

# Análise da diversidade da microbiota intestinal de ratos submetidos à ressecção da valva ileocecal e criação de esfíncter artificial

## *Analysis of the diversity of the intestinal microbiota of rats subjected to resection of the ileocecal valve and creation of artificial sphincter*

ÂNGELA APARECIDA BARRA, TCBC-MG<sup>1</sup>; ALCINO LÁZARO DA SILVA, ECBC-MG<sup>2</sup>; CÍCERO DE LIMA RENA, ECBC-MG<sup>3</sup>; MARIA CRISTINA VASCONCELOS FURTADO<sup>4</sup>; ALESSANDRA BARBOSA FERREIRA<sup>5</sup>; MARCELO NAGEN<sup>6</sup>; FERNANDA DE SOUZA FREITAS<sup>7</sup>

### R E S U M O

**Objetivo:** analisar através de biologia molecular a diversidade da microbiota da junção ileocecal antes e após a ressecção da válvula ileocecal e reconstrução do trânsito com e sem a criação de “neoesfíncter”. **Métodos:** Os animais foram distribuídos em dois grupos: Grupo A (n=7) com ressecção da válvula ileocecal e anastomose ileocólica término-terminal em plano único, e Grupo B (n=7) com ressecção da válvula ileocecal e anastomose ileocólica término-terminal em plano único e confecção do esfíncter artificial. Reoperados com 20 dias coletou-se novamente conteúdo intraluminal do íleo e do cólon. Das amostras coletadas, extraiu-se DNA para reação de PCR-DGGE. Os padrões de bandas eletroforéticas, gerados na reação, foram submetidos ao programa Bionumerics para análise da similaridade e da diversidade da microbiota. **Resultados:** a diversidade da microbiota foi maior e em mais amostras do íleo do que as do cólon. O grupo com a válvula apresentou os maiores valores e variações no cólon de 2,11 a 2,93. Em três animais de cada grupo estabeleceu-se comparação da similaridade e não se assemelharam ao controle. **Conclusão:** a ressecção da válvula ileocecal levou à mudanças da microbiota ileal e, com a criação de novo esfíncter, as variações foram maiores.

**Descritores:** Intestinos. Canal anal. Valva ileocecal. Reação em cadeia da polimerase. Biologia molecular.

### INTRODUÇÃO

A junção ileocecal é uma estrutura muscular com função de esfíncter<sup>1</sup>. Regula o fluxo ileal para o ceco, contribuindo para o processo absorptivo. Dificulta o refluxo cecoileal reduzindo a colonização do íleo por bactérias do cólon<sup>2,3</sup>.

A perda anatômica e/ou funcional da região ileocecal cursa com quadro de disbiose. Trata-se do supercrescimento bacteriano de espécies fora dos seus respectivos sítios habituais. A manifestação clínica da disbiose corresponde à síndrome disabsortiva<sup>4,5</sup>.

O sistema digestório é colonizado por mais de 30.000 espécies de bactérias, sendo mais de 60% não cultiváveis fora do ambiente intestinal por técnicas convencionais. Com o emprego de novas técnicas de biologia molecular, como extração de DNA e reação em cadeia de polimerase (RCP), tem-se demonstrado sucesso na identi-

cação de microrganismos, principalmente, os não cultiváveis ou que não sobrevivem às técnicas de transporte e estocagem para o cultivo<sup>6-8</sup>.

A criação de válvulas ou esfíncteres artificiais no intestino busca reduzir a velocidade do trânsito e impedir o refluxo do conteúdo colônico para o intestino delgado. Várias técnicas foram descritas, tais como, constrição externa, por meio de anel ou sutura, intussuscepção segmentar do intestino, tunelização submucosa, miectomias, seromiectomias ou por seromiotomias. Essas técnicas são empregadas para reduzir as manifestações clínicas de situações como a síndrome do intestino curto<sup>3,9-15</sup>. A partir da modificação da técnica de Lázaro da Silva<sup>16,17</sup>, Rena *et al.* criaram válvula artificial em 20 pacientes, com bons resultados. Usaram duas seromiotomias circunferenciais, com anel seromuscular intermediário sepultado constituindo um piloro com inervação intrínseca preservada<sup>18</sup>.

Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Realizado com a contribuição do Centro de Biologia e Reprodução do Biotério da Universidade Federal de Juiz de Fora e do Departamento de Microbiologia Industrial BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa.

1. Professora Adjunta do Departamento de Medicina e Enfermagem da Universidade Federal de Viçosa.- MG-BR; 2. Professor Emérito da Universidade Federal de Minas Gerais-MG-BR; 3. Professor Associado da Universidade Federal de Juiz de Fora; 4. Professora Adjunta da Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora.; 5. Doutora em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa; 6. Mestre em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa; 7. Graduada em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa.

A proposta desse trabalho experimental foi analisar através de biologia molecular a diversidade da microbiota da junção ileocecal antes e após a ressecção da válvula ileocecal e reconstrução do trânsito com e sem a criação de "neoesfíncter".

## MÉTODOS

Foram utilizados 14 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos com seis meses de vida, da colônia do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR), da Universidade Federal de Juiz de Fora - MG. Este centro é cadastrado no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, Brasil sob o nº 02/2010.

Os animais foram distribuídos em dois grupos: Grupo A (n=7) com ressecção da válvula ileocecal e anastomose ileocólica término-terminal em plano único, e Grupo B (n=7) com ressecção da válvula ileocecal e anastomose ileocólica término-terminal em plano único e confecção do esfíncter artificial pela técnica de Rena *et al.*<sup>18</sup>.

Os animais ficavam alojados em gaiolas de polipropileno, com maravalhas selecionadas, mamadeira para água e cocho para ração. As gaiolas estavam em armários climatizados, com controle de temperatura, luminosidade, umidade e troca de ar programado. No pré-operatório os animais permaneceram em jejum para sólidos de seis horas, porém era oferecida água com açúcar (5g/100ml) *ad libitum*. Após pesados, os animais eram anestesiados. A técnica anestésica, idêntica entre os grupos, constituiu-se de injeção intraperitoneal de 10mg/kg de xilazina, associadas à 90mg/kg de ketamina. Durante o período pós-operatório, os animais eram mantidos em gaiolas e ambiente apropriados e recebiam apenas água no primeiro dia de pós-operatório. Nos dois dias seguintes, recebiam ração triturada e umedecida em água. No quar-

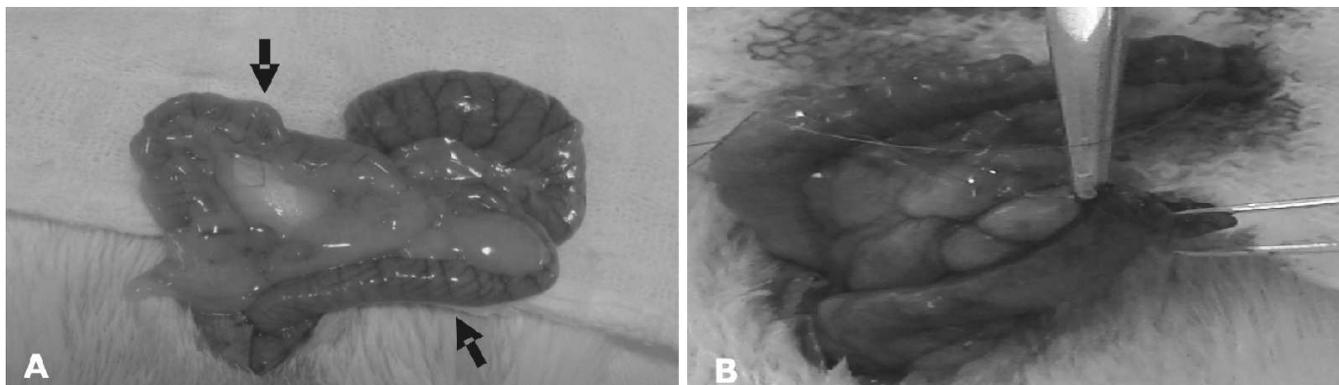
to dia a alimentação pastosa era substituída por ração peletizada<sup>19</sup>.

Na primeira intervenção cirúrgica, certificado o plano anestésico, realizava-se antissepsia da área do abdome com álcool a 70%GL. Sob rigorosa técnica asséptica, executava-se uma incisão longitudinal mediana, de 3cm, na linha média do abdome abrangendo pele e tela subcutânea. Os músculos eram separados no plano mediano e a cavidade peritoneal era alcançada; o segmento ileocólico identificado era exteriorizado da cavidade peritoneal. O pedículo vascular ileocecocólico era ligado com fio inabsorvível (Nylon 4.0), junto à face mesentérica. A seguir, era seccionado o íleo terminal, a 2cm da junção ileocecal, para coleta do conteúdo entérico em tubo esterilizado. A quantidade coletada dependia do conteúdo que ali se encontrava. Ressecava-se o segmento do íleo demarcado pela isquemia, o ceco e 2cm do colo ascendente. Da extremidade do colo, também, era coletado conteúdo intraluminal em volume aproximado com o do íleo, reservado em outro tubo estéril (Figura 1 A). Os tubos eram identificados com o número do animal e o segmento de origem do material e armazenado em refrigeração a -4°C.

No grupo A realizou-se a anastomose ileocólica término-terminal e fechamento da cavidade (Figura 1 B).

No grupo B, após a anastomose término-terminal, confeccionou-se o esfíncter artificial conforme a técnica de Rena *et al.*<sup>18</sup>, 5cm a montante da anastomose, sendo que, entre as sermiotomias distal e proximal, o anel seromuscular possuía 2mm de extensão (Figura 2 A, B, C e D).

Os animais foram acompanhados por um período de 20 dias e submetidos à segunda intervenção cirúrgica. Sob a mesma técnica e dose anestésica foram posicionados para a abertura da cavidade peritoneal e liberação de aderências a região que envolvia a anastomose ileocólica ficou exposta para enterotomia e coleta de amostras de conteúdo intraluminal do segmento do cólon e segmento ileal pré-anastomose nos grupos A e B. Também foi coletada amostra no segmento intermediário entre a anastomose e a válvula do grupo B, sob as mesmas condições de rigorosa técnica asséptica (Figura 3 A e B).

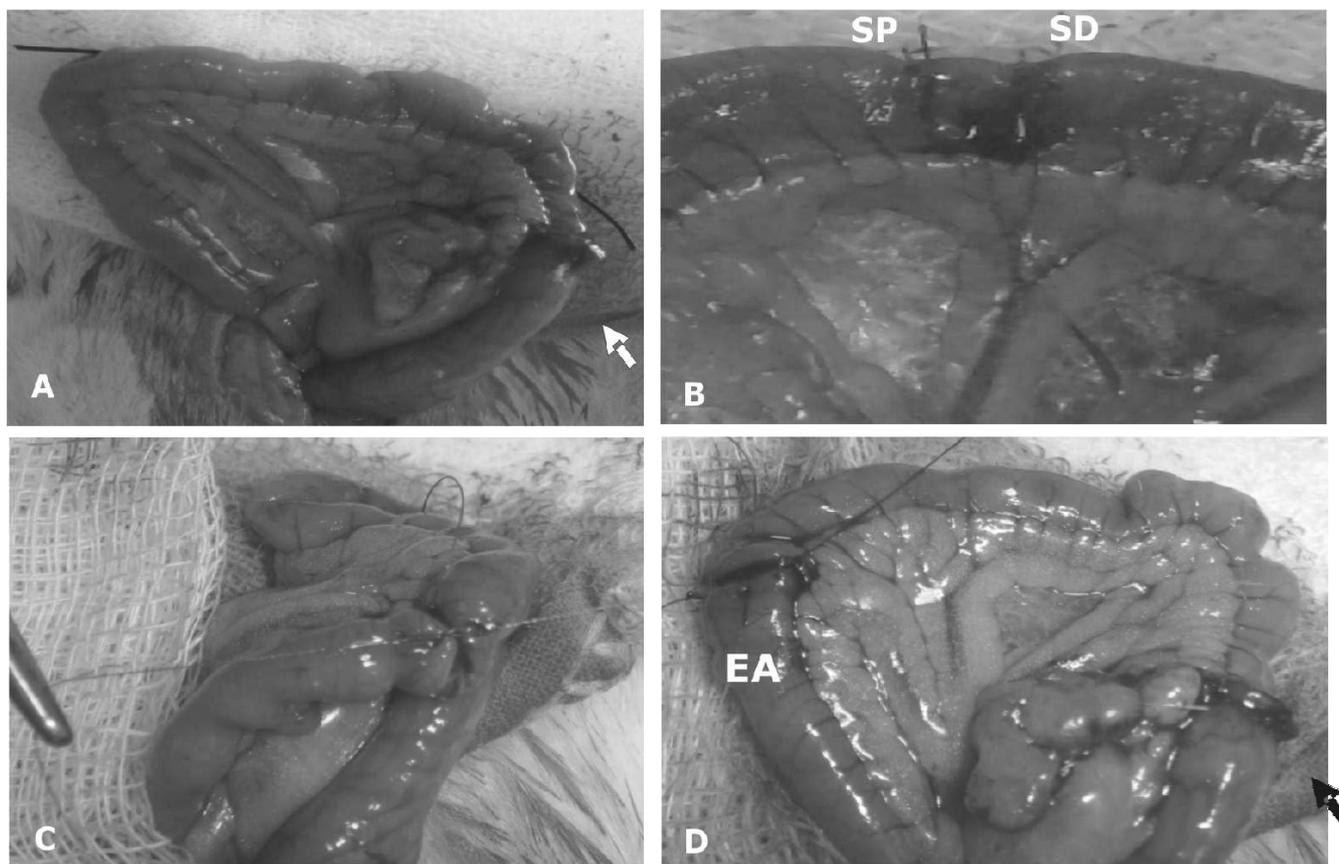


**Figura 1** - A- Local no segmento ileocecocólico onde foi colhido o conteúdo intraluminal intestinal (setas); B- Início da anastomose ileocólica término-terminal.

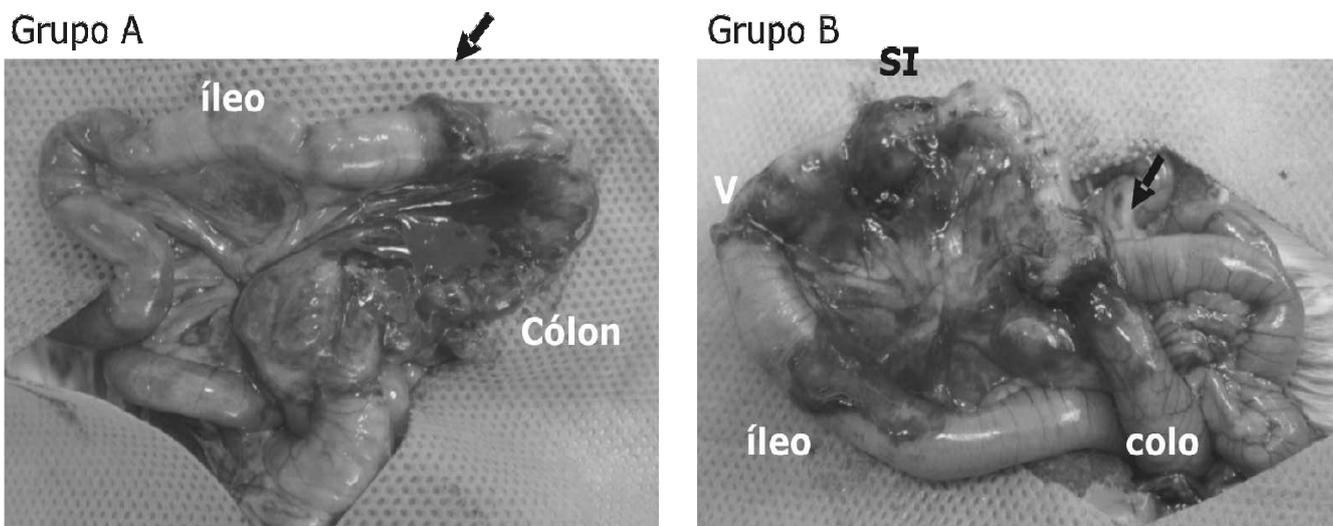
As amostras de conteúdo intraluminal coletadas com espátula e tubo estéreis individuais foram identificadas por número do animal e segmento a que pertenciam e conservadas em refrigeração a -4°C. Posteriormente, foram transferidas para o Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia no Instituto de

Biotechnology Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa, para análise molecular da microbiota pelo método PCR-DGGE.

A amostra controle foi determinada a partir da retirada e transferência do volume de 0,02g do conteúdo dos segmentos do íleo e dos segmentos do cólon, dos sete



**Figura 2** - A- Marcação do local das sermiotomias com fio de seda a 5cm da anastomose; B- anel seromuscular de 2mm entre as sermiotomias proximal SP e distal SD; C- sutura com pontos separados da borda distal da sermiotomia distal com a borda proximal da sermiotomia proximal; D- término da confecção do esfíncter (EA) anastomose (seta)



**Figura 3** - Representação da região onde foi coletada a amostra de conteúdo Intraluminal: anastomose (seta), válvula (V), segmento intermediário (SI).

animais de cada grupo, na primeira intervenção, adicionados em outro tubo, totalizando quatro amostras. Do conteúdo entérico de cada frasco da segunda intervenção, foi separada uma amostra de 0,150g correspondente a cada segmento, gerando 35 amostras. Dessa forma, foram obtidas 39 amostras para extração do DNA, distribuídas conforme os grupos, os animais e o segmento da coleta do conteúdo intraluminal.

O DNA bacteriano total foi extraído a partir das 39 amostras, utilizando o QIAamp DNA Stool Mini kit. As amostras de DNA extraídas foram analisadas em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1X [Tris-HCl 40mM, ácido acético 20mM e EDTA 1mM (pH 8,3)]. Após a eletroforese, o gel foi mantido sob agitação em solução de brometo de etídio (0,25µg mL<sup>-1</sup>)<sup>20</sup>. A quantificação realizada em Nanodrop 2000. O DNA extraído foi submetido à visualização em sistema de digitalização de imagem.

Do DNA extraído das amostras, fragmentos do gene codificador dos rRNAs16S de eubacterias foram amplificados pela reação em cadeia de polimerase utilizando os *primers* específicos 1392R e 27F e condições da reação<sup>21</sup> (Tabela 1). Os amplicons resultantes da amplificação por RCP foram analisados em gel de agarose 1,2% tampão TAE (Trisacetato 40mM e EDTA 1mM). Após a eletroforese, o gel foi mantido sob agitação em solução de brometo de etídio (0,25µg mL<sup>-1</sup>)<sup>20</sup>. Marcador de tamanho 100pb DNA Ladder foi utilizado para estimativa dos tamanhos dos diferentes amplicons<sup>21</sup>.

Utilizando um termociclador e os *primers* Nested contendo o grampo GC (1378R e 984)<sup>22</sup> (Tabela 2), a PCR-DGGE foi realizada em tubos de 200µL para um volume final de 25µL. A mistura de reação foi preparada com 5µL de tampão GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, Madison, USA), 200µM de desoxirribonucleotídeo-trifosfatados, 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 5µg

de albumina sérica bovina (ASB), 2% (v/v de formamida desionizada, 1,5U de Taq DNA polimerase, 20ng de DNA total e água desionizada esterilizada para completar o volume final. Para a separação dos diferentes amplicons sem DGGE foram aplicados 18µL dos produtos da PCR, em gel de poliacrilamida vertical em tampão TAE, sendo o gradiente de ureia/formamida de 40% a 60%. Para a separação dos amplicons obtidos na primeira reação da PCR foi utilizado gel de poliacrilamida a 6% (p/v – o que significa?), e para os amplicons da segunda reação, gel de poliacrilamida a 8% (p/v). A eletroforese foi conduzida em temperatura de 60°C e voltagem constante de 60V durante 16 horas, e o gel corado com SYBR<sup>®</sup> Gold. As eletroforeses foram feitas em um equipamento “DCode<sup>™</sup> Universal Mutation Detection System” (Bio-Rad – Califórnia USA).

A comparação estatística dos perfis de bandas dos géis das 39 amostras obtidos após a DGGE foi realizada utilizando o programa Bionumerics. A variável “bactérias totais” foi estimada com base em uma matriz binária, na qual a presença da banda correspondente a cada unidade taxonômica operacional (UTO) foi codificada como “1” e ausência como “0”. A estrutura da comunidade microbiana foi avaliada com base no coeficiente “Dice” de similaridade e no método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*) para análise dos agrupamentos. Os dados obtidos com o auxílio do programa Bionumerics, foram utilizados para calcular a riqueza, o índice de diversidade Shannon-Weaver (H), e a equitabilidade (E). A riqueza representa o número de bandas no gel do PCR-DGGE, que se refere às unidades taxonômicas operacionais (*operational taxonomic units* – UTO). O índice de diversidade (H) é calculado como:  $H = 2,3 / N(\log N - \sum ni \log ni)$  sendo N= soma da massa de todas as bandas de DNA; ni= massa de banda de DNA. A equitabilidade (E) é expressa como  $E = H / \log R$ , em que H é

**Tabela 1** - Condições do processo de amplificação do DNA extraído das amostras.

Primers	Sequência	Condições da reação - 30 ciclos		
		Desnaturação	Anelamento	Extensão
1392R	5'-ACGGGCGGTGTGTAC3'	1 minuto a 94°	1 minuto a 54°	1 minuto e 30 segundos a 72°
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'			

**Tabela 2** - Condições do processo de PCR-DGGE.

Primers	Sequência	Condições da reação – Temperatura inicial de 95°/3 minutos - 35 ciclos		
		Desnaturação	Anelamento	Extensão
F984GC	5'CGCCCCGGGGCGCGCCCCGGG CGGGGCGGGGCACGGGGG GAACGCGAAGAACCTTAC3	30 segundos a 94°	30 segundos a 57°	1 minuto e 30 segundos a 72° Extensão final /7 minutos
R1378	5'CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG3			

o índice de diversidade e R representa o número de bandas. A diversidade "Shannon-Weaver" é o índice de diversidade geral que aumenta com o número de espécies e é maior quando a massa de indivíduos é distribuída mais uniformemente entre as espécies. A equitabilidade indica se existem bandas dominantes.

## RESULTADOS

Na análise multivariada da estrutura da comunidade bacteriana disposta no dendrograma de similaridade de "Dice", em apenas três animais de cada grupo houve agrupamento de bandas dos segmentos na eletroforese em comparação com as das amostras controle. No grupo A as amostras dos animais "3", "4" e "5" se agruparam, assim como, as amostras dos segmentos ileal e colônico do controle. A similaridade analisada pelo dendrograma de coeficiente de Dice, considerando as amostras de segmento ileal e colônico foi 65%, 75% e 80% nos animais "5", "3" e "4", respectivamente. Nas amostras do grupo controle a similaridade entre os segmentos foi 45% e ficaram externas aos agrupamentos dos três animais do grupo A (Figura 4).

No grupo B o agrupamento pelo perfil de bandas das amostras dos segmentos ileal, intermediário e colônico dos animais "5", "7" e "9" permitiu análise comparativa com as amostras-controle. A similaridade foi 80% entre os segmentos colônicos e intermediário e 62% no segmento ileo do animal "5". No animal "7" foi 70% para o segmento ileal e intermediário e 66% para o cólon. No animal "9" foi 56% entre os segmentos colônico e ileal e 54% para o intermediário. Em relação ao controle a similaridade dos segmentos foi 55% e este também ficou a parte dos outros animais (Figura 5).

A partir da eletroforese das amostras foram calculados valores para a diversidade, equitabilidade e riqueza. Entre amostras do mesmo animal para a variável diversidade, foram encontrados valores maiores em sete amostras ileais, em cinco amostras o segmento colônico apresentou valores maiores e em três as comparações foram muito próximas. No entanto, o maior valor encontrado da diversidade correspondeu ao segmento colônico do animal "6" do grupo A. O menor valor encontrado correspondeu ao segmento colônico do animal "9" do grupo B. Para o atributo equitabilidade valores maiores foram encontrados em oito amostras do cólon, valores próximos em seis amostras-controle e em duas do íleo os valores foram maiores. O valor mais elevado, da equitabilidade, 2,94, foi encontrado na amostra colônica do animal 4A e o menor, 2,23 na amostra ileal do animal 7B. A riqueza variou de 6UTOs à 18UTOs e os valores de extremidade foram de amostras do cólon de animais pertencentes ao grupo B. No grupo A, a amostra-controle do íleo apresentou maior diversidade em relação no segmento do cólon. A média da diversidade das amostras pós-intervenção foi

menor do que a do controle para o segmento ileal, e maior para o segmento do cólon. No grupo B, a média da diversidade foi maior no pós-operatório de ambos os segmentos (Tabelas 3 e 4).

## DISCUSSÃO

A criação de mecanismos esfíncterianos no intestino delgado é relacionada com o controle da velocidade de trânsito intestinal, principalmente nas ressecções extensas do intestino. Estudos em ratos, cães e humanos mostraram que as válvulas artificiais tornam o trânsito intestinal mais lento e promovem ganho ponderal após ressecções intestinais<sup>18,23-26</sup>. Aliado a esses resultados, algumas técnicas descritas, mostram a redução da colonização dos segmentos proximais do intestino delgado, identificando o crescimento bacteriano por meio de cultura de fezes ou coleções intraluminares. O método possui a limitação de não abranger o universo da microbiota intestinal, pois as espécies cultiváveis representam 20% a 40% das existentes no intestino<sup>3,10,11,15,16</sup>.

O emprego de método de biologia molecular com maior especificidade e sensibilidade têm revelado mais informações sobre esse ecossistema<sup>21</sup>. No experimento

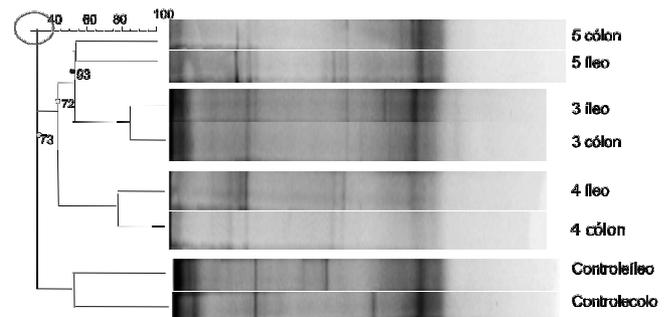


Figura 4 - Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S de bactérias totais nas amostras dos segmentos ileais e colônicos dos animais 5, 3 e 4 e controle do grupo A.

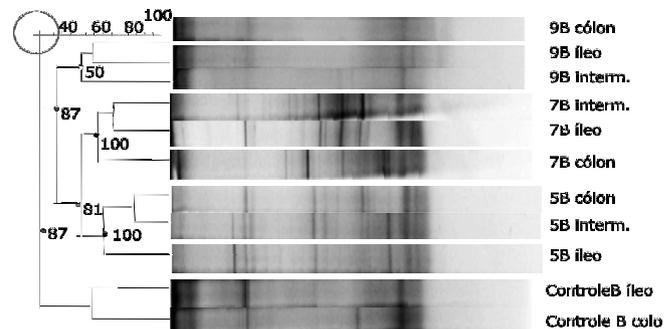


Figura 5 - Perfis eletroforéticos em DGGE de fragmentos dos rDNAs 16S de bactérias totais nas amostras dos segmentos ileais, intermediário e colônicos dos animais 9, 7 e 5 e controle do grupo B.

**Tabela 3** - Valores das variáveis nas amostras do grupo A para todos os segmentos.

Amostras- controle A	H' Índice "Shannon Weaver"		Equitabilidade		Riqueza	
	Íleo 2,65	Cólon 2,36	Íleo 2,45	Cólon 2,47	Íleo 12	Cólon 9
1 <sup>a</sup>	2,57	2,67	2,31	2,33	13	14
3 <sup>a</sup>	2,50	2,34	2,40	2,46	11	9
4 <sup>a</sup>	2,71	2,49	2,51	2,94	12	7
5 <sup>a</sup>	2,68	2,66	2,40	2,39	13	13
6 <sup>a</sup>	2,77	2,93	2,30	2,44	16	16
7 <sup>a</sup>	2,19	2,59	2,59	2,87	7	8
8 <sup>a</sup>	2,70	2,71	2,43	2,37	13	14
Média	2,59	2,63	2,42	2,54	12,14	11,57

Destaque para os maiores valores circulados.

**Tabela 4** - Valores das variáveis nas amostras do grupo B para todos os segmentos.

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

Destaque para os menores valores.

desenvolvido após a confirmação da extração do DNA, a ampliação dos fragmentos genéticos foi realizada a reação PCR-DGGE para estabelecer a diversidade da microbiota nas diversas amostras. O método de PCR-DGGE é técnica utilizada nos estudos de ecologia microbiana com resultados representativos na identificação da riqueza e abundância de diferentes filótipos das amostras e possibilita estimativas reais da diversidade microbiana<sup>27,28</sup>.

A disposição comparativa da similaridade das amostras com a amostra-controle, em três dos sete animais, revela que a intervenção, tanto no grupo onde foi retirada a válvula ileocecal quanto no que, além de ressecção, foi criado um "esfíncter artificial", a diferença foi 45%, indicando que a intervenção pode colaborar para a modificação da diversidade de bactérias totais. A diversidade elevada na maioria das amostras ileais nos vários animais, independente do grupo, nos remete a pensar que os métodos até o momento utilizados para essa análise subestimaram esse dado ou, mesmo o cólon tendo uma maior concentração de micro-organismos, a diversidade de gêneros e espécies identificadas pode ser menor. A diferença significativa da diversidade encontrada

para a amostra do segmento ileal do grupo B quando comparada com a do pré-operatório necessita de ampliação da pesquisa para definição se essa ocorrência foi em função da ascensão de bactérias do cólon para o íleo. Outra questão a ser pesquisada está relacionada à diminuição da velocidade do trânsito intestinal com a criação do "novo esfíncter" contribuindo para modificar o perfil da microbiota.

Permanece ainda o desafio de abordagem da junção ileocecal para investigação da microbiota. Não só a perda anatômica, mas disfunções da junção ileocecal também podem cursar com alterações da distribuição da microbiota. Machado *et al.*, em estudo retrospectivo de enema opaco, identificaram prevalência de 25% de refluxo do cólon para o íleo, independente de idade e sexo<sup>29</sup>. Quais são as consequências dessas alterações? Elaborar estratégias e alternativas para investigar a microbiota intestinal é de extrema importância, dado que, hoje, ela é considerada um órgão funcionalmente ativo, com capacidade de promover a saúde<sup>28,30</sup>. Pesquisas com a utilização de pré e pró-bióticos e têm apresentado resultados satisfatórios para situações como doença inflamatória in-

testinal, obesidade e câncer de cólon<sup>4</sup>. No entanto, é necessário reconhecer que a microbiota intestinal apresenta comportamento peculiar, que se descreve como forma de biometria, e que, mesmo as intervenções clínicas, nutricionais e cirúrgicas devem ser investigadas profundamente para oferecer maior subsídio para pesquisas futuras<sup>7</sup>. Nesta linha de pensamento esse trabalho pretende

elucidar os achados da diversidade por meio de sequenciamento para identificação de possíveis gêneros e espécies bacterianas do DNA extraído além de sua quantificação.

Em conclusão, a diversidade da microbiota ileal encontrada foi maior do que a do cólon. A criação do esfíncter artificial potencializou essa diversidade.

## A B S T R A C T

**Objective:** To analyze, through molecular biology, the diversity of the intestinal microbiota before and after resection of the ileocecal junction and reconstruction of intestinal transit with and without the creation of a neosphincter. **Methods:** Fourteen Wistar rats were divided into two groups: Group A (n = 7), submitted to resection of the ileocecal valve and end-to-end, single-layer ileocolic anastomosis; and Group B (n = 7) with resection of the ileocecal valve and end-to-end, single-layer ileocolic anastomosis followed by construction of an artificial sphincter. Intraluminal contents were collected from both groups. The animals were reoperated 20 days after the first procedure, with new collection of intraluminal contents of the ileum and colon. From the samples collected, DNA was extracted for PCR-DGGE. The electrophoretic banding patterns generated in the reaction were analyzed for similarities and diversities of the microbiota. **Results:** The diversity of microorganisms was larger and in more samples when collected from the ileum than from the colon. The group with the neosphincter showed the highest variation in the colon, from 2.11 to 2.93. In three animals from each group was established comparing the similarity and not resembled the control. **Conclusion:** ileocecal resection led to changes in ileal microbiota and, with the creation of new sphincter, the changes were even greater.

**Key words:** Intestines. Anal canal. Ileocecal valve. Polymerase chain reaction. Molecular biology.

## REFERÊNCIAS

- Di Dio LJA. Lançamento oficial da Terminologia Anatomica em São Paulo: um marco histórico para a medicina brasileira. *Rev Assoc Med Bras.* 2000;46(3):191-3.
- Glassman JA. An artificial ileocecal valve. *Surg Gyn Obst.* 1942;74:92-8.
- Richardson JD, Griffen Jr WO. Ileocecal valve substitutes as bacteriologic barriers. *Am J Surg.* 1972;123(2):149-53.
- Almeida LB, Marinho CB, Souza CS, Cheib VBP. Disbiose intestinal. *Rev Bras Nutr Clin.* 2009;24(1):58-65.
- Frank DN, Zhu W, Sartor RB, Li E. Investigating the biological and clinical significance of human dysbioses. *Trends Microbiol.* 2011;19(9):427-34.
- Montalto M, D'Onofrio F, Gallo A, Cazzato A, Gasbarrini G. Intestinal microbiota and its functions. *Dig Liver Dis.* 2009;3(2):30-4.
- Sekirov I, Russel SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90(3):859-904.
- Kinross JM, Darzi AW, Nicholson JK. Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Med.* 2011;3(3):14.
- Schiller WR, DiDio LJ, Anderson MC. Production of artificial sphincters. Ablation of the longitudinal layer of the intestine. *Arch Surg.* 1967;95(3):436-42.
- Ricotta J, Zuidema GD, Gadacz TR, Sadri D. Construction of an ileocecal valve and its role in massive resection of the small intestine. *Surg Gynecol Obstet.* 1981;152(3):310-4.
- Myrvold H, Tindal MS, Isenberg HD, Stein TA, Scherer J, Wise L. The nipple valve as a sphincter substitute for the ileocecal valve: prevention of bacterial overgrowth in the small bowel. *Surgery.* 1984;96(1):42-7.
- Kholoussy AM, Yang Y, Bonacquisti K, Witkowska T, Takenaka K, Matsumoto T. The competence and bacteriologic effect of the telescoped intestinal valve after small bowel resection. *Am Surg.* 1986;52(10):555-9.
- Sencan A, Akçora B, Mir E, Sencan A, Günsar C, Arslan O, et al. Does ileal reverse segment in rats with short bowel syndrome change intestinal morphology? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;31(2):165-8.
- Zurita M, Raurich JM, Ramírez A, Gil J, Darder J. A new neovalve type in short bowel syndrome surgery. *Rev esp enferm dig.* 2004;96(2):110-8.
- Maegawa FAB, Souza JA, Araújo EJ, Koh IHJ, Acampora AJ, Farias DC, et al. Reconstituição da válvula ileocecal em cães. *Acta Cir Bras.* 2005;20(1):55-63.
- Lázaro da Silva A. Tentativa de tratamento do "dumping" através de um "esfíncter" ileal. *Rev Assoc Med Minas Gerais.* 1974;25(1):32-3.
- Silva AL. Amputação abdômino-perineal com colostomia perineal. *Rev bras colo-proct.* 1991;11(3):105-8.
- Rena CL, Lázaro da Silva A, Barra AA, Melo GE, Paula WT. Seromiotomia dupla no intestino delgado: tentativa de criação de um piloro artificial. *Rev Col Bras Cir.* 1996;23(3):143-7.
- Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LFP. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56(1):1-10.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2<sup>th</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Muyzer G, de Wall EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(3):695-700.
- Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EM. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(8):3233-41.
- Stacchini A, Didio LJ, Christoforidis AJ, Boreli V. Intestinal transit time is delayed by artificial sphincters after massive enterectomy in dogs. *Am J Surg.* 1986;151(4):480-3.
- Rena CL, Silva AL, Barra AA, Furtado MCV, Rena RL, Rena RL. Alterações morfológicas da musculatura dos músculos longitudinal e circular de ratos submetidos à criação de piloros no intestino delgado. *Rev Col Bras Cir.* 2007;34(1):41-7.
- Barra AA, Silva AL, Rena CL, Furtado MCV, Pinto RM. Estudo morfológico do intestino de ratos após a criação cirúrgica de esfíncteres artificiais. *Rev Col Bras Cir.* 2008;35(2):109-13.

26. Furtado MCV, Silva AL, Rena CL, Barra AP, Felga AMG, Rossman MC. Influência de válvulas artificiais sobre a morfometria intestinal de ratos. *Rev Col Bras Cir.* 2008;35(5):315-22.
27. Cotter PD. Small intestine and microbiota. *Curr Opin Gastroenterol.* 2011;27(2):99-105.
28. Huys G, Vanhoutte T, Vandamme P. Application of sequence-dependent electrophoresis fingerprinting in exploring biodiversity and population dynamics of human intestinal microbiota: what can be revealed? *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2008;2008:597603.
29. Machado WM, Miranda JR, Morceli J, Padovani CR. The small bowel flora in individuals with cecoileal reflux. *Arq Gastroenterol.* 2008;45(3):212-8.
30. Zilberstein B, Quintanilha AG, Santos MA, Pajecki D, Moura EG, Alves PR, et al. Digestive tract microbiota in healthy volunteers. *Clinics (Sao Paulo).* 2007;62(1):47-54.

Recebido em 23/04/2012

Aceito para publicação em 20/07/2012

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: nenhuma

**Como citar este artigo:**

Barra AA, Silva AL, Rena CL, Furtado MCV, Ferreira AB, Nagen M, Freitas FS. Análise da diversidade da microbiota intestinal de ratos submetidos à ressecção da valva ileocecal e criação de esfíncter artificial. *Rev Col Bras Cir.* [periódico na Internet] 2012; 39(6). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

**Endereço para correspondência:**

Ângela Aparecida Barra

E-mail: [barra.angela@oi.com.br](mailto:barra.angela@oi.com.br)