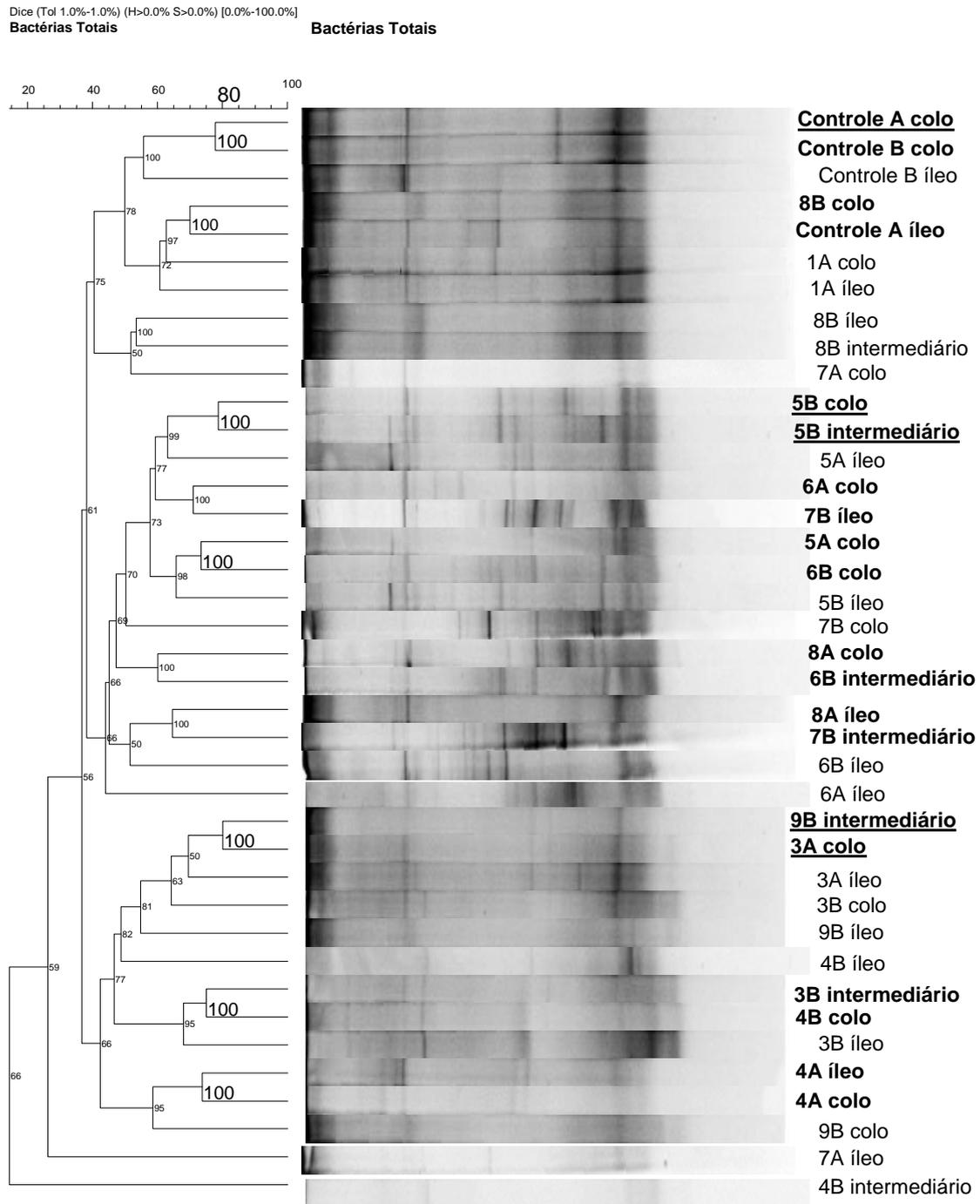


Figura 10 - Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S de bactérias totais nas amostras dos segmentos intestinais de todos os animais. Amostras em destaque de negrito foram as que se agruparam com similaridade acima de 70%.

5

10

9 ANEXO

15



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA

Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO –

Certificamos que o Protocolo nº 021/2010 – CEEA sobre “Análise da microflora de ratos submetidos à ressecção de segmento ileocecal e reconstrução do trânsito com criação de válvula artificial”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Alcino Lázaro da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 15/06/2010.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 021/2010 - CEEA about “Análise da microflora de ratos submetidos à ressecção de segmento ileocecal e reconstrução do trânsito com criação de válvula artificial” – Alcino Lázaro da Silva - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 15/06/2010.

Juiz de Fora, 21 de junho de 2010


 Presidente/CEEA


 Secretário/CEEA