

Embora a etiologia das doenças inflamatórias intestinais permaneça desconhecida dos dias atuais, amplas evidências sugerem que a microbiota intestinal e seus produtos seria o possível fator responsável pelo início, cronificação e recidivas destas doenças, por complicações sépticas e contribuiria para o desenvolvimento de algumas manifestações extra-intestinais (SARTOR, 2000).

Os aspectos clínicos e as alterações histológicas similares entre retocolite ulcerativa (RCU) e disenteria bacilar e entre doença de Crohn e tuberculose, foram as observações iniciais que sugeriram possível etiologia infecciosa para estas doenças.

Entre as teorias mais aceitas, acredita-se que a flora intestinal poderia interferir basicamente por quatro mecanismos: (1) reação inflamatória intestinal causada por um agente patogênico específico e persistente, (2) disbiose, caracterizada por alteração na função e composição bacteriana, (3) exposição da mucosa intestinal a produtos da flora bacteriana por quebra da barreira intestinal ou (4) resposta

inflamatória exarcebada e aberrante, incluindo perda da tolerância imune a antígenos intraluminais (FARREL, LAMONT, 2002).

Com o advento de técnicas mais sensíveis de detecção de DNA microbiano, houve um recrudescimento do entusiasmo em pesquisar agentes específicos para as doenças inflamatórias intestinais.

Mais recentemente, o *Mycobacterium tuberculosis*, o vírus do sarampo e *Listeria monocytogenes* têm sido citados como possíveis causas de doença inflamatória intestinal, principalmente da doença de Crohn (ARDIZZONE et al.,1999; FIOCCHI, 1998; SHANAHAN, 2000). Entretanto, nenhuma pesquisa, até o momento, conseguiu evidenciar uma correlação direta e irrefutável da participação destes microrganismos no aparecimento e na evolução destas doenças.

Além destes, a *Escherichia coli* patogênica( COOKE, 1974; BURKE, AXON, 1987,1988), *Clostridium difficile*, *Cryptosporidium*, *Legionella*, *Shigella*, *Helicobacter hepaticus* e os vírus da imunodeficiência humana e hepatite C e D (FARREL, LAMONT, 2002), são citados como possíveis agentes específicos.

Entretanto, nenhum destes agentes foram adequadamente estudados em investigações controladas e os tratamentos direcionados a agentes específicos não tenham sido efetivos no tratamento das doenças inflamatórias intestinais (SARTOR,1997).

As alterações dos componentes da flora intestinal (disbiose) são outras evidências da participação bacteriana na etiologia destas doenças, sendo geralmente estudadas através de modelos experimentais, onde a participação da flora é condição primordial para a completa expressão da doença (GORDON et al., 1997).

Sabe-se ainda, que estudos realizados em animais axênicos (animais livres de germes), evidenciam a função primordial da participação bacteriana nas doenças inflamatórias intestinais (DII), por mostrarem que, na ausência de bactérias, não ocorre inflamação da mucosa intestinal (ELSON, 1999).

A flora intestinal apresenta duas formas distintas: bactérias que são encontradas regularmente em todos (flora transitória) e bactérias específicas a cada indivíduo, chamada de flora indígena ou microbiota (BERG, 1996)

Os estudos iniciais da microbiota intestinal eram, em sua maioria, realizados através da coleta de fezes ou de conteúdo intestinal colhido durante cirurgias. Entretanto, nestes materiais, a verdadeira flora indígena, está associada com a flora intestinal transitória, de menor importância para os processos morfo-fisiológicos intestinais.

Apenas mais recentemente, maior atenção têm sido dada para a microflora do epitélio colorretal, onde cresce flora distinta, que difere quantitativa e qualitativamente da flora luminal e fecal, podendo ter um

papel importante na etiologia das doenças inflamatórias intestinais (POXTON et al., 1997).

Os estudos que utilizam coleta de fezes para a identificação da microbiota intestinal têm como desvantagem a presença maior de flora transitória, que eventualmente pode esconder a verdadeira flora intestinal do indivíduo.

Estudos mais sensíveis são realizados por biópsias da mucosa intestinal, reações metabólicas ou por reação em cadeia da polimerase (PCR), identificando de forma bastante significativa, os componentes da flora bacteriana associada à mucosa intestinal. Entretanto, dificuldades éticas, principalmente de realização de biópsias de mucosa em indivíduos saudáveis, dificultam as pesquisas com esta metodologia.

Entre as alternativas encontradas para contornar esta limitação, está a coleta do muco que recobre a mucosa intestinal, que apresenta microbiota característica da flora endógena do indivíduo e que sofre menos efeitos das alterações da frequência evacuatória (diarréia) e de sangramento intestinal (HARTLEY et al., 1992).

Apesar de todo conhecimento em relação à microbiota, não encontramos estudos que determinassem, através da coleta do muco intestinal, a concentração e localização das principais bactérias aeróbias e anaeróbias nos diversos segmentos intestinais num mesmo doente,

portador de retocolite ulcerativa, antes e após realização de retocoliectomia com anastomose de bolsa ileal ao canal anal.

Seguindo a linha de pesquisa em doenças inflamatórias intestinais, adotada pela Disciplina de Coloproctologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, iniciada por KISS, em 1992, que estudou pela microscopia eletrônica a superfície epitelial do íleo em reservatórios ileais pélvicos e após anastomose ileorretal, demonstrando que havia um processo de “colonização” da mucosa ileal e continuada por ROCHA, em 1996, que observou que esse processo só se iniciava a partir do fluxo de fezes nestes reservatórios, é que, no intuito de acrescentar maiores informações e entendimento deste processo, do ponto de vista de conteúdo bacteriano, desenvolveu-se este estudo pareado, em pacientes portadores de retocolite ulcerativa, antes e após realização de retocoliectomia com anastomose de bolsa ileal ao canal anal.

### **1.1. Objetivo**

Assim, será objetivo desse estudo, identificar quantitativa e qualitativamente, as bactérias do muco intestinal em doentes portadores de retocolite ulcerativa grave, antes e após realização de retocoliectomia com anastomose de bolsa ileal ao canal anal, comparando a frequência e a concentração média destas bactérias no pré-operatório, com a flora bacteriana da bolsa ileal e com um grupo controle.

## **Microbiota Intestinal**

O ser humano vive em estreita associação com um grande número de microorganismos, presentes na pele, na boca e no trato gastrointestinal. Existe íntima relação entre o hospedeiro e sua microflora, que foi se desenvolvendo de acordo com a evolução da espécie humana.

Embora bactérias fecais tenham sido observadas microscopicamente há pelo menos 300 anos por van Leeuwenhoek, só recentemente o grau de colonização microbiana do trato gastrointestinal baixo passou a ter sua importância reconhecida.

SAVAGE, em 1977, observou que existe aproximadamente  $10^{14}$  células associadas ao corpo humano e que cerca de 90% delas são microrganismos, cuja grande maioria reside no cólon.

A visão tradicional que se tinha do intestino grosso era que fosse apenas um apêndice do trato digestivo, cuja principal função seria a conservação de água e sódio e o armazenamento dos resíduos fecais a serem eliminados. Entretanto, sabe-se atualmente, que o potencial metabólico da microbiota colônica humana é extremamente importante e grandioso, rivalizando com o fígado em número de reações bioquímicas e transformações em que ele participa (MACFARLANE; MACFARLANE, 1997).

Do ponto de vista histórico, alguns autores foram os responsáveis pelos conhecimentos básicos que hoje norteiam a visão atual da relação micróbio-hospedeiro.

Pasteur postulava que a composição da flora indígena era de fundamental importância para o bem-estar do indivíduo, devido interação entre hospedeiro e bactéria (GUSTAFSSON, 1982).

A introdução dos antibióticos, que interagem profundamente com a microbiota normal, também mostrou que esta interação é cada vez mais evidente nos seres humanos. Sintomas que são encontrados em animais livres de germes, por exemplo, podem ser encontrados em pacientes tratados com antibióticos e persistirem por longos períodos de tempo (BORGSTRÖM et al., 1977).

O conceito conhecido como colonização resistente, onde a flora intestinal protegeria contra infecções causadas por agentes patogênicos,



foi introduzido por van der WAAIJ et al.(1971). Estes autores observaram, em estudos experimentais, que o uso de antibióticos por via oral causava diminuição da resistência à colonização por flora não indígena.

Sabe-se atualmente, que esta resistência da flora intestinal normal, está associada com a estabilidade desta microbiota e seu efeito no sistema imune, uso de antimicrobianos, produção de bacteriocinas e com a competição por nutrientes e locais de adesão na mucosa intestinal (SALMINEN et al., 1995).

Assim, o conhecimento adequado da flora endógena foi essencial não apenas para o entendimento da fisiologia da digestão, como também para o entendimento da patologia e tratamento das doenças intestinais microbianas.

Apesar desses ensaios iniciais, só recentemente se desenvolveram métodos que permitem caracterizar diretamente os mecanismos moleculares responsáveis pelo estabelecimento e manutenção dos vários ecossistemas microbianos localizados na superfície mucosa.

O trato gastrointestinal humano no útero é estéril. Após poucas horas do nascimento, os orifícios oral e anal são colonizados e *Escherichia coli*, clostrídeos e estreptococos podem ser encontrados no reto. A flora intestinal nesse período é variável e derivada primariamente do ambiente da criança (BERTAZZONI et al., 1978).

As bactérias que colonizam o cólon dependem principalmente do tipo de alimentação, ou seja, se a criança é alimentada no peito ou com outros tipos de alimentos. As fezes das crianças alimentadas com leite materno apresentam grande concentração de bactérias gram-positivas, principalmente *Lactobacillus bifidus*, enquanto que as das crianças alimentadas com outros leites são mais complexas, com predominância de aeróbios e anaeróbios gram-negativos, semelhante as fezes de crianças mais velhas, com uma dieta mista (COLGAN, 1956).

A flora individual das fezes é marcadamente estável em cada indivíduo em amostras seriadas. Entretanto, tanto o número quanto os tipos de alguns organismos menores flutuam de espécie para espécie (NICHOLS, CONDON, 1975).

Pessoas de diferentes localidades podem apresentar variações da microflora intestinal. Assim, adultos ingleses apresentavam significativamente mais *Bacteroides* e *Bifidobacterium* que ugandenses residentes em Londres (ARIES et al., 1969). Ou ainda, americanos que consumiam dieta ocidental, possuíam mais bactérias anaeróbias que vegetarianos, japoneses e chineses (REDDY; WYNDER, 1973; FINEGOLD et al., 1974).

Entretanto, estas diferenças parecem estar mais ligadas com a dieta, que pode modificar a composição da microflora intestinal, do que com origem étnica ou fatores climáticos (REDDY et al., 1975).

Idade é outro fator que influencia a flora colônica, onde pessoas mais idosas têm poucos bacilos anaeróbios, mais fungos e coliformes que os jovens.

BERTAZZONI-MINELLI et al. (1993), estudaram, em mulheres, a relação entre a composição da flora fecal e a idade. Observaram que nas mulheres menopausadas, as amostras fecais continham mais fungos, clostrídios e lactobacilos que aquelas de mulheres em idade fértil. Concluíram que as alterações hormonais da menopausa influenciam na flora fecal e que a diminuição da função imune e da motilidade intestinal neste período também poderiam determinar mudanças no perfil bacteriano fecal.

Diarréia e gastroenterites geralmente determinam diminuição do número de coliformes. Pacientes com retocolite ulcerativa grave ou doença de Crohn que envolve o cólon, apresentam aumento de bactérias coliformes aeróbicas nas fezes (COOKE, 1967).

A microflora gastrointestinal está dividida em dois grandes grupos: flora oral e flora fecal, ambas contendo uma mistura de germes aeróbios e anaeróbios. Pode ainda ser dividida em transitória e indígena, embora freqüentemente seja difícil distingui-las entre si (SALMINEN et al., 1995).

A saliva contém aproximadamente  $10^6$  unidades formadoras de colônias (ufc) por mililitro de flora mista. O estômago normalmente

apresenta concentrações muito baixas ( $10^1$  a  $10^2$  ufc/ml) de algumas espécies aeróbicas ácido-resistentes como estreptococos, lactobacillus e fungos e transitoriamente, após as refeições, apresenta elevação dessa concentração devido a saliva deglutida com os alimentos. Entretanto, essa flora é largamente destruída pelo ácido gástrico, passando apenas alguns poucos microorganismos para o duodeno e intestino delgado (NICHOLS, 1996).

No intestino proximal, zona que inclui duodeno, jejuno e grande parte do íleo, observa-se microflora de menos que  $10^4$  ufc/ ml, composta predominantemente por estreptococos aeróbicos gram-positivos e lactobacillus, além de anaeróbios da cavidade oral. Essa flora de transição é originada da cavidade oral e passa para o trato gastrointestinal após as refeições.

A flora do íleo terminal costuma resultar, em grande parte, do contínuo refluxo de bactérias fecais através da válvula íleo-cecal, apresentando uma concentração de aeróbios e anaeróbios em torno de  $10^4$  a  $10^5$  ufc/ ml. *Escherichia coli*, o mais prevalente dos aeróbios, foi isolado em concentrações de  $10^6$  a  $10^8$  /g de conteúdo intestinal e o *Bacteroides fragilis*, o mais frequente dos anaeróbios, tinha concentração de  $10^9$  a  $10^{11}$  (NICHOLS; CONDON, 1971).

Na microflora fecal do intestino grosso humano, predominam anaeróbios não esporulados, que representam 99% do total de microrganismos desta região (HILL; DRASAR, 1985).

Os bacteróides, especialmente o *Bacteroides fragilis*, são os anaeróbios mais freqüentemente encontrados nos estudos que utilizam amostras fecais, observando-se ainda bifidobactérias, clostrídeos, peptoestreptococos, fusibactérias, lactobacilos, enterobactérias, bactérias metanogênicas e sulforedutoras (DUERDEN; DRASAR, 1991; PEACH et al., 1974).

A grande concentração de anaeróbios, se deve ao meio ambiente favorável, que inclui estase fecal e baixo potencial de óxido-redução, fazendo com que a concentração de anaeróbios seja de 1000 a 10000 vezes mais comum que os aeróbios, em todos os níveis do cólon (GALL, 1970).

### **Funções relacionadas com a microbiota intestinal**

Entre os efeitos benéficos da microbiota pode-se destacar a proteção contra infecções exógenas, atuação na síntese de algumas vitaminas e possível inativação de substâncias cancerígenas produzidas durante o processo de digestão.

Por outro lado, podem ser responsáveis por infecções oportunistas extra-intestinais, quando na presença de fatores deletérios ao hospedeiro, tais como uso de drogas imunossupressoras, cirurgias abdominais ou portadores de endocardite de origem reumática(SIMON; GORBACH, 1984).

Sabe-se ainda que a microbiota apresenta impacto direto na morfologia do intestino, uma vez que são responsáveis pela degradação de muco-glicoproteínas produzidas pelo epitélio, levando a equilíbrio entre secreção e degradação da camada de muco protetora da mucosa.

Alterações geneticamente determinadas na mucosa intestinal, particularmente alterações na glicosilação das glicoproteínas do muco, podem resultar na perda da barreira mucosa em pacientes com doença inflamatória intestinal (RHODES, 1996).

A microflora entérica é constituída por mais de 500 espécies bacterianas (GUSTAFSSON, 1982), representando um ecossistema extremamente complexo, que pode ter importante papel na patogênese das doenças inflamatórias intestinais.

SCHULTSZ et al. (1999), estudaram através de biópsias retais e hibridização in situ, a distribuição espacial das bactérias na mucosa intestinal de 19 doentes com doença inflamatória intestinal (DII) e 14 controles. Observaram que os espécimes dos pacientes com DII, continham mais bactérias que o grupo controle, que as bactérias

estavam localizadas dentro da camada de muco, porém não aderiam às células epiteliais e não estavam presentes na lâmina própria. Verificaram ainda que não houve correlação entre o número de bactérias presentes e o grau de inflamação, uso de anti-inflamatórios ou sulfassalazina. Concluíram que o muco intestinal na doença inflamatória tem menor efeito protetor contra a microflora endógena, resultando em aumento da associação das bactérias com a camada mucosa.

A microbiota também apresenta efeitos na motilidade intestinal e na diferenciação do epitélio, modificando os programas de diferenciação da linhagem epitelial.

NASMYTH et al (1989), estudando a relação entre a morfologia da mucosa ileal, a bacteriologia fecal e os ácidos graxos voláteis fecais em 15 doentes com bolsa ileal e 14 com ileostomia definitiva após retocoliectomia por retocolite ulcerativa, observaram que o efluente da bolsa ileal, comparado com o efluente da ileostomia, tinha mais anaeróbios que aeróbios, com um grande número de Bacteróides e Bifidobactérias. Verificaram ainda, que os ácidos graxos (produto da fermentação bacteriana anaeróbica) também estavam aumentados na bolsa ileal e que o grau de atrofia das vilosidades estava relacionado com o número de Bacteróides e com o butirato fecal, mostrando que a

microbiota da bolsa ileal tem grande influência na morfologia da mucosa.

Embora não se conheça adequadamente por quais mecanismos a microflora intestinal interage com o sistema imune, sabe-se que esta é indispensável para a maturação deste sistema, morfologia normal do intestino e na manutenção de resposta inflamatória intestinal imunologicamente adequada e balanceada.(GIONCHETTI et al, 2000).

Para manter este balanço, vários outros mecanismos são necessários, incluindo a barreira representada pela camada epitelial, descamação, peristalse, camada de muco e imunoglobulina secretória (IgA), que representam a barreira imune primária contra patógenos.

Uma visão comum assegura que os indivíduos afetados por doenças autoimunes têm conhecida predisposição genética e que estas doenças representariam uma resposta exarcebada do hospedeiro a fatores ambientais normais. Alternativamente, essas doenças poderiam representar uma resposta apropriada a estímulos anormais (PODOLSKY, 1991).



## **Fatores bacterianos nas doenças inflamatórias intestinais**

Observações clínicas e experimentais mostram que existe um papel para a microflora intestinal na patogênese e na cronicidade da inflamação das doenças inflamatórias intestinais. Porém, permanece sem resposta, uma questão fundamental: a flora intestinal estaria aberrante nos doentes acometidos ou estaria-se diante de uma resposta imune exarcebada à flora intestinal normal ?.

Os mecanismos pelos quais ocorrem este envolvimento ainda não estão esclarecidos. Entretanto, parecem estar envolvidos a invasão da mucosa pelas bactérias, ação direta dos antígenos microbianos, produção de antígenos pelo metabolismo de fatores endógenos ou dietéticos ou ainda a elaboração de toxinas e metabólitos tóxicos para células do epitélio intestinal. (HARTLEY et al., 1992).

Nos últimos anos, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Listeria monocytogenes* e o vírus do sarampo foram investigados como possíveis responsáveis pelas doenças inflamatórias intestinais, principalmente na doença de Crohn (ARDIZZONE et al., 1999; SARTOR, 1995).

Na retocolite ulcerativa, poderiam ser causadores da doença a *Escherichia coli* patogênica, *diplostreptococcus*, *Fusobacterium*

*necrophorum*, *Shigella*, *Helicobacter hepaticus* e vírus RNA (SARTOR, 2000).

Entretanto, até o presente momento, nenhum dos microrganismos estudados como agentes etiológicos destas doenças foram avaliados por estudos controlados e os tratamentos direcionados para agentes específicos, não foram efetivos para resolução da doença (SARTOR, 1997).

SWIDSINSKI et al. (2002), investigaram a flora da mucosa em biópsias colonoscópicas lavadas de 305 doentes com inflamação intestinal e 40 controles. As culturas microbianas foram validadas quantitativamente pela reação em cadeia da polimerase (PCR), hibridização *in situ* e microscopia eletrônica. Observaram que as concentrações bacterianas aumentaram progressivamente com a severidade da doença, na presença de processo inflamatório ou não e que os pacientes com doença inflamatória apresentavam inclusões características de múltiplas bactérias nos enterócitos localizados próximos à lâmina própria, sem contato com o fluxo fecal. Concluíram que os achados sugeriam que as alterações na flora da mucosa dos doentes com DII não seriam secundárias à inflamação, porém resultariam de resposta específica do hospedeiro; que possivelmente a mucosa sadia seria capaz de expulsar as bactérias fecais e que esta

função estaria profundamente alterada nos pacientes com doença inflamatória intestinal.

O íleo terminal e o cólon são áreas de alta concentração de bactérias e, coincidentemente, representam as áreas mais frequentemente acometidas pelas doenças inflamatórias intestinais (GIONCHETTI et al., 2000). Além disto, o íleo terminal, o ceco e o reto são áreas de relativa estase, determinando contato prolongado da mucosa com o conteúdo luminal ( LINSKENS et al., 2001)

Estudos recentes (DUCHMANN et al, 1995; MACPHERSON et al., 1996) mostraram fortes evidências de que na doença inflamatória em atividade ocorre uma quebra da tolerância a flora comensal normal, sustentando a teoria de que a hiperreatividade aos antígenos normais da microflora intestinal estaria associada com a perpetuação da doença inflamatória intestinal.

Supressão da microflora intestinal, derivação fecal e repouso intestinal poderiam diminuir a atividade da doença de Crohn, mas parecem ser pouco efetivos em doentes com retocolite ulcerativa (RUTGEERTS et al., 1991, 1995).

Corroborando o papel central da flora bacteriana nas doenças inflamatórias intestinais, rotineiramente se usa antimicrobianos nos surtos agudos e na manutenção da remissão da doença.

Entretanto, acredita-se que estes medicamentos atuariam mais sobre o metabolismo das bactérias do que por ação direta sobre as mesmas.

KMIOT et al. (1993), estudando o efeito do metronidazol sobre a morfologia da mucosa da bolsa ileal, proliferação celular e bacteriologia fecal em pacientes com bolsite aguda, observaram que não houve diferença na contagem de bactérias dos pacientes com ou sem bolsite mas que havia resolução das alterações morfológicas do epitélio causadas pela inflamação e diminuição da proliferação celular, evidenciando a resolução do processo inflamatório.

SVARTZ, que em 1938, desenvolveu a sulfassalazina, observou que havia aumento da concentração de diplostreptococos nas fezes de pacientes com retocolite ulcerativa e artrite reumatóide. Reproduziu lesões articulares em ratos, pela injeção peritoneal de streptococos isolados destes doentes. Quando a sulfapiridina tornou-se disponível, associou esta sulfa, de ação contra o streptococos, com o ácido 5-aminossalicílico, conhecido pela capacidade de concentração no tecido conectivo das articulações e submucosa do cólon, empregando-a com sucesso no tratamento destas doenças.

Apesar do entusiasmo inicial com a sulfassalazina, existem poucos estudos sobre o papel dos antibióticos no tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

Embora venham sendo usados com sucesso no tratamento da doença de Crohn, há poucas evidências de sua eficácia na retocolite ulcerativa.

TURUNEN et al. (1998), em estudo prospectivo e duplo-cego, observaram que a ciprofloxacina foi útil na manutenção da remissão nos doentes com retocolite moderada a severa, refratária ao tratamento convencional, embora, como possível “bias”, houvesse grande número de fumantes neste grupo.

Para estudar o efeito da sulfassalazina na flora bacteriana associada à mucosa, HARTLEY et al. (1996) realizaram biópsias de sigmóide em 24 pacientes com diagnóstico inicial de retocolite ulcerativa, 20 com reagudização da doença (10 não usavam sulfassalazina) e 40 com doença em remissão (21 sem sulfassalazina). Observaram pouca diferença na flora da mucosa. A *Escherichia coli* tinha baixa frequência, exceto nos pacientes com doença em atividade. Alguns doentes foram colonizados por *Clostridium difficile*, porém sem aparente importância no comportamento da doença. Concluíram que a liberação de altas concentrações de sulfapiridina e 5-ASA causaram apenas pequenas alterações na flora associada à mucosa.

De maneira semelhante, MARKS et al. (1979), observaram que havia diminuição marcante da flora luminal, porém pouco efeito na flora

associada à mucosa, quando utilizavam um derivado de sulfa na preparação intestinal para cirurgia abdominal.

Similarmente, as bolsites podem estar associadas com proliferação bacteriana e disbiose, já que os doentes são efetivamente tratados com antibióticos, respondendo ao uso de metronidazol e/ou ciprofloxacina.

Em estudo realizado por microscopia eletrônica, para comparar a flora bacteriana de biópsias de doentes com bolsites, com os achados de bolsa ileal normal, ileostomia convencional e íleo normal, MCLEOD et al. (1994), observaram que a contagem média de anaeróbios facultativos nas bolsites foi significativamente maior do que nas ileostomias convencionais e íleo normal; que não houve diferença significativa na média dos anaeróbios de todos os grupos. Encontraram ainda, bactérias na parede intestinal de 47% das bolsas ileais, sem diferença significativa na presença de bolsite. Concluíram que a elevação das bactérias aeróbias na parede mucosa poderia influenciar na patogênese das bolsites.

Também com o objetivo de verificar o papel dos fatores microbiológicos nas bolsites, RUSELER-VAN EMBDEN et al. (1994), estudaram a composição da microflora no reservatório ileal, a capacidade de degradação do muco por enzimas bacterianas, o pH e a atividade proteolítica do efluente da bolsa. Amostras de fezes foram coletadas de 5 doentes com bolsite e de 9 doentes com bolsa não

inflamada. Verificaram houve um aumento de aeróbios em pacientes com bolsite, diminuição de bifidobacteria e lactobacilos anaeróbios, mais *Clostridium perfringens* e algumas espécies não encontradas nos doentes controle. Concluíram que a bolsite possivelmente resultava da instabilidade da flora na bolsa, desaparecimento daquelas que determinam homeostase (disbiose) e que a proteção do epitélio da bolsa pela camada de muco estava afetada pelo aumento da atividade das enzimas derivadas das bactérias e do hospedeiro.

Por outro lado, quando se estudou a flora fecal de pacientes com bolsites, comparando-a com bolsas ileais normais, não se encontrou alterações significantes, quantitativa ou qualitativamente, da microbiota intestinal ( O'CONNELL et al., 1986; LUUKONEN et al., 1988)

Sabe-se ainda, que a ocorrência de bolsite se dá principalmente nos doentes com antecedentes de retocolite ulcerativa, embora as razões sejam desconhecidas.

DUFFY et al. (2002), estudando a população bacteriana de bolsas ileais, em doentes com antecedentes de retocolite ulcerativa e polipose familiar, observaram que 80% das bolsas realizadas por retocolite ulcerativa apresentavam bactérias anaeróbicas sulfato-redutoras, ausentes nas bolsas por polipose familiar hereditária. Estas bactérias, inibem a oxidação do butirato, importante substrato energético do colonócito, impedindo sua utilização por estas células e levando a

diminuição dos mesmos, o que poderia estar envolvido na patogênese das doenças inflamatórias.

Poderiam ainda, pela elevação do sulfato luminal, aumentar a incidência de úlceras na mucosa intestinal (OHKHUSA, 1985).

Ainda corroborando a participação bacteriana na etiologia destas doenças, cresce cada vez mais o interesse nos possíveis efeitos benéficos do uso de probióticos nas doenças inflamatórias intestinais.

Os probióticos são microrganismos vivos que alteram o ambiente microbiano intestinal. Podem ser administrados como suplemento alimentar isolado ou associados a carboidratos não digeríveis (prebióticos) que, atuando no metabolismo da flora entérica, favorece o crescimento dos probióticos (SHANAHAM, 2000; FARREL, LAMONT, 2002).

VENTURI et al. (1999), estudando o efeito de probióticos, contendo lactobacilos, bifidobactérias e *Streptococcus thermophilus*, em 20 doentes portadores de RCU, observaram que 75% destes permaneciam em remissão, doze meses após a administração diária de duas doses de 3g por um ano.

Mais recentemente, BORODY et al., relataram casos de retocolite ulcerativa tratados através da administração de enemas de retenção de probióticos, preparados com a flora fecal de adultos saudáveis.



Observaram melhora de alguns sintomas já na primeira semana e reversão completa dos sintomas quatro meses após este tratamento.

Estes estudos com probióticos podem auxiliar no tratamento das doenças inflamatórias intestinais, assim como o uso de imunonutrição com ácidos graxos ômega-3, que, em estudos experimentais realizados por CAMPOS et al. (2002, 2003), mostrou-se bastante eficiente como modulador da resposta inflamatória, atenuando as conseqüências morfológicas e inflamatórias e diminuindo a concentração colônica de mediadores pró-inflamatórios.

Finalmente, pode-se dizer que a importância da flora bacteriana intraluminal normal, estaria fundamentada nos estudos que mostraram ausência de inflamação intestinal espontânea em modelos experimentais de colite com murinos mutantes e transgênicos, em ambiente livre de germes ( D'HAENS et al., 1998).

## **Pacientes**

Foram estudados 10 doentes portadores de retocolite ulcerativa, com indicação para tratamento cirúrgico, atendidos no Ambulatório de Doenças Inflamatórias da Disciplina de Coloproctologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O Protocolo de Pesquisa deste estudo, nº 312/01, foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na sessão do dia 26/07/2001, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Trata-se de estudo prospectivo e pareado, onde estudou-se a microflora intestinal de um mesmo grupo de doentes, coletando-se muco intestinal antes da realização de tratamento cirúrgico para retocolite grave (retocoliectomia total com anastomose de bolsa ileal em J ao canal

anal e ileostomia em alça temporária) e após cerca de dois e oito meses do fechamento da ileostomia.

Seis eram do sexo feminino e quatro do sexo masculino, com média de idade de 38,5 anos (24 a 48 anos). A média de tempo entre o diagnóstico da afecção e o tratamento cirúrgico, foi de 6 anos (2 a 12 anos).

Todos os doentes tiveram como indicação cirúrgica a intratabilidade clínica, estando em uso de algum tipo de medicamento durante a coleta, a saber: nove estavam em uso de prednisona (15 a 40mg/dia), cinco de ciprofloxacina (1g/dia), quatro de sulfassalazina (3-4g/dia) e dois azatioprina (100-150mg/dia) (Tabela 1). Apesar da medicação, todos os pacientes mantinham doença endoscopicamente em atividade e eram totalmente dependentes da medicação para se manterem relativamente estáveis quanto aos sintomas.

TABELA 1 - MEDICAÇÃO EM USO DURANTE COLETA DO MATERIAL

MEDICAÇÃO/PACIENTES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sulfassalazina		■					■	■		■
Ciprofloxacina	■		■		■	■			■	
Prednisona	■	■	■		■	■	■	■	■	■
Azatioprina				■		■				

### **Grupo Controle**

Como grupo controle deste estudo, utilizou-se pacientes estudados por QUINTANILHA et al. (2001), que, com a mesma metodologia, determinaram a flora bacteriana de indivíduos normais, pela coleta de muco de 24 pacientes submetidos à colonoscopia, com média de idade de 53 anos (18-80), cujos exames colonoscópicos e laboratoriais (hemograma, parasitológico de fezes) foram considerados normais.

Além destes parâmetros, foram critérios de inclusão no referido estudo: estar sem medicação antibiótica e/ou anti-inflamatórios nos

últimos seis meses e não ter antecedentes de cirurgia abdominal, diabetes, esclerodermia ou câncer.

Nas tabelas 2 e 3, estão as bactérias encontradas e as concentrações médias das mesmas no íleo terminal e no reto do grupo controle.

TABELA 2. CONCENTRAÇÃO MÉDIA (LOG<sup>10</sup>) DAS BACTÉRIAS NO ÍLEO TERMINAL-GRUPO CONTROLE

ÍLEO TERMINAL	% observada	% observada <b>22 casos</b>	CONCENTRAÇÃO DAS BACTÉRIAS (LOG <sub>10</sub> )			
			Média	DP	Mediana	Amplitude
<i>Bacteroides sp (pigmentado)</i>	4,17	<b>4,55</b>	-	-	-	NO - 5
<i>Bacteroides sp</i>	4,17	<b>4,55</b>	-	-	-	NO - 2
<i>Clostridium ramosum</i>	4,17	<b>4,55</b>	-	-	-	NO - 1
<i>Clostridium sp</i>	4,17	<b>4,55</b>	-	-	-	NO - 1
<i>Eubacterium lentum</i>	4,17	<b>4,55</b>	-	-	-	NO - 4
<i>Fusobacterium fusiforme</i>	4,17	<b>4,55</b>	-	-	-	NO - 3
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4,17	<b>4,55</b>	-	-	-	NO - 4
<i>Peptococcus anaerobius</i>	4,17	<b>4,55</b>	-	-	-	NO - 2
<i>Peptococcus assachalyticus</i>	4,17	<b>4,55</b>	-	-	-	NO - 2
<i>Staphylococcus sp</i>	4,17	<b>4,55</b>	-	-	-	NO - 5
<i>Bacillus sp</i>	8,33	<b>9,09</b>	-	-	-	NO - 1
<i>Bifidobacterium sp</i>	8,33	<b>9,09</b>	-	-	-	NO - 3
<i>Candida sp</i>	8,33	<b>9,09</b>	-	-	-	NO - 4
<i>Enterococcus faecalis</i>	8,33	<b>9,09</b>	-	-	-	NO - 5
<i>Eubacterium sp</i>	8,33	<b>9,09</b>	-	-	-	NO - 5
<i>Peptostreptococcus sp</i>	8,33	<b>9,09</b>	-	-	-	NO - 3
<i>Pseudomonas sp</i>	8,33	<b>9,09</b>	-	-	-	NO - 4
<i>Rodothorula sp</i>	12,50	<b>13,64</b>	-	-	-	NO - 4
<i>Streptococcus. sp (alfa hem. grupo. Viridans)</i>	12,50	<b>13,64</b>	-	-	-	NO - 4
<i>Fusobacterium sp</i>	16,67	<b>18,18</b>	-	-	-	NO - 4
<i>Proteus</i>	16,67	<b>18,18</b>	-	-	-	NO - 7
<i>Enterobacter sp</i>	25,00	<b>27,27</b>	3,83	0,75	4,00	NO - 5
<i>Peptococcus sp</i>	25,00	<b>27,27</b>	2,67	1,51	2,00	NO - 5
<i>Lactobacillus sp</i>	29,17	<b>31,82</b>	3,57	2,07	4,00	NO - 7
<i>Staphylococcus sp (coag -)</i>	29,17	<b>31,82</b>	2,57	1,72	2,00	NO - 5
<i>Enterococcus sp</i>	33,33	<b>36,36</b>	4,13	1,64	4,00	NO - 7
<i>Bacterioide sp (npg)</i>	41,67	<b>45,45</b>	3,20	1,55	3,00	NO - 5
<i>E.coli</i>	41,67	<b>45,45</b>	4,70	2,67	5,00	NO - 9
<i>Propionibacterium sp</i>	45,83	<b>50,00</b>	3,82	3,16	3,00	NO - 9
<i>Corynebacterium sp</i>	50,00	<b>54,55</b>	2,92	1,38	3,00	NO - 5
<i>Clostridium sp (gel -)</i>	58,33	<b>63,64</b>	4,00	2,15	4,00	NO - 7
<i>Klebsiella sp</i>	66,67	<b>72,73</b>	4,50	1,83	5,00	NO - 7
<i>Veillonella sp</i>	79,17	<b>86,36</b>	3,63	1,57	4,00	NO - 7

TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO MÉDIA (LOG<sup>10</sup>) DAS BACTÉRIAS NO RETO-GRUPO CONTROLE

RETO	% observada	% observada 20 casos	CONCENTRAÇÃO DAS BACTÉRIAS (LOG <sub>10</sub> )				Amplitude
			Média	DP	Mediana		
<i>Bacteroides sp (pg)</i>	4,17	<b>5,00</b>	-	-	-	-	3
<i>Bifidobacterium sp</i>	4,17	<b>5,00</b>	-	-	-	-	1
<i>Clostridium sp</i>	4,17	<b>5,00</b>	-	-	-	-	3
<i>Clostridium sp (gel+)</i>	4,17	<b>5,00</b>	-	-	-	-	3
<i>Rodothorula sp</i>	4,17	<b>5,00</b>	-	-	-	-	3
<i>Selenomonas sp</i>	4,17	<b>5,00</b>	-	-	-	-	5
<i>Staphylococcus sp (coag+)</i>	4,17	<b>5,00</b>	-	-	-	-	2
<i>Streptococcus sp (a hem. gr. Viridans)</i>	4,17	<b>5,00</b>	-	-	-	-	3
<i>Propionibacterium sp</i>	16,67	<b>20,00</b>	-	-	-	-	4
<i>Candida sp</i>	25,00	<b>30,00</b>	6,33	2,07	7,00	NO	9
<i>Proteus</i>	25,00	<b>30,00</b>	4,50	1,76	5,00	NO	7
<i>Enterobacter sp</i>	29,17	<b>35,00</b>	3,43	1,51	3,00	NO	5
<i>Peptococcus sp</i>	29,17	<b>35,00</b>	6,71	1,38	7,00	NO	9
<i>Staphylococcus sp (coag -)</i>	29,17	<b>35,00</b>	3,00	1,15	3,00	NO	5
<i>Fusobacterium sp</i>	37,50	<b>45,00</b>	3,78	1,48	3,00	NO	7
<i>Clostridium sp (gel -)</i>	45,83	<b>55,00</b>	3,82	1,25	4,00	NO	5
<i>Bacteroides sp (npg)</i>	50,00	<b>60,00</b>	4,75	2,05	5,00	NO	7
<i>Enterococcus sp</i>	50,00	<b>60,00</b>	6,17	2,37	7,00	NO	9
<i>Corynebacterium sp</i>	54,17	<b>65,00</b>	5,08	1,26	5,00	NO	7
<i>Klebsiella sp</i>	54,17	<b>65,00</b>	5,08	1,32	5,00	NO	7
<i>Lactobacillus sp</i>	54,17	<b>65,00</b>	6,92	2,02	7,00	NO	9
<i>E.coli</i>	58,33	<b>70,00</b>	4,71	1,94	4,00	NO	7
<i>Veillonella</i>	66,67	<b>80,00</b>	6,38	2,19	7,00	NO	9
<i>Enterococcus faecalis</i>	75,00	<b>90,00</b>	5,39	1,29	5,00	NO	7

## **Grupos de estudo**

Os pacientes foram divididos em três grupos, assim nomeados:

Grupo I – Microbiota na retocolite ulcerativa (RCU) – pré-operatório

Grupo II – Microbiota na bolsa ileal

Fase-1. Coleta realizada dois meses após o fechamento da ileostomia.

Fase-2. Coleta realizada oito meses após o fechamento da ileostomia

Grupo III – Microbiota do grupo controle



## **Videocolonoscopia e coleta do material**

No pré-operatório, os pacientes foram submetidos a exame colonoscópico, realizado sempre pelo mesmo examinador, no Serviço de Colonoscopia da Disciplina de Coloproctologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, após realização de preparo mecânico intestinal anterógrado com solução de manitol a 10%, terminado cerca de cinco horas antes do exame.

Após atingir o íleo terminal, a coleta de muco foi realizada no íleo distal, ceco, ascendente, transverso, descendente, sigmóide e reto, através de sonda estéril, com extremidade distal encapada com película de microfilme (QUINTANILHA et al., 2001), introduzida através do canal de biópsia do colonoscópio. Para cada segmento examinado era empregada uma única sonda.

Separava-se 0.1 mililitro do muco obtido em cada um dos sete segmentos, injetando-o em um tubo plástico fechado, estéril, contendo 0.9 mililitros de solução VGMA-3. As amostras eram enviadas ao laboratório de microbiologia, num prazo máximo de 60 minutos.

No pós-operatório, os pacientes eram novamente submetidos a exame endoscópico, após enema de monofosfato de sódio, realizado cerca de quatro horas antes do procedimento.

Durante o exame, coletava-se 0.1 mililitro de muco da porção média da bolsa ileal (amostra única), através da mesma sonda (siliconizada, estéril, com ponta recoberta por película de microfilme), sendo o material encaminhado para o laboratório nas mesmas condições de transporte descritas anteriormente.

As coletas pós-operatórias foram realizadas após dois e oito meses de restabelecimento do trânsito intestinal e todos os doentes, na primeira coleta, apresentavam mucosa da bolsa ileal macroscopicamente normal, estando sem uso de antimicrobianos e/ou imunossupressores desde a alta hospitalar.

Apenas um paciente apresentava sinais e sintomas de bolsite grave na segunda coleta, estando em uso de imunossupressor (azatioprina-50mg/dia) e andiarreicos, sem melhora significativa dos sintomas.

## **Semeadura e cultura das amostras coletadas**

Retirava-se 0,01 mililitro de cada tubo, para realização de semeio e cultura, com posterior identificação e contagem dos microorganismos, (QUINTANILHA, 1994, MACHADO et al., 1989). Para isto, utilizava-se meios seletivos para microorganismos anaeróbios e aeróbios, empregando métodos preconizados por COWAN; STEEL(1974) para aeróbios e de SUTTER et al. (1980) e HOLDEMAN et al. (1977) para anaeróbios.

A concentração microbiana em todas as coletas foi determinada através da diluição do material colhido, expressa em  $\log_{10}$  das unidades formadoras de colônias (ufc) por mililitro (ml), nas razões decimais seriadas de  $10^1$  a  $10^{10}$ , em condições assépticas, sob fluxo constante de nitrogênio e gás carbônico, para manutenção das condições de anaerobiose.

Para o cultivo das bactérias, foram utilizados os seguintes meios:

<i>Staphylococcus sp</i>	Chapman-Stone medium*
<i>Enterobactérias</i>	MacConkey agar*
<i>Streptococcus sp/Sarcina sp</i>	Ágar-sangue*
<i>C. albicans/ T. candida</i>	Ágar-Sabouraud**

<i>Enterococcus sp</i>	Enterococcus selective agar**
<i>Peptococcus sp</i>	Phenylethialcohol agar*
<i>Peptostreptococcus sp</i>	Phenylethialcohol agar*
<i>Veillonella sp</i>	Veillonella medium*
<i>Fusobacterium sp</i>	BHI*+Vitamina K+Hemina +Espstreptomicina
<i>Clostridium sp</i>	Reinforced Clostridium medium**
<i>B fragilis</i>	Bacteroides fragilis Bile-esculin Agar Médium (BBE)
<i>Bifidobacterium sp</i>	Bifidobacterium medium
<i>Propionibacterium sp</i>	Propionibacterium medium
<i>Actinomyces sp</i>	BHI*+Extrato de levedura
Bactérias anaeróbias gram negativas produtoras de pigmento negro	Ágar sangue(TSA)+Vit.K+Hemina
* DIFCO, St Louis, MO, USA	**MERCK DIAGNÓSTICA,RJ, BRASIL

## **Comparações entre os grupos estudados**

Por tratar-se de estudo pareado, entre pacientes antes e após tratamento cirúrgico da retocolite ulcerativa com realização de bolsa ileal, sendo esta, em última análise, tecido ileal que ao longo do tempo sofre processo de colonização e para facilitar o entendimento e a análise estatística dos dados obtidos, optou-se por comparar o conteúdo bacteriano do íleo terminal e do reto dos pacientes com retocolite ulcerativa com o conteúdo da bolsa ileal e do íleo terminal e do reto do grupo controle.

1. Realizou-se, inicialmente, a análise descritiva dos dados encontrados no pré-operatório e nas coletas da bolsa ileal, calculando-se a freqüência bacteriana em cada segmento e concentração média das mesmas.
2. Para comparar a freqüência das bactérias entre o grupo controle e pacientes com retocolite ulcerativa antes da cirurgia, utilizou-se o teste exato de Fischer. Para a análise das freqüências antes e após a realização da bolsa ileal, utilizou-se o teste de McNemar.
3. Para comparar as médias do logaritmo das concentrações de bactérias de indivíduos normais com pacientes portadores de retocolite ulcerativa e com a bolsa ileal, utilizou-se o teste U de Mann-Whitney para amostras independentes.

4. Para comparar as concentrações médias entre amostras pareadas dos pacientes portadores de RCU antes e após a realização da bolsa ileal, utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon.
  
5. Para os testes estatísticos, utilizou-se um nível de significância de 5% ( $\alpha=0.05$ ).
  
6. Utilizou-se o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 8.0, para realização dos testes estatísticos.

### **Grupo I –Microbiota dos pacientes com RCU**

No total, foram isoladas 25 espécies de bactérias, com média de 16,7 bactérias por segmento.

#### Íleo terminal

No íleo terminal, as bactérias *E. coli*, *Peptococcus sp*, *Bacteroides sp* (npg) e *Staphylococcus sp* (coag-) apresentaram as maiores concentrações médias ( $10^4$  a  $10^{5,50}$ ), porém somente em 20% dos doentes. *Enterobacter sp* e *Veillonella sp* apresentavam concentrações menores ( $10^{2,83}$  e  $10^{2,25}$ , respectivamente), porém identificadas em 60% e 80% dos pacientes, respectivamente.



## Ceco

*E. coli* e *Peptococcus sp* apresentavam as maiores concentrações médias ( $10^9$  e  $10^{5,67}$ ). Entretanto, estavam presentes em 20% e 30% dos doentes, respectivamente. Observou-se também que 50% dos doentes apresentavam *Bacteroides sp* (npg) e *Clostridium sp* (gel-) , em concentrações médias de  $10^{5,40}$  e  $10^{5,20}$  , respectivamente. Já a *Veillonella sp*, apresentava concentração média menor ( $10^{3,75}$ ), estando presente em 80% dos pacientes.

## Ascendente

Neste segmento, 50% dos doentes apresentavam *Enterobacter sp* , numa concentração média de  $10^{4,80}$ . Já a *Veillonella sp* , presente em 80% dos pacientes, apresentava concentração média de  $10^{3,38}$ .

## Transverso

No cólon transverso, 40% dos doentes apresentavam *Enterobacter sp* e *Klebsiella sp* , em concentrações médias de  $10^{4,00}$  e  $10^{3,50}$  , respectivamente. Já a *Veillonella sp*, apresentava concentração média de  $10^{2,17}$ , estando presente em 60% dos doentes.

## Descendente

*Fusobacterium sp*, *Proteus* e *Staphylococcus sp* apresentavam concentrações médias entre  $10^{4,33}$  e  $10^5$ , em 20% dos doentes. Nota-se ainda, que 50% dos doentes apresentavam *Klebsiella sp*, em concentração média de  $10^{3,80}$ . Já a *Veillonella sp*, apresentava concentração média de  $10^{2,78}$ , estando presente em 90% dos casos.

## Sigmóide

*E. coli*, *Proteus*, *Peptococcus sp* e *Staphylococcus sp* apresentaram as maiores concentrações médias ( $10^5$  a  $10^9$ ), em 30% dos casos. Notou-se também, que 50% dos doentes apresentavam *Bacteroides sp* (npg), em concentração média de  $10^{5,20}$ . Já a *Veillonella sp*, apresentava concentração média de  $10^{3,33}$ , estando presente em 90% dos doentes.

## Reto

*Proteus*, *Bacteroides sp* (npg), *Corynebacterium sp* e *Peptococcus sp* apresentavam as maiores concentrações médias ( $10^5$  a  $10^7$ ), em, no máximo, 20% dos casos. Notou-se ainda, que 70% dos doentes apresentavam *Enterobacter sp*, em concentração média de  $10^{4,57}$ . Já a

*Veillonella sp*, apresentava concentração média de  $10^{4,00}$ , estando presente em 70% dos casos.

TABELA 4- CONCENTRAÇÃO MÉDIA (LOG<sup>10</sup>) DAS BACTÉRIAS MAIS FREQUENTES POR SEGMENTO, NOS DOENTES DO GRUPO I.

Bactérias/Segmento	Íleo		Ceco		Ascendente		Transverso		Descendente		Sigmóide		Reto	
	%	log	%	log	%	log	%	log	%	log	%	log	%	log
<i>Bacteróides sp npig</i>	30%	4,67	50%	5,40	20%	4,50	30%	3,67	40%	4,25	50%	5,20	20%	6,00
<i>Clostridium (gel-)</i>	30%	2,00	50%	5,20	20%	4,50	30%	1,67	40%	3,00	40%	4,25	40%	4,75
<i>Corynebacterium sp</i>	30%	2,00	20%	4,00	20%	3,00	30%	2,67	30%	2,33			30%	5,67
<i>E. coli</i>	20%	5,50	20%	9,00	20%	3,00					30%	9,00		
<i>Enterobacter sp</i>	60%	2,83	30%	3,00	50%	4,80	40%	4,00	30%	3,33	30%	3,33	70%	4,57
<i>Fusobacterium</i>							20%	2,00	20%	5,00				
<i>Klebsiella sp</i>			30%	4,67	20%	2,00	40%	3,50	50%	3,80	20%	3,50	20%	4,50
<i>Proteus</i>			20%	4,50					20%	4,50	30%	5,33	20%	7,00
<i>Peptococcus sp</i>	30%	5,00			20%	4,50	30%	3,00			30%	5,00	20%	5,00
<i>Propionibacterium sp</i>			40%	4,25	20%	4,00			30%	3,33			20%	4,00
<i>Staphylococcus sp</i>														
<i>(coag-)</i>	20%	4,00	30%	5,00					30%	4,33			40%	2,25
<i>Veillonella sp</i>	80%	2,25	80%	3,75	80%	3,38	60%	2,17	90%	2,78	90%	3,33	70%	4,00

### Comparação entre os grupos I e III – íleo terminal

#### Freqüência

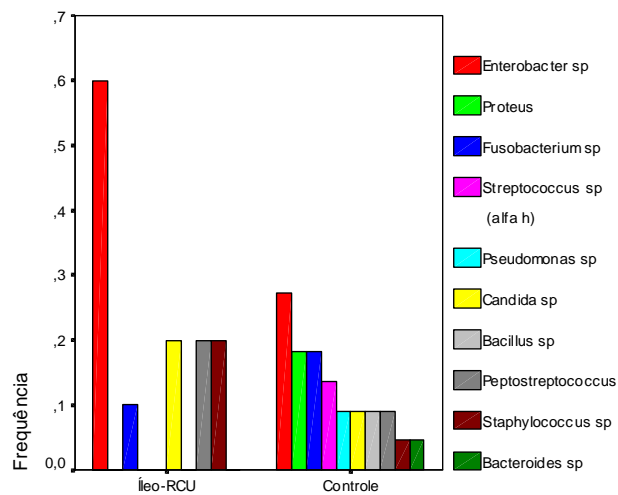
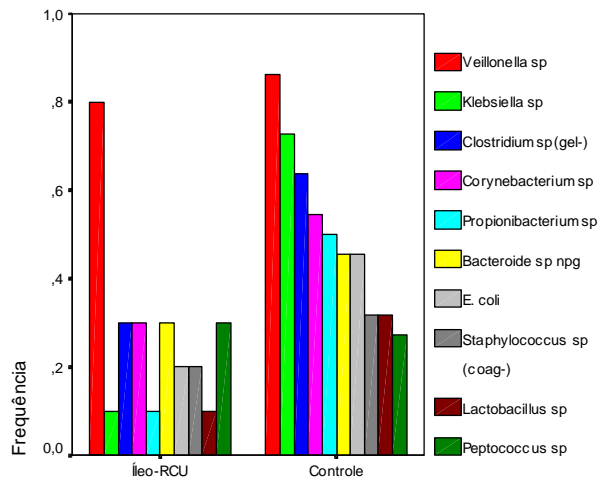
Quando se comparou o íleo terminal do grupo I com o do grupo III, observou-se que a *Klebsiella sp* foi significativamente mais freqüente no grupo III. As demais bactérias apresentaram freqüência semelhante nos dois grupos (Tabela 5 e Gráfico 1).

TABELA 5 – FREQUÊNCIA DAS BACTÉRIAS (CONCENTRAÇÃO SUPERIOR A 10<sup>1</sup>) NO ÍLEO TERMINAL DOS GRUPOS I E III

BACTÉRIA	CONTROLE	GRUPO I	TOTAL	P-VALUE*
<i>Veillonella sp</i>	0,86	0,80	0,84	0,637
<b><i>Klebsiella sp</i></b>	<b>0,73</b>	<b>0,10</b>	<b>0,53</b>	<b>0,002</b>
<i>Clostridium sp(gel-)</i>	0,64	0,30	0,53	0,128
<i>Corynebacterium sp</i>	0,55	0,30	0,47	0,265
<i>Propionibacterium sp</i>	0,50	0,10	0,38	0,050
<i>Bacteroides sp npg</i>	0,45	0,30	0,41	0,467
<i>E. coli</i>	0,45	0,20	0,38	0,248
<i>Staphylococcus sp (coag-)</i>	0,32	0,20	0,28	0,681
<i>Lactobacillus sp</i>	0,32	0,10	0,25	0,380
<i>Peptococcus sp</i>	0,27	0,30	0,28	1,000
<i>Enterobacter sp</i>	0,27	0,60	0,38	0,119
<i>Proteus</i>	0,18	0,00	0,13	0,283
<i>Fusobacterium sp</i>	0,18	0,10	0,16	1,000
<i>Streptococcus sp (alfa h)</i>	0,14	0,00	0,09	0,534
<i>Pseudomonas sp</i>	0,09	0,00	0,06	1,000
<i>Candida sp</i>	0,09	0,20	0,13	0,572
<i>Bacillus sp</i>	0,09	0,00	0,06	1,000
<i>Peptostreptococcus sp</i>	0,09	0,20	0,13	0,572
<i>Staphylococcus sp</i>	0,05	0,20	0,09	0,224
<i>Bacteroides sp</i>	0,05	0,00	0,03	1,000

\* Nível descritivo do teste exato de Fischer

GRÁFICO 1- FREQUÊNCIA DAS BACTÉRIAS NO ÍLEO TERMINAL DO GRUPO I (RCU) E GRUPO III (CONTROLE)



## Concentração média

As concentrações médias das bactérias *Clostridium sp(gel-)*, *Klebsiella sp* e *Propionibacterium sp* foram significativamente superiores no íleo terminal do grupo controle. Observou-se ainda, leve superioridade da concentração média da *Veillonella sp* no grupo controle. As distribuições das concentrações dessas quatro bactérias estão apresentadas nos gráficos 2,3, 4 e 5 e na tabela 6.

GRÁFICO 2- BOX-PLOT DA CONCENTRAÇÃO MÉDIA DO *CLOSTRIDIUM SP*

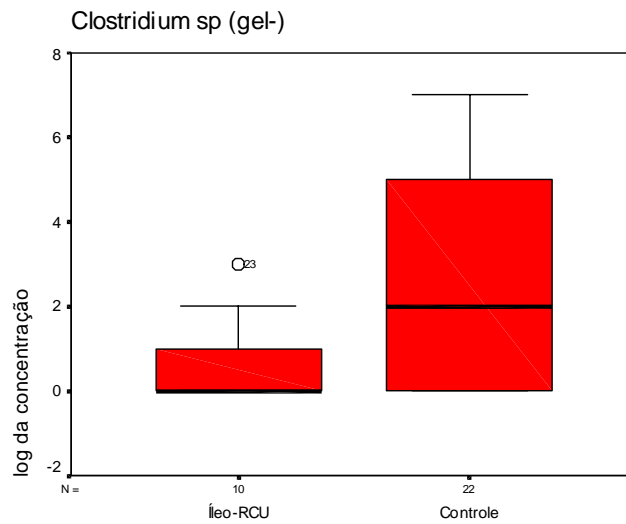


GRÁFICO 3- BOX-PLOT DA CONCENTRAÇÃO MÉDIA DA *KLEBSIELLA SP*

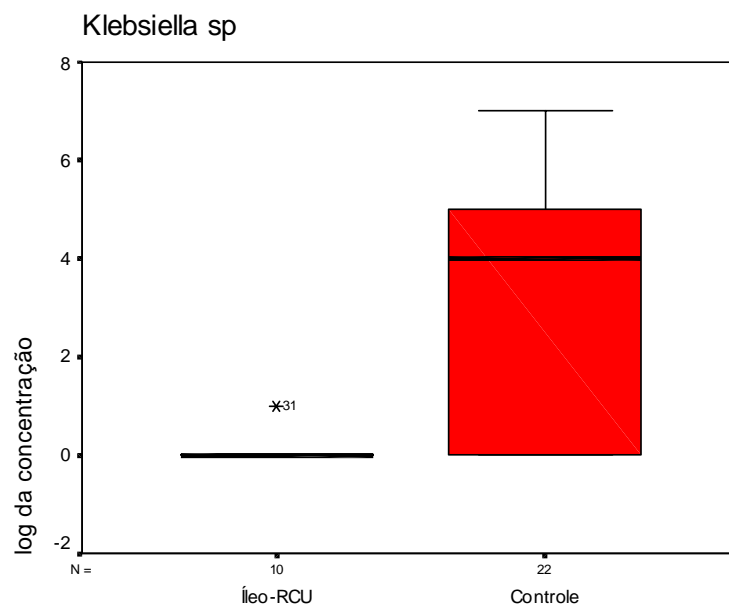


GRÁFICO 4- BOX-PLOT DA CONCENTRAÇÃO MÉDIA DA *PROPIONIBACTERIUM SP*

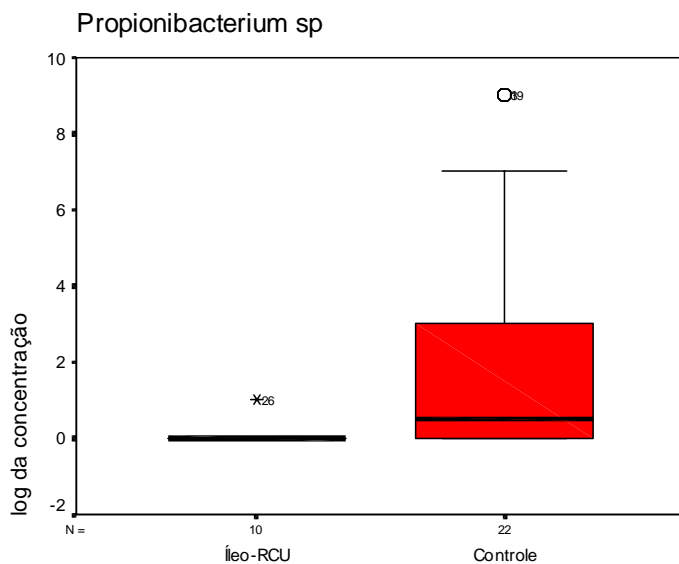


GRÁFICO 5- BOX-PLOT DA CONCENTRAÇÃO MÉDIA DA *VEILLONELLA SP*

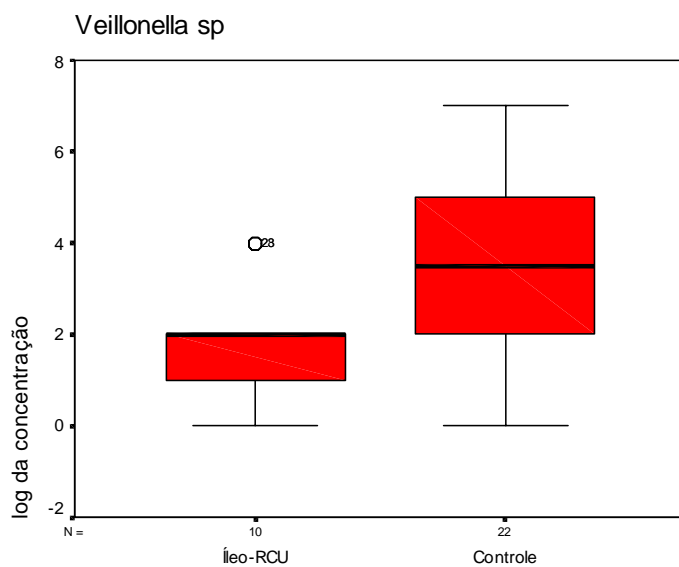




TABELA 6 –CONCENTRAÇÃO DAS BACTÉRIAS (LOG<sup>10</sup>) NO ÍLEO TERMINAL DOS GRUPOS I E III

GRUPOS	MEDIDAS	<i>Bacteroides</i> sp não pig	<i>Candida</i> sp	<i>Clostridium</i> sp (gel-)	<i>Corynebacterium</i> sp	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter</i> sp	<i>Fusobacterium</i> sp	<i>Klebsiella</i> sp	
I- RCU	íleo terminal									
	Média		1,40	0,30	0,60	0,60	1,10	1,70	0,30	0,10
	Desvio		2,46	0,67	1,07	0,97	2,42	1,64	0,95	0,32
	Padrão									
	Mínimo		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo		7,00	2,00	3,00	2,00	7,00	4,00	3,00	1,00
	Percentis									
		25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		50	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00
		75	3,25	0,25	1,25	2,00	1,00	3,25	0,00	0,00
III	Íleo terminal									
	Média		1,45	0,32	2,55	1,59	2,14	1,05	0,55	3,27
	Desvio		1,92	1,04	2,60	1,79	2,96	1,79	1,30	2,57
	padrão									
	Mínimo		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo		5,00	4,00	7,00	5,00	9,00	5,00	4,00	7,00
	Percentis									
		25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		50	0,00	0,00	2,00	1,00	0,00	0,00	0,00	4,00
		75	3,00	0,00	5,00	3,00	5,00	3,00	0,00	5,00
P-VALUE			0,6144	0,4793	<b>0,0349</b>	0,1265	0,2060	0,2226	0,5410	<b>0,0010</b>

TABELA 6 –CONCENTRAÇÃO DAS BACTÉRIAS (LOG<sup>10</sup>) NO ÍLEO TERMINAL DOS GRUPOS I E III (CONTINUAÇÃO)

GRUPOS	MEDIDAS	<i>Lactobacillus</i> sp	<i>Peptococcus</i> sp	<i>Peptostreptococcus</i> sp	<i>Propionibacterium</i> sp	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Staphylococcus</i> sp (coag-)	<i>Veillonella</i> sp	
I-RCU	Íleo terminal								
	Média		0,30	1,50	0,60	0,10	0,50	0,80	1,80
	Desvio Padrão		0,95	2,92	1,26	0,32	1,27	1,75	1,40
	Mínimo		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo		3,00	9,00	3,00	1,00	4,00	5,00	4,00
	Percentis	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75
	50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	
	75	0,00	3,00	0,75	0,00	0,25	0,75	2,50	
III	Íleo terminal								
CONTROLE	Média		1,14	0,73	0,27	1,91	0,23	0,82	3,14
	Desvio Padrão		2,03	1,42	0,88	2,93	1,07	1,53	1,93
	Mínimo		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo		7,00	5,00	3,00	9,00	5,00	5,00	7,00
	Percentis	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75
		50	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	3,50
	75	2,00	1,25	0,00	3,25	0,00	1,25	5,00	
p-value			0,1902	0,6815	0,3946	0,0260	0,1984	0,6441	0,0575

Grupo I: 10 casos válidos

Grupo III: 22 casos válidos

## **Comparação entre os grupos I e III - reto**

### Frequência

A frequência das bactérias *E. coli* (80%), *Lactobacillus sp* (65%), *Klebsiella sp* (65%) e *Enterococcus sp* (60%) foi significativamente superior no reto do grupo controle. Por outro lado, observou-se a presença de *Peptostreptococcus sp* no reto de 30% dos pacientes com RCU, que esteve ausente no grupo controle.

Para as demais bactérias, não houve diferenças estatísticas de frequência nos dois grupos comparados (Tabela 7 e Gráfico 6)

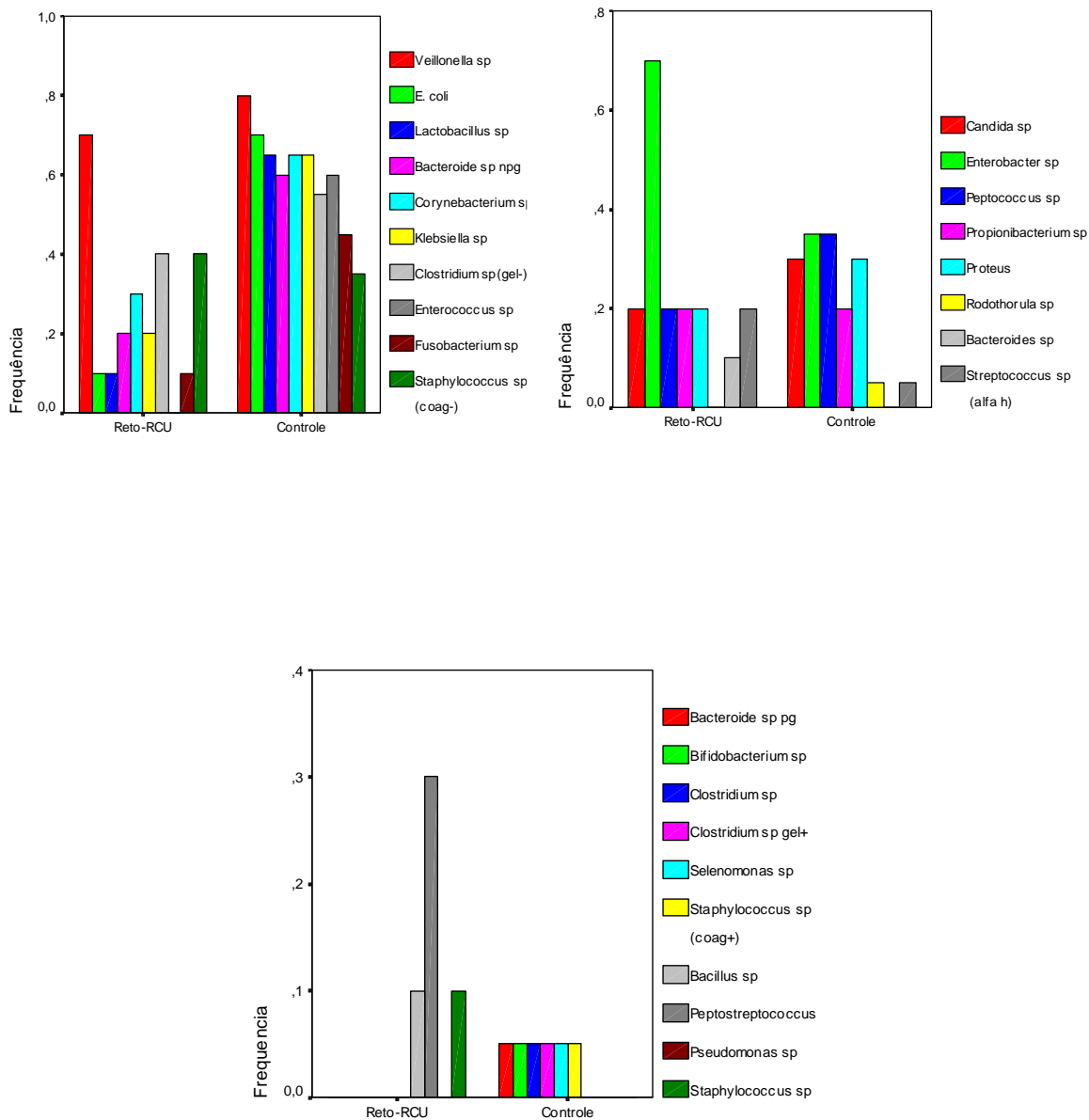
TABELA 7- FREQUÊNCIA DAS BACTÉRIAS NO RETO – GRUPO III (CONTROLE)

X GRUPO I (RCU)

BACTÉRIAS	CONTROLE	RCU	P-VALUE*
<i>Veillonella sp</i>	0,8000	0,70	0,657
<b><i>E. coli</i></b>	<b>0,7000</b>	<b>0,10</b>	<b>0,005</b>
<b><i>Lactobacillus sp</i></b>	<b>0,6500</b>	<b>0,10</b>	<b>0,007</b>
<i>Bacteroides sp npg</i>	0,6000	0,20	0,058
<i>Corynebacterium sp</i>	0,6500	0,30	0,122
<b><i>Klebsiella sp</i></b>	<b>0,6500</b>	<b>0,20</b>	<b>0,050</b>
<i>Clostridium sp(gel-)</i>	0,5500	0,40	0,700
<b><i>Enterococcus sp</i></b>	<b>0,6000</b>	<b>0,00</b>	<b>0,002</b>
<i>Fusobacterium sp</i>	0,4500	0,10	0,101
<i>Staphylococcus sp (coag-)</i>	0,3500	0,40	1,000
<i>Enterobacter sp</i>	0,3500	0,70	0,122
<i>Peptococcus sp</i>	0,3500	0,20	0,675
<i>Candida sp</i>	0,3000	0,20	0,682
<i>Propionibacterium sp</i>	0,2000	0,20	1,000
<i>Proteus</i>	0,3000	0,20	0,682
<i>Rodothorula sp</i>	0,0500	0,00	1,000
<i>Bacteroides sp</i>	0,0000	0,10	0,333
<i>Streptococcus sp (alfa hem)</i>	0,0500	0,20	0,251
<i>Bacteroides sp pg</i>	0,0500	0,00	1,000
<i>Bifidobacterium sp</i>	0,0500	0,00	1,000
<i>Clostridium sp</i>	0,0500	0,00	1,000
<i>Clostridium sp (gel+)</i>	0,0500	0,00	1,000
<i>Selenomonas sp</i>	0,0500	0,00	1,000
<i>Staphylococcus sp (coag+)</i>	0,0500	0,00	1,000
<i>Bacillus sp</i>	0,0000	0,10	0,333
<b><i>Peptostreptococcus sp</i></b>	<b>0,0000</b>	<b>0,30</b>	<b>0,030</b>
<i>Staphylococcus sp</i>	0,0000	0,10	0,333

\* Nível descritivo do teste exato de Fisher

GRÁFICO 6 – FREQUÊNCIA DAS BACTÉRIAS NO RETO DOS GRUPOS I E III



## Concentração média

Quanto às concentrações médias, *E. coli*, *Klebsiella sp* e *Lactobacillus sp* foram significativamente superiores no reto do grupo controle (tabela 8).

TABELA 8 – CONCENTRAÇÃO DAS BACTÉRIAS (LOG<sup>10</sup>) NO RETO DOS GRUPOS

I E III

GRUPOS	MEDIDAS	<i>Bacteroi de sp não pig/o</i>	<i>Candida sp</i>	<i>Clostridiu m sp (gel - )</i>	<i>Coryneb acterium sp</i>	<i>E.coli</i>	<i>Enterobac ter sp</i>	<i>Fusobacte rium sp</i>	<i>Klebsiella sp</i>	
I-RCU	RETO									
	Média	1,20	0,50	1,90	1,70	0,40	3,20	0,70	0,90	
	Desvio Padrão	2,90	1,08	3,03	3,06	1,26	3,49	2,21	1,91	
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Máximo	9,00	3,00	9,00	9,00	4,00	9,00	7,00	5,00	
	Percentis	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	
	75	0,75	0,50	3,50	4,00	0,00	6,00	0,00	1,00	
III-CONTROLE RETO	Média	2,85	1,90	2,10	3,30	3,30	1,20	1,70	3,30	
	Desvio Padrão	2,85	3,16	2,15	2,68	2,74	1,88	2,16	2,70	
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Máximo	7,00	9,00	5,00	7,00	7,00	5,00	7,00	7,00	
	Percentis	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		50	2,50	0,00	2,00	4,00	3,50	0,00	0,00	4,50
	75	5,00	4,50	4,75	5,00	6,50	2,00	3,00	5,00	
p-value		0,100	0,502	0,588	0,109	0,006	0,109	0,183	0,031	

TABELA 8 – CONCENTRAÇÃO DAS BACTÉRIAS (LOG<sup>10</sup>) NO RETO DOS GRUPOS I E III (CONTINUAÇÃO)

GRUPOS	MEDIDAS	<i>Lactobacillus sp</i>	<i>Peptococcus sp</i>	<i>Propionibacterium sp</i>	<i>Proteus</i>	<i>Staphylococcus sp</i> (coag - gr. <i>Viridans</i> )	<i>Strept. sp</i> (alfa hem. gr. <i>Viridans</i> )	<i>Veillonella sp</i>
I- RCU	RETO							
	Média	0,40	1,00	0,80	1,40	0,90	0,50	2,80
	Desvio Padrão	1,26	2,83	2,20	2,95	1,45	1,08	2,94
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	4,00	9,00	7,00	7,00	4,00	3,00	9,00
	Percentis							
		25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00
		75	0,00	0,25	0,25	1,75	0,50	5,00
III- CONTROLE	RETO							
	Média	4,50	2,35	0,65	1,35	1,05	0,15	5,10
	Desvio Padrão	3,75	3,38	1,39	2,30	1,61	0,67	3,26
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	9,00	9,00	4,00	7,00	5,00	3,00	9,00
	Percentis							
		25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,25
		50	6,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,00
		75	7,00	6,50	0,00	2,75	0,00	7,00
p-value		0,006	0,502	1,000	0,846	0,948	0,530	0,082

Pacientes com RCU: 10 casos válidos

Pacientes Normais: 22 casos válidos

## Grupo II – Bolsa ileal- primeira coleta (bolsa ileal-fase1)

Na primeira coleta da bolsa ileal, após dois meses de fechamento da ileostomia, foram isoladas 16 bactérias, sendo as mais freqüentes: *Veilonella sp* (90%), *Enterobacter sp* (70%), *Klebsiella sp* (70%), *Staphylococcus sp* (70%), *Corynebacterium sp* (60%), *Peptococcus sp*(60%), *Clostridium sp* (gel-) (50%) e *Lactobacillus sp* (50%) (Tabela 9).

**TABELA 9- CONCENTRAÇÃO BACTERIANA E FREQUÊNCIA DAS BACTÉRIAS NO GRUPO II-FASE1.**

BACTÉRIAS-BOLSA ILEAL	CONCENTRAÇÃO BACTERIANA/ PACIENTE										FREQUÊNCIA	
<i>Actinomyces sp</i>							2					10%
<i>Bacteroides sp (npg)</i>			2	2	1							30%
<i>Candida sp</i>				2				1				20%
<i>Clostridium sp (gel -)</i>		2		2		2		1	2			50%
<i>Corynebacterium sp</i>		1		1	3		3		1	1		60%
<i>E. coli sp</i>				3	5		5	5				40%
<i>Enterobacter sp</i>	4	5	3				7	3	2	3		70%
<i>Klebsiella sp</i>	4				4	4	5	2	3	3		70%
<i>Lactobacillus sp</i>	2		2			1			2	2		50%
<i>Proteus sp</i>	1	2		3							1	30%
<i>Peptococcus sp</i>	2	2		2	1	3		1				60%
<i>Propionibacterium sp</i>							3	1				20%
<i>Pseudomonas sp</i>					1							10%
<i>Staphilococcus sp</i>	5		1	5		4	5	2	3			70%
<i>Streptococcus (alfahem)</i>				2	1					2		30%
<i>Veilonella sp</i>	3	5	3	1		4	1	4	1	3		90%



### Comparação entre o grupo II (fase 1) e o grupo III (íleo terminal)

#### Freqüência

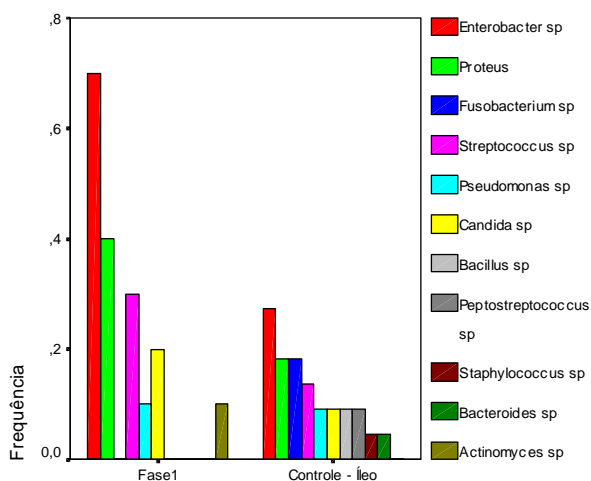
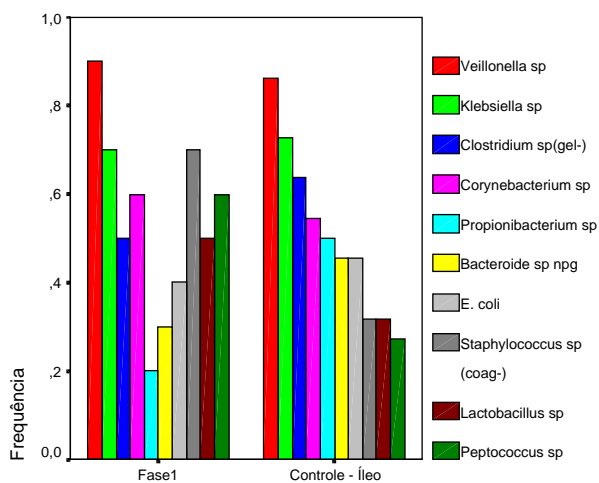
Observou-se freqüência semelhante das bactérias nos grupos estudados, exceto da bactéria *Enterobacter sp*, que foi significativamente mais freqüente no grupo II-fase1 (Tabela 10 e Gráfico 7).

TABELA 10 – FREQUÊNCIA DAS BACTÉRIAS – COMPARAÇÃO ENTRE ÍLEO DO GRUPO III (CONTROLE) E O GRUPO II (FASE1)

BACTÉRIAS	CONTROLE- ÍLEO	FASE 1	P-VALUE*
<i>Veillonella sp</i>	0,86	0,90	1,000
<i>Klebsiella sp</i>	0,73	0,70	1,000
<i>Clostridium sp(gel-)</i>	0,64	0,50	0,699
<i>Corynebacterium sp</i>	0,55	0,60	1,000
<i>Propionibacterium sp</i>	0,50	0,20	0,141
<i>Bacteroides sp npg</i>	0,45	0,30	0,467
<i>E. coli</i>	0,45	0,40	1,000
<i>Staphylococcus sp (coag-)</i>	0,32	0,70	0,062
<i>Lactobacillus sp</i>	0,32	0,50	0,438
<i>Peptococcus sp</i>	0,27	0,60	0,119
<b><i>Enterobacter sp</i></b>	<b>0,27</b>	<b>0,70</b>	<b>0,049</b>
<i>Proteus</i>	0,18	0,40	0,218
<i>Fusobacterium sp</i>	0,18	0,00	0,283
<i>Streptococcus sp (alfa hem)</i>	0,14	0,30	0,346
<i>Pseudomonas sp</i>	0,09	0,10	1,000
<i>Candida sp</i>	0,09	0,20	0,572
<i>Bacillus sp</i>	0,09	0,00	1,000
<i>Peptostreptococcus sp</i>	0,09	0,00	1,000
<i>Staphylococcus sp</i>	0,05	0,00	1,000
<i>Bacteroides sp</i>	0,05	0,00	1,000
<i>Actinomyces sp</i>	0,00	0,10	0,313

- Nível descritivo do teste exato de Fischer

GRÁFICO 7- FREQUÊNCIA DAS BACTÉRIAS NO GRUPO II (FASE 1) E NO ÍLEO TERMINAL DO GRUPO III (CONTROLE)



## Concentração média

Quanto a comparação das concentrações, observou-se que a concentração média das bactérias *Enterobacter sp* e *Staphylococcus sp* (*coag-*) foi significativamente maior na bolsa ileal-fase1 (tabela 11).

TABELA 11 – CONCENTRAÇÃO DAS BACTÉRIAS (LOG<sup>10</sup>) NOS GRUPOS II (FASE-1) E III (ÍLEO TERMINAL)

GRUPOS MEDIDAS	<i>Bacteroid e sp não pig/o</i>	<i>Candida sp</i>	<i>Clostridium sp (gel -)</i>	<i>Corynebacteriu m sp</i>	<i>E.coli</i>	<i>Enterobacter sp</i>
<b>II (FASE-1)</b>						
Média	0,50	0,30	0,90	1,00	1,80	2,70
Desvio	0,85	0,67	0,99	1,15	2,39	2,31
Padrão						
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	2,00	2,00	2,00	3,00	5,00	7,00
Percentis	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	50	0,00	0,00	0,50	1,00	0,00
	75	1,25	0,25	2,00	1,50	5,00
<b>III-CONTROLE (ÍLEO)</b>						
Média	1,45	0,32	2,55	1,59	2,14	1,05
Desvio	1,92	1,04	2,60	1,79	2,96	1,79
Padrão						
Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Máximo	5,00	4,00	7,00	5,00	9,00	5,00
Percentis	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	50	0,00	0,00	2,00	1,00	0,00
	75	3,00	0,00	5,00	3,00	5,00
<b>p-value</b>	<b>0,2338</b>	<b>0,4793</b>	<b>0,1233</b>	<b>0,5786</b>	<b>0,7181</b>	<b>0,0435</b>

TABELA 11 – CONCENTRAÇÃO DAS BACTÉRIAS (LOG<sup>10</sup> ) NOS GRUPOS II (FASE-1) E III (ÍLEO TERMINAL) - CONTINUAÇÃO

GRUPO	MEDIDAS	<i>Klebsiella</i> <i>sp</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>sp</i>	<i>Peptococcus</i> <i>sp</i>	<i>Propionibacterium</i> <i>sp</i>	<i>Proteus</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>sp</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>sp</i> (coag - Viridans)	<i>Streptococcus</i> <i>sp</i> (alfa hem. gr.)	<i>Veillonella</i> <i>sp</i>
II (FASE1)										
	Média	2,50	0,90	1,10	0,40	0,70	0,10	2,50	0,50	2,50
	Desvio Padrão	1,90	0,99	1,10	0,97	1,06	0,32	2,17	0,85	1,65
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	5,00	2,00	3,00	3,00	3,00	1,00	5,00	2,00	5,00
	Percentis	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
		50	3,00	0,50	1,00	0,00	0,00	2,50	0,00	3,00
		75	4,00	2,00	2,00	0,25	1,25	0,00	5,00	1,25
III (ÍLEO)										
	Média	3,27	1,14	0,73	1,91	0,77	0,27	0,82	0,55	3,14
	Desvio Padrão	2,57	2,03	1,42	2,93	1,82	0,94	1,53	1,41	1,93
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	7,00	7,00	5,00	9,00	7,00	4,00	5,00	4,00	7,00
	Percentis	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75
		50	4,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	3,50
		75	5,00	2,00	1,25	3,25	0,00	0,00	1,25	0,00
	p-value	0,270	0,605	0,151	0,094	0,363	1,000	0,0244	0,4199	0,3532

Grupo II: 10 casos válidos

Grupo III: 22 casos válidos

### Comparação entre o grupo II (fase1) e o reto do grupo III

As bactérias *Enterococcus sp* e *Fusobacterium sp* foram observadas apenas no reto do grupo III. Para as demais bactérias, não foram encontradas diferenças significantes de frequência entre os grupos (Tabela 12 e Gráfico 8).

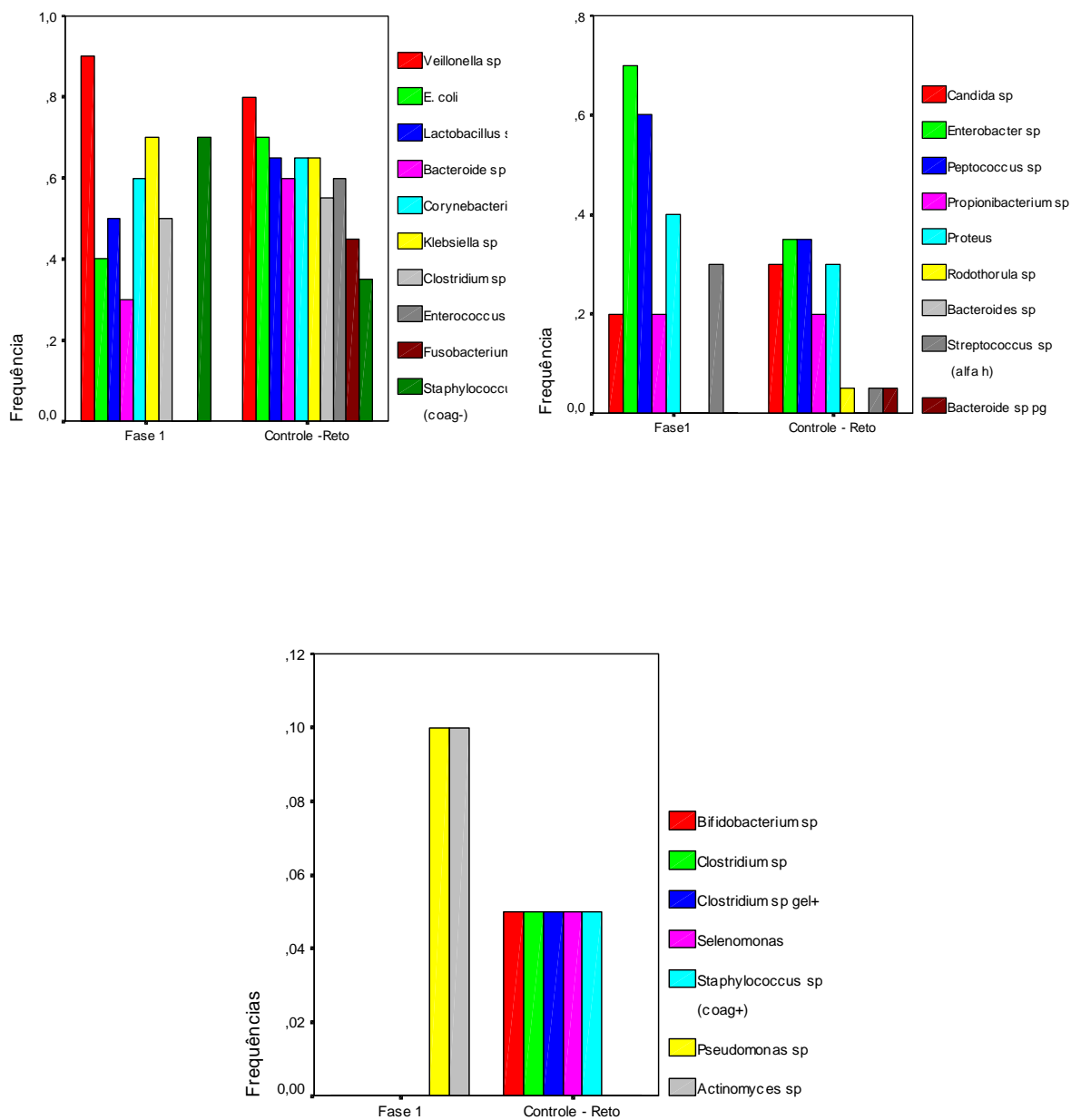
TABELA 12 – FREQUÊNCIA DAS BACTÉRIAS – RETO DO GRUPO CONTROLE X

BOLSA ILEAL-FASE1

BACTÉRIAS	CONTROLE-RETO	FASE1	P-VALUE*
<i>Veillonella sp</i>	0,8000	0,90	0,640
<i>E. coli</i>	0,7000	0,40	0,139
<i>Lactobacillus sp</i>	0,6500	0,50	0,461
<i>Bacteroide sp (npg)</i>	0,6000	0,30	0,245
<i>Corynebacterium sp</i>	0,6500	0,60	1,000
<i>Klebsiella sp</i>	0,6500	0,70	1,000
<i>Clostridium sp(gel-)</i>	0,5500	0,50	1,000
<b><i>Enterococcus sp</i></b>	<b>0,6000</b>	<b>0,00</b>	<b>0,002</b>
<b><i>Fusobacterium sp</i></b>	<b>0,4500</b>	<b>0,00</b>	<b>0,013</b>
<i>Staphylococcus sp (coag-)</i>	0,3500	0,70	0,122
<i>Candida sp</i>	0,3000	0,20	0,682
<i>Enterobacter sp</i>	0,3500	0,70	0,122
<i>Peptococcus sp</i>	0,3500	0,60	0,255
<i>Propionibacterium sp</i>	0,2000	0,20	1,000
<i>Proteus</i>	0,3000	0,40	0,690
<i>Rodothorula sp</i>	0,0500	0,00	1,000
<i>Streptococcus sp (alfa h)</i>	0,0500	0,30	0,095
<i>Bacteroide sp pg</i>	0,0500	0,00	1,000
<i>Bifidobacterium sp</i>	0,0500	0,00	1,000
<i>Clostridium sp</i>	0,0500	0,00	1,000
<i>Clostridium sp (gel+)</i>	0,0500	0,00	1,000
<i>Selenomonas sp</i>	0,0500	0,00	1,000
<i>Staphylococcus sp (coag+)</i>	0,0500	0,00	1,000
<i>Actinomyces sp</i>	0,0000	0,10	0,333
<i>Pseudomonas sp</i>	0,0000	0,10	0,333

- Nível descritivo do teste exato de Fisher

GRÁFICO 8 - FREQUÊNCIA DAS BACTÉRIAS NA BOLSA ILEAL-FASE 1 E NO RETO DO GRUPO III (CONTROLE).



## Concentração média

No que se refere às concentrações bacterianas, a média das bactérias *Bacteroides sp* (npg), *Lactobacillus sp* e *Veilonella sp* foram significativamente superiores no grupo controle (tabela 13).

TABELA 13 – COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES BACTERIANAS NOS GRUPOS II (FASE 1) E III (RETO)

GRUPOS	MEDIDAS	Bacteroides sp não pig/o	Candida sp	Clostridium sp (gel -)	Corynebacterium sp	E.coli	Enterobacter sp	
II (FASE1)								
	Média		0,50	0,30	0,90	1,00	1,80	2,70
	Desvio Padrão		0,85	0,67	0,99	1,15	2,39	2,31
	Mínimo		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo		2,00	2,00	2,00	3,00	5,00	7,00
	Percentis	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		50	0,00	0,00	0,50	1,00	0,00	3,00
		75	1,25	0,25	2,00	1,50	5,00	4,25
III (RETO)								
	Média		2,85	1,90	2,10	3,30	3,30	1,20
	Desvio Padrão		2,85	3,16	2,15	2,68	2,74	1,88
	Mínimo		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo		7,00	9,00	5,00	7,00	7,00	5,00
	Percentis	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		50	2,50	0,00	2,00	4,00	3,50	0,00
		75	5,00	4,50	4,75	5,00	6,50	2,00
p-value			0,049	0,502	0,214	0,061	0,198	0,091

TABELA 13 – COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES BACTERIANAS NOS GRUPOS II (FASE 1) E III (RETO) - CONTINUAÇÃO

GRUPOS	MEDIDAS	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Lactobacillus sp</i>	<i>Peptococcus sp</i>	<i>Propionibacterium sp</i>	<i>Proteus</i>	<i>Staphylococcus sp (coag - gr. Viridans)</i>	<i>Strept. sp (alfa hem. gr. Viridans)</i>	<i>Veillonella sp</i>
II (FASE 1)									
	Média	2,50	0,90	1,10	0,40	0,70	2,50	0,50	2,50
	Desvio Padrão	1,90	0,99	1,10	0,97	1,06	2,17	0,85	1,65
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	5,00	2,00	3,00	3,00	3,00	5,00	2,00	5,00
	Percentis	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
		50	3,00	0,50	1,00	0,00	0,00	2,50	3,00
		75	4,00	2,00	2,00	0,25	1,25	5,00	4,00
III (RETO)									
	Média	3,30	4,50	2,35	0,65	1,35	1,05	0,15	5,10
	Desvio Padrão	2,70	3,75	3,38	1,39	2,30	1,61	0,67	3,26
	Mínimo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Máximo	7,00	9,00	9,00	4,00	7,00	5,00	3,00	9,00
	Percentis	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,25
		50	4,50	6,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,00
		75	5,00	7,00	6,50	0,00	2,75	3,00	7,00
p-value		0,286	0,044	0,880	0,914	1,000	0,074	0,307	0,035
Grupo II: 10 casos válidos									
Grupo III: 20 casos válidos									



### Grupo II – Bolsa ileal –segunda coleta ( bolsa ileal-fase2)

Foram identificadas 16 bactérias, sendo a *Escherichia coli* o aeróbio mais freqüente (50%) e a *Veillonella sp*, o anaeróbio mais encontrado (50%) (Tabela 14).

TABELA 14- BACTÉRIAS DA BOLSA ILEAL –FASE 2

BACTÉRIAS –BOLSA ILEAL	CONCENTRAÇÃO BACTERIANA (LOG <sup>10</sup> )								TOTAL DE PACIENTES
<i>Actinomyces sp</i>							1		1
<i>Bacillus sp</i>								1	1
<i>Bacteroides sp (npg)</i>				1					3
<i>Candida sp</i>					1		1		2
<i>Clostridium sp (gel -)</i>		2	2						2
<i>Corynebacterium sp</i>								2	1
<i>E. coli</i>		2		3	2	4	2		5
<i>Enterobacter sp</i>		4	3	2					2
<i>Klebsiella sp</i>					2	2	1	2	4
<i>Lactobacillus sp</i>						1	1		2
<i>Proteus</i>				1					1
<i>Peptococcus sp</i>				1	1		2		1
<i>Propionibacterium sp</i>						1		2	2
<i>Pseudomonas</i>						1			1
<i>Staphilococcus</i>		1			1	2		1	4
<i>Veillonella sp</i>				2	3		1	1	2

## **Comparação entre íleo terminal e reto do Grupo I (RCU) e as fases 1 e 2 do Grupo II.**

### Freqüência

Quanto à freqüência, observou-se que a *Klebsiella sp* na fase 1 foi superior à do íleo terminal dos pacientes com RCU ( $p=0.031$ ). Nas demais comparações, não houve variação significativa da freqüência das bactérias (Tabela 15).

### Concentração média

Observou-se que a concentração média da *Klebsiella sp* aumentou significativamente na fase 1 ( $p=0.0169$ ) e levemente na fase 2 ( $p=0.0633$ ) (Gráfico 9 e tabela 16). Verificou-se ainda, pequeno aumento da concentração média da bactéria *Staphylococcus sp (coag-)* ( $p= 0.0578$ ) na fase 1 da bolsa ileal (Gráfico 10 e tabela 17).

Para as demais bactérias, não houve diferenças nas médias das concentrações entre o íleo e o reto de pacientes com retocolite ulcerativa e as fases 1 e 2 da bolsa ileal.

TABELA 15 - FREQUÊNCIA DAS BACTÉRIAS ANTES E APÓS BOLSA ILEAL

BACTÉRIAS	Íleo	Fase 1	Fase 2	Reto	Nível Descritivo do Teste de McNemar				
					íleo x F1	íleo x F2	reto x F2	reto x F1	F1 x F2
<i>Actinomyces sp</i>	0,00	0,10	0,10	0,00	-	-	-	-	1,000
<i>Bacteroides sp npg</i>	0,30	0,30	0,20	0,20	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>Bacteroides sp</i>	0,00	0,00	0,00	0,10	-	-	-	-	-
<i>Bacillus sp</i>	0,00	0,00	0,10	0,10	-	-	1,000	-	-
<i>Candida sp</i>	0,20	0,20	0,20	0,20	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>Clostridium sp(gel-)</i>	0,30	0,50	0,20	0,40	0,625	1,000	0,625	1,000	0,250
<i>Corynebacterium sp</i>	0,30	0,60	0,10	0,30	0,250	0,500	0,625	0,250	0,063
<i>Eikenella corrodens</i>	0,10	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	0,20	0,40	0,50	0,10	0,500	0,250	0,125	0,250	1,000
<i>Enterobacter sp</i>	0,60	0,70	0,40	0,70	1,000	0,687	0,375	1,000	0,453
<i>Fusobacterium sp</i>	0,10	0,00	0,00	0,10	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella sp</i>	0,10	0,70	0,40	0,20	<b>0,031</b>	0,250	0,625	0,063	0,250
<i>Micrococcus sp</i>	0,10	0,00	0,00	0,10	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sp</i>	0,10	0,50	0,30	0,10	0,125	0,625	0,500	0,219	0,687
<i>Peptococcus sp</i>	0,30	0,60	0,40	0,20	0,375	1,000	0,500	0,125	0,687
<i>Peptostreptococcus sp</i>	0,20	0,00	0,00	0,30	-	-	-	-	-
<i>Propionibacterium sp</i>	0,10	0,20	0,20	0,20	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>Proteus</i>	0,00	0,40	0,10	0,20	-	-	1,000	0,687	0,250
<i>Pseudomonas sp</i>	0,00	0,10	0,10	0,00	-	-	-	-	1,000
<i>Staphylococcus sp</i>	0,20	0,00	0,40	0,10	0,063	-	-	0,453	-
<i>Sarcinia sp</i>	0,00	0,00	0,00	0,10	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus sp (coag-)</i>	0,20	0,70	0,00	0,40	-	0,687	-	-	-
<i>Streptococcus sp (alfa h)</i>	0,00	0,30	0,00	0,20	-	-	-	1,000	-
<i>Veillonella sp</i>	0,80	0,90	0,50	0,70	1,000	0,375	0,687	0,625	0,219

GRÁFICO 9 - CONCENTRAÇÃO DA *KLEBSIELLA SP* AO LONGO DAS FASES

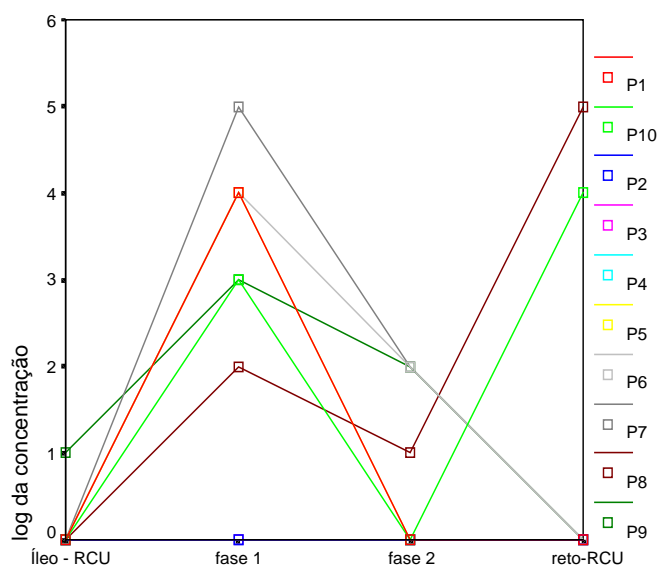


TABELA 16 – CONCENTRAÇÃO DA *KLEBSIELLA SP* AO LONGO DAS FASES

PACIENTES	ÍLEO	F1	F2	RETO
1	0	4	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	4	0	0
6	0	4	2	0
7	0	5	2	0
8	0	2	1	5
9	1	3	2	0
10	0	3	0	4

GRÁFICO 10 – CONCENTRAÇÃO DO *STAPHYLOCOCCUS SP* (COAG -) AO LONGO DAS FASES

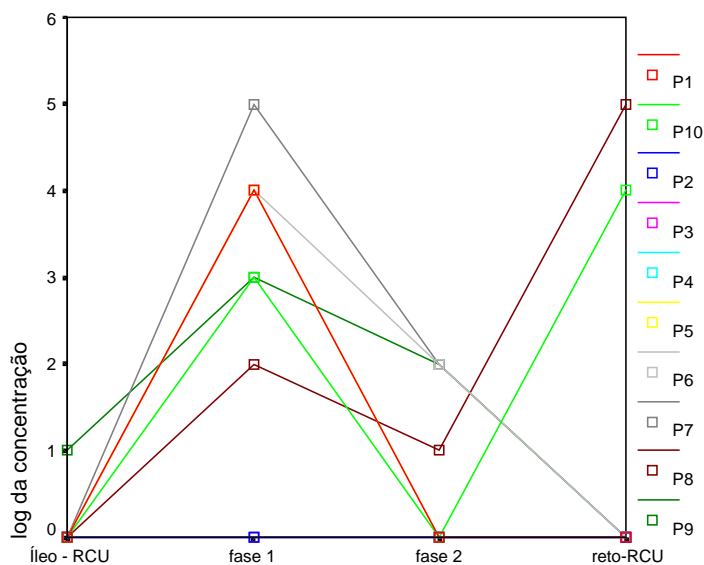


TABELA 17– LOG DA CONCENTRAÇÃO DO *STAPHYLOCOCCUS SP* (COG -) AO LONGO DAS FASES

PACIENTES	ÍLEO	F1	F2	RETO
1	0	5	0	1
2	0	0	0	4
3	0	1	0	0
4	0	5	0	0
5	0	0	0	3
6	0	4	0	0
7	5	5	0	0
8	3	2	0	1
9	0	3	0	0
10	0	0	0	0

### **Resumo das comparações de frequências**

1. Íleo terminal – Grupo I X Grupo III : *Klebsiella sp* foi significativamente mais freqüente no grupo controle.
2. Reto – Grupo I X Grupo III : *E. coli* (80%), *Lactobacillus sp* (70%), *Enterococcus sp* (60%) e *Klebsiella sp* (65%) são significativamente superior no reto do grupo controle.
3. Grupo II (bolsa ileal-fase1) X Grupo III (íleo terminal) : *Enterobacter sp* foi significativamente mais freqüente na bolsa ileal
4. Grupo II (bolsa ileal-fase1) X Grupo III (reto) : As bactérias *Enterococcus sp* e *Fusobacterium sp* foram significativamente mais freqüentes no grupo controle.
5. Íleo e reto do Grupo I X Grupo II (bolsa ileal fase 1 e 2): A *Klebsiella sp* foi significativamente mais freqüente na primeira coleta da bolsa ileal, quando comparada com o íleo terminal dos pacientes do grupo I. Para as demais bactérias, não houve variação significativa da frequência das mesmas.

### **Resumo das comparações das concentrações**

1. Íleo terminal – Grupo I X Grupo III: *Clostridium sp(gel-)* , *Klebsiella sp*, e *Propionibacterium sp* foram significativamente superiores no íleo terminal do grupo controle.
2. Reto – Grupo I X Grupo III: *E. coli*, *Klebsiella sp* e *Lactobacillus sp* são superiores no grupo controle.
3. Grupo II (bolsa ileal-fase1) X Grupo III (íleo terminal): A concentração média do *Enterobacter sp* e *Staphylococcus sp (coag-)* foi significativamente maior na bolsa ileal.
4. Grupo II (bolsa ileal-fase1) X Grupo III (reto): as concentrações médias das bactérias *Bacteróides sp (npg)*, *Lactobacillus sp* e *Veilonella sp* foram significativamente superiores no grupo controle.
5. Íleo e reto do Grupo I X Grupo II (bolsa ileal fase 1 e 2: a concentração média da *Klebsiella sp* aumentou significativamente na fase 1 (p=0.0169) e levemente na fase 2 (p=0.0633).

O papel da flora intestinal na etiologia e manutenção das doenças inflamatórias intestinais vem sendo exaustivamente estudado nas últimas décadas, já que as bactérias têm sido consideradas fundamentais neste processo, embora por mecanismos ainda não adequadamente esclarecidos.

O advento de melhores técnicas de coleta e cultivo para germes aeróbios e, principalmente, para anaeróbios, possibilitou a identificação da microflora endógena e melhor conhecimento sobre suas funções (NICHOLS RL, 1996).

De conhecido, sabe-se que a microbiota pode atuar como um fator primário ou adjuvante, por ação direta na mucosa intestinal, pela liberação de toxinas que desencadeiam resposta inflamatória exacerbada, pelo metabolismo dos produtos de degradação das bactérias ou por causar alterações na barreira mucosa.

Apesar da importância do tema, existem várias razões para poucas publicações sobre o mesmo, principalmente para pesquisa de bactérias associadas à mucosa.



Ao contrário das fezes e do conteúdo da luz intestinal, que são materiais facilmente coletados, existem dificuldades éticas para se obter amostras da mucosa intestinal, já que a realização de biópsias, em indivíduos normais, não está isenta dos riscos inerentes ao procedimento.

Outro fator limitante dos estudos da microbiota intestinal é a dificuldade de comparação dos resultados obtidos. Utilizam-se diferentes tipos de materiais, tais como fezes, biópsias de mucosa ou coleta de conteúdo intestinal. Estes materiais, por sua vez, podem ser obtidos através de retossigmoidoscopia ou colonoscopia, durante cirurgia abdominal ou peças cirúrgicas. As metodologias também são bastante variadas. Levando-se em conta todas estas variáveis, percebe-se o prejuízo na falta de homogeneidade e na interpretação dos achados de cada estudo.

Podem ainda dificultar a comparação dos estudos de microbiota, o tipo de preparo intestinal, uso de antibióticos, oxigenação dos tecidos durante as coletas intra-operatórias, intervalo entre a interrupção arterial de determinado órgão e a coleta da amostra, o tamanho e o peso do espécime coletado através de biópsias intestinais.

Os preparos intestinais que mais interferem com a população bacteriana são aqueles aos quais se associam o uso de antibióticos por

via oral, principalmente a associação eritromicina/neomicina (LINDSEY et al, 1990).

O manitol a 10%, empregado para o preparo mecânico intestinal antes da coleta das amostras deste estudo, é uma substância facilmente encontrada em nosso meio, que permite a limpeza adequada do cólon para a realização da colonoscopia, com baixos índices de efeitos colaterais (HABR-GAMA et al, 1981).

KEIGLEY et al. (1981), estudando o efeito do manitol oral na microflora colônica, através de aspirado do conteúdo intestinal durante cirurgia, observaram que não havia diferenças significativas da flora intestinal dos doentes preparados com manitol e daqueles sem preparo mecânico. A *Escherichi coli* foi a única bactéria que estava em concentrações elevadas, explicando o aumento da produção de gás potencialmente explosivo no grupo preparado com manitol.

Ainda com relação ao manitol, CHAMPAULT; PATEL (1978), referiram que a microbiota intestinal retorna rapidamente à sua composição original, logo após o efeito esperado.

Pelos motivos expostos, a realização da colonoscopia após cerca de cinco horas do término do preparo, permitiu a coleta de muco intestinal com microbiota muito próxima de seus padrões habituais.

Investigações da flora intestinal na retocolite ulcerativa (MARKS et al., 1979; HUDSON et al., 1984), não apresentaram evidências

convincentes de sua participação na patogênese da doença, embora, nestas pesquisas, as alterações da microbiota tenham sido estudadas na flora fecal.

Neste estudo, optou-se pela coleta de muco em segmentos distintos do íleo terminal e cólon, o que permitiu avaliação mais fidedigna da flora residente em cada segmento e as variações específicas que possam ocorrer nestas e outras doenças, em futuras pesquisas.

O estudo do muco intestinal, reflete, de forma mais adequada, a flora endógena destes segmentos e não apenas a flora transitória, que é o maior contingente bacteriano quando se utiliza matéria fecal.

Outro motivo para a escolha de muco intestinal para este estudo, foram as referências de HARTLEY et al. (1992), de que a flora associada à mucosa intestinal sofre menos efeito de alterações como sangramento e diarreia, sintomas encontrados em todos os pacientes do presente estudo. MITSUOKA; BENNO (1982), que referem que estas variáveis modificam a flora fecal nos portadores de doença inflamatória intestinal.

Enfim, a escolha do estudo da microbiota associada ao muco intestinal, se baseou, ainda, na maior interferência desta flora nas reações metabólicas que sofrem influência das bactérias intestinais (HILL; DRASAR, 1975).

Nas pesquisas de estabelecimento de flora residente em qualquer órgão, é rotina que se faça a coleta do material sem uso de

antimicrobianos ou de qualquer medicação de possa interferir na identificação e contagem das bactérias.

Entretanto, na fase pré-operatória deste estudo, a coleta do material foi feita na vigência de antibióticos (sulfapiridina e/ou ciprofloxacina), já que tratavam-se de doentes portadores de retocolite ulcerativa grave, dependentes das drogas em uso para controle aceitável da doença, enquanto aguardavam tratamento cirúrgico.

O doente ideal para este tipo de estudo, ou seja, aquele em primeiro surto de retocolite ulcerativa e ainda não tratado com antibióticos, praticamente não existe no Ambulatório de Doenças Inflamatórias do Hospital das Clínicas, para onde são encaminhados justamente os doentes com quadro clínico mais grave e crônico.

Ainda assim, consideramos importante o conhecimento da flora intestinal neste tipo de situação, onde, mesmo em uso contínuo e crônico de medicamentos, os doentes mantêm doença ativa, na inferência de se identificar a flora que, eventualmente poderia contribuir na etiologia ou cronificação do processo inflamatório.

HARTLEY et al. (1992), observaram que havia diminuição da flora associada à mucosa nos doentes com retocolite ulcerativa em atividade e que as alterações encontradas nos pacientes com recidiva da doença, onde 50% deles estavam em uso de sulfassalazina, foram semelhantes as dos pacientes com surto inicial da retocolite ulcerativa.

Estudo realizado por FABIA et al. (1993), também observou significativa diminuição no número de bactérias anaeróbias e lactobacillus em pacientes com doença inflamatória em atividade.

POXTON; BROWN (1997), estudaram a flora associada à mucosa intestinal através da realização de biópsias no cólon proximal e reto, em seis pacientes com retocolite ulcerativa e seis sem doença inflamatória intestinal. Observaram que a flora era similar nos dois locais de coleta de um mesmo paciente e que não houve diferença entre os pacientes com RCU ou não, mesmo naqueles em uso de antibióticos, concluindo que, em estudos futuros, biópsias colhidas em sigmóide e reto, sem preparo intestinal, podem ser representativa da flora nos demais segmentos.

No presente estudo, onde realizou-se coleta de material em cada segmento colônico, íleo terminal e reto dos doentes com retocolite ulcerativa, observou-se que a frequência e a concentração de algumas bactérias, principalmente anaeróbios estritos, estavam diminuídas em relação ao grupo controle, embora sem diferenças significantes, exceto pela *Klebsiella sp*, bactéria aeróbia, que foi significativamente mais freqüente no grupo controle.

As bactérias anaeróbias obrigatórias estão intimamente associadas ao epitélio intestinal, formando uma barreira que impede o

contato direto de bactérias potencialmente patogênicas com este epitélio (DE WITT; KUDSK, 1999).

A quebra desta ecologia normal poderia ocorrer, por exemplo, pelo uso de antibióticos de amplo espectro, devido maior sensibilidade das bactérias anaeróbias a este medicamento do que a flora restante (BERG, 1981). Tal fato poderia explicar a diminuição dos anaeróbios obrigatórios, encontrada nos pacientes com retocolite ulcerativa antes da realização do tratamento cirúrgico.

Quando se comparou a flora intestinal do grupo de doentes com retocolite ulcerativa, no pré-operatório, com a flora do grupo controle, não se observou diferença estatística significativa na proporção de aeróbios e anaeróbios, evidenciando que não ocorre alteração marcante na flora, mesmo na presença de inflamação e/ou uso de antimicrobianos.

Tal observação é compatível com os estudos clínicos que sugerem que a sulfassalazina não tem ação marcante antimicrobiana, agindo provavelmente no metabolismo das bactérias (HARTLEY et al, 1992, 1996).

Outro aspecto interessante, foi com relação à bactéria anaeróbia estrita *Veillonella sp*, que, nos estudos de QUINTANILHA et al. (2001), foi considerada um marcador de normalidade da flora intestinal, mostrando

que havia baixo potencial de óxido-redução dos segmentos examinados e conseqüente manutenção das condições de anaerobiose do cólon.

HILL e DRASAR (1975), referem ainda que, a *Veillonella sp*, assim como outros componentes menos encontrados na microflora intestinal, podem ser importantes na flora pessoal de cada indivíduo, interferindo de forma expressiva nos processos associados com a microbiota indígena.

Neste estudo, observou-se que, apesar de haver diminuição da concentração desta bactéria no grupo de doentes com retocolite ulcerativa, sua freqüência se manteve elevada e constante em todos os segmentos examinados, sendo encontrada em pelo menos 70% das amostras deste grupo, semelhante a porcentagem encontrada nas amostras do grupo controle.

Desta forma, podemos inferir que a *Veillonella sp* é um fator a mais a favor da constância da flora intestinal, ou seja, que esta sofre apenas pequenas alterações na presença de inflamação da mucosa intestinal.

Quando se observou a freqüência e a concentração da microbiota intestinal nos diversos grupos, notou-se que, isoladamente, nenhuma bactéria poderia ser responsabilizada pela manutenção do processo inflamatório no grupo com RCU.

Vários microrganismos já foram responsabilizados pelo aparecimento ou manutenção do quadro clínico na retocolite ulcerativa (SARTOR, 2000).

A *Escherichia coli*, por exemplo, tem sido relatada como agente causador de colite, em estudos realizados por COOKE (1967, 1974) e por BURKE; AXON (1988).

No presente estudo, encontrou-se *Escherichia coli* em concentrações elevadas em alguns segmentos intestinais do grupo de pacientes com retocolite ulcerativa, porém em, no máximo, 30% dos doentes, o que não nos permitiu responsabilizá-la pela manutenção do processo inflamatório.

Observou-se ainda, que entre as bactérias aeróbias, a *Klebsiella sp* foi a mais freqüente no íleo terminal do grupo controle e a *Escherichia coli*, a mais freqüente no reto deste grupo.

No íleo terminal dos doentes com retocolite ulcerativa, a *Klebsiella sp* praticamente não aparece, retornando aos valores encontrados no grupo controle, logo na primeira coleta realizada na bolsa ileal.

Evidenciou-se assim, que, nesta primeira coleta da bolsa ileal, o comportamento bacteriano tem mais semelhanças com íleo terminal do grupo controle.

Quando se comparou o conteúdo bacteriano da bolsa ileal após dois e oito meses do fechamento da ileostomia protetora, observou-se



que o número total de bactérias encontradas foi o mesmo (16 espécies), apesar do intervalo de seis meses entre as duas coletas.

KISS, em 1992, estudando ao microscópio eletrônico de varredura, a superfície epitelial de reservatórios ileais em doentes portadores de retocolite ulcerativa e polipose cólica familiar, tratados pela retocoliectomia com conservação esfínteriana, observou nítida alteração da superfície mucosa nos reservatórios ileais. Concluiu que, ao contrário do grupo controle, que apresentava vilosidades com aspecto digitiforme, os reservatórios ileais tinham mucosa freqüentemente plana, quase desprovida de vilosidades, apresentando aspecto de roscas, que se assemelhava à mucosa cólica e retal normais.

ROCHA, em 1996, continuando os estudos de KISS (1992), sobre as alterações morfológicas do epitélio dos reservatórios ileais com microscopia eletrônica, observou que estas modificações eram dependentes do fluxo de fezes através da bolsa ileal e que já estavam presentes nas primeiras biópsias, realizadas após um mês da realização de retocoliectomias com anastomose de bolsa ileal ao canal anal sem ileostomia ou após um mês do fechamento da ileostomia protetora.

Alguns autores ( SCOTT; PHILLIPS, 1989; LOHMULLER et al., 1990), referiram que estas alterações morfológicas dos reservatórios ileais, agora com mucosa semelhante a do cólon, poderiam predispor a recidivas da doença e aparecimento das bolsites.

Com base nestas evidências, observou-se no presente estudo, que a reconstituição da microbiota do muco da bolsa ileal foi se instalando de forma mais gradual que as alterações morfológicas descritas nos estudos acima, uma vez que, após oito meses do fechamento da ileostomia, a bolsa ileal mantinha o mesmo número de bactérias encontradas na primeira coleta, realizada cerca de dois meses após o fechamento da ileostomia.

Enfim, pode-se dizer que, a manutenção do quadro clínico da RCU não se relaciona com a presença de maior flora bacteriana e nem de microbiota em concentração patogênica, estando possivelmente associado a outros fatores de ordem local, a serem testados em novos estudos, delineados a partir desta linha de pesquisa.

Mesmo assim, continua sendo cada vez maior, o interesse no conhecimento do mecanismo de ação das bactérias nas doenças inflamatórias intestinais e de como probióticos e imunonutrientes poderiam atuar na microbiota intestinal, abrindo novas alternativas terapêuticas para estes doentes, possivelmente mais eficazes e isentas dos efeitos colaterais dos medicamentos atualmente utilizados.

A observação da frequência e da concentração bacterianas nos pacientes com retocolite ulcerativa antes da cirurgia, na bolsa ileal após dois e oito meses do fechamento da ileostomia e no grupo controle, permite concluir que:

1. Isoladamente, não se encontrou nenhuma bactéria em concentração ou frequência significativamente alteradas, que pudesse estar associada com a manutenção do processo inflamatório da mucosa intestinal nos pacientes com retocolite ulcerativa.
2. A microbiota intestinal dos doentes com retocolite ulcerativa, apesar de sofrer diminuição da frequência e concentração de algumas bactérias, não apresenta diferenças significativas da flora encontrada no grupo controle.

ARDIZZONE, S.; BOLLANI, S; MANZIONNA, G.; BIANCHI PORRO, G.

Inflammatory bowel disease approaching the 3<sup>rd</sup> millennium:  
pathogenesis and therapeutic implications. **Eur. J. Gastroenterol.**  
**Hepatol.**, v.11, p. 27-32, 1999.

ARDIZZONE, S.; BIANCHI PORRO, G. Inflammatory bowel disease: new  
insights into pathogenesis and treatment. **J. Intern. Med.**, v. 252,  
p. 475-496, 2002.

ARIES, V.C.; CROWTHER, J.S.; DRASAR, B.S. et al. Bacteria and the  
aetiology of cancer of the large bowel. **Gut** , v.10, p. 334-335, 1969.

BERG, R.D. Promotion of the translocation of enteric bacteria from the  
gastrointestinal tracts of mice by oral treatment with penicillin,  
clindamycin or metronidazole. **Infect. Immun**, v.33, p. 854, 1981.

BERG, R.D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends in Microbiology**, v. 4, p. 413-461, 1996.

BERTAZZONI-MINELLI, E.; BENONI, G.; BERTI, T. et al. A simplified method for the evaluation of human faecal flora in clinical practice. **Helv. Paediatr. Acta**, v. 32, p. 471-78, 1978.

BERTAZZONI-MINELLI, E.; BENINI, A.; BEGHINI, A.; CERRUTTI, R.; NARDO, G. Bacterial flora in healthy women of different ages. **Microb. Ecol. Health. Dis.**, v. 6, p. 43-52, 1993.

BORGSTRÖM, A.; GENELL, S.; OHLSSON, K. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.12, p. 525-529, 1977.

BORODY, T.J.; WARREN, E.F.; LEIS, S.; SURACE, R.; ASHMAN, O. Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 37, p. 42-7, 2003.

BURKE, D.A.; AXON, A.T.R. *Clostridium difficile*, sulphasalazine, and ulcerative colitis. **Postgrad. Med. J.**, v.63, p.955-7.

BURKE, D.A.; AXON, A.T.R. Adhesive *E. coli* in inflammatory bowel disease and infective diarrhea. **B.M.J.**, v. 297, p. 102-104, 1988.

CAMPOS, F.G.; WAITZBERG, D.L.; TEIXEIRA, M.G.; MUCERINO, D.R.; HABR-GAMA, A.; KISS, D.R.. Inflammatory bowel disease: principles of nutritional therapy. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Méd. São Paulo**, v. 57, p. 187-98, 2002.

CAMPOS, F.G.; WAITZBERG, D.L.; LOGULO, A.F.; TORRINHAS, R.S.; TEIXEIRA, W.G.; HABR-GAMA, A. Immunonutrition in experimental colitis: beneficial effects of Omega-3 fatty acids. **Arq. Gastroenterol.**, v.39, p. 48-54, 2002.

CAMPOS, F.G.; WAITZBERG, D.L.; TEIXEIRA, M.G.; MUCERINO, D.R.; HABR-GAMA, A.; KISS, D.R. Pharmacological nutrition in inflammatory bowel diseases. **Nutr. Hosp.**, v. 18, p. 57-64, 2003.

CHAMPAULT, G.; PATEL, J.C. La préparation colique à la chirurgie. **J. Chir.** (Paris), v.115, p. 689, 1978.

- COLGAN, M.T. The bacterial flora of the intestinal tract; changes in diarrheal disease and following antimicrobial therapy. **J. Pediat.**; v.49, p. 214, 1956.
- COOKE, E.M. A quantitative comparison of the faecal flora of patients with ulcerative colitis and of normal persons. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 94, p. 439, 1967.
- COOKE, E.M. Faecal flora of patients with ulcerative colitis during treatment with salicylazosulphapyridine. **Gut** , v.15, p. 143-6, 1974.
- COWAN, S.T.; STEEL, K.J. **Manual for identification of medical bacteria**. 2ed. New York, Cambridge University Press, 1974.
- DE WITT, R.C.; KUDSKY, K.A. The gut's role in metabolism, mucosal barrier function and gut immunology. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.13. p. 1-16, 1999.
- D'HAENS, G.R.; GEBOES, K.; PEETERS, M. et al. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. **Gastroenterology**, v. 114, p. 771-4, 1998.

DUCHMAN, R.; KAISER, I.; HERMANN, E.; MAYET, W.; EWE, K.

Tolerance exists toward resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease. **Clin. Exp. Immunol.** V.102, p. 448-455, 1995.

DUERDEN, B.I.; DRASAR, B.S. (eds). Anaerobes in human diseases.

London, Edward Arnold. 1991.

DUFFY, M.; O' MAHONY, L.; COFFEY, J.C.; COLLINS, J.K.; SHANAHAN,

F.; REDMOND, H.P.; KIRWAN, W.O. Sulfate-reducing bacteria colonize pouches formed for ulcerative colitis but not for familial adenomatous polyposis. **Dis. Colon Rectum**, v. 45, p. 384-388, 2002.

ELSON, C.O. Experimental models of intestinal inflammation: new

insights into mechanisms of mucosal homeostasis. In: Ogra PL,

Mestecky J, Lamm ME et al. **Handbook of mucosal immunology**

San Diego; Academic Press, p. 1007-1024, 1999.

FABIA, R.; ARRAJAB, A.; ANDERSON, M.L. et al. Impairment of

bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis

in the rat. **Digestion**, v. 54, p. 248-55, 1993.



FARREL, R.J.; LAMONT, J.T. Microbial factors in inflammatory bowel disease. **Gastroenterol. Clin. North. Am.**, v. 31, p. 41-62, 2002.

FINEGOLD, S.M.; ATTEBERY, H.R.; SUTTER, V.L. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and America diets. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 27, p. 1456-1469, 1974.

FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 115, p.182-205, 1998.

GALL, L.S. Normal faecal flora of man. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 23, p. 1457-1465, 1970.

GIONCHETTI, P.; RIZZELLO, F.; VENTURI, A. Probiotics in infective diarrhoea and inflammatory bowel disease. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 15, p. 489-493, 2000.

GORDON, J.I.; HOOPER, L.V.; MCNEVIM, S.M. et al. Epithelial cell growth and differentiation: III: promoting diversity in the intestinal: conversations between the microflora, epithelium and diffuse GALT. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p.565-70, 1997.

GUSTAFSSON, B.E. The physiological importance of the colonic microflora. **Scand. J. Gastroenterol. Suppl.**, v. 77, p. 117-131.

HABR-GAMA, A.; TEIXEIRA, M.G.; ALVES, P.R.A.; VENTURA, T.C.M.; GAMA-RODRIGUES, J.J. Emprego da solução de manitol a 10% no preparo do intestino grosso para colonoscopia e cirurgia. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Méd. S. Paulo**, v. 3, p. 239-243, 1981.

HARTLEY, M.G.; HUDSON, M.J.; SWARBRICK, E.T. et al. The rectal mucosa-associated microflora in patients with ulcerative colitis. **J. Med. Microbiol.**; 36: 96-103, 1992.

HARTLEY, M.G.; HUDSON, M.J.; SWARBRICK, E.T. et al. Sulphasalazine treatment and the colorectal mucosa-associated flora in ulcerative colitis. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 10, p. 157-163, 1996.

HILL, M.J.; DRASAR, B.S. The normal colonic bacterial flora. **Gut** , p. 318-323, 1975.

- HOLDEMAN, L.V.; CATO, E.P.; MOORE W.E.C. **Anaerobic Laboratory Manual**. 4 ed. Blacksburg, Virginia Polytechnics, Institute and State University, 1977.
- KEIGHLEY, M.R.B.; TAYLOR, E.W.; HARES, M.M. et al. Influence of oral mannitol bowel preparation on colonic microflora and the risk of explosion during endoscopic diathermy. **Br. J. Surg.**,v.68 p. 554-556, 1981.
- KISS, D.R. Contribuição da microscopia eletrônica de varredura ao estudo da superfície epitelial do íleo em reservatórios ileais pélvicos a após anastomose íleo-retal. São Paulo,1992. 86 p. **Tese (Livre-docência)** – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- KISS, D.R.; HABR-GAMA, A.; FREYMÜLLER, E.; SMITH, R.L.; PINOTTI, H.W. Microscopia eletrônica na varredura da superfície epitelial do íleo em reservatórios ileais pélvicos e após anastomose ileorretal. **Rev. Bras. Coloproct.**, v. 14, p. 81-88, 1994.

KMIOT, W.A.; YOUNGS, D.; TUDOR, R.; THOMPSON, H.; KEIGHLEY, M.R. Mucosal morphology, cell proliferation and faecal bacteriology in acute pouchitis. **Br. J. Surg.**, p. 1445-9, 1993.

LINDSEY, J.T.; SMITH, J.W.; MCCLUGAGE, S.G.; NICHOLS, R.L. Effects of commonly used bowel preparations on the large bowel mucosal-associated and luminal microflora in the rat model. **Dis. Colon. Rectum** v. 33, p. 554-60, 1990.

LINSKENS, R.K.; HUIJSDENS, X.W.; SAVELKOUL, P.H. et al. The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. **Scand. J. Gastroenterol. Suppl.**, v. 234, p. 29-40, 2001.

LOHMULLER, J.L.; PEMBERTON, J.H.; DOZOIS, R.R. et al. Pouchitis and extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease after ileal pouch-anal anastomosis. **Ann. Surg.**, v. 5, p. 622-9, 1990.

LUUKONEM, P.; VALTONEN, V.; SIVONEN, A.; SIPPONEN, P.;

JARVINEN, H. Fecal bacteriology and reservoir ileitis in patients operated on for ulcerative colitis. **Dis. Colon Rectum**, v. 31, p.864-67, 1988.

MACFARLANE, G.T.; MACFARLANE, S. Human colonic microbiota:

ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 32; Suppl 222, p. 3-9, 1997.

MACHADO, W.M.; MORAES-FILHO, J.P.P.; SANTOS, M.A.A.;

BERTARELLO, A. Jejunal flora of patients with megaesophagus secondary to Chagas's disease. **Trans. R. Soc. Tro. Med. Hyg.**, v. 83, p.199, 1989.

MCLEOD, R.S.; ANTONIOLI, D.; CULLENJ et al. Histologic and

microbiologic features of biopsy samples from patients with normal and inflamed pouch. **Dis. Colon Rectum**, v.37, p.26-31, 1994.

MACPHERSON, A.; KHOO, U.Y.; FORGACS, I.; PHILPOTT-HOWARD, J.;

BJARNASON, I. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are direct against intestinal bacteria. **Gut**, v. 38, p. 365-75, 1996.

MARKS, C.G.; HAWLEY, P.R.; PEACH, S.L.; DRASAR, B.S. et al. The effects of phthalysulphathiazole on the bacteria of the colonic mucosa and intestinal contents as revealed by the examination of surgical samples. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 14, p. 891-6, 1979.

MITSUOKA, T.; BENNO, Y. Bacterial species of the intestinal flora of patients with inflammatory bowel disease. In: Shiratori T, Nakano H (eds). **Inflammatory Bowel Disease** (Japan Medical Research Foundation Publication n° 22) Tokyo. University of Tokyo Press, p. 35-42, 1982.

NASMYTH, D.G.; GODWIN, P.G.; DIXON, M.F.; WILLIAMS, N.S.; JOHNSTON, D. Ileal ecology after pouch-anal anastomosis or ileostomy. A study of mucosal morphology, fecal bacteriology, fecal volatile fatty acids and their interrelationship. **Gastroenterology**, v. 96, p. 817-24, 1989.

NICHOLS, R.L.; CONDON, R.E. Preoperative preparation of the colon.

**Surg. Gynecol. Obstet.**; p. 132:323, 1971.

NICHOLS RL, CONDON RE. Role of the endogenous gastrointestinal  
..... microflora in postoperative wound sepsis. **Surg. Annu.** 1975: 279-  
293.

NICHOLS, R.L. Surgical infections: prevention and treatment-1965 to  
1995. **Am. J. Surg.**, v. 172, p. 68-74, 1996.

O'CONNELL, P.R.; RANKIN, D.H.; WEILAND, L.H.; RULY, K.A. Enteric  
bacteriology, absorption, morphology and emptying after ileal  
pouch-anal anastomosis. **Br. J. Surg.**, v. 73, p. 909-14, 1986.

OHKHUSA, T. Production of experimental ulcerative colitis in hamsters  
by dextran sodium sulphate and changes in intestinal microflora.  
**Jap. J. Gastroenterol.**, v. 82, p. 1327-36, 1985.

PEACH, S.; FERNANDEZ, F.; JOHNSON, K.; DRASAR, B.S. The non-  
sporring anaerobic bacteria in human faeces. **J. Med. Microbiol.**, v.,  
p. 213-221, 1974;.

PODOLSKY, D.K. Inflammatory bowel disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, p. 928-937, 1991.

POXTON, I.R.; BROWN, R. Mucosa-associated bacterial flora of human colon. **J. Med. Microbiol.**, v. 46, p. 85-91, 1997.

QUINTANILHA, A.G. Microbiota do jejuno proximal (Identificação qualitativa e quantitativa dos microorganismos aeróbios e anaeróbios antes e após cirurgia para correção de megacólon chagásico. São Paulo, 1994, 76p. **Tese (Doutorado)**-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

QUINTANILHA AG, ZILBERSTEIN B, SANTOS MAA, PAJECKI D, MOURA EG, MARTINS B, RODRIGUES JG. Sample Method for Determination of the Lower Gastrointestinal Tract Microbiota. In: 11<sup>th</sup> World Congress of the International Association of Surgeons & Gastroenterology, 2001, Creta, Grécia. **Hepato-Gastroenterology** p.48, 2001;



- REDDY, B.S.; WYNDER, E.L. Large bowel carcinogenesis: fecal constituents of population with diverse incidence rates of colon cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 50, p. 1437-1442, 1973.
- REDDY, B.S.; WEISBURGER, J.H.; WYNDER, E.L. Effects of high risk and low risk diets for colon carcinogenesis on fecal microflora and steroids in man. **J. Nutr.**, v. 105, p. 1437-1442, 1975.
- RHODES, J.M. Unifying hypothesis for inflammatory bowel disease and associated colon cancer: sticking the pieces together with sugar. **Lancet**, v. 347, p. 40-44, 1996.
- ROCHA, M.E.S. Estudo prospectivo da superfície epitelial de reservatórios ileais pélvicos com o microscópio eletrônico de varredura em pacientes portadores de retocolite ulcerativa. São Paulo, 1996. 59 p. **Tese (mestrado)** – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- RUSELER-VAN-EMBDEN, J.G.H.; SCHOUTEN, W.R.; VAN LIESHOUT, L.M.C. Pouchitis: result of microbial imbalance? **Gut**, v. 35, p. 658-64, 1994.

RUTGEERTS, P.; GOBOES, K.; PEETERS, M. et al. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. **Lancet**, v. 338, p. 771-4, 1991.

RUTGEERTS, P.; HIELE, M.; GOBOES, K. et al. Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. **Gastroenterology**, v. 108, p. 1617-21, 1995.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; ONNELA, T. Gut flora in normal and disordered states. **Chemotherapy**, v. 41, p. 5-15, 1995.

SARTOR, R.B. Workshop XI: *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. In: Tytgat GNJ, BARTELSMAN JF, VAN de VENTER SHJ. Editors. **Inflammatory bowel diseases**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press; 1995.

SARTOR, R.B. Enteric microflora in IBD: pathogens ou commensals? **Inflamm. Bowel. Dis.**, v.3, p. 230-5, 1997.

SARTOR, R.B. Microbial factors in the pathogenesis of Crohn's disease, ulcerative colitis, and experimental intestinal inflammation. In Kirsner (ed): **Inflammatory Bowel Disease**, ed 5. Philadelphia, WB Saunders, p 153-178, 2000.

SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 31, p.107-33, 1977.

SCHULTSZ, C.; VAN DEN BERG, F.M.; TEN KATE, F.W.; TYTGAT, G.N.J.; DANKERT J. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. **Gastroenterology**, v. 117, p. 1089-1097, 1999.

SCOTT, A.D.; PHILLIPS, R.K.S. Ileitis and pouchitis after colectomy for ulcerative colitis. **Br. J. Surg.**, v.; 76, p. 668-9, 1989.

SHANAHAM, F. Probiotics and inflammatory bowel disease. Is there a scientific rationale ?. **Inflamm. Bowel Dis.**, v. 6, p. 107-15, 2000.

SUTTER, V.L.; CITRON, D.M.; FINEGOLD, S.M.. **Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual**, 3 ed. St. Louis, C V Mosby, 1980.

- SVARTZ, N. Sulfasalazine:II. Some notes on the Discovery and development of salazopyrin. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 83, p.497-503, 1988.
- SWIDSINSKI. A.; LADHOFF, A. PERNTHALER, A.; SWIDSINSKI, S. et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 122, p. 44-54, 2002.
- TURUNEN, U.M.; FARKKILA, M.A.; HAKALA, K. et al. Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study. **Gastroenterology**, v. 115, p. 1072-8, 1998.
- VAN DER WAAIJ, D.; BERGHUIS DE VRIES, J.M.; LEKKERKERK VAN DER WEES, J.E.C. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. **J. Hyg.**, v. 69, p. 405-411, 1971.
- VAN HEEL, D.A.; Mc GOVERN, D.P.B.; JEWEL, D.P. Crohn's disease: genetic susceptibility, bacteria and innate immunity. **Lancet**, v. 357, p. 1902-4, 2001.

VENTURI, A.; GIONCHETTI, P.; RIZZELLO, F.; JOHANSSON, R.;

ZUCOSNI, E. et al. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 13 p. 1103-8, 1999.