
TRATAMENTO DA DOENÇA INFLAMATÓRIA DO CÓLON COM LACTOBACILLUS CASEI, RHAMNOSUS, EM RATOS

MARIA DE LOURDES PESSOLE BIONDO-SIMÕES - FSBPC
LUIZ MARTINS COLLAÇO
EVELI SEBEN DISARÒ
MARCOS ANTONIO SCHIREA TESSEROLI
GEORGETTE MARAHAILEH

BIONDO-SIMÕES MLP, COLLAÇO LM, DISARÒ ES, TESSEROLI MAS & MARHAILEH G - Tratamento da doença inflamatória do cólon com *Lactobacillus casei*, *Rhamnosus*, em ratos. *Rev bras Coloproct*, 1999; 19(3): 164 - 167

RESUMO: A retocolite ulcerativa inespecífica não possui etiologia esclarecida e o seu tratamento atual, promove a remissão das crises, mas não a cura da doença. Recentemente, autores têm argumentado que a administração de *Lactobacillus casei* poderia ajudar uma vez que observaram que estes se mostram diminuídos quando da reagudização da doença. O presente experimento acompanha a evolução de retocolite ulcerativa induzida em ratos Wistar com ácido acético e tratada com *Lactobacillus casei*. Metade deles recebeu solução salina por sondagem orogástrica e metade, 106 bacilos. A administração era diária em volume de 1,0 ml. Nos 4, 7, 10 e 12 dias após o início do tratamento sorteavam-se animais do grupo controle e do grupo experimento para avaliação. Após eutanásia e laparotomia estudava-se a cavidade abdominal e o cólon distal que era estudado macro e microscopicamente. Constatou-se que a evolução da doença foi semelhante nos dois grupos e nos quatro tempos estudados, uma vez que a perda de peso, a presença de úlceras e a profundidade destas foi igual. Conclui-se que a administração de *Lactobacillus casei* não interfere na evolução da retocolite ulcerativa induzida, em ratos, nas condições do experimento.

UNITERMOS: colite ulcerativa; *Lactobacillus*

A doença inflamatória inespecífica do cólon ou retocolite ulcerativa inespecífica é conhecida desde 1875 quando Wilks e Moxon a relataram pela primeira vez⁽¹⁾. Clinicamente é caracterizada por crises de diarreia acompanhadas de muco e pus que muitas vezes levam à hospitalização. Mesmo quando não chega a este nível de gravidade, retira o indivíduo de suas funções.

Löfberg (1989) descreve incidência de 5-8 doentes por 100.000 habitantes e prevalência de 120 doentes por 100.000 habitantes⁽⁶⁾. Embora inicialmente tenha sido relatada uma preferência pelo sexo feminino, Tsunoda e col. (1990) observaram relação de 1,2 homens para uma mulher⁽⁸⁾. Há de se ressaltar que acomete adultos jovens com idade média de 30,2 anos⁽²⁾.

Embora esta doença seja conhecida há mais de um século, sua etiologia permanece obscura. Várias hipóteses são levantadas: infecciosa, imunológica, psicogênica, genética e mutacional, desequilíbrio da reação imune da flora intestinal, alterações vasculares e aumento dos radicais livres derivados do oxigênio.

O tratamento para esta doença é preferentemente clínico, reservando-se o tratamento cirúrgico para os casos de complicações. O tratamento clínico, muito discutido, leva à remissão da crise mas não à cura.

Recentemente Fabia e col. (1993) relatam ter observado que os pacientes com crise de doença inflamatória do cólon apresentavam diminuição de *Lactobacillus* na flora intestinal. Estes autores induziram colite em ratos com ácido acético e observaram baixa importância da concentração de *Lactobacillus* na flora intestinal destes animais. Sugeriram que esta redução possa ter papel importante no curso da colite⁽⁴⁾. Em outro estudo experimental concluíram que a administração de *Lactobacillus reuteri* R2LC, previne o desenvolvimento de colite em ratos⁽³⁾.

Gorbach e col.(1987) administraram *Lactobacillus GG* a pacientes com colite causada por *Clostridium difficile* e registraram bons resultados⁽⁵⁾.

Se a administração de *Lactobacillus* está diminuída na flora intestinal de pacientes com colite, a oferta destes proporcionaria remissão mais rápida das crises e das lesões intestinais? Com o objetivo de responder a este questionamento, colite foi induzida em ratos e *Lactobacillus* são administrados.

Trabalho realizado na Disciplina de Experimentação em Clínica e Cirurgia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná (FEMPAR).

MÉTODOS

O presente estudo obedece as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados no experimento 48 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia), da linhagem Wistar, com idade de 135 dias e peso médio de 312,54 gramas, distribuídos em grupos de seis ratos, em gaiolas de polipropileno de dimensões padronizadas e mantidos no Laboratório de Experimentação Clínica e Cirúrgica da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná. A temperatura, a umidade e o ciclo claro-escuro eram os mesmos do ambiente geral, sem regulação artificial. Os animais tinham livre acesso a água durante todo o experimento e a ração comercial foi introduzida 24 horas após a indução de colite ulcerativa.

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos, C e E, com 24 ratos, respectivamente controle e experimento.

Nas primeiras 24 horas os animais ficaram em jejum. Em seguida, fez-se lavagem intestinal com solução salina isotônica a 0,9% através de sondagem retal, utilizando-se 10 ml de volume. Após quatro a seis horas, induziu-se a colite através do método de MacPherson e Pfeifer (1978), injetando-se 1 ml de ácido acético a 8%⁽⁷⁾.

O grupo controle recebeu 1 ml de solução salina isotônica a 0,9% através de sondagem orogástrica. O grupo experimento recebeu "*Lactobacillus casei*", subespécie *Rhamnosus*, na dosagem de 1 milhão de lactobacilos diluído em 1 ml de solução salina isotônica 0,9% para cada animal. Estas soluções foram administradas uma vez ao dia durante todo o tempo de observação.

Foram realizadas aferições no 4º, 7º, 10º e 12º dia após o início do tratamento, quando se sacrificaram de seis a oito animais de cada grupo com dose letal de éter sulfúrico. Seis horas antes do sacrifício injetou-se azul de Evans pela veia dorsal do pênis na concentração de 20 mg/kg de peso do animal com a finalidade de demarcar as áreas de lesão.

Os ratos foram pesados, a seguir, realizava-se laparotomia mediana e analisava-se a cavidade. Buscava-se a presença de aderência sob o segmento colônico e os órgãos vizinhos envolvidos e a presença de líquido na cavidade abdominal. Fazia-se a documentação fotográfica e ressecava-se o cólon. Abria-se a peça cirúrgica com incisão longitudinal e avaliavam-se os aspectos macroscópicos da mucosa e a presença de úlceras.

As peças eram fotografadas, colocadas sobre papel de filtro, imersas em formalina a 10% e encaminhadas para estudo histopatológico, utilizando-se duas colorações hematoxilina-eosina e tricrômico de Mallory.

A avaliação microscópica permitia conhecer a profundidade das úlceras que foram classificadas em superficiais quando comprometiam somente a mucosa, intermediárias quando comprometiam a mucosa e a submucosa, e profundas quando atingiam

a muscular. A presença de infiltrados mono e polimorfonucleares permitia saber a intensidade e o tipo de reação inflamatória.

Submeteram-se os resultados à tratamento estatístico usando-se os testes exato de Fisher para tabelas 2x2 e Mann Whitney para as médias. Estabeleceu-se $p < 0,05$ ou 5% como nível de rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS

Registrou-se o óbito de dois animais, sem que à necrópsia se tenha identificado a causa.

Na aferição do 4º dia observou-se que os animais, de ambos os grupos, perderam peso com intensidade semelhante ($p = 0,3500$). O mesmo verificou-se no 7º dia ($p = 1550$) e no 10º dia ($p = 0,4020$). Na aferição realizada no 12º dia, as perdas de peso foram maiores do que nos outros tempos, porém semelhantes entre os dois grupos ($p = 0,2860$).

Não se encontrou líquido livre na cavidade peritoneal em nenhum dos animais de ambos os grupos e nos quatro tempos estudados. Identificaram-se aderências presentes em cinco cólons do grupo controle e em um do grupo experimento ($p = 0,5000$).

Foram encontradas aderências do cólon, em todos os tempos, que se fizeram com a gordura do funículo espermático.

A avaliação macroscópica dos cólons mostrava áreas dilatadas que coincidiam com as áreas marcadas pelo azul de Evans e que à abertura da víscera correspondiam às áreas ulceradas.

Úlceras cobertas de fibrina de diferentes tamanhos foram encontradas nos dois grupos e nos quatro tempos sem diferenças significantes ($p_4 = 0,2727$, $p_7 = 0,5000$, $p_{10} = 0,0513$ e $p_{12} = 0,1528$).

Não houve diferença quanto à presença macroscópica de úlceras nos quatro tempos. Na **Fig. 1** podem-se visibilizar aspectos destas úlceras.



Fig. 1 - Segmento de cólon do rato número 2 do grupo experimento, no quarto dia de tratamento com *Lactobacillus casei*. Observaram-se áreas ulceradas e deprimidas. Entre elas, áreas de mucosa típicas da retocolite ulcerativa.

Edema, infiltrado polimorfonuclear e monomorfonuclear foram vistos em todos os cortes histológicos. Úlceras estiveram presentes em todos os tempos sem diferença entre os grupos.

No 4º, 7º e 10º dias as úlceras eram sempre intermediárias ou profundas. Já no 12º dia, úlceras profundas não foram vistas, apenas intermediárias e superficiais.

Na Fig. 2 vêem-se detalhes histopatológicos das úlceras.



Fig. 2 - Fotomicrografia de corte histológico de cólon de rato do grupo experimento, do sétimo dia. Observa-se área ulcerada com intenso infiltrado inflamatório, glândulas encurtadas e dilatadas.

DISCUSSÃO

Entre as várias hipóteses aventadas para a etiologia da doença inflamatória inespecífica do cólon encontra-se a deficiência de *Lactobacillus*. Fabia e col. (1993) observaram que seus pacientes com crises de agudização da doença apresen-

tavam importante diminuição da concentração de *Lactobacillus*. Posteriormente induziram colite em ratos com ácido acético e verificaram que nestes também existia diminuição destes bacilos. Estes autores concluíram que uma das características da doença era a baixa dos *Lactobacillus*⁽⁴⁾. Estes autores, estudando colite em ratos, induzida com ácido acético, descreveram três vezes mais mieloperoxidase, demonstrando aumento do índice de infiltrado neutrofílico e seis vezes mais exudação plasmática na luz do cólon demonstrando aumento da permeabilidade da mucosa. Relataram que a administração intra-colônica imediatamente após a indução de *Lactobacillus* R2LC prevenia o desenvolvimento da doença⁽³⁾.

Em trabalho anterior, Gorbach e col. (1987), haviam registrado uma boa evolução dos quadros de colite causados por *Clostridium difficile* quando administraram aos seus doentes *Lactobacillus* GG.

No presente estudo induziu-se colite pelo método de MacPherson e Pfeiffer (1978) empregando-se ácido acético⁽⁷⁾, porém em concentração a 8%. Para o tratamento, aos animais do grupo experimento administrou-se diariamente 1 milhão de *Lactobacillus casei* subespécie *Rhamnosus* (*Lactobacillus* GG) do Laboratório Dicofarm - Itália.

Pode-se verificar que a evolução da doença nos animais dos grupos controle e experimento foi semelhante em todos os aspectos analisados, isto é, perda de peso, presença de úlceras e profundidade delas, o que nos leva a questionar a utilidade da administração destes bacilos. Administrados isoladamente não parecem, pelo menos em ratos, modificar o comportamento da doença. Talvez seu emprego associado a um dos muitos esquemas terapêuticos possa auxiliar a abreviar a duração das crises. Contudo, necessita investigação.

BIONDO-SIMÕES MLP, COLLAÇO LM, DISARÒ ES, TESSEROLI MAS & MARHAILEH G - Treatment of the inflammatory colon disease with *Lactobacillus casei*, *Rhamnosus*, in rats.

SUMMARY: The etiology of nonspecific ulcerative rectocolitis has not been clarified and its current treatment promotes remission of crises but not cure of the disease. Several authors have recently argued that the administration of *Lactobacillus casei* may be of help because these bacilli are reduced when the diseases recur acutely. In the present experiment we monitored the evolution of ulcerative rectocolitis induced with acetic acid in Wistar rats and treated with *Lactobacillus casei*. Half of the animals received saline solution by orogastric gavage and half received 106 bacili. Administration was daily in a volume of 1.0 ml. At 4, 7, 10 and days after the beginning of treatment, animals from the control group and the experimental group were picked at random for evaluation. After euthanasia and laparotomy, the abdominal cavity was examined and distal colon was studied macro- and microscopically. The evolution of the disease was similar in the two groups at the 4 times studied, with the presence of ulcers and their depth being identical. We conclude that under the conditions of the present experiment, the administration of *Lactobacillus casei* does not interfere with the evolution of induced ulcerative rectocolitis in rats.

KEY WORDS: ulcerative colitis; lactobacillus

REFERÊNCIAS

1. Bargen JA. Chronic ulcerative colitis associated with malignant disease. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 727-730.
2. Carter FM, Robin SM, Cohen Z. Subtotal colectomy for ulcerative colitis: complications related to the rectal remnant. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 1005-1009.
3. Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson M, Wilén R, Andersson R, Molin, Bengmark S. The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 155-62.
4. Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson M, Andersson R, Willén R, Jeppsson B, Molin G, Bengmark S. Impairment of bacterial flora in human ulcerative

- colitis and experimental colitis in the rat. *Digestion* 1993; 54: 248-255.
5. Gorbach SL, Chang T, Goldin B. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. *Lancet* 1987; ii: 1519.
 6. Löfberg R, Leijonmarck C, Broström O., Hellers G, Tribukait B, Öst A. Mucosal dysplasia and DNA contents in ulcerative colitis patients with ileorectal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 566-571.
 7. MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion* 1978; 17: 135-150.
 8. Tsunoda A, Talbot IC, Nicholls RJ. Incidence of dysplasia in the anorectal mucosa in patients having restorative proctocolectomy. *Br J Surg* 1990; 77: 506-508.

Endereço para correspondência:

Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões
Rua Ari José Valle, 1987, Santa Felicidade
82030-000 - Curitiba - PR