UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

EDUARDA DE CASTRO FURTADO

Microbiota intestinal de pacientes portadores da
Síndrome do Intestino Curto

Ribeirão Preto – SP

2010

EDUARDA DE CASTRO FURTADO

**Microbiota intestinal de pacientes portadores da Síndrome do
Intestino Curto**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Nutrologia

Orientadora: Dra. Vivian Marques Miguel
Suen

Ribeirão Preto

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Furtado, Eduarda de Castro

Microbiota intestinal de pacientes portadores da Síndrome do Intestino Curto – Ribeirão Preto, 2010.

xx, 83p.: il.; 30cm

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP/USP, Departamento de Clínica Médica – Sub-área: Nutrologia

Orientadora: Suen, Vivian Marques Miguel

1. Síndrome do Intestino Curto
2. Microbiota intestinal
3. Enterobacteriaceae

Nome: FURTADO, Eduarda de Castro

Título: Microbiota intestinal de pacientes portadores da Síndrome do Intestino

Curto

Dissertação apresentada a Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas

Aprovada em:

Banca examinadora

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Aos pacientes portadores da Síndrome do Intestino Curto
participantes deste projeto que a cada dia de convivência, a cada
dificuldade superada, a cada batalha vencida me fizeram enxergar
melhor meu mundo, com mais sentimento e leveza, e acreditar que
nós fazemos nossos problemas do tamanho que queremos.

Agradecimientos

À minha orientadora, Dra. Vivian Marques Miguel Suen, por todo apoio, dedicação, amizade e confiança em mim e em meu trabalho, pelo acolhimento maternal desde o início da minha graduação.

Ao Prof. Dr. Júlio Sérgio Marchini, ser humano ímpar que exerce uma função que transcende a de simples professor. É exemplo e definição de Mestre, aquele não dá aula simplesmente, mas o que faz a pergunta. Possuidor da sabedoria do conviver em harmonia com seus estudantes, obrigada por fazer de cada conversa verdadeiros ensinamentos. E obrigada principalmente pelas perguntas sem resposta que me motivam a crescer pessoal e profissionalmente.

Ao Prof. Dr. Gutemberg de Melo Rocha por me abrir as portas do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Rodrigues Coelho e a técnica Carol Kobori da Fonseca pela assistência laboratorial.

À Profa. Dra. Cláudia Maffei por disponibilizar equipamentos de seu laboratório.

Ao Dr. Ebert Hanna (Ita) pela disponibilidade, gentileza e presteza sempre. Obrigada pelos incentivos e críticas tão fundamentais para este trabalho.

Aos membros da Unidade Metabólica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – HCFMRP/USP – pela solicitude, incentivos e dedicação aos seus respectivos trabalhos.

Ao meu grande amigo e companheiro de laboratório Marcos por me acompanhar em todas as empreitadas (desde correção de dissertação,

natação de “madrugada” até aventuras em alto mar), por me mostrar o lado divertido, positivo e o que realmente vale a pena carregar na lembrança.

Às minhas companheiras de laboratório, Clarissa e Thaila, por me fazerem enxergar amizade, companheirismo e sinceridade até mesmo quando o ambiente não era propício para isto.

Aos meus pais, tão fundamentais em minha vida. Obrigada por abrirem mão de seus próprios sonhos em função dos meus. Nunca encontrarei palavras que expressem o tamanho do meu amor e gratidão por vocês. Tenham certeza, levarei sempre comigo as palavras de Rui Barbosa: “se um dia, já homem feito e realizado, sentires que a terra cedes aos pés, que tuas obras desmoronam, que não há ninguém a tua volta para te estender a mão, esquece a tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta a tua infância e balbucia, entre lágrimas e esperança as últimas palavras que ainda restarão na alma: minha mãe, meu pai”.

Às minhas tias Nea e Denise, que não são menos que mães para mim. Obrigada, além da colaboração imensurável neste trabalho, pelo colo carinhoso e reuniões insubstituíveis ao final das tardes.

À minha avó Benedita, que provando, dia a dia, que seus problemas não são maiores que sua fé, passa sua melhor lição de vida: nada deve ser capaz de retirar o sorriso do rosto e vontade de viver.

Ao meu amor Fernando Seiji, que me faz ter a certeza de que nenhum resultado importa mais que a descoberta do Amor. Obrigada por dar colorido aos meus dias e fazer da minha vida história de cinema. Eu mais que te amo.

A minha família, que me faz sentir amada e amparada onde quer que eu esteja.

À família que eu escolhi: Bruna (Ip), Carla (Loirinha), Giovana (Gi), Graziela (Gra) e Priscila (Pri). Obrigada por me fazerem experimentar o calor do amor de irmão. Não tenho nada mais a falar do que um milhão de obrigada e que eu amo vocês.

Às minhas mais que amigas, Marília (Onita), Ana Patrícia (Petrus) e Bárbara (Babbi). Vocês me dão ânimo e me impulsionam a sempre buscar meus sonhos e ser feliz, além de fazerem cada momento único: trabalho vira diversão, chefe vira iniciante e “tudo na merda” vira “mil maravilhas”.

Aos prezados indivíduos participantes deste trabalho que sempre foram tão solícitos e dispostos a colaborar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – pelo apoio financeiro.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA – por incentivos financeiros em participação de congressos e eventos científicos.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVO	10
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	12
3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	13
3.2. DETERMINAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL.....	14
3.2.1. Determinação do Consumo Alimentar	14
3.2.2. Determinação do Gasto Energético	15
3.2.3. Avaliação Antropométrica do Estado Nutricional	15
3.2.4. Avaliação Laboratorial do Estado Nutricional	17
3.3. DETERMINAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL	17
3.3.1. Isolamento e Identificação de Bactérias Intestinais	17
3.3.2. Sorologia Convencional	19
3.3.3. Extração de DNA Genômico Fecal	20
3.3.3.1. Protocolo Proposto por Ley et al, 2005 (30)	20
3.3.3.2. Protocolo do Kit QIAamp DNA Stool® - QIAGEN®	21
3.3.4. Amplificação da Região 16S.....	21
3.3.5. Reação de Ligação	22
3.3.6. Preparação de Células Eletrocompetentes e Eletroporação.....	22
3.3.7. Extração de DNA Plasmidial	23
3.3.8. Quantificação do DNA	24
3.3.9. Sequenciamento de DNA	24
3.4. PESQUISA DE GENES RELACIONADOS COM VIRULÊNCIA DE <i>E. COLI</i> POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	25
3.4.1. Gene <i>eae</i>	25
3.4.2. Gene <i>bfp</i>	26
3.4.3. Gene <i>ipaH</i>	27
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4. RESULTADOS	30
4.1. AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL.....	34
4.1.1. Avaliação da Ingestão Alimentar	34
4.1.2. Avaliação Antropométrica do Estado Nutricional	38
4.1.3. Avaliação Laboratorial do Estado Nutricional	39
4.2. DETERMINAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL	45
4.2.1. Isolamento e Identificação de Bactérias Intestinais	45
4.2.2. Sorologia Convencional	52
4.2.3. Extração de DNA Genômico Fecal	52
4.2.3.1. Modelo Proposto por Ley et al, 2005.	52
4.2.3.2. Pelo kit QIAAMP DNA STOOL® - QIAGEN®	54
4.2.4. Amplificação da Região Intergênica 16S DNAR	55
4.2.5. Extração de DNA Plasmidial	56
4.2.6. Quantificação do DNA e Sequenciamento.	58
4.3. PESQUISA DE GENES RELACIONADOS COM VIRULÊNCIA DE <i>E. COLI</i> POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	60
4.3.1. Gene <i>eae</i>	60
4.3.2. Gene <i>bfp</i>	61
4.3.3. Gene <i>ipaH</i>	62

5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS	78

Listas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição e composição da microbiota do trato gastrointestinal de populações saudáveis	6
Figura 2 – Delineamento experimental do estudo	13
Figura 3 – Comparação entre média de consumo de macronutrientes dos grupos Paciente e Controle com suas recomendações de ingestão	37
Figura 4 – Comparação entre média de consumo de tiamina, riboflavina, piridoxina, cobalamina, folato e vitamina C com suas recomendações de ingestão	37
Figura 5 – Comparação entre média de consumo de cálcio, potássio, sódio, fósforo, cobre, ferro e zinco com suas recomendações de ingestão	38
Figura 6 – Variação dos valores de Hemoglobina – grupo Paciente.....	42
Figura 7 – Variação dos valores de Hematócrito – grupo Paciente.....	42
Figura 8 – Variação dos valores de Proteínas totais – grupo Paciente	44
Figura 9 – Variação dos valores de Albumina – grupo Paciente	44
Figura 10 – Diversidade de bactérias intestinais aeróbias e anaeróbias facultativas – grupo Paciente, coleta 1.....	47
Figura 11 – Diversidade de bactérias intestinais aeróbias e anaeróbias facultativas – grupo Paciente, coleta 2.....	48
Figura 12 – Diversidade de bactérias intestinais aeróbias e anaeróbias facultativas – grupo Controle	48
Figura 13 – Diversidade de bactérias intestinais aeróbias e anaeróbias facultativas de 1 paciente, sem e com o uso de omeprazol.....	50
Figura 14 – DNA genômico de amostra fecal extraído pelo protocolo de Ley <i>et al</i> – grupo Paciente.....	53
Figura 15 – DNA genômico de amostra fecal extraído pelo protocolo de Ley <i>et al</i> – grupo Controle	53
Figura 16 – DNA genômico de amostra fecal extraído pelo kit QIAamp DNA Stool® - QIAGEN® - grupo Paciente	54
Figura 17 – DNA genômico de amostra fecal extraído pelo kit QIAamp DNA Stool® - QIAGEN® - grupo Controle.....	55
Figura 18 – Amplificação da região intergênica 16S DNAr – amostra número 2	56
Figura 19 – Verificação da reação de extração de DNA plasmidial – método de lise alcalina.....	57
Figura 20 – Identificação de possíveis microorganismos da microbiota intestinal de paciente enterectomizado a partir de dados de sequenciamento de DNA – análise via BLAST	59

Figura 21 – Identificação de possíveis microorganismos da microbiota intestinal de paciente enterectomizado a partir de dados de sequenciamento de DNA – análise via <i>Ribosomal Database Project</i> - RDP.....	59
Figura 22 – Amplificação do gene relacionado à virulência de EPEC - <i>eae</i>	60
Figura 23 – Amplificação do gene relacionado à virulência de EPEC - <i>bfp</i>	61
Figura 24 – Amplificação do gene relacionado à virulência de EIEC - <i>ipaH</i>	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização populacional: idade, sexo, tabagismo e etilismo de pacientes e controles	30
Tabela 2 – Causas de SIC, presença de válvula íleo-cecal e tamanho do intestino remanescente.....	32
Tabela 3 – Doenças associadas e medicações do grupo Paciente.....	33
Tabela 4 – Comparação de variáveis dietéticas de pacientes e controles	35
Tabela 5 – Comparação de variáveis antropométricas de pacientes e controles.....	39
Tabela 6 – Avaliação laboratorial do estado nutricional – exames bioquímicos – grupo Paciente	41
Tabela 7 – Características das amostras fecais – grupos Paciente e Controle	45
Tabela 8 – Diversidade bacteriana segundo presença ou ausência de válvula íleo-cecal... ..	49
Tabela 9 – Coeficientes de correlação de Spearman para Quantidade de Gram (positivas / negativas) e Fibras, índice de Massa Corporal (IMC) e Energia ingerida	51
Tabela 10 – Quantificação de bactérias por análise de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) – grupos Paciente e Controle	51

Resumo

Furtado EC. *Microbiota intestinal de pacientes portadores da Síndrome do Intestino Curto* [Dissertação]. Ribeirão Preto. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2010.

Introdução: A Síndrome do Intestino Curto (SIC) é definida como um conjunto de sinais e sintomas conseqüentes de alterações nutricionais e metabólicas secundária a insuficiência intestinal funcional e/ou orgânica, como nos casos de grandes ressecções do intestino delgado. Ressecções intestinais eliminam sítios de colonização, alteram a área de absorção e, o uso freqüente de antibióticos devido a infecções recorrentes, presença de alimentos não digeridos no cólon, trânsito acelerado e diarreia, nestes mesmos pacientes, podem contribuir para a alteração da microbiota intestinal. **Objetivo:** Caracterizar a microbiota intestinal de pacientes portadores da Síndrome do Intestino Curto atendidos na Unidade Metabólica e do HCFMRP/USP. **Casuística e Métodos:** Foram recrutados os pacientes portadores de síndrome do intestino curto atendidos na Unidade Metabólica do HCFMRP/USP (uso de terapia nutricional parenteral). Para o grupo controle foram recrutados indivíduos saudáveis e eutróficos da comunidade e pareados segundo sexo e idade. Foram avaliadas amostras de fezes e exames bioquímicos, estes últimos foram somente dos pacientes. A avaliação do consumo alimentar foi feita por meio do inquérito Diário Alimenta e a avaliação do estado nutricional a partir de medidas antropométricas. Para detecção de cepas patogênicas foram realizados cultivos e testes bioquímicos específicos em meio aeróbio para determinação de espécies da família Enterobacteriaceae. Em cada cepa de *E. coli* isolada foram aplicados anti-soros para determinação de possível patogenicidade. Metodologia molecular também foi utilizada para determinação do perfil da microbiota intestinal bacteriana: sequenciamento de bibliotecas de DNAr 16S e PCR para detecção de genes característicos de cepas patogênicas de *E. coli*. **Resultados:** Verificou-se a presença de subnutrição protéico-calórica no grupo Paciente mesmo com terapia nutricional para recuperação deste estado nutricional. Quanto a microbiota, observou-se maior diversidade de Gram negativas, porém menor quantidade por grama de fezes da família Enterobacteriaceae em pacientes com SIC. Porém a análise molecular mostrou a manutenção na proporção de espécies bacterianas, equivalente a microbiota intestinal saudável. **Conclusão:** Apesar da subnutrição, retirada maciça do intestino delgado, uso freqüente de antibióticos, depressão do sistema imune, presença de alimentos não digeridos no trato gastrointestinal e trânsito intestinal acelerado, a relação e proporção entre as espécies bacterianas intestinais permanecem similares à normalidade.

Palavras-chave: síndrome do intestino curto; microbiota intestinal; Enterobacteriaceae.

Summary

Furtado EC. *Intestinal microbiota of patients with Short Bowel Syndrome* [Dissertation]. Ribeirão Preto. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2010.

Introduction The short bowel syndrome (SBS) is defined as a set of signs and symptoms resulting from nutritional and metabolic changes after major small bowel resections. Intestinal resections eliminate colonization sites and alter the absorption area. Besides, the frequent use of antibiotics due to recurrent infections, the presence of undigested food remaining in the intestinal tract, rapid transit and diarrhea in these same patients may contribute to the change of intestinal microbiota. **Objective:** To characterize the intestinal microbiota of patients with short bowel syndrome treated at the Metabolic Unit and HCFMRP / USP. **Materials and Methods:** We recruited all the patients with short bowel syndrome treated at the Metabolic Unit of HCFMRP / USP (use of parenteral nutrition therapy). The control group was composed by healthy individuals matched by age and sex. Samples of feces and biochemical tests from the patient group were evaluated. The control group had no biochemical tests, only feces samples to be analysed. The nutritional status was evaluated through anthropometric measurements and the assessment of food intake through food diary survey. The pathogenic strains from Enterobacteriaceae were detected by cultivation and specific biochemical tests in aerobic environment. In each strain of isolated *E. coli* antisera were applied for determination of pathogenicity. PCR analysis was also used to determine the profile of intestinal bacterial microbiota: sequencing libraries of 16S rDNA and PCR for detection of genes characteristic of pathogenic strains of *E. coli*. **Results:** Although receiving periodic parenteral nutrition the Patient group had protein-calorie malnutrition. In regards to the microbiota there was greater diversity, but lower concentration of the family Enterobacteriaceae in patients with SBS. However, the molecular analysis showed the a proportion of bacterial species equivalent to the intestinal flora from the control group. **Conclusion:** Although the protein-calorie malnutrition, massive resection of the small intestine, frequent use of antibiotics, immune system depression, presence of undigested food in the gastrointestinal tract and rapid intestinal transit rate, the ratio and the proportion of the intestinal bacterial species remain similar to normal.

Keywords: short bowel syndrome; intestinal microbiota; Enterobacteriaceae

"Muitas vezes as pessoas
são egocêntricas, ilógicas e insensatas.
Perdoe-as assim mesmo.

Se você é gentil,
as pessoas podem acusá-lo de interesseiro.
Seja gentil assim mesmo.

Se você é um vencedor,
terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.
Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco,
as pessoas podem enganá-lo.
Seja honesto e franco assim mesmo.

O que você levou anos para construir,
alguém pode destruir de uma hora para outra.
Construa assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz,
as pessoas podem sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo.

O bem que você faz hoje,
pode ser esquecido amanhã.
Faça o bem assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você,
mas isso pode não ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja você que, no final das contas,
é tudo entre você e Deus.
Nunca foi entre você e os outros."

Madre Tereza de Calcutá

Introdução

1. Introdução

A integridade do trato gastrintestinal é importante para o funcionamento do organismo, pois é por meio deste que se obtêm os nutrientes necessários para realização dos processos vitais. Particularmente o intestino, quando é acometido por alguma doença, desenvolve alterações em sua função o que, clinicamente, pode se manifestar como síndrome de má-absorção ⁽¹⁾. Vários são os gatilhos para essa síndrome, podendo acometer porções distintas do intestino delgado ou mesmo regiões do cólon. Exemplos de causas desencadeadoras de má-absorção são supercrescimento bacteriano no intestino delgado, espru tropical, subnutrição grave, síndrome do cólon irritável e síndrome do intestino curto ⁽¹⁾.

A síndrome do intestino curto (SIC) pode ser definida como um conjunto de sinais e sintomas conseqüentes de alterações metabólicas e nutricionais secundárias a insuficiência intestinal, seja funcional ou orgânica, como nas grandes ressecções do intestino delgado ⁽²⁾.

O comprimento total do intestino delgado humano, in vivo, mede em torno de 3,5 a 4 m, podendo chegar a 7m quando esse perde sua tonicidade. Nessa ocasião, o duodeno assume 25 cm, jejuno 3,5 m e íleo 2,5 m. Além de toda esta extensão, todo o lúmen intestinal se apresenta com vilosidades, microvilosidades e pregas circulares totalizando uma área de absorção de aproximadamente 200 m². O tempo de transito intestinal, ou seja, o tempo gasto pelo alimento para percorrer o intestino delgado e chegar a válvula íleo-cecal, quando o intestino está íntegro, é de 2 horas. Já o cólon, in vivo, mede em torno de 1,5 m e o tempo de trânsito nesta região intestinal pode chegar a

48 horas ^(1, 3, 4). Assim, nos casos de insuficiência orgânica, após ressecções extensas de intestino delgado, com intestino remanescente menor que 1 metro, o tempo de trânsito intestinal geralmente passa a ser menor que 15 minutos ^(5, 6).

Dentre as causas de ressecções intestinais mais comuns em adultos estão a doença de Crohn, enterite por radiação e isquemia mesentérica ⁽⁵⁾. Dependendo do local da ressecção, consequências distintas podem ocorrer visto que cada segmento intestinal tem uma função própria em digestão e absorção. O duodeno controla o esvaziamento gástrico e é responsável pela maior etapa de digestão uma vez que é neste local em que enzimas digestivas como proteases são secretadas. O jejuno, segundo segmento intestinal, contém enzimas com afinidade por dissacarídeos em sua mucosa e desta forma completa a digestão de carboidratos. Absorve monossacarídeos e peptídeos. Os lipídeos, por sua vez, são absorvidos em micelas após emulsificação pelos sais biliares. O íleo, parte final do intestino delgado, é responsável pela absorção dos sais biliares e por absorver 70% de toda a água presente no lúmen; além disso, é sítio específico de absorção da cobalamina ^(1, 5, 7).

Assim, na SIC, a ressecção extensa leva à má absorção de macro e micronutrientes, desequilíbrios de líquidos e eletrólitos e grande consumo da massa corpórea, visualizada pela perda de peso ⁽⁸⁾. Como consequência, há hipovolemia, distúrbios eletrolíticos (hipopotassemia, hipocalcemia, hipocupremia, hipomagnesemia, hipozinquemia, hipocloremia, hipofosfatemia, entre outros), deficiência de ácidos graxos essenciais, anemia, hiperoxalúria e acidose metabólica ⁽⁵⁾. Os distúrbios carenciais podem ter maior ou menor

gravidade dependendo do local e da extensão da ressecção ⁽⁹⁾. Não se pode precisar qual o comprimento mínimo intestinal compatível com a vida uma vez que há variação interpessoal de adaptação, mas sabe-se que geralmente ressecções de até 40% do intestino delgado são mais toleráveis e a presença do íleo e da válvula íleo-cecal condiz com um melhor prognóstico ⁽¹⁾.

Após enterectomia, observa-se geralmente um processo adaptativo do intestino delgado remanescente que se dilata e alonga; microscopicamente nota-se aumento de altura das vilosidades, maior profundidade das criptas e elevação do número de células ⁽¹⁰⁾. Nesse processo de adaptação estão envolvidos vários fatores, entre eles, presença de alimentos no trato gastrointestinal, hormônios intestinais como o peptídeo glucagon-like tipo 2 (GUT-2), neuro-hormônios e poliaminas ⁽¹¹⁾.

A presença de alimentos no tubo intestinal é fundamental para a aceleração do processo adaptativo do intestino, e assim estes são ofertados gradativamente aos pacientes submetidos a enterectomia logo que há possibilidade de uso do trato gastrointestinal observado pelo controle dos fatores inflamatórios locais e certeza de cicatrização intestinal correta ⁽⁵⁾. O tratamento nutricional dos pacientes com SIC se faz em múltiplas fases de acordo com a recuperação pós-cirúrgica. Apesar da reintrodução da dieta via oral, a terapia nutricional parenteral é quase sempre indispensável à sobrevivência devido ao acelerado tempo de trânsito intestinal ⁽⁵⁾.

Além das complicações metabólicas e nutricionais descritas, as infecciosas são prevalentes e a segunda causa de morte de pacientes com esta síndrome ⁽¹²⁾. Estas infecções ocorrem principalmente envolvendo os cateteres utilizados para a infusão da nutrição parenteral e se relacionam ao

local de inserção, migração de patógenos ao longo da superfície externa do cateter e possivelmente à translocação de bactérias intestinais uma vez que microorganismos comumente colonizadores do trato gastrointestinal como *Enterococcus* e *Escherichia coli* são encontrados em 13% e 4% dos cateteres infectados, respectivamente ⁽¹³⁾. Estudos apontam que a translocação bacteriana seria uma provável via de septicemia ^(6, 14, 15).

Assim como em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) que têm a função do sistema imune comprometida pela atividade do vírus HIV, parte significativa de pacientes com SIC são imunodeprimidos devido a seu estado de subnutrição grave e crônica ⁽¹⁶⁾, uma das razões para a vulnerabilidade e suscetibilidade destes às infecções.

Descreve-se que o intestino de populações saudáveis é colonizado por mais de 400 espécies de enterobactérias não-patogênicas (a Figura 1 apresenta as espécies mais frequentes, bem como distribuição e concentração ao longo do trato gastrointestinal) que exercem funções fundamentais para manutenção do estado de saúde do indivíduo ⁽¹⁷⁾. Exemplos dessas funções são: proteção contra doenças de células epiteliais, auxílio na digestão de alimento, interferência em componentes endógenos e exógenos, potencial imunológico e prevenção de colonização do trato gastrointestinal por patógenos ^(18, 19).

Figura 1: Distribuição e composição da microbiota do trato gastrintestinal de populações saudáveis. (Adaptado de Trabulsi LR & Sampaio MC, 2004).

Pacientes com SIC possivelmente têm sua microbiota alterada, uma vez que as ressecções intestinais eliminam sítios de colonização. O uso freqüente de antibióticos devido a infecções recorrentes, presença de alimentos não digeridos no intestino remanescente, trânsito intestinal acelerado e diarreias podem também contribuir para a alteração da microbiota⁽²⁰⁾ e assim formar um círculo de funcionamento sistêmico fora do padrão, pois alterações fisiopatológicas decorrentes da entectomia possivelmente levam a alterações na microbiota intestinal, que alterada perpetua o quadro.

A freqüência aumentada de evacuação diária e até mesmo os quadros diarreicos constantes nestes pacientes são geralmente atribuídos ao processo

adaptativo pós-cirúrgico. Porém sabe-se que diarreia ainda é um importante problema de saúde pública no Brasil, principalmente em classes sócio-econômicas mais baixas. Portanto, considerar todo quadro diarreico de pacientes com SIC como sendo funcional poderia mascarar um possível foco infeccioso.

Infecções entéricas causadas por cepas patogênicas de *E. coli* são freqüentes, porém ainda subestimadas devido a métodos diagnósticos inapropriados na prática clínica ⁽²¹⁾. Sabe-se, contudo, que as cepas de *E. coli* que mais afetam a população sul-americana são as enteropatogênicas (EPEC) - contêm os genes de virulência *eae* (que está envolvido com produção de intiminas) e *bfp* (*bundle-forming pilus*), o que confere o poder de ataque e lesão aos enterócitos; e enteroinvasivas (EIEC) – contêm o gene *ipaH* (gene localizado em plasmídeo de virulência desta cepa). Esses genes são características essenciais para que a cepa desenvolva sua patogenicidade e detectá-los é além de tudo uma ferramenta diagnóstica crucial para o tratamento adequado do paciente infectado ^(21, 22).

Observa-se, portanto, que o estudo da microbiota intestinal de pacientes com SIC é essencial uma vez que o tratamento destes é de difícil manejo devido a múltiplas infecções, uso de antibioticoterapia freqüente, entre outros. Além disso, vale ressaltar a escassez de dados sobre a microbiota intestinal destes pacientes. Uma pesquisa bibliográfica realizada no *Pubmed/Medline*, com as palavras chaves “*short bowel syndrome and gut microbiota or intestinal flora*”, sem limitação de tempo, encontrou 12 referências bibliográficas, sendo que a mais recente data de novembro de 2004. Estes trabalhos foram realizados em diferentes países (França, Estados Unidos, Japão, Holanda e

Espanha) e conseqüentemente em diferentes condições ambientais o que, pode não condizer com a realidade dos pacientes atendidos na instituição referida, o Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, referência no tratamento de pacientes com esta síndrome no Brasil.

Diante do exposto, a hipótese levantada é que pacientes com SIC têm sua microbiota intestinal alterada e assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar e comparar com controles, em um estudo transversal, a microbiota intestinal dos pacientes portadores da SIC, que recebem nutrição parenteral cíclica, atendidos na Unidade Metabólica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

Objetivos

2. Objetivos

Caracterizar e comparar com controles a microbiota intestinal de pacientes portadores da Síndrome do Intestino Curto, que recebem nutrição parenteral cíclica, atendidos na Unidade Metabólica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

2.1. Objetivos específicos

2.1.1 determinar o estado nutricional destes pacientes e respectivos controles;

2.1.2 determinar o consumo alimentar destes pacientes e respectivos controles;

2.1.3 determinar as cepas da família Enterobactereacea, cultiváveis em ambiente aeróbio, presentes na microbiota intestinal destes pacientes e respectivos controles;

2.1.4 verificar a presença de *Escherichia coli* patogênicas nas amostras destes pacientes e respectivos controle.

Casuística e Métodos

3. Casuística e Métodos

Para formação do grupo Paciente foram recrutados todos os paciente portadores da SIC atendidos na Unidade Metabólica que recebem nutrição parenteral cíclica. Foram critérios de exclusão a presença de quadros infecciosos com sinais clínicos e/ou uso de terapia antibacteriana.

O grupo Controle foi composto por indivíduos adultos eutróficos, recrutados da comunidade, sem nenhuma enfermidade aparente, pareados ao grupo Paciente segundo sexo e idade. Foram critérios de exclusão para o grupo Controle: tabagismo, etilismo, cirurgias prévias do trato gastrointestinal, quimioterapia, radioterapia, uso de antibióticos, uso de probióticos e a presença de doenças que acometem o trato gastrointestinal como doença de Crohn e Síndrome do Cólon Irritável. Como, na prática, há grande dificuldade e confusão para distinguir os alimentos classificados como prebióticos, estes não foram incluídos como critérios de exclusão.

Todos os indivíduos recrutados foram informados a respeito do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi iniciado após aprovação pelo Comitê de Ética do HCFMRP-USP (processo HCRP nº 10328/2008).

3.2. Determinação do estado nutricional

3.2.1. Determinação do consumo alimentar

Para avaliação do consumo alimentar foi utilizada a metodologia descrita por Santos e colaboradores ⁽²³⁾ para o inquérito “Dia Alimentar Habitual”, um método simples e de baixo custo para determinação da ingestão dietética usual do indivíduo que consiste em coleta retrospectiva de dados, como uma revisão da ingestão diária habitual, organizado de forma a se questionar a ingestão alimentar, quantidade de refeições bem como seus horários; requer que o indivíduo se lembre dos alimentos e das quantidades usuais de consumo.

Este inquérito foi aplicado nos 2 momentos de coleta de dados no grupo Paciente e apenas 1 vez no grupo Controle, por um entrevistador treinado. Os dados foram posteriormente avaliados pelo software Nutwin[®] e os valores obtidos foram comparados com os valores de recomendação propostos pelo *United States Department of Agriculture* (USDA) em seus documentos *Dietary Reference Intakes* (DRI) ⁽²⁴⁾ referentes aos valores de *Estimated Average Requirements* (EAR) e, para os nutrientes que ainda não possuem esse valor definido, utilizou-se como parâmetro valores de *Adequate Intake* (AI).

Os valores obtidos com os inquéritos alimentares dos indivíduos participantes desta pesquisa foram padronizados em porcentagem, considerando os valores de recomendação.

3.2.2. Estimativa do Gasto Energético

O valor de Gasto Energético Basal (GEB) foi estimado segundo as equações preditivas propostas por Harris e Benedict ⁽²⁵⁾ que têm como variáveis influentes no cálculo o peso, a estatura, a idade e o sexo.

- Homem: $66,5 + 13,8 \times \text{Peso (kg)} + 5 \times \text{Estatura (cm)} - 6,8 \times \text{Idade (anos)}$
- Mulher: $655,1 + 9,5 \times \text{Peso (kg)} + 1,8 \times \text{Estatura (cm)} - 4,7 \times \text{Idade (anos)}$

3.2.3. Avaliação antropométrica do estado nutricional

As medidas antropométricas aferidas foram: peso, estatura, dobras cutâneas tricipital e subescapular; circunferências da cintura, braço e muscular do braço. Estas medidas foram realizadas de acordo com as normas descritas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) ⁽²⁶⁾.

Para a medida do peso, em kg, foi utilizada balança Filizola eletrônica[®], com precisão de 0,1kg. Essa medida foi feita pela manhã, estando os indivíduos em jejum, com roupas leves, descalços e após esvaziamento da bexiga. Para a medida da estatura, os indivíduos estavam em posição ereta, com a cabeça em plano vertical, descalços e com os pés juntos. Apoiaram as costas, nádegas e calcanhares na haste graduada e inextensível, a qual forneceu o valor em metros.

A dobra cutânea tricipital (DT) foi medida na parte posterior do braço não-dominante, sobre o músculo tricipital, no ponto médio entre o acrômio e o

olécrano (o ponto médio é conseguido estando o indivíduo com flexão do cotovelo em 90° e palma da mão virada para cima), pinçando-se a pele e o tecido subcutâneo entre o polegar e o indicador, onde se aplicou o adipômetro, 1 cm abaixo dos dedos que pinçaram a prega, sendo a leitura feita após 2 a 3 segundos, no milímetro mais próximo. A dobra cutânea subescapular (DSE) foi medida logo abaixo da extremidade inferior da escápula direita. A pele e o tecido subcutâneo foram pinçados neste local e a dobra, angulada em 45° a partir do plano horizontal, dirigiu-se superiormente para dentro, onde se colocou o adipômetro, 1 cm abaixo dos dedos que pinçaram a dobra. Estas medidas foram tomadas em triplicata. Em cada medição foi reiniciado o procedimento de colocação do adipômetro e todas foram feitas com o mesmo instrumento.

A circunferência do braço (CB) foi medida no ponto médio do braço não-dominante, estando este relaxado e estendido ao longo do corpo, com a palma da mão virada para a coxa. A circunferência muscular do braço (CMB) foi calculada a partir da DT e CB pela fórmula: $CMB_{(cm)} = CB_{(cm)} - [\pi \times DT_{(cm)}]$.

A circunferência da cintura (CC) foi aferida no ponto médio entre as costelas inferiores e as cristas ilíacas no momento final da expiração.

Todas as medidas foram feitas com o indivíduo em pé, em posição ereta, ou seja, em posição ortostática: abdômen relaxado, braços ao lado do corpo e pés juntos. A fita usada para medida das circunferências era flexível e inelástica, sempre firme no plano horizontal, circundando totalmente o local medido, mas sem comprimir o tecido subcutâneo e as leituras foram feitas no centímetro mais próximo do ponto de cruzamento da fita.

3.2.4. Avaliação laboratorial do estado nutricional

Este tópico de avaliação do estado nutricional foi empregado apenas para os pacientes que são submetidos, rotineiramente, a exames bioquímicos como parte do seguimento na instituição.

Os exames laboratoriais avaliados foram: Lipidograma, Hemoglobina, Hematórito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Capacidade Latente de Ligação do Ferro (UIBC), Ácido Fólico, Ferro sérico, Zinco sérico, Magnésio sérico, Proteínas totais e Albumina. Os resultados analisados foram os que datavam o mais próximo da coleta das amostras de fezes do paciente, em um intervalo máximo de 3 meses.

3.3. Determinação da microbiota intestinal

3.3.1. Isolamento e identificação de bactérias intestinais

O material utilizado para análise da microbiota intestinal foi amostra fecal. Cada paciente teve sua coleta feita em duplicata, tendo o intervalo de uma internação entre elas. Caso ocorresse alguma intercorrência na internação em questão, a amostra era desprezada ou não coletada, prorrogando-se assim para a internação subsequente. Foi feita apenas uma coleta de cada controle.

Os indivíduos foram esclarecidos quanto ao método de coleta estéril ⁽²⁷⁾, sem ajuda de nenhum material como suporte, evacuando diretamente no coletor plástico estéril fornecido. Foi entregue também um par de luvas e espátula coletora estéril.

Após a coleta, o material foi acondicionado em caixa isotérmica resfriada com gelo e transportado imediatamente ao Laboratório de Micologia Molecular, no Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Iniciou-se o processo de análise fecal a partir de observação macroscópica das fezes coletadas, analisando características como cor, textura, presença de muco, sangue e restos alimentares ⁽²⁷⁾.

O procedimento inicial de caracterização da microbiota intestinal a partir de cada amostra foi realizado com base nas instruções determinadas pelo *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* ⁽²⁷⁾ e consistiu no isolamento das colônias bacterianas cultiváveis em ambiente aeróbio, no qual parte das fezes foi semeada, em triplicata, em placas contendo ágar MacConkey e ágar sangue Mueller-Hinton e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, as colônias macroscopicamente diferentes foram isoladas e submetidas a testes bioquímicos para identificação.

As cepas isoladas foram submetidas primeiramente submetidas a coloração diferencial de Gram. As Gram positivas foram avaliadas pelas provas da Catalase, Coagulase e Oxidase. As Gram negativas foram avaliadas quanto a algumas atividades metabólicas por meio de indicadores contidos nos meios de Rugai, Citrato de Simmons e Motilidade em ágar semi-sólido a 37°C e por meio da reação de Oxidase.

Também foi empregado o método quantitativo de contagem bacteriana a partir do plaqueamento em meio sólido que consistiu em: primeiramente diluir 1g de fezes em 10 ml de tampão fosfato-salino (PBS) filtrado e, a partir desta solução, iniciou-se um processo de diluições seriadas variando de 10^2 a 10^9 mg

de fezes/ mL de PBS. Plaqueou-se 100 µL destas diluições nos seguintes ágar: MacConkey, sangue Mueller-Hinton, *Salmonella-Shigella* (SS), Manitol e Bile-esculina. Incubou-se a 37°C por 24 horas e após este período iniciou-se contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) bem como verificou-se a positividade ou não nos ágar utilizados para testes específicos. Assim, considerando-se a diluição, obteve-se o número de bactérias viáveis por mililitro da suspensão original.

3.3.2. Sorologia Convencional

Os isolados bacterianos positivos para *Eschericia coli* foram cultivados em tubos contendo meio Infusão Cérebro-coração (BHI), incubadas a 37°C por 24 horas, e após esse período foram submetidos aos antisoros polivalentes específicos da PROBAC®. O método de análise seguiu as instruções do fabricante.

- Soro Anti *E.coli* Entopatogênica Clássica

1. Polivalente A: contém anticorpos contra as *E. coli* 026, 055, 0111 e 0119.
2. Polivalente B: contém anticorpos contra as *E. coli* 0114, 0125, 0142 e 0158.
3. Polivalente C: contém anticorpos contra as *E. coli* 086, 0126, 0127 e 0128.

- Soro Anti *E. coli* Enteroinvasiva

1. Polivalente A: contém anticorpos contra as *E. coli* 028ac, 0136, 0144 e 0152.
2. Polivalente B: contém anticorpos contra as *E. coli* 0112ac, 0124, 0243, 0164 e O167.

- Soro Anti *E. coli* O157

3.3.3. Extração de DNA genômico fecal

3.3.3.1. protocolo proposto por Ley et al, 2005 ⁽²⁸⁾.

Este protocolo baseado na metodologia descrita por Ley e colaboradores⁽²⁸⁾ consistiu em: lavagem de aliquota de fezes recém emitidas com salina estéril (NaCl 0,85%), por meio de centrifugação. Após este procedimento e peso final da alíquota de aproximadamente 100 mg foi misturado a amostra 500µg de solução tampão (200mM Tris, pH8.0; 200mM NaCl; 20mM EDTA), 210µl de SDS a 20%, 500µl fenol:clorofórmio:álcool isoamilico (25:24:1) e 500 µl de esferas de zirconia de 0,1mm de diâmetro; as células foram quebradas mecanicamente com auxílio de vortex em temperatura ambiente. Após este procedimento e separação de sobrenadante isolado por centrifugação (5 minutos em rotação máxima - 13400 rpm), fez-se nova precipitação com fenol:clorofórmio:álcool isoamilico (25:24:1) na proporção volume/volume. Novamente separou-se o sobrenadante isolado por rotação máxima (13400 rpm por 5 minutos) e incubou-se, com 10 µl de RNase a 10mg/ml, por 1 hora à 37°C. Passado esse período, fez-se nova precipitação com fenol:clorofórmio:álcool isoamilico (25:24:1) na proporção volume/volume. Separou-se o sobrenadante isolado por rotação máxima (13400 rpm por 5 minutos) e adicionou-se a ele isopropanol, 2 vezes o seu volume. Misturou-se por inversão e incubou-se a temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugou-se, então, em rotação máxima (13400 rpm) por 10 minutos, desprezou-se o isopropanol e lavou-se a amostra com 1ml de etanol 70% gelado. Centrifugou-

se por 5 minutos em rotação máxima (13400 rpm), desprezou-se o etanol e, após a amostra estar seca, ressuspendeu-a com água ultra pura estéril, 2 vezes o volume da amostra final seca. Após a extração, verificou-se o protocolo por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de UV.

3.3.3.2. protocolo do kit QIAamp DNA Stool® - QIAGEN®

Este processo de extração de DNA genômico fecal seguiu o protocolo de instruções do fabricante do produto.

3.3.4. Amplificação da região 16S

A reação de amplificação da região intergênica 16S DNAr foi realizada em 50 µL de uma mistura de reação com 5 µL de tampão (HCl 100 mM; KCl 500 mM), 6 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTP (2,5 mM), 1 µL (10 pmol) dos iniciadores universal 1391R (5' – GACGGGCGGTGWGTRCA-3') e específico de bactérias 8F (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'), 0,40 µL de Taq DNA Polimerase (5 U µL⁻¹) (Promega®, Madison®, EUA) e 2 µL (100 ng) de amostra de DNA molde. As reações de amplificação consistiram de uma etapa inicial de desnaturação (95°C por 3 minutos), seguida por 35 ciclos intermediários (94°C por 1 minuto; 60°C por 1 minuto; 72°C por 3 minutos), e uma etapa terminal de extensão (72°C por 5 minutos) e resfriamento (15°C por 15 minutos). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese, em gel de agarose 1,2%, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE), a 100V, por 30

minutos. As bandas resolvidas no gel foram visualizadas após coloração com brometo de etídeo, sob iluminação ultravioleta, e fotografadas.

3.3.5. Reação de Ligação

Foi utilizado o vetor pCR2.1-TOPO do TOPO TA cloning kit[®] (Invitrogen[®]). Cada reação continha 4 µL do produto de PCR fresco, 1 µL de solução salina e 1 µL do vetor TOPO TA. A ligação ocorreu durante 30 minutos à temperatura ambiente e os produtos foram utilizados para transformação.

3.3.6. Preparação de células eletrocompetentes e eletroporação

Para a obtenção de células eletrocompetentes, uma colônia da linhagem de *E. coli* DH10β foi inoculada em 5 ml de meio LB líquido (Tryptona 10g/L ; Extrato de levedura 5g/L; NaCl 10g/L) e crescida sob agitação constante a 37°C por 16 horas. Deste volume, 1,2 ml foi transferido para 300 ml de meio TY (Tryptona 20g/L; Extrato de levedura 5g/L) e, novamente, incubada a 37°C, sob agitação constante até atingir uma densidade ótica (O.D.) de 0,6. A cultura foi então resfriada em banho de gelo por 15 minutos, lavada por 4 vezes com água ultra pura estéril gelada, intercalada por centrifugação a 5000 rpm por 5 min. Em seguida as células foram lavadas duas vezes em glicerol 10%, centrifugadas a 5000 rpm por 5 min, e ressuspensas em glicerol 10%. A eletroporação foi realizada com 40 µl da solução contendo as células (0,33%) onde foram adicionados 1 µl da reação de ligação no vetor TOPO. A mistura de células e DNA foi transferida para cubetas de eletroporação e submetida a um

choque elétrico de 1,25 KV por cerca de 5 ms (eletroporador Gene Pulser® – BioRad®). Após o choque, as células foram ressuspensas em meio SOC sem antibiótico e incubadas a 37°C por 1 hora. Após recuperação as células foram plaqueadas em meio LB contendo Ampicilina 50 ug/mL, X-Gal 40 ug/mL e IPTG 0.1mM. As placas foram incubadas a 37°C e a seleção das colônias positivas foi feita por meio da seleção das colônias brancas (os plasmídeos que tiveram fragmentos de DNA inseridos foram identificados por sua capacidade de formar colônias sem cor quando crescidos em meio contendo X-Gal/IPTG, ao contrário das sem fragmentos, que formam colônias azuis).

3.3.7. Extração de DNA plasmidial

Para a extração de DNA plasmidial, os clones selecionados foram inoculados em 5 ml de meio LB contendo a droga de seleção e incubados sobre agitação a 37°C durante 16 horas. Um volume de 1,5 ml da cultura foi utilizado para a extração de DNA plasmidial (Miniprep) através do método de lise alcalina ⁽²⁹⁾. As bactérias crescidas foram colocadas em tubos *eppendorfs* e centrifugadas por 5 minutos. Após centrifugação, o precipitado foi recuperado e adicionaram-se 100 µl da solução I (EDTA 10Mm, TRIS-base 25mM, Glicose 50 mM). Acrescentaram-se 200 µl da solução II (NaOH 0,2 mM, SDS 1%). O tubo foi invertido suavemente algumas vezes.

Adicionaram-se 150 µl da solução III (60 % de Acetato de potássio 5M, 11,5 % de Ácido Acético Glacial, 28,5 % de água destilada). Centrifugou-se por 5 minutos e recuperou-se a parte líquida em outro tubo, desprezando o precipitado. Então a solução foi lavada em um volume igual de

fenol/clorofórmio. Após centrifugação por 5 minutos, recuperou-se a fase superior em outro tubo *ependorf*. O DNA plasmidial foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol, aproximadamente 1 ml e deixado no congelador *over-nigth*. O DNA plasmidial foi então ressuspendido em 50 µl de tampão TE pH 8,0 (EDTA 1 Mm, TRIS-base 10 Mm).

3.3.8. Quantificação do DNA

Para quantificação do DNA plasmidial foi utilizado o aparelho espectrofotômetro (GE®). Aplicou-se 1 µl da amostra de DNA em 0,999 ml de água destilada, registrando-se os valores de densidade ótica nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Calculou-se a razão entre esses valores para obter uma estimativa da quantidade de DNA presente na amostra e para avaliação de sua pureza ⁽²⁹⁾.

3.3.9. Sequenciamento de DNA

Para a reação de sequenciamento foram utilizados de 200 a 500 ng de DNA, 5 pmol do oligonucleotídeo M13, 3 µL de *Byg Dye terminator*® (Applied Biosystems®) e 7,5 µL de água ultra pura estéril para 10 µL de volume final de reação. Os parâmetros do programa, utilizado no termocilador, foram: 95°C por 1 minuto; e 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, e 60°C por 1 minuto e 30 segundos.

Ao produto da reação de sequenciamento foram adicionados 12,5 µl de água ultra pura estéril, 2 µl de acetato de amônio 7,5 mol/l, 65 µl de etanol

96%, e posteriormente, lavado com 150 µl de etanol 80% e seco. A amostra foi dissolvida em 4 µl de *Formamide Loading Dye*[®] (Applied Biosystems[®]), desnaturado a 96°C e submetida a eletroforese em seqüenciador automático (ABI-PRISM 377[®] – Applied Biosystems[®]).

Os dados dos cromatogramas obtidos foram submetidos a análise de similaridade utilizando os programas BLAST ⁽³⁰⁾ e *Ribosomal Database Project* ⁽³¹⁾.

3.4. Pesquisa de genes relacionados com virulência de *E. coli* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para caracterizar o potencial de virulência das amostras de *E. coli* identificadas, foi analisado por meio de técnica de PCR ^(21, 22, 32) a presença dos genes *eae*, *bfp* e *ipaH*. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados em transluminador de UV.

3.4.1. Gene *eae*

As condições de ciclo e concentração de reagentes para a detecção do gene *eae* foram as seguintes: cada reação foi realizada em um volume final de 50 µl. Uma mistura, típica para PCR ⁽³³⁾, consistiu em: solução tampão de Taq polimerase 1x (200 mM Tris pH 8,4, 500 mM KCl), 3 mM MgCl₂, 1 µl do iniciador *eae_F* a 10 pmol (5' – TCAATGCAGTTCCGTTATCAGTT – 3'), 1 µl do iniciador *eae_R* a 10 pmol (5' – GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG – 3'), 1 µl

dNTP a 0,2 mM (mistura de dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 2,5µl DMSO, 1,25 U de Taq DNA polimerase e 3 µl de DNA molde. Para obtenção do DNA lisou-se 5 colônias de *E. coli* isoladas, fervendo-as por 20 minutos em 0,5% de Triton X-100. As condições básicas da amplificação incluíram um ciclo a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos compreendendo a desnaturação (94°C, 1,5 minutos), anelamento (53°C, 45 segundos) e extensão (72°C, por 1 minutos), finalizando com um ciclo a 72°C por 10 minutos.

3.4.2. Gene *bfp*

As condições de ciclo e concentração de reagentes para a detecção do gene *bfp* foram as seguintes: cada reação foi realizada em um volume final de 50 µl. Uma mistura, típica para PCR ⁽³³⁾, consistiu em: solução tampão de Taq polimerase 1x (200 mM Tris pH 8,4, 500 mM KCl), 3 mM MgCl₂, 1 µl do iniciador *bfp_F* a 10 pmol (5' – GGAAGTCAAATTCATGGGGGTAT – 3'), 1 µl do iniciador *bfp_R* a 10 pmol (5' – GGAATCAGACGCAGACTGGTAGT – 3'), 1 µl dNTP a 0,2 mM (mistura de dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 2,5µl DMSO, 1,25 U de Taq DNA polimerase e 3 µl de DNA molde. Para obtenção do DNA lisou-se 5 colônias de *E. coli* isoladas, fervendo-as por 20 minutos em 0,5% de Triton X-100. As condições básicas da amplificação incluíram um ciclo a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos compreendendo a desnaturação (94°C, 1,5 minutos), anelamento (49°C, 45 segundos) e extensão (72°C, por 1 minutos), finalizando com um ciclo a 72°C por 10 minutos.

3.4.3. Gene *ipaH*

As condições de ciclo e concentração de reagentes para a detecção do gene *ipaH* foram as seguintes: cada reação foi realizada em um volume final de 50 µl. Uma mistura, típica para PCR ⁽³³⁾, consistiu em: solução tampão de Taq polimerase 1x (200 mM Tris pH 8,4, 500 mM KCl), 3 mM MgCl₂, 1 µl do iniciador ipaH_F a 10 pmol (5' – CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGG – 3'), 1 µl do iniciador ipaH_R a 10 pmol (5' – GTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGC – 3'), 1 µl dNTP a 0,2 mM (mistura de dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1,25 U de Taq DNA polimerase e 3 µl de DNA molde. Para obtenção do DNA lisou-se 5 colônias de *E. coli* isoladas, fervendo-as por 20 minutos em 0,5% de Triton X-100. As condições básicas da amplificação incluíram um ciclo a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos compreendendo a desnaturação (94°C, 1,5 minutos), anelamento (49°C, 45 segundos) e extensão (72°C, por 1 minutos), finalizando com um ciclo a 72°C por 10 minutos.

3.5. Análise estatística

Por meio do programa SPSS[®], Versão 18, realizou-se uma análise exploratória dos dados. Esta metodologia tem como objetivo básico descrever uma série de valores de mesma natureza, permitindo que se tenha uma visão global da variação desses valores.

Os testes para inferência estatística utilizados foram *Mann Whitney* (para as amostras não pareadas e não paramétricas) e o Teste de pontos sinalizados

de *Wilcoxon* (para as amostras pareadas e não paramétricas). O nível de significância adotado foi de 5%.

Para verificar a correlação dos resultados obtidos em quantidade de tipos bacterianos e outras variáveis possivelmente influentes neste item citado utilizou-se o coeficiente de correlação de postos de *Spearman* ⁽³⁴⁾.

Resultados

4. Resultados

A coleta de dados ocorreu entre março de 2009 a janeiro de 2010. O grupo Paciente foi composto por 7 pacientes portadores da SIC submetidos a nutrição parenteral cíclica atendidos na Unidade Metabólica, o que representou a totalidade dos pacientes assistidos na instituição no período entre março a julho de 2009, tempo estipulado para serem realizadas as coletas correspondentes a primeira amostra fecal deste grupo, e o grupo Controle, composto por 7 indivíduos sadios e eutróficos da comunidade, pareados ao grupo Paciente segundo critérios de sexo e idade. Dados de caracterização populacional (idade, sexo, etnia, tabagismo e etilismo) são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização populacional: idade, sexo, tabagismo e etilismo de pacientes e controles.

Indivíduo	Grupo	Idade	Sexo	Cor	Tabagismo	Quantidade (anos/maço)	Etilismo	Quantidade (g de álcool / dia)
1	paciente	65	Mas*	Branco	sim	45	não	-
2	paciente	65	Fem**	Branco	não	-	não	-
3	paciente	69	Mas*	Branco	não	-	sim	6
4	paciente	51	Fem**	Negro	sim	32	não	-
5	paciente	46	Mas*	Branco	sim	13	não	-
6	paciente	41	Fem**	Branco	não	-	não	-
7	paciente	72	Mas*	Negro	sim	50	Sim	25
Média		58 (DP 12)	3 / 7 Fem**	2 / 7 negro	4 / 7 sim	34 (DP 16)	2 / 7 sim	15 (DP 13)
8	controle	54	Fem**	Branco	não	-	não	-
9	controle	46	Fem**	Branco	não	-	não	-
10	controle	48	Fem**	Branco	não	-	não	-
11	controle	66	Mas*	Negro	não	-	não	-
12	controle	52	Mas*	Branco	não	-	não	-
13	controle	63	Mas*	Branco	não	-	não	-
14	controle	60	Mas*	Branco	não	-	não	-
Média		56 (DP 8)	3 / 7 Fem**	1 / 7 negro	0 / 7 sim	-	0 / 7 sim	-

* Masculino; ** Feminino

A causa que levou à enterectomia foi isquemia mesentérica (100% das amostras) com retirada de segmentos intestinais distintos. O comprimento do intestino delgado remanescente variou de 10 a 100 cm após o ângulo de Treitz, com preservação ou não da válvula íleo-cecal. Já o intestino grosso variou de intacto até a retirada do cólon transversal (Tabela 2). Observa-se que em 3 pacientes houve retirada da válvula íleo-cecal e segmentos do cólon, e nos pacientes com preservação desta válvula também houve preservação do cólon.

As doenças secundárias mais prevalentes no grupo Paciente foram hipertensão arterial sistêmica (5 pacientes) e insuficiência renal crônica (4 pacientes), e as classes de medicamentos mais frequentemente prescritas para este grupo foram: suplementos nutricionais, que variaram desde uma vitamina / mineral isolada até polivitamínicos completos (6 pacientes), inibidor da bomba de prótons (5 pacientes) e anti-hipertensivos (4 pacientes) (Tabela 3).

O intervalo médio de descanso entre os ciclos de nutrição parenteral foi de 23 dias (DP 8). Um paciente não teve intervalo entre a nutrição parenteral pois a recebeu desde a data de sua enterectomia até o seu óbito, 4 meses depois, por choque séptico.

Tabela 2 – Causas de SIC, presença de válvula íleo-cecal e tamanho de intestino remanescente.

Indivíduo	Grupo	Causa da SIC	Válvula íleo-cecal	Intestino Delgado Remanescente	Intestino Grosso Remanescente
1	paciente	isquemia mesentérica	Não	10 cm pós Treitz	transverso em diante
2	paciente	isquemia mesentérica	Não	20 cm pós Treitz	transverso em diante
3	paciente	isquemia mesentérica	Sim	30 cm pós Treitz + 20 cm íleo	intacto
4	paciente	isquemia mesentérica	Sim	20 cm pós Treitz até 5 cm antes da válvula ileo-cecal	intacto
5	paciente	isquemia mesentérica	Sim	1 m pós Treitz	intacto
6	paciente	isquemia mesentérica	Sim	8 cm duodeno + 15 cm jejuno + 5cm íleo	intacto
7	paciente	isquemia mesentérica	Não	30 cm pós Treitz	segunda metade do transverso em diante

Tabela 3 – Doenças associadas e medicações do grupo Paciente.

Indivíduo	Grupo	Repetição	Outras doenças	Medicação
1	paciente	1	HAS*, IRC*, Nefrolitíase de repetição, TVP* prévia, osteoporose	Captopril / Clonazepam / Carbonato de cálcio
2	paciente	1	HAS, IRC, Dissecção aórtica prévia	Atenolol / Omeprazol / Loperamida / Amlodipina / Enalapril / Clonidina
3	paciente	1	HAS / IRC	Omeprazol / Ondansetrona / Carbonato de cálcio / Ácido nicotínico / Ácido acetil-salicílico
4	paciente	1	Trombofilia idiopática	Omeprazol / Vitamina B1 / Polivitamínico / Varfarina / Vitamina D3
5	paciente	1	HAS, gastrectomia a BII prévia (há 25 anos), trauma abdominal prévio (há 15 anos), pancreatite crônica por trauma (há 15 anos), Síndrome do Pânico	Enzimas pancreáticas / Vitamina D3 / Captopril / Amlodipina / Clonazepam / Amitriptilina / Omeprazol / Dimeticona / Vitamina B1 / Carbonato de Cálcio / Vitamina B6 / Xarope de Complexo B / Sulfato de Magnésio / Sulfato de Cobre
6	paciente	1	constipação intestinal - cirurgia prévia	Omeprazol / Bromoprida / Ondansetrona / Tramadol
7	paciente	1	2 AVCs* prévios (1 há 10 anos, outro há 6), fibrilação atrial crônica, insuficiência cardíaca, HAS, IRC	Furosemida / Enalapril / Lorazepam / Enoxaparina / Carvedilol
1	paciente	2	HAS, IRC, Nefrolitíase de repetição, TVP prévia, osteoporose	Nifedipina / Vitamina D3 / Polivitamínico / Citrato de Mg / Omeprazol / Vitamina B1 / Carbonato de Cálcio
2	paciente	2	HAS, IRC, Dissecção aórtica prévia	Atenolol / Enalapril / Clonidina / Amlodipina / Loperamida / Omeprazol / Varfarina / Citrato de Mg / Polivitamínico / Vitamina B1 / Bicarbonato de Sódio / Xarope de KCl / Carbonato de cálcio / Vitamina D3
3	paciente	2	HAS / IRC	Omeprazol / Carbonato de cálcio / Ácido nicotínico / Ácido acetil-salicílico
4	paciente	2	Trombofilia idiopática	Omeprazol / Vitamina B1 / Polivitamínico / Varfarina / Xarope de KCl / Citrato de Mg / Nicotina adesivo transdermico
5	paciente	2	HAS, gastrectomia a BII prévia (há 25 anos), trauma abdominal prévio (há 15 anos), pancreatite crônica por trauma (há 15 anos), Síndrome do Pânico	Enzimas pancreáticas / Captopril / Amlodipina / Clonazepam / Amitriptilina / Omeprazol / Sulfato ferroso / Citrato de Mg / Sulfato de Cobre / Polivitamínico / Vitamina D3/ Carbonato de cálcio / Sulfato de zinco
6	paciente	óbito	óbito	óbito
7	paciente	2	2 AVCs prévios (1 há 10 anos, outro há 6), fibrilação atrial crônica, insuficiência cardíaca, HAS, IRC	Amlodipina / Hidralazina / Diltiazem / Carbamazepina / Loperamida / Polivitamínico / Ácido Fólico / Bromoprida / Dimeticona / Tramadol / Dipirona sódica / Vitamina B1 / Carbonato de cálcio / Vitamina D3 / Varfarina

*HAS= hipertensão arterial sistêmica, IRC = insuficiência renal crônica, AVC= acidente vascular cerebral

4.1. Avaliação do estado nutricional

4.1.1. Avaliação da ingestão alimentar

Todos os sujeitos da pesquisa tiveram sua ingestão dietética avaliada em cada momento de coleta fecal. Em cada uma delas, os dados dietéticos obtidos foram traduzidos em energia, macro e micronutrientes (Tabela 4). Observa-se, com base nos resultados estatísticos, que não houve variação significativa no consumo alimentar dos pacientes no período estudado e que este foi semelhante ao dos controles.

Analisando a razão de ingestão *quilocalorias / quilograma de peso corporal* tem-se que o grupo Controle teve média de ingestão energética compatível com manutenção do seu peso (faixa de recomendação: 25-30 kcal/kg/dia), enquanto o grupo Paciente teve seu nível médio de ingestão acima do valor de manutenção, ou seja, a ingestão energética foi correspondente ao nível de ingestão de recuperação de estado nutricional. Outra razão de ingestão, *gramas de proteínas / quilograma de peso corporal*, é utilizada para cálculo e recomendação de consumo protéico sem prejuízo da função renal (recomendação de ingestão: 0,6 a 0,8g de proteínas/kg de peso/dia – para eutróficos utiliza-se peso atual e para subnutridos, peso ajustado em 25% ⁽³⁵⁾); os dois grupos de estudo tiveram ingestão protéica acima dos níveis preconizados.

Tabela 4: Comparação das variáveis dietéticas de pacientes e controles

Variáveis	Controle	Paciente coleta 1	p valor 1*	Paciente coleta 2	p valor 2**
Energia (kcal)	1954	1941	1	2156	0.463
kcal/ kg/ dia	29	41	0.253	51	0.463
Carboidrato (g)	238	239	0.886	281	0.249
% carboidrato*	47	49	0.317	56	0.917
Proteína (g)	89	98	0.568	108	0.463
g de proteína/ kg/ dia	1,3	1,2	0.224	1,5	0.6
% proteína*	18	20	0.558	24	0,463
Lipideo (g)	75	67	0.475	68	0.917
% lipídeo*	34	31	0.116	25	0.463
% gordura monoinsaturada*	11	10	0.886	10	0.6
% gordura poliinsaturada*	9	9	0.775	9	0.6
% gordura saturada*	11	8	0.086	9	0.116
Fibra (g)	24	22	0.886	21	0.463
Colesterol (mg)	195	173	0.886	193	0.6
Tiamina (mg)	2	2	0.668	2	0.752
Riboflavina (mg)	1	2	0.886	2	0.248
Niacina (mg)	17	20	0.317	21	0.917
Piridoxina (mg)	2	2	0.775	2	0.116
Folato (µg)	364	320	0.775	378	0.753
Cobalamina (µg)	5	6	0.617	8	0.463
Vitamina C (mg)	664	991	0.475	1257	0.28
Ca (mg)	730	605	0.391	707	0.345
Cu (mg)	1	1	0.943	1	0.173
Fe (mg)	14	16	0.668	17	0.6
K (mg)	2809	2762	0.775	3556	0.116
Mg (mg)	468	274	0.886	318	0.345
Na (mg)	2943	3238	0.775	3389	0.753
P (mg)	1227	1238	0.775	1324	0.917
Zn (mg)	12	13	0.568	14	0.6
GEB (kcal/dia)	1274	1203	0,317	1166	0,917

*p valor 1 é referente ao teste estatístico para comparação dos valores das variáveis de controles e a primeira coleta dos pacientes.

**p valor 2 é referente ao teste estatístico para comparação dos valores das variáveis da primeira e segunda coleta dos pacientes.

A partir de dados de média de ingestão de macronutrientes, comparou-se a porcentagem que cada um deles, carboidratos, proteínas e lipídeos, representa no Valor Energético Total (VET) ingerido com o intervalo de balanceamento dietético proposto pelas *Dietary References Intake* (DRI). Assim, tem-se que os grupos Paciente e Controle balancearam suas dietas conforme o intervalo de distribuição energética recomendado, visualizado na Figura 3.

A comparação das ingestões das vitaminas tiamina, riboflavina, piridoxina, cobalamina, folato e vitamina C dos grupos Paciente e Controle com as recomendações de ingestão demonstrou que a média de consumo dos grupos foi semelhante e de acordo com a recomendação, exceto para cobalamina e vitamina C que tiveram médias de ingestão acima do recomendado, porém não excedendo o nível máximo tolerado de ingestão (UL) (Figura 4).

Também para as médias de consumo dos minerais cálcio, potássio, sódio, fósforo, cobre, ferro e zinco, a ingestão dos grupos Paciente e Controle foi adequada. Exceto cálcio e potássio, que tiveram a ingestão menor do que a recomendação, os outros minerais foram consumidos adequadamente, nunca ultrapassando suas respectivas UL, conforme o preconizado (Figura 5).

Figura 3: Comparação entre média de consumo de macronutrientes dos grupos Paciente e Controle com suas recomendações de ingestão.

Figura 4: Comparação entre média de consumo de tiamina, riboflavina, piridoxina, cobalamina, folato e vitamina C dos grupos Paciente e Controle com suas recomendações de ingestão.

Figura 5: Comparação entre média de consumo de cálcio, potássio, sódio, fósforo, cobre, ferro e zinco dos grupos Paciente e Controle com suas recomendações de ingestão.

4.1.2. Avaliação antropométrica do estado nutricional

Os resultados da avaliação antropométrica estão apresentados na Tabela 5. Observa-se que o grupo Paciente foi constituído por indivíduos que, em média, apresentavam-se em quadro de subnutrição, classificado com base em valor de IMC (menor que $18,5 \text{ kg/m}^2$), depleção de massa protéica (valor calculado de CMB menor que 90% de adequação) e lipídica (valor medido de DCT e DCSE menor que 90% de adequação). Já os indivíduos do grupo Controle se encontravam dentro dos limites de classificação em eutrofia (valor de IMC entre $18,5$ a $24,9 \text{ kg/m}^2$; valor calculado de CMB entre 90,1 a 110% de

adequação e valor medido de DCT e DCSE entre 90,1 a 110% de adequação). Em relação a estimativa de gasto energético basal (GEB) não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Paciente e Controle. As medidas de circunferências de cintura foram utilizadas como indicativos de risco para doença cardiovascular e, nos dois grupos, estes valores não foram sugestivos de risco aumentado.

Tabela 5: Comparação das variáveis antropométricas de pacientes e controles

Variáveis	Controle	Paciente coleta 1	p valor 1*	Paciente coleta 2	p valor 2**
Peso (kg)	68	52	0.022	50	0.917
IMC (kg/m ²)	23.3	18.7	0.015	17.8	0.917
CB (cm)	29	25	0.012	24	0.34
CMB (cm)	24	22	0.253	21	0.345
DCSE (mm)	17	8	0.003	8	0.891
DCT (mm)	16	9	0.006	7	0.854
CC (cm)	88	79	0,133	74	0,344
GEB (kcal/dia)	1274	1202	0,317	1166	0,917

*p valor 1 é referente ao teste estatístico para comparação dos valores das variáveis de controles e a primeira coleta dos pacientes.

**p valor 2 é referente ao teste estatístico para comparação dos valores das variáveis da primeira e segunda coleta dos pacientes.

4.1.3. Avaliação laboratorial do estado nutricional

Os exames bioquímicos foram obtidos somente do grupo Paciente que os realizam rotineiramente como parte do protocolo de atendimento à SIC. Não se obteve estes dados do grupo Controle uma vez que, para a escolha dos indivíduos que compuseram este grupo, um dos critérios de inclusão foi o bom estado de saúde. Assim, por ser um método invasivo (exige coleta de sangue) e este não ser um fator crucial na determinação do estado nutricional, optou-se

pela não inclusão da avaliação laboratorial do estado nutricional no grupo Controle.

Os valores dos exames bioquímicos foram obtidos nos 2 momentos de coleta fecal e considerava-se os resultados dos exames que, de alguma forma, representam ou são influenciados pelo estado nutricional, ou seja, marcadores bioquímicos dos parâmetros nutricionais. Os valores utilizados foram os dos exames que datavam até 3 meses da data da coleta fecal (Tabela 6).

Valor médio e individual de hemoglobina e hematócrito estiveram abaixo dos seus valores de referência, sugestivo de uma variação metabólica, caracterizada inicialmente como anemia. Houve variação destes parâmetros no período entre as análises na qual 2 pacientes apresentaram discreta melhora e 4 queda dos valores, porém nenhuma variação foi clínica ou estatisticamente significativa (Figura 6 e 7).

Tabela 6: Avaliação laboratorial - exames bioquímicos - grupo Paciente

Variáveis	Valor de referência	Paciente coleta 1	Paciente coleta 2	p valor
Colesterol Total (mg/dl)	< 200	100	105	0.5
LDL (mg/dl)	< 100	49	42	0.273
HDL (mg/dl)	> 40	35	43	0.713
Triglicerídeos (mg/dl)	≤ 150	71	97	0.068
Hemoglobina (g/dl)	♂: 14 a 18 ♀: 12 a 16	11	10	0.248
Hematócrito (%)	♂: 42 a 54 ♀: 36 a 46	34	33	0.167
Volume Corpuscular Médio (mm ³)	84 a 99	92	95	0.518
Ferro sérico (mg/dL)	♂: 65 a 170 ♀: 50 a 170	65	75	0.345
UIBC (µl)	120 a 470	161	170	0.786
Ácido Fólico (ng/ml)	3 a 17	13	10	0.5
Zinco sérico (mg/dl)	60 a 110	62	64	0.465
Magnésio sérico (mg/dl)	1,5 a 2	1,18	1,07	0.344
Proteínas Totais séricas (g/100 ml)	6 a 7,8	6.4	6.5	0.317
Albumina Sérica (g/100 ml)	3,5 a 4,8	2.5	2.8	0.518

Figura 6: Variação dos valores de Hemoglobina – grupo Paciente

Figura 7: Variação dos valores de Hematócrito – grupo Paciente

Os valores séricos de magnésio estavam abaixo do esperado quando comparado com seu valor de referência. E, observando valores de proteínas totais e albuminas, preditores de estado nutricional, principalmente de subnutrição protéica, tem-se que proteínas totais tiveram valor médio entre faixa de referência, enquanto que albumina esteve abaixo da faixa de normalidade.

Quando se analisa os valores individuais destes parâmetros, proteínas totais e albumina, nota-se que metade dos pacientes os apresentou dentro a faixa de referência; já a outra metade dos pacientes apresentou seus valores abaixo do valor de referência de normalidade, e os valores baixos de um parâmetro coincidiu com o valor abaixo da referência do outro parâmetro. Variações intrapessoais no período da coleta de dados não foram clínica nem estatisticamente significantes (Figura 8 e 9).

Figura 8: Variação dos valores de Proteínas totais – grupo Paciente

Figura 9: Variação dos valores de Albumina – grupo Paciente

4.2. Determinação da microbiota intestinal

4.2.1. Isolamento e identificação de bactérias intestinais

Para o grupo Paciente, as texturas de fezes mais prevalentes foram pastosa (5 / 13) e semi-líquida (5 / 13), estando o estado líquido presente em apenas 3 amostras. Todas as amostras de pacientes apresentaram muco junto às fezes, porém em nenhuma foi observada a presença de sangue. No quesito restos alimentares, 9 das 13 amostras de pacientes foram positivas, enquanto que em nenhuma amostra do grupo Controle foi observada a presença dos mesmos (Tabela 7).

Tabela 7: Característica das amostras fecais – grupos Paciente e Controle.

Indivíduo	Grupo	Repetição	Data de Coleta	Textura das fezes	Cor das fezes	Restos alimentares	Presença de muco	Presença de sangue
1	paciente	1	1/3/2009	semi-líquida	amarelo	sim	não	não
2	paciente	1	1/3/2009	semi-líquida	amarelo	sim	sim	não
3	paciente	1	1/3/2009	pastosa	marrom	não	não	não
4	paciente	1	7/3/2009	semi-líquida	marrom	sim	sim	não
5	paciente	1	16/4/2009	pastosa	marrom	não	não	não
6	paciente	1	30/4/2009	líquida	amarelo	não	sim	não
7	paciente	1	30/4/2009	líquida	amarelo	não	sim	não
1	paciente	2	20/8/2009	pastosa	marrom	sim	sim	não
2	paciente	2	10/9/2009	líquida	amarelo	sim	sim	não
3	paciente	2	9/4/2009	pastosa	marrom	sim	sim	não
4	paciente	2	3/6/2009	pastosa	marrom	sim	não	não
5	paciente	2	28/9/2009	semi-líquida	marrom	sim	sim	não
6	paciente	-	-	-	-	-	-	-
7	paciente	2	23/9/2009	semi-líquida	marrom	sim	sim	não
8	controle	1	1/12/2009	pastosa	marrom	não	não	não
9	controle	1	3/12/2009	pastosa	marrom	não	não	não
10	controle	1	29/12/2009	pastosa	marrom	não	não	não
11	controle	1	7/1/2010	pastosa	marrom	não	não	não
12	controle	1	7/1/2010	pastosa	marrom	não	não	não
13	controle	1	22/2/2010	pastosa	marrom	não	não	não
14	controle	1	20/3/2010	pastosa	marrom	não	não	Não

Analisando a microbiota intestinal, verificou-se que a diversidade bacteriana de pacientes e controles são equivalentes ($p=0,21$). Já quando se analisou as 2 categorias de bactérias formadas com base na classificação de Gram (positivos e negativos), notou-se o grupo Paciente, quando comparado ao Controle, teve maior diversidade de bactérias Gram negativas ($p=0,029$) e diversidade semelhante de bactérias Gram positivas ($p=0,072$). Observou-se também que a variação da diversidade bacteriana entre as coletas de repetição do grupo Paciente não foi diferente ($p=0,916$), assim como também foram semelhantes as quantidades de Gram negativas ($p=0,891$) e positivas ($p=0,713$) (Figura 10, 11 e 12).

Verifica-se também, que a família Enterobacteriaceae, representada neste trabalho pelos isolados de bactérias Gram negativas, correspondeu a aproximadamente 64% da variedade total de tipos bacterianos isolados. Entre esses, o gênero mais freqüente encontrado, tanto no grupo Controle quanto Paciente foi *Escherichia coli*, estando presente em todas as amostras de Controle e não sendo determinada em apenas 1 amostra de Paciente.

Notou-se ainda que a ausência da válvula íleo-cecal não influenciou a diversidade bacteriana intestinal dos pacientes, ou seja, pacientes que tiveram sua válvula íleo-cecal retirada apresentaram microbiota intestinal semelhante a dos pacientes cujas válvulas foram mantidas (Tabela 8).

Por ser notória a grande freqüência de pacientes que ingerem drogas inibidoras da bomba de prótons e seu efeito em reduzir a acidez estomacal possivelmente interfere na microbiota do trato gastrointestinal, comparou-se a diversidade bacteriana intestinal dos pacientes que ingeriram com os que não faziam uso da droga omeprazol (única droga ingerida pertencente a classe de

inibidores da bomba de prótons). Observa-se que a média de quantidade de tipos bacterianos nos 2 grupos foi a mesma e que a diversidade de bactérias Gram negativas e positivas também foram semelhantes.

Figura 10: Diversidade de bactérias intestinais aeróbias e anaeróbias facultativas cultiváveis – grupo Paciente, coleta 1.

Figura 11: Diversidade de bactérias intestinais aeróbias e anaeróbias facultativas cultiváveis – grupo Paciente, coleta 2.

Figura 12: Diversidade de bactérias intestinais aeróbias e anaeróbias facultativas cultiváveis – grupo Controle.

Tabela 8: Diversidade bacteriana segundo presença ou ausência de válvula íleo-cecal

Pacientes			
quantidade média	com válvula íleo-cecal	sem válvula íleo-cela	p valor
tipos bacterianos	4 (DP 0.6)	5 (DP 2)	0.586
tipos Gram positivos	0	2 (DP 1)	0.078
tipos Gram negativos	4 (DP 0.6)	4 (DP 1)	1

Dos 2 pacientes que não utilizavam omeprazol no momento da primeira coleta, apenas 1 paciente não consumiu o medicamento durante todo o período de estudo pois o outro paciente, que também não a utilizava no momento da primeira coleta, a consumia no segundo momento. Por esta razão, observou-se o comportamento da microbiota intestinal deste ultimo paciente que inicialmente não consumia a droga e no segundo momento já estava sob seu efeito (Figura 13).

Visualiza-se que antes do uso do omeprazol, a diversidade bacteriana intestinal do paciente analisado foi 2 vezes a diversidade após o uso da droga, com mudança também do perfil bacteriano: sem o efeito da droga a diversidade, além de mais ampla, contou com maior número de tipos de bactérias Gram negativas (5 cepas Gram negativas e 1 Gram positiva) ao passo que, após o uso do medicamento, ampliou-se a diversidade de Gram positivas enquanto Gram negativas não se fizeram mais presente (3 cepas Gram positivas e nenhuma Gram negativa).

Figura 13: Diversidade bacteriana intestinal de 1 paciente sem e com o uso de omeprazol

A fim de se encontrar alguma associação entre a diversidade bacteriana das amostras fecais com outras variáveis pesquisadas no grupo Paciente, realizou-se inferência estatística pela metodologia de coeficiente de correlação de Spearman para verificar a possível correlação entre a diversidade de bactérias, Gram negativas e positivas, com os parâmetros antropométricos e dietéticos. Devido a limitação amostral, foi necessário restringir o número de variáveis para realização do cálculo. Assim optou-se por verificar a associação da diversidade bacteriana com um parâmetro representativo de estado nutricional (IMC) e dois itens dietéticos (fibras e energia). Observa-se que não houve associação entre elas, ou seja, IMC, fibras e energia não influenciaram a diversidade bacteriana fecal nestas amostras (Tabela 9).

Tabela 9: Coeficientes de correlação de Spearman para Quantidade de Gram (positivo / negativo) e Fibra, Índice de Massa Corporal (IMC) e Energia ingerida.

Fibra	r	IC (95%)		P-valor
		LI	LS	
Gram neg	-0.02	-0.46	0.42	0.92
Gram pos	0.31	-0.14	0.66	0.17

IMC	r	IC (95%)		P-valor
		LI	LS	
Gram neg	-0.18	-0.57	0.28	0.43
Gram pos	0.24	-0.22	0.61	0.30

Energia	r	IC (95%)		P-valor
		LI	LS	
Gram neg	0.22	-0.24	0.60	0.34
Gram pos	0.15	-0.31	0.55	0.51

Com os resultados de quantificação bacteriana pelo método de contagem de unidade formadora de colônia (UFC), observou-se que a quantidade média total de UFC foi maior no grupo Controle (11 vezes a quantidade do grupo Paciente) (Tabela 10).

Tabela 10: Quantificação de bactérias por análise de Unidade Formadora de Colônia (UFC) - grupos Paciente e Controle

UFC x 10 ⁴	Controle	Paciente
Total de bactérias	6500	587
Total de Gram positivas	4500	4
Total de Gram negativas	2000	582

4.2.2. Sorologia Convencional

Foram isoladas 409 cepas compatíveis com, segundo testes bioquímicos, *Escherichia coli*. Estas foram submetidas ao teste de sorologia convencional específicos para as *E. coli* patogênicas mais prevalentes na comunidade - EPEC e EIEC – e também para a causadora de doença de maior gravidade – EHEC: as cepas testadas foram negativas para todos os anti-soros aplicados.

4.2.3. Extração de DNA genômico fecal

4.2.3.1. Modelo proposto por Ley *et al*, 2005.

Todas as amostras fecais foram submetidas ao protocolo de extração proposto por Ley *et al*. Os geis contendo DNA genômico são mostrados na Figura 14 e 15, nas quais, as bandas visíveis da primeira coluna são representadas pelo marcador λ -*hind* e as bandas subseqüentes, pelas amostras em ordem numérica crescente; no gel dos pacientes, as colunas iniciais são representantes de amostra da primeira coleta, e as seguintes, da segunda.

Figura 14: DNA genômico de amostra fecal extraído pelo protocolo de Ley et al. – grupo Paciente.

*a letra 'r' significa repetição de coleta de amostra

Figura 15: DNA genômico de amostra fecal extraído pelo protocolo de Ley et al. – grupo Controle.

4.2.3.2. pelo kit QIAamp DNA Stool® - QIAGEN®

Todas as amostras fecais foram submetidas ao protocolo de extração estabelecidos pelo fabricante do kit QIAamp DNA Stool® - QIAGEN®. Os geis contendo DNA genômico são mostrados na Figura 16 e 17.

Figura 16: DNA genômico de amostra fecal extraído pelo kit QIAamp DNA Stool® - QIAGEN® - grupo Paciente.

*a letra 'r' significa repetição de coleta de amostra

Figura 17: DNA genômico de amostra fecal extraído pelo kit QIAamp DNA Stool® - QIAGEN® - grupo Controle.

4.2.4. Amplificação da região intergênica 16S DNAr

Para obtenção das condições ótimas de ciclo e temperatura, foram realizados, inicialmente, PCR sob diferentes concentrações de seus reagentes bem como com diferentes gradientes de temperatura.

Como DNA molde desta reação utilizou-se DNA genômico da amostra número 2, determinado aleatoriamente. Foram empregados, em reações diferentes, DNA genômico extraídos pelos dois protocolos: por Ley *et al* e pelo kit QIAamp DNA Stool® - QIAGEN®.

Após testes para definição da reação ótima, amplificou-se a região intergênica de interesse visualizado na Figura 18. As bandas visíveis da

primeira coluna são representadas pelo marcador λ -*hind*, a segunda e terceira coluna pelas amostras extraídas de fezes repetição 1, protocolo de Ley e kit QIAamp DNA Stool® - QIAGEN®, respectivamente; a quarta e quinta coluna pelas amostras extraídas de fezes repetição 2, protocolo de Ley e kit QIAamp DNA Stool® - QIAGEN®, respectivamente. Observa-se assim, amplificação correta da região esperada em todas as amostras (1,3 Kb).

Figura 18: Amplificação da região intergênica 16S DNAr – paciente 2.

4.2.5. Extração de DNA plasmidial

Aleatoriamente, foram selecionados da biblioteca de clones bacterianos 12 clones que foram submetidos a extração de DNA plasmidial por método de lise alcalina. Para verificação da realização correta do protocolo, uma alíquota

do produto da reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão TAE, a 100V, por 30 minutos. As bandas resolvidas no gel foram visualizadas após coloração com brometo de etídeo, sob iluminação ultravioleta, e fotografadas (Figura 19). As bandas visualizadas na linha superior representam o vetor TOPO e as bandas da segunda linha, os insertos desejados (1,3 Kb).

Figura 19: Verificação da reação de extração de DNA plasmidial – método de lise alcalina.

4.2.6. Quantificação do DNA e Sequenciamento.

O resultado para cada seqüência analisada foi uma gama de possibilidades de microorganismos existentes e já seqüenciados que contenham seqüências similares à analisada. Os dados obtidos foram agrupados segundo os gêneros dos microorganismos (Figura 20 e 21). Observa-se, pelos dois métodos de análise, a predominância do gênero *Lactobacillus*, seguida por microorganismos não cultiváveis (bactérias e lactobacilos).

Figura 20: Identificação de possíveis microorganismos da microbiota intestinal de paciente enterectomizado a partir de dados de sequenciamento de DNA – análise via BLAST.

Figura 21: Identificação de possíveis microorganismos da microbiota intestinal de paciente enterectomizado a partir de dados de sequenciamento de DNA – análise via *Ribosomal Database Project* – RDP.

4.3. Pesquisa de genes relacionados com virulencia de *E. coli* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

4.3.1. Gene *eae*

A cepa E2348/69 foi utilizada para estudo do gene *eae*. Após testes com gradiente de temperatura e diferentes concentrações de reagentes, foi determinado a condição ótima de reação e a amplificação do gene desejado, visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,5% (banda desejada com aproximadamente 600 Kb) (Figura 22). A primeira coluna visualizada representa o marcador θ -*hae*, e a coluna seguinte, a amplificação do gene testado.

Figura 22: Amplificação do gene relacionado à virulência de EPEC – *eae*.

4.3.2. Gene *bfp*

A cepa E2348/69 foi utilizada para estudo do gene *bfp*. Após testes com gradiente de temperatura e diferentes concentrações de reagentes, foi determinado a condição ótima de reação e a amplificação do gene desejado, visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,5% (banda desejada com aproximadamente 300 Kb) (Figura 23). A primeira coluna visualizada representa o marcador *θ-hae*, e a coluna seguinte, a amplificação do gene testado.

Figura 23: Amplificação do gene relacionado à virulência de EPEC – *bfp*.

4.3.3. Gene *ipaH*

A cepa MA245/5 foi utilizada para estudo do gene *ipaH*. Após testes com gradiente de temperatura e diferentes concentrações de reagentes, foi determinado a condição ótima de reação e a amplificação do gene desejado, visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,5% (banda desejada com aproximadamente 900 Kb) (Figura 24). A primeira coluna visualizada representa o marcador θ -hae, e a coluna seguinte, a amplificação do gene testado.

Figura 24: Amplificação do gene relacionado à virulência de EIEC – *ipaH*.

Discussão

5. Discussão

O presente estudo teve como objetivo avaliar a microbiota intestinal de pacientes portadores da SIC. O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (HCFMRP-USP) é um centro de referência brasileiro em tratamento de pacientes portadores desta síndrome. Atualmente, são regularmente atendidos 26 pacientes adultos, sendo que 6 recebem nutrição parenteral periódica na Unidade Metabólica e 20 pacientes são acompanhados ambulatorialmente, sendo que estes não fazem uso de terapia nutricional parenteral pois mantêm-se clinicamente estáveis com a alimentação via oral.

A caracterização do estado nutricional dos pacientes deste estudo confirma os dados literários que caracterizam o estado nutricional de pacientes com SIC como subnutrição e suportam este dado principalmente na perda de grande parte do intestino, o que leva a depleção de massa gordurosa e protéica^(5; 36; 37).

Pacientes e controles, por residirem na mesma região territorial do país, possuem hábitos alimentares semelhantes, o que é visualizado em alimentos e traduzido em macro e micronutrientes. Porém, as ressecções intestinais prejudicam e/ou limitam a absorção dos nutrientes. Assim, a média de absorção energética máxima é de 62% do ingerido; carboidratos, lipídeos e proteínas se limitam a 61%, 54% e 81% de absorção do total ofertado⁽³⁶⁾. Com base nisso, do total das 2000 kcal, em média, consumidas pelos pacientes, apenas 1200 kcal, aproximadamente, são absorvidas o que atende somente seu ao gasto energético basal. Isso, quando em ambiente hospitalar não é

preocupante uma vez que a terapia nutricional parenteral é elaborada a fim de se garantir a cobertura da necessidade energética diária do paciente, deixando as energias e nutrientes provenientes da dieta oral como complemento. Mas, quando em domicílio, os pacientes têm de se manter apenas com a ingestão via oral e, se mantida essa ingestão, cuja absorção cobre apenas a energia basal diária, o estado nutricional de subnutrição possivelmente não será recuperado. É também descrito que pacientes com SIC têm hiperfagia ^(38, 39), porém os resultados apresentados neste estudo não corroboram esse dado uma vez que a ingestão do grupo Paciente foi semelhante a dos controles.

Utilizando para adequação de ingestão de proteínas a razão de gramas de proteínas por quilograma de peso corporal, observa-se que tanto Paciente quanto Controle realiza dieta com ingestão excessiva deste macronutriente (1,2g de proteína/kg/dia em pacientes e 1,3g de proteína/kg/dia em controles), mesmo considerando os limites de absorção dos pacientes. Isto é um ponto preocupante já que muitos pacientes se encontram em quadro de insuficiência renal crônica e a oferta abusiva de proteínas pode agravar e/ou acelerar o processo de prejuízo de função renal ^(35; 40; 41).

Como já descrito, ressecções intestinais acarretam ineficiência na absorção de nutrientes e eletrólitos. A ressecção de um segmento intestinal específico, por exemplo a retirada do íleo, leva a deficiência na absorção de cobalamina ⁽⁹⁾ Assim, nos pacientes deste estudo, em que houve ressecção de praticamente todo o intestino delgado, são esperadas inúmeras carências nutricionais. Dentre os micronutrientes, é comum a depleção de magnésio, como observado neste trabalho. As explicações para esta ocorrência frequente são relacionadas a perdas em secreções, prejuízo na absorção e também a

depleção de sódio aumenta a eliminação de magnésio urinário. Outro fator que faz com que a hipomagnesemia seja freqüente em pacientes com SIC é que ácidos graxos não absorvidos no lúmen intestinal se ligam ao magnésio intraluminal, impedindo sua absorção ⁽³⁷⁾.

Observando-se os pacientes deste estudo, verificou-se a presença de anemia mesmo com níveis de ferro sérico e capacidade latente de ligação do ferro (UIBC) normais. A partir deste fato, é possível que este estado carencial seja conseqüente da subnutrição protéico-energética além da deficiência de ferro. Ou seja, com falta de substrato e energia para manter as funções vitais adequadas, o organismo desvia suas rotas metabólicas para manutenção de processos vitais como o funcionamento cerebral em prejuízo da síntese e função de outros quesitos. ^(1, 4, 8, 42) A produção de proteínas séricas é prejudicada, o que é clinicamente evidenciado como anemia e resultado da diminuição na produção de hemoglobina. Outro exemplo de achado laboratorial que caracteriza subnutrição é a diminuição de albumina séria. Sendo albumina e hemoglobina componentes do item de avaliação bioquímica Proteínas Totais Séricas, é coerente que este também esteja baixo já que 2 de seus componentes estão com valores abaixo da faixa de referência. Deve-se lembrar, no entanto, que este trabalho não avaliou marcadores de processos inflamatórios. Assim, proteínas séricas como albumina e ferritina poderiam estar baixas em resposta negativa ao processo inflamatório, o que levaria também a queda nos valores de Proteínas totais séricas ^(1; 4).

Partindo para análise fecal, verifica-se, a partir de observação macroscópica, grande quantidade de muco presente nas amostras fecais dos pacientes. Este muco excessivo pode ser resultado da presença de alimentos

não digeridos no intestino remanescente o que, juntamente com o tempo de transito intestinal já acelerado por conta da fisiologia da doença, acarretam em diarreias. Estes freqüentes episódios diarreicos levam a eliminação e agressão à barreira mucosa normal do indivíduo que responde com aumento na produção de muco. ⁽⁴³⁾ Outro fator importante neste aumento é a possível presença de inflamação e/ou processo infeccioso intestinal. ^(44, 45)

Em busca de patógenos intestinais, a análise microbiológica foi enfatizada na família Enterobacteriaceae. Esta é classificada como a mais importante família bacteriana por conter uma grande diversidade de espécies patogênicas responsáveis, quase que na totalidade, por infecções hospitalares e intestinais. Em cerca de 90% das amostras de infecções humanas, o agente causador do quadro pertencia a esta família bacteriana, que contém em torno de 30 gêneros e mais de 100 espécies de microorganismos anaeróbios facultativos, cultiváveis facilmente em laboratório ^(17, 46).

É determinado que esta família esteja presente na microbiota intestinal normal sem prejuízos ao hospedeiro ^(47, 48) Uma das explicações para isto é o fato de indivíduos saudáveis possuem sistema imune competente e barreira intestinal íntegra, o que impede a passagem destes para outras partes do organismo além de o intestino contar com um rígido controle de equilíbrio de sua microbiota. A acidez gástrica, um ponto crucial de controle microbiológico, é responsável pelo baixo número de bactérias no intestino delgado proximal. Outro ponto importante de controle microbiológico é a própria regulação dos microorganismos que disputam fontes de carboidratos, oxigênio e até mesmo liberam toxinas aos outros. Assim, bactérias que já são comuns ao trato gastrointestinal e que se encontram em maior quantidade neste ambiente

conseguem impedir o crescimento de um patógeno quando este chega ao lúmen em pequena quantidade ^(17, 47, 48)

Exemplos desses mecanismos são os lactobacilos, membros da microbiota intestinal humana normal, que inibem o crescimento de outros membros da microbiota e competem por sítios de adesão com microorganismos oportunistas. A *Escherichia coli* inibe o crescimento de *Shigella* por competir por fontes de carboidratos. Bactérias anaeróbias facultativas, quando consomem o oxigênio local, favorecem o crescimento de anaeróbias restritas. Além disso, subprodutos metabólicos selecionam bactérias capazes de utilizá-los; geralmente as anaeróbias se adaptam e processam melhor os ácidos acético, butírico e propiônico. ^(17, 49)

Os resultados das análises microbiológicas a procura de patógenos revelou uma maior diversidade de bactérias da família Enterobacteriaceae em pacientes portadores da SIC, quando comparada aos controles. Este achado se torna preocupante quando se associa a isto com o quadro de subnutrição crônica destes pacientes, o que acaba por comprometer o sistema imunológico dos mesmos e também facilita a abertura de canais intercelulares entre os enterócitos ^(1; 50). Com a depressão do sistema imune, perda da barreira imune intestinal e facilidade na passagem de microorganismos do lúmen intestinal para a circulação devido ao espaçamento entre os enterócitos, há grande preocupação de que estes patógenos encontrados nas amostras fecais de pacientes possam invadir a circulação e causar focos infecciosos e até mesmo sepse ⁽⁵¹⁾.

Analisando a influencia da válvula íleo-cecal na microbiota intestinal dos pacientes, observa-se que, neste trabalho, pacientes com e sem válvula íleo-

cecal possuíam diversidade bacteriana intestinal semelhante, fato talvez influenciado pelo baixo tamanho amostral que limita maiores observações. Mas sabe-se que esta válvula exerce grande influência no controle microbiológico, evitando o supercrescimento bacteriano no intestino delgado proximal ^(1; 3; 6).

Como já exposto, a acidez estomacal também é ponto determinante de colonização do trato gastrointestinal. Por isso, o uso crônico de anti-ácidos pode mudar o pH estomacal e do intestino proximal, possibilitando mudanças na microbiota local. Como a maioria dos pacientes deste estudo ingeria droga inibidora da bomba de prótons – omeprazol – rotineiramente, analisou-se a influência deste medicamento a microbiota intestinal, porém nenhuma diferença foi encontrada entre os que ingeriam e os que não ingeriam o medicamento, achado também possível de influência devido ao pequeno tamanho amostral. Mas, ao observar a microbiota de 1 paciente que não consumia omeprazol no primeiro momento e utilizava no segundo momento de coleta, verifica-se o possível efeito do medicamento em diminuir a presença de cepas da família Enterobacteriaceae na microbiota intestinal, o contrário do afirma a literatura quando diz que o uso crônico deste tipo de medicamento pode influenciar negativamente a mudança da diversidade bacteriana do trato gastrointestinal ^(1; 3; 7).

Em pacientes, as cepas mais prevalentes nas amostras fecais foram *Escherichia coli* e *Klebsiella ssp*. Cepas de *Klebsiella* estão relacionadas à vários casos de morte por infecção nosocomial, principalmente pneumonia ^(17, 46). Já *E. coli*, também relacionada com vários focos infecciosos (entre os principais estão infecções do trato urinário) é especialmente analisada devido a grande parte das cepas patogênicas colonizarem o trato intestinal e causarem

diarréias que, em indivíduos com estado nutricional comprometido como os pacientes deste estudo, podem levar até a morte^(21, 22).

Assim, por análise sorológica com soros específicos para as principais cepas causadoras de diarréias em nosso meio, constatou-se que nenhuma delas foi positiva para patogenicidade em trato gastrointestinal, o que era esperado, uma vez que nenhum indivíduo apresentou queixas gastrointestinais que apontariam para infecção.

Em vista da importância de detecção e tratamento de infecções ocasionadas por estes patógenos, houve uma preocupação com o desenvolvimento de métodos que fossem mais acurados e ao mesmo tempo simples, rápidos e de baixo custo. O método molecular Reação em Cadeia da Polimerase – PCR - com utilização de *primers* específicos para amplificação de genes relacionados à virulência das cepas se enquadram neste quesito.

Após a revisão literária para determinação das cepas patogênicas mais prevalentes em nosso meio, foram desenvolvidos *primers* específicos para os genes relacionados à virulência de *E. coli enteropatogênica* (EPEC), responsáveis por adesão aos enterócitos e comprometimento de sua função, e *E. coli enteroinvasiva* (EIEC) que tem por características a invasão e destruição dos enterócitos, possibilitando assim a aplicação futura deste método na detecção destas espécies bacterianas.

Porém, ao mesmo tempo em que pacientes têm maior diversidade de bactérias Gram negativas em relação ao controle, apresentam concentração bacteriana em menor quantidade. Este fato pode ser explicado pela retirada de sítios de colonização das bactérias, ou seja, ressecções intestinais eliminam locais de colonização e concentração de microorganismos, fazendo então com

que o número de bactérias por grama de fezes seja menor em enterectomizados que em indivíduos com intestino íntegro. Outro fato que pode ter contribuído para o menor número de bactérias em pacientes é que estes fazem uso freqüente de antibióticos com fins terapêuticos, pois focos infecciosos, principalmente em cateteres, são comuns e uma das principais causas de morte de pacientes com SIC ⁽¹³⁾.

A análise geral da microbiota intestinal de pacientes com SIC foi feita a partir de análise da região de DNA ribossomal 16S, técnica molecular amplamente utilizada em análises microbiológicas. A região de DNA ribossomal analisada é uma região intergênica que possui sítios fortemente conservados, caracterizando os procariotos, e sítios fortemente característicos de cada espécie bacteriana. Assim, consiste em um método aplicável e confiável na determinação de microorganismos.

Com a determinação das espécies bacterianas por meio de análise das seqüências destes fragmentos de DNA, verificou-se que a grande maioria dos microorganismos analisados teve sua seqüência compatível com *Lactobacillus ssp.*

Este microorganismo é comum a microbiota intestinal humana e compõe grande parte deste microbioma, um ambiente anaeróbio que determina, portanto, a sobrevivência de cepas anaeróbias restritas e/ou facultativas, como este exemplo. *Lactobacillus ssp* exercem funções vitais ao indivíduo como recuperação da energia ingerida não absorvida, transformação de produtos dietéticos em substrato energético para enterócitos, fermentação de fibras alimentares, proteção da barreira mucosa intestinal contra agressão de patógenos, entre outros ^(17, 18, 19). Assim, observa-se a necessidade de se

manter este gênero na microbiota intestinal e a busca da manutenção da proporção destes microorganismos neste meio. Mesmo que possivelmente haja diminuição do número absoluto destes organismos, a relação destes com o total de organismos presente neste meio é mantida.

Estudos de outras patologias intestinais como Doença de Chron e Síndrome do Intestino Irritável verificam alterações na microbiota intestinal, possivelmente caracterizando esta microbiota intestinal doente ^(52, 53, 54). Nestes casos, há diminuição na porcentagem do filo Firmicutes, ao qual pertencem os *Lactobacillus*, e aumento de Bacteroides. Nestes casos, a utilização terapêutica de probióticos que continham cepas viáveis de *Lactobacillus ssp* mostrou-se eficaz na diminuição dos sintomas das doenças, concretizando assim a necessidade de manutenção do padrão maior destes microorganismos para a organização ideal do metabolismo e saúde do indivíduo.

Assim, observa-se a necessidade de contínuas pesquisas em busca da caracterização da microbiota intestinal de pacientes portadores da Síndrome do Intestino Curto a fim de se caminhar para a determinação da real microbiota intestinal destes pacientes, abrindo caminhos para novas terapêuticas que visem à diminuição de sintomas, recuperação de estado nutricional e melhora em suas sobrevidas.

Portanto, com base nos resultados apresentados conclui-se que os pacientes com deste estudo, portadores da SIC, recebendo nutrição parenteral cíclica e em estado de subnutrição, possuem microbiota intestinal semelhante a de indivíduos sadios da comunidade, com diferença apenas na diversidade de cepas Gram negativas, que está aumentada. Estas cepas pertencem a família Enterobacteriaceae, a família bacteriana mais importante em patogenicidade.

Assim, diversidade aumentada desta família na microbiota intestinal dos pacientes com SIC pode ocasionar prejuízos imensuráveis a saúde dos mesmos por se tratar de indivíduos com sistema imune comprometido devido ao quadro de subnutrição grave.

Conclusões

6. Conclusões

Com base nos resultados apresentados nesse estudo, podemos concluir:

- Os pacientes portadores da SIC recebendo terapia nutricional parenteral cíclica estão em estado de subnutrição protéico-energética.
- Com retirada de quase a totalidade do intestino delgado, pacientes têm seu estado metabólico em constante risco pela facilidade de desequilíbrio eletrolítico, neste estudo exemplificado por hipomagnesemia.
- o consumo protéico de pacientes e controles é excessivo, ultrapassando os limites de recomendação de ingestão deste macronutriente.
- Pacientes com SIC têm diversidade intestinal de bactérias da família Enterobacteriaceae aumentada em relação ao controle.
- A ausência da válvula íleo-cecal não influenciou a diversidade da microbiota intestinal dos pacientes com SIC.
- O uso crônico de droga inibidora da bomba de prótons não influenciou a diversidade da microbiota intestinal dos pacientes.
- A análise da microbiota intestinal de 1 paciente que iniciou o uso do medicamento omeprazol durante o período do estudo mostrou aumento de cepas Gram positivas e diminuição de Gram negativas após o uso da medicação.
- Apesar da maior diversidade bacteriana, pacientes com SIC têm menor quantidade de bactérias por grama de amostra em comparação aos indivíduos sadios do grupo Controle.

- Há manutenção da proporção das espécies bacterianas colonizadoras intestinais, com predomínio de *Lactobacilos*, em pacientes com SIC.
- A aplicação de métodos de biologia molecular para caracterização da microbiota intestinal é uma ferramenta importante visto a imensa diversidade bacteriana nesse nicho e a impossibilidade de detecção de toda variedade por métodos microbiológicos de cultivo.
- O desenvolvimento de métodos rápidos e eficazes, como a PCR, na detecção de cepas patogênicas de *E. coli* é de extrema relevância na prática clínica uma vez que diarreia ainda é um problema de saúde pública no Brasil e que o quadro clínico dos pacientes com SIC é composto por episódios diarreicos, e este fato pode mascarar possíveis contaminações por cepas enteropatogênicas, aumentando os riscos de vida destes pacientes com comprometimento imunológico.

Referências

7. Referências

1. Greenberger NJ, Isselbacher KJ. Disorders of Absorption. Principles of *Internal Medicine*. Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Kasper DL, Jameson JL. 20ª Edição. 2005.
2. Marchini, JS, Unamuno, MRDL, Lemos Neto PA, Carneiro JJ, Oliveira, JED, Iglesias ACRG, Vannucchi H. Short bowel syndrome: physiopathological and clinical aspects, and long-term nutritional support. *Medicina, Ribeirão Preto* 27: 310-9, 1994.
3. Lawrence SF, Marvin HS, Mark LF. *Gastrointestinal and Liver Disease*. Editora W.B. Saunders Co. 8ª Edição. 2006.
4. Goldman L, Ausiello DA. *Cecil: Tratado de Medicina Interna*. Editora Elsevier. 22ª Edição. 2005.
5. Borges NJBG, Nonino-Borges CB, Unamuno MRDL, Suen VMM, Marchini JS. Terapia Nutricional na Síndrome do Intestino Curto. *Nutrição Clínica*. Helio Vannucchi, Julio Sérgio Marchini – *Nutrição Clínica*, pág 49-64. Ed. Guanabar Kooga S.A., 1ª Edição, 2007.
6. Carlson GL. Surgical Management of intestinal failure. *Nutrition Society*, 2003; 62: 711-718.
7. Beyer PL, MS, RD, LD. Terapia Nutricional para os Distúrbios do Trato Grastintestinal Inferior. *Alimentos, nutrição e dietoterapia*. L. Kathleen Mahan, Sylvia Escott-Stumo. Pág 672-703. São Paulo: Roca, 11ª Edição, 2005.
8. Beyer PL, MS, RD, LD. Terapia Nutricional para os Distúrbios do Trato Grastintestinal Inferior. *Alimentos, nutrição e dietoterapia*. L. Kathleen

-
- Mahan, Sylvia Escott-Stumo. Pág 672-703. São Paulo: Roca, 11^a Edição, 2005.
9. Nonino CB, Borges RM, Pasquali LS, Marchini JS. Terapia Nutricional Oral em Pacientes com Síndrome do Intestino Curto. Rev. Nutr. Campinas, 14(3): 201-205, set./dez., 2001.
10. Neves JS, Nascimento JEA, Silva MHGG, Bicudo A, Nascimento M, Nochi Junior R. Influência da Glutamina na Mucosa do Intestino Delgado de Ratos Submetidos à Enterectomia Extensa. Rev. Col. Bras. Cir., 30(6): 406-415, 2003.
11. Welters CF, Dejong CH, Deutz NE, Heineman E. Intestinal function and metabolism in the early adaptive phase after massive small bowel resection in the rat. J Pediatr Surg. 36(12):1746-51, 2001.
12. Banerjee A, Warwicker P. Acute renal failure and metabolic disturbances in the short bowel syndrome. Q. J. Med, 95:37-40, 2002.
13. Machado JC, Suen VMM, Figueiredo JFC, Marchini JS. Biofilms, infection and parenteral nutrition therapy. Journal of Parenteral Enteral Nutrition, *in press*
14. Dibaise JK, Young RJ, Vanderhoof JA. Enteric microbiota flora, bacterial overgrowth and short bowel syndrome. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 4:11-20, 2006.
15. Bongaerts GPA, Tolboom JJM, Naber AH, Sperl WJ, Severijnen RS, Bakkeren JA, Willems JL. Role of bacteria in the pathogenesis of short bowel syndrome-associated D-lactic acidemia. Microb. Pathog. 22(5): 285-293, 1997.

-
16. Carbonnel F, Beaugierie L, Abou RA, D'Almagne H, Rozenbaum W, Le Quintrec Y, Gendre JP, Cosnes J. Macronutrient intake and malabsorption in HIV infection: a comparison with other malabsorptive states. *Gut*, 41:805-810,1997.
 17. Trabulsi LR, Sampaio MC. Microbiota ou Flora Normal do Corpo Humano. *Microbiologia*. Trabulsi LR, Alterthum F. pág. 101-174. Ed. Atheneu, 4ª Edição, 2004.
 18. Ecburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, 10; 308 (5728): 1635-1638, 2005.
 19. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T, Tanaka R. Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bactéria in Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12): 7220-7228, 2004.
 20. Kaneko T, Bando Y, Kurihara H, Satomi K, Nonoyama K, Matsuura N. Fecal Microflora in a Patient with Short-Bowel Syndrome and Identification of Dominant Lactobacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(12) 3181-3185, 1997.
 21. Aranda KRS., Fabbricotti SH, Fagundes-Neto U, Scaletsky ICA. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. *FEMS Microbiol. Lett.* 267: 145-150. 2007.
 22. Vidal M, Kruger E, Durán C, Lagos R, Levine M, Prado V, Toro C, Vidal R. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six

- categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 5362-5365, 2005.
23. Santos LC, Toral N, Cintra IP. Inquéritos Para Avaliação do Consumo Alimentar: Aplicabilidade na Prática Clínica. *Atenção Nutricional: Abordagem Dietoterápica em Adultos*. Moreira EAM, Chiarelo PG. pág. 36-46, Guanabara Koogan, 1ª Edição, 2008.
24. www.usda.gov – Acessado em 20 de janeiro de 2010.
25. Miles JM. Energy expenditure in hospitalized patients: implications for nutritional support. *Mayo Clin Proc.* 81(6), 809-816, 2006.
26. www.who.int – Acessado em 25 de agosto de 2008.
27. *National Committee for Clinical Laboratory Standards - USA* (NCCCLS, 2007) - www.clsi.org
28. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JL. Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS*, 102(31), 2005.
29. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ª edição. Editora: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
30. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> – Acessado em 03 de março de 2010.
31. <http://rdp.cme.msu.edu> – Acessado em 03 de março de 2010.
32. Araújo MR. Identificação dos sorogrupos enteropatogênicos STEC, EPEC, E EIEC DE *Escherichia coli* através da caracterização de padrões de adesão e invasão em Células HEp-2 e pela técnica de MULTIPLEX-PCR. 2004. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul.

-
33. Saiki et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239:487-491. 1988.
 34. Pagano M, Gauvreau K. *Princípios de Bioestatística*, São Paulo: Thomson, 2004.
 35. Toigo G, Aparicio M, Attman PO, Cano N, Cianciaruso B, Engel B, Fouque D, Heidland A, Teplan V, Wanner C. Expert working group report on nutrition in adult patients with renal insufficiency. *Clinical Nutrition*, 19(3):197-207, 2000.
 36. Lochs H, Dejong C, Hammarqvist F, Hebuterne X, Leon-Sanz M, Schutz T, Gemert W, Gossum A, Valentini L, Lubke H, Bischoff S, Engelmann N, Thul P. ESPEN Guidelines on enteral nutrition: gastroenterology. *Clinical Nutrition*, 25:260-274, 2006.
 37. Gossum A, Cabre E, Hébuterne X, Jeppesen P, Krznaric Z, Messing B, Powell-Tuck J, Staun M, Nightingale J. ESPEN Guidelines on parenteral nutrition: gastroenterology. *Clinical Nutrition*, 28:415-427, 2009.
 38. Joly F, Mayeur C, Messing B, Lavergne-Slove A, Cazals-Hatem D, Noordine ML, Cherbuy C, Duée PH, Thomas M. Morphological adaptation with preserved proliferation/transporter content in the colon of patients with short bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 297: G116-G123. 2009.
 39. Compher CW, Kinosian BP, Metz DC. Ghrelin does not predict adaptative hyperphagia in patients with short bowel syndrome. *J Parenter Enteral Nutr*. 33(4): 428-32. 2009.

-
40. Cano N, Fiaccadori E, Tesinsky P, Toigo G, Druml W, Kuhlmann M, Mann H, Hörl WH. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition Adult Renal Failure. *Clinical Nutrition*, 25, 295-310. 2006.
41. Cano NJM, Aparicio M, Brunori G, Carrero JJ, Cianciaruso B, Fiaccadori E, Lindholm B, Teplan V, Fouque D, Guarnieri G. ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: Adult Renal Failure. *Clinical Nutrition*, 28: 401-414. 2009.
42. García-Urkia N, Aldazabal P, Asensio AB, Garcia-Arenzana JM, Bachiller P, Eizaguirre I. Short Bowel Syndrome in the Research setting: 15 years' experiences.
43. Carlson GL. Surgical Management of intestinal failure. *Nutrition Society*, 62: 711-718. 2003.
44. Kim ES, Cheon JH, Park JJ, Moon CM, Hong SP, Kim TI, Kim WH. Colonoscopy as an adjunctive method for the diagnosis of irritable bowel syndrome: focus on pain perception. *J Gastroenterol Hepatol*. 25(7): 1232-8. 2010.
45. Surawicz CM. Mechanism of Diarrhea. *Curr Gastroenterol Rep*. 2010.
46. Murray P *et al*. Manual of clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Ed. 8, Washington, 2003.
47. Bircher JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R, Gordon JI. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science Express*, 2008.
48. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome Project. *Nature*. 18;449(7164):804-10. 2007.

-
49. Morimoto K, Takeshita T, Nanno M, Tokodume S, Najayama K. Modulation of natural killer cell activity by supplementation of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in habitual smokers. *Prev Med.* 40(5): 589-95. 2005.
50. Takeda K, Okumura K. Effects of fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain *shirota* on the human NK-cell activity. *J. Nutri.* 137: 7915-7935. 2007.
51. Klatt NR, Harris LD, Vinton CL, Sung H, Briant JA, Tabb B, Morcock D, McGinty JW, Lifson JD, Lafont BA, Martin MA, Levine AD, Estes JD, Brenchley JM. Compromised gastrointestinal integrity in pigtail macaques is associated with increased microbial translocation, immune activation, and IL-17 production in the absence of SIV infection. *Mucosal Immunol.* 3(4): 387-98. 2010.
52. Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, Matsumoto K, Takada T, Nomoyo K. Establishment of an analytical system for the human fecal microbiota, based on reverse transcription-quantitative PCR targeting of multicopy rRNA molecules. *Applied and Environmental Microbiology.* 1961-1969. 2009.
53. Bazzocchi G, Gionchetti P, Almerigi PF, Amadini C, Campieri M. Intestinal microflora and oral bacteriotherapy in irritable bowel syndrome. *Digest Liver Dis.* 34(2):S24-53. 2002.
54. Conte M, Schippa S, Zamboni I, Penta M, Chiarini F, Seganti L, Osborn J, Falconieri P, Barrelli O, Cucchiara S. Gut-associated bacterial microbiota in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 55: 1760-1767. 2006.