

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

**ESTUDO DO PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL EM
MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE ULCERATIVA
INDUZIDA EM CAMUNDONGO DA LINHAGEM C57BL/6**

Ana Carolina Medeiros Milanezi

ORIENTADORES: Prof. Dr. João Henrique Corrêa Kanan e Profa. Dra. Sueli Teresinha
Van Der Sand

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

**ESTUDO DO PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL EM
MODELO EXPERIMENTAL DE COLITE ULCERATIVA
INDUZIDA EM CAMUNDONGO DA LINHAGEM C57BL/6**

Trabalho de conclusão do curso de graduação
como requisito parcial para obtenção do grau
de bacharel em Ciências Biológicas,
apresentado conforme as normas técnicas da
Revista Brasileira de Biociências.

Autora: Ana Carolina Medeiros Milanezi

Orientadores: Prof. Dr. João Henrique Corrêa
Kanan e Profa. Dra. Sueli Teresinha Van Der
Sand

Porto Alegre, 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e minhas irmãs, que durante toda minha vida me apoiaram e incentivaram meus sonhos e minhas decisões, possibilitando que se tornassem realidade. Obrigada pela paciência, pelas palavras e principalmente, pelo amor de vocês.

A Paula, que me recebeu em Porto Alegre e se revelou a melhor companheira de apartamento que alguém poderia ter. Estes anos ao teu lado foram sem dúvida os melhores.

A todos meus amigos criciumenses e gaúchos, que sempre estiveram comigo mesmo quando eu não pude fazer o mesmo.

As meninas do laboratório 164 que me receberam tão bem e tiveram uma paciência inesgotável me auxiliando em tudo que precisei.

À Fabiany e Dra. Ana Helena, que aceitaram expandir seu projeto e me receberam tão bem nas coletas, possibilitando a execução deste trabalho.

A Marcela, melhor amiga e melhor conselheira. Você foi, sem dúvidas, quem mais me apoiou durante este período totalmente novo para mim, sempre me dando forças e fazendo com que eu me sentisse cada vez mais certa de minha decisão.

E principalmente, aos meus orientadores Dr. João Henrique Corrêa Kanan e Dra. Sueli Teresinha Van Der Sand que acreditaram em mim e aceitaram me acompanhar neste momento. Graças a vocês pude me encontrar dentro da Biologia, e tenho agora a certeza de estar no caminho certo.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	4
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
<i>Animais.....</i>	11
<i>Indução da colite ulcerativa aguda</i>	12
<i>Coleta das amostras da microbiota intestinal</i>	12
<i>Isolamento bacteriano</i>	12
<i>Determinação do número de bactérias heterotróficas</i>	13
<i>Identificação bacteriana.....</i>	13
RESULTADOS.....	14
<i>Isolamento bacteriano</i>	14
<i>Determinação do número de bactérias heterotróficas</i>	14
<i>Identificação bacteriana.....</i>	15
DISCUSSÃO	16
REFERÊNCIAS	22

**ESTUDO DO PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL EM MODELO
EXPERIMENTAL DE COLITE ULCERATIVA INDUZIDA EM CAMUNDONGO
DA LINHAGEM C57BL/6**

Ana Carolina Medeiros Milanezi^{1*}, Fabiany da Costa Gonçalves², Ana Helena da Rosa Paz²,
Sueli Teresinha Van Der Sand¹ e João Henrique Corrêa Kanan¹

Título resumido: Estudo da microbiota intestinal em modelo experimental de colite
ulcerativa

1. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
2. Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular – Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre/UFRGS.

* Autor para contato. E-mail: anamilanezi@gmail.com

RESUMO: (Estudo do perfil da microbiota intestinal em modelo experimental de colite ulcerativa induzida em camundongos da linhagem C57BL/6). O trato gastrointestinal dos vertebrados é extensamente colonizado por micro-organismos que estabelecem uma relação mutuamente benéfica. Esta situação é consequência de um longo processo de coevolução, que permitiu o desenvolvimento de tolerância imune a esta microbiota por parte do hospedeiro. Alterações que resultam na quebra desta homeostasia podem comprometer esta relação e, possivelmente, estão envolvidas no desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais, como a colite ulcerativa. O objetivo deste trabalho foi analisar a resposta da microbiota ao longo da indução de colite ulcerativa em um camundongo C57BL/6 pela administração de dextran sulfato de sódio 2%. Amostras da região anal do camundongo foram obtidas em quatro momentos ao longo do estudo: um dia antes do início do tratamento (dia 0), no segundo dia de tratamento (dia 2), no quinto dia de tratamento (dia 5) e no último dia de tratamento (dia 8). As amostras eram semeadas em meio de cultura ágar padrão para contagem e meios seletivos e não seletivos. As colônias consideradas morfologicamente distintas eram subsequentemente isoladas e submetidas à identificação bioquímica. Foram observadas oscilações no número de bactérias heterotróficas entre os dias analisados e identificadas três espécies de bactérias Gram-negativas: *Citrobacter rodentium*, que esteve presente ao longo de toda a patologia; *Yersinia intermedia* e *Escherichia coli*, presentes apenas antes do início da indução da doença. Estes resultados indicam que a composição da microbiota sofreu mudanças que podem estar relacionadas com o quadro inflamatório característico da colite ulcerativa neste modelo utilizado.

Palavras-chave: microbiota, colite ulcerativa, doença inflamatória intestinal, trato gastrointestinal.

ABSTRACT: (Profile study of intestinal microbiota in experimental ulcerative colitis model induced in mice of the C57BL/6 lineage). The gastrointestinal tract of vertebrates is extensively colonized by microorganisms that establish a mutually beneficial relationship. This is due to a long coevolution process, which allowed the development of host immune tolerance to the microbiota. Changes that affect this homeostasis may compromise this relation, and are possibly involved in the development of inflammatory bowel diseases, like ulcerative colitis. The aim of this study was to analyze the response of the microbiota during the induction of ulcerative colitis in a C57BL/6 mouse by administration of 2% dextran sodium sulfate. Samples of the anal region of the mouse were obtained in four moments during the study: the day before the beginning of treatment (day 0), on the second day of treatment (Day 2), the fifth day of treatment (day 5), and in the last day of treatment (day 8). The samples were plated on Plate Count Agar for standard counting; and non-selective and selective media. Colonies that were considered morphologically distinct were subsequently isolated and subjected to biochemical identification. Oscillations in the number of heterotrophic bacteria were observed and three species of Gram-negative bacteria were identified: *Citrobacter rodentium*, which was present throughout the pathology; *Escherichia coli* and *Yersinia intermedia*, present only before the disease induction. These results indicate that the composition of the microbiota undergone changes which can be related with the inflammatory profile characteristic of ulcerative colitis in this model.

Key words: microbiota, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease, gastrointestinal tract.

INTRODUÇÃO

Os vertebrados carregam consigo um vasto e complexo conjunto de micro-organismos que recobre seus tecidos de mucosa e a pele. A microbiota, como é chamada, é adquirida pelos humanos e outros mamíferos no primeiro contato com o mundo externo, visto que o desenvolvimento do feto ocorre no útero da mãe, ambiente normalmente desprovido de contaminações. O trato gastrointestinal (TGI) abriga a maior diversidade e abundância de micro-organismos, sendo estimada a existência de $3,15 \times 10^{11}$ células por grama de peso seco somente na região do cólon (Houte & Gibbons 1966, Whitman *et al.* 1998). Em conjunto, já foram descritas mais de 1200 espécies de bactérias que podem compor a microbiota do TGI em humanos, sendo que cada indivíduo pode ser colonizado por aproximadamente 16% deste número. Isto representa, possivelmente, em torno de cem vezes mais genes da comunidade microbiana do que genes do próprio hospedeiro e, conseqüentemente, sua expressão tem uma importante contribuição na fisiologia da mucosa gastrointestinal. (Qin *et al.* 2010, Dongqian *et al.* 2012, Maynard *et al.* 2012). Estudos de larga escala utilizando abordagem da metagenômica¹ demonstram a predominância de dois filos bacterianos no TGI: Firmicutes e Bacteroidetes, representando 65% e 23% da população, respectivamente. Em seguida, aparecem os filos Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria, TM7 e Verrucomicrobia em menor frequência (Figura 1) (Frank & Pace 2008). O convívio com tamanha diversidade de micro-organismos no TGI só foi possível após milhões de anos de coevolução (Ley *et al.* 2006), que não só levou a coexistência pacífica, como trouxe benefícios mútuos.

Diversas contribuições exercidas pela microbiota sobre seus hospedeiros são conhecidas, e muitas delas são essenciais para o funcionamento adequado das atividades fisiológicas, mantendo a homeostase do TGI. Além de alterações em aspectos morfológicos, como a parede do intestino delgado mais fina e distensão do ceco, observou-se que animais

¹ Metagenômica baseia-se na análise genômica do DNA microbiano que pode ser extraído diretamente das comunidades em amostras ambientais (Keller & Zengler, 2004).

germ-free (i.e. livre de micro-organismos) apresentam uma limitação na capacidade de armazenar gordura em comparação aos animais com microbiota normal (Thompson & Trexler 1971, Anne-Marie *et al.* 2012). Outro efeito observado ocorre no metabolismo de carboidratos que o hospedeiro é incapaz de digerir, onde a fermentação anaeróbica promovida pelos micro-organismos (especialmente pertencentes aos filos predominantes Firmicutes e Bacteroidetes) do intestino dá origem a ácidos graxos de cadeia curta. Estes produtos, como o propionato, acetato e butirato, atuam não só como fonte de energia para as células epiteliais do intestino, como também inibem o crescimento de outros organismos patogênicos ao tornar o pH intestinal mais ácido (Nemoto *et al.* 2012). Complementar a este mecanismo indireto, a associação bem estabelecida da microbiota com o hospedeiro acaba por limitar a disponibilidade de recursos e de espaço físico para os micro-organismos potencialmente patogênicos através da competição (Maynard *et al.* 2012).

Atualmente, existe um consenso de que a imunidade adaptativa surgiu, pelo menos em parte, como uma forma de permitir que o hospedeiro desenvolvesse tolerância aos micro-organismos não patogênicos que colonizassem os seus tecidos. Através desta nova estratégia de resposta imune seria possível ao hospedeiro conviver com micro-organismos benéficos, ao invés de iniciar uma resposta imune centrada na eliminação dos organismos estranhos (McFall-Ngai 2007). Uma das hipóteses sugere que o aparecimento da imunoglobulina – A (IgA), uma classe de anticorpos dominante no TGI e especializada na interação com a microbiota, adicionaria uma nova “etapa” de adaptação à presença dos micro-organismos, exercendo pressão seletiva sobre aqueles que promoviam ou não ações benéficas ao hospedeiro. Seu mecanismo de ação único, o qual inclui a agregação multimérica e transporte através da mucosa, junto com a compartimentalização dos tecidos linfóides associados ao intestino – Placas de Peyer, folículos linfóides isolados e linfonodos mesentéricos – podem ter sido adaptações essenciais para o comensalismo observado. Isto possibilitaria que, ao

longo da coevolução entre a microbiota intestinal e o hospedeiro, se estabelecesse a participação dos micro-organismos comensais no desenvolvimento e educação do sistema imune deste (Maynard *et al.* 2012).

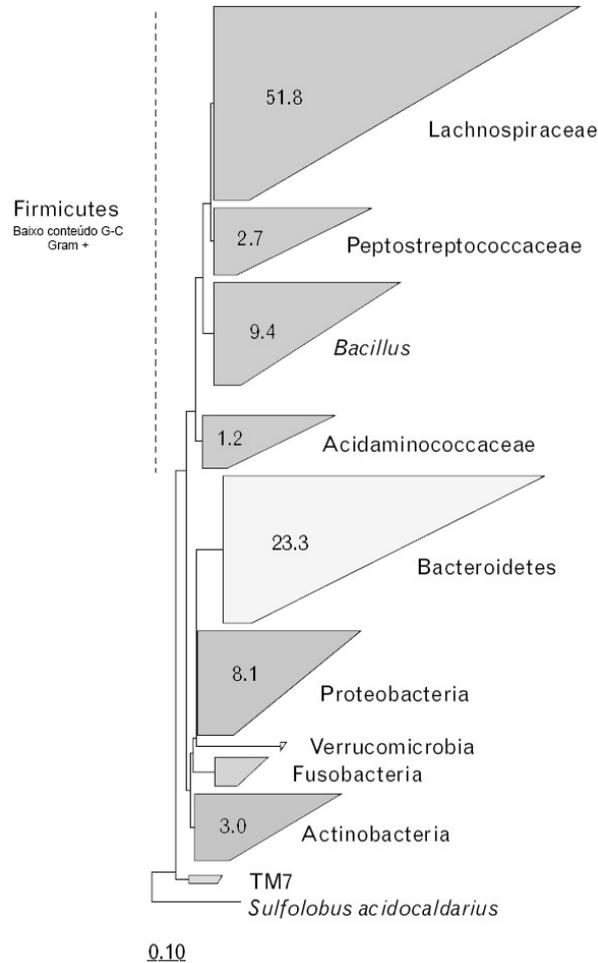


Figura 1 – Distribuição filogenética da microbiota intestinal humana

Fonte: Frank & Pace (2008)

Evidências para esta constatação são provenientes de diversos estudos realizados com camundongos *germ-free* e gnotobióticos (i.e. microbiota definida), onde observou-se o impacto dos micro-organismos residentes do TGI na imunidade do hospedeiro. Alguns dos aspectos observados incluem menor quantidade de centros germinativos nos folículos linfóides isolados, tamanho reduzido das Placas de Peyer, menor capacidade de produção de anticorpos (resultante, em parte, da diminuição de células secretoras de IgA), menor

quantidade de células T da lâmina própria e produção reduzida de moléculas antimicrobianas (Macpherson & Harris 2004, Nishio & Honda 2012). A exposição contínua aos micro-organismos residentes do TGI nos camundongos convencionais, resulta em maior rapidez no processamento de antígenos pelos macrófagos em comparação aos animais *germ-free*. Apesar destes animais serem capazes de montar uma resposta imune normal quando estimulados, tais características demonstram que a presença da microbiota no TGI influencia diretamente em processos relacionados ao condicionamento do sistema imune (Anne-Marie *et al.* 2012).

Para que os micro-organismos comensais se mantenham inócuos no TGI, o hospedeiro apresenta uma série de mecanismos que permitem a coexistência entre ambos. As células epiteliais intestinais (CEI) junto com duas camadas adjacentes de muco, formam a interface entre o hospedeiro e a microbiota, representando um dos componentes mais importantes no intermédio das relações estabelecidas entre eles. A camada externa contém os microorganismos comensais, enquanto a camada interna, que tem como principal componente a proteína MUC2 que se organiza de forma estratificada (Johansson *et al.* 2010), é desprovida de bactérias, impedindo o contato direto destes organismos com as CEI. No entanto, mesmo em condições normais o contato entre as CEI e a microbiota pode ocorrer, e nestas situações os micro-organismos são facilmente contidos através de adaptações exibidas pelo TGI. A presença dos micro-organismos é detectada pelas CEI em receptores de reconhecimento de padrões, e a informação é transmitida para uma gama de componentes inatos e adaptativos do sistema imune local, impedindo que ocorra a invasão dos tecidos adjacentes. Exemplos de funções reguladas por esta sinalização são a produção de moléculas antimicrobianas como as defensinas, o condicionamento de células dendríticas que levam à resposta mediada por células T auxiliares 2 (T_H2) e a produção de IgA pelos linfócitos B (Macpherson & Harris 2004, Nishio & Honda 2012).

A importância da proteína MUC2 foi demonstrada em estudos utilizando camundongos deficientes na produção desta estrutura, onde a ausência da camada de muco promovia o contato direto entre a microbiota e as CEI, induzindo um quadro inflamatório (Johansson *et al.* 2013). Além da invasão aos tecidos, a composição da microbiota também é capaz de causar um desequilíbrio que afeta não só o metabolismo, como a interação entre os micro-organismos comensais e o sistema imune. A disbiose, termo utilizado para denominar a mudança na comunidade microbiana do TGI, pode ter sua origem em tratamentos que fazem uso de antibióticos, mudanças na dieta ou a invasão por patógenos (Maynard *et al.* 2012). Independente da causa, a desestabilização do consórcio de micro-organismos residentes do TGI interfere diretamente na relação harmoniosa estabelecida com o sistema imune, que passa a responder à antígenos da microbiota, podendo contribuir para doenças mediadas pelo sistema imune. Dentre elas, inclui-se a doença inflamatória intestinal (DII).

A doença inflamatória intestinal consiste em uma condição inflamatória idiopática, que ocorre tipicamente na segunda e terceira década de vida e afeta ambos os sexos (Blumberg *et al.* 1999, Bouma & Strober 2003, Xavier & Podolsky 2007). A maioria dos indivíduos afetados progride para a doença recorrente e crônica, que pode resultar em dano irreversível da função gastrointestinal. Diversos estudos sugerem que as DII podem ser causadas por uma resposta imune inadequada contra a microbiota intestinal, que leva ao quadro inflamatório observado. A doença se manifestaria em indivíduos geneticamente suscetíveis, acionados por fatores ambientais, como o uso de certos medicamentos, o tabagismo ou qualquer outra doença intestinal capaz de induzir a quebra da homeostase (Blumberg *et al.* 1999). Os fatores genéticos que tornam o hospedeiro predisposto à manifestação destas patologias podem interferir na permeabilidade das CEI e alterar a regulação das bactérias comensais. Em conjunto, estes aspectos resultam na resposta imune

exacerbada na mucosa intestinal, caracterizada pela ativação crônica de células T, junto com a produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios.

A doença de Chron e a colite ulcerativa representam as duas principais formas de DII. Embora as duas condições manifestem fenótipos similares, existem diferenças clínicas, patológicas e fisiológicas consideráveis que permitem separá-las (Quadro 1). A colite ulcerativa é a forma de DII mais difundida mundialmente, é menos propensa a complicações que a doença de Chron e invariavelmente envolve o cólon e o reto, podendo se estender a partir deste de forma proximal (Damiani *et al.* 2006, Danese & Fiocchi 2011). A multifatorialidade desta patologia impede que ela seja reproduzida em modelos experimentais mais simples, como por exemplo, cultura de células. A utilização de modelos animais revelou-se extremamente útil no estudo da colite ulcerativa, pois permite analisar os eventos iniciais da doença e seu desenvolvimento, identificar quais fatores imunológicos e genéticos estão se manifestando e avaliar a interação entre os diversos componentes envolvidos (Gaudio *et al.* 1998).

O modelo experimental proposto por Okayasu *et al.* (1990) em camundongos mostrou-se capaz de reproduzir sintomas clínicos exibidos na doença, incluindo perda de peso, diarreia, sangue oculto fecal e sangramento retal com a administração de doses de 5% e 10% de dextran sulfato de sódio (DSS) na água de beber. Os processos inflamatórios e erosões típicas do tecido foram restritos às paredes do cólon, e foram observadas alterações na microbiota, como aumento dos membros da família Bacteroidaceae e espécies do gênero *Clostridium* (Okayasu *et al.* 1990). O quadro 2 sumariza as principais características exibidas na indução da colite ulcerativa pela administração de DSS em camundongos (Elson *et al.* 1995). A influência do DSS na permeabilidade e espessura da camada interna de muco, responsável por separar a comunidade bacteriana comensal das células epiteliais foi recentemente demonstrada. Explantes de cólon obtidos de camundongos C57BL/6 e humanos

submetidos a colonoscopia expostos à DSS mostraram permeabilidade e espessura significativamente menor, permitindo que as bactérias penetrassem a camada de muco, e como consequência, o tecido subjacente (Johansson *et al.* 2010).

Quadro 1 – Comparação entre as duas principais formas de DII

	Colite Ulcerativa	Doença de Chron
Regiões afetadas	O processo inflamatório inevitavelmente envolve o reto, de onde se estende de forma proximal, mantendo-se restrito ao cólon.	Qualquer parte do TGI pode ser afetada, mas mais comumente, o íleo terminal, ceco, região peri-anal e cólon. É caracterizada pela presença de segmentos afetados intercalados com porções normais do intestino.
Histologia	A inflamação afeta as camadas superficiais da mucosa, com infiltração dos linfócitos e granulócitos, e perda de células caliciformes. Presença de ulcerações e abscessos crípticos.	Ocorre densa infiltração de todas as camadas da parede intestinal por linfócitos e macrófagos, com presença de granulomas em mais de 60% dos pacientes, fissuras ulcerativas e fibrose submucosa.
Características clínicas	Diarreia severa, perda de sangue e perda progressiva de funções peristálticas, levando à rigidez do colon. Manifestações inflamatórias extra-intestinais podem ocorrer.	Dores, diarreia, estreitamento do lúmen levando a obstrução e aperto intestinal. Formação de abscesso e fistulização da pele e de órgãos internos.

Fonte: Adaptado de Bouma & Strober (2003)

Quadro 2 – Principais características do modelo experimental de colite ulcerativa induzido por DSS.

Espécies animais	Camundongos, Hamster, Ratos.
Áreas envolvidas	Cólon e reto.
Evolução temporal	Pico ocorre entre 7-10 dias.
Patologia	Doença aguda e crônica. Sem formação de granulomas. Inflamação da mucosa e submucosa, com ulcerações.
Mecanismos patogênicos	Possivelmente injúria epitelial.
Envolvimento de bactérias	Provavelmente.
Anormalidades de mediadores inflamatórios e citocinas	Aumento de PGE ₂ , TXB ₂ , LTB ₄ , IL-2, IL-4, IL-6.
Reprodutibilidade	100% reproduzível.

Fonte: Adaptado de Elson et al. (1995)

Uma extensa lista de estudos realizados com humanos e modelos animais busca elucidar a relação entre os diversos fatores atuando na manifestação da colite ulcerativa e outras DII, e muitos deles tem focado em estudar a participação da microbiota. Camundongos mantidos em ambiente livre de micro-organismos não desenvolvem colite ulcerativa induzida experimentalmente, demonstrando que a microbiota da mucosa é necessária para a indução e propagação do processo inflamatório (Bouma & Strober 2003). Análises da microbiota

associada à mucosa de pacientes com colite ulcerativa também apontam diferenças na sua composição em relação ao grupo controle, com a perda de bactérias comensais nos indivíduos doentes (Nishikawa *et al.* 2009). O mesmo pode ser observado em estudos utilizando amostras de fezes que, em conjunto, indicaram que a população microbiana de pacientes com colite ulcerativa e doença de Chron em sua forma ativa, é significativamente distinta da microbiota exibida por indivíduos saudáveis ou com a forma inativa destas DII (Manichanh *et al.* 2006, Andoh *et al.* 2011). Apesar de nenhum micro-organismo específico ter sido atribuído à indução da colite ulcerativa e da inegável influência de fatores genéticos e ambientais, estes estudos sugerem a importância da disbiose na manifestação da doença, assim como de outras DII. No entanto, ainda não está claro se as alterações exibidas na composição da população de micro-organismos comensais ocorrem antes (causa) ou após (consequência) a manifestação da doença.

Estudos que avaliem a microbiota ao longo do aparecimento da patologia são de grande importância para compreender a dinâmica dos micro-organismos com o hospedeiro. A partir disto, o objetivo deste trabalho foi acompanhar a composição da população microbiana de um camundongo ao longo do período de indução de colite ulcerativa pela administração de DSS.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foi utilizado um camundongo macho C57BL/6, obtido conforme os critérios da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Durante o período do experimento, o animal foi mantido em instalações adequadas, em ciclo de 12 horas claro/escuro, recebendo ração comercial e água potável *ad libitum*. A manutenção do animal seguiu a Lei 11.794, que

estabelece procedimentos para o uso científico de animais. A utilização deste animal para este fim foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA sob o número GPPG 11.0244 FIPE/HCPA.

Indução da colite ulcerativa aguda

A colite ulcerativa aguda foi induzida no camundongo C57BL/6 (6 semanas de vida) pela administração de 2% dextran sulfato sódio (DSS; peso molecular 10.000 Da; MP Biomedicals) do dia 1 ao dia 8 na água de beber *ad libitum* (Neufert *et al.* 2007).

Coleta das amostras da microbiota intestinal

As amostras da microbiota intestinal foram coletadas utilizando suabes estéreis na região anal do camundongo, após este receber estímulo que induzia o animal a defecar. As coletas foram realizadas em quatro momentos distintos, a saber: 1) um dia antes do início do tratamento (dia 0), 2) no segundo dia de tratamento (dia 2), 3) no quinto dia de tratamento (dia 5) e 4) no último dia de tratamento (dia 8).

Após as coletas, as amostras eram armazenadas sob refrigeração e encaminhadas ao Setor de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do ICBS- UFRGS para as análises microbiológicas.

Isolamento bacteriano

Após o transporte, a amostra contendo o suabe da coleta foi incubada em estufa à 35 °C durante uma hora. Em seguida, a amostra passou por diluições seriadas (1:10 e 1:100) e 100 µL de cada diluição foi semeada através da técnica de espalhamento em superfície, utilizando a alça de Drigalski (Antunes 1995). O espalhamento foi realizado em triplicata nos meios ágar tripton de soja (TSA), eosina azul de metileno (EMB), ágar *Salmonella-Shigella* (SSA) e ágar sal-manitol (SMA). As placas foram incubadas a temperatura de 35 °C por 24 h.

As colônias que apresentavam morfologia distinta eram selecionadas e isoladas em placas contendo os mesmos meios de cultura de origem. Um segundo isolamento foi realizado para garantir a pureza das colônias. Após o isolamento, as colônias foram inoculadas em caldo triptona de soja (TSB) e incubadas à 35 °C durante 16-24h. A partir deste crescimento, verificou-se a pureza da cultura, arranjo e morfologia das células através da coloração de Gram, e a classificação das bactérias em Gram positivas e Gram negativas. Uma vez confirmada a pureza da cultura, uma alíquota do meio foi armazenada em glicerol 20% e mantida em freezer a -20 °C. Outra alíquota foi semeada em tubos de ensaio contendo TSA inclinado, que após incubação à 35 °C por 24h, foi armazenado sob refrigeração para posterior manipulação.

Determinação do número de bactérias heterotróficas

O número de bactérias heterotróficas presente nas amostras foi determinado semeando 100 µL das diluições de 1:1, 1:10 e 1:100 das amostras em triplicatas de placas contendo o meio de cultura ágar padrão para contagem (PCA). As placas foram incubadas à 35 °C por 16 - 24 h. Foram contadas as colônias nas placas que apresentavam entre 20 e 200 unidades formadoras de colônia (UFC).

Identificação bacteriana

A identificação da população bacteriana foi baseada em provas bioquímicas clássicas para bactérias Gram negativas de acordo com Holt *et al.* (1984). Os testes realizados incluem catalase, vermelho de metila (VM) / Voges Proskauer (VP), motilidade, sulfeto de hidrogênio (H₂S), citrato, oxidase e utilização de diferentes açúcares (glicose, lactose, manitol, l-arabinose, maltose e manose).

RESULTADOS

Isolamento bacteriano

Foram isoladas, no total, 56 colônias de bactérias provenientes do crescimento nos meios utilizados nos diferentes dias (Tabela 1). Das 35 colônias isoladas do meio TSA (não-seletivo), 29 eram bactérias Gram-positivas, sendo que aproximadamente 59% representavam bacilos formadores de endósporos. As seis colônias de bactérias Gram-negativas isoladas deste meio apresentavam morfologia de cocobacilos, sem agrupamentos específicos. O mesmo foi observado nos isolamentos realizados nos meios seletivos para bactérias Gram-negativas (EMB e SSA). A tabela 2 mostra a distribuição das colônias Gram-negativas ao longo dos dias de coleta. Quatro colônias selecionadas do meio TSA para isolamento não cresceram após três tentativas, por isso foram desconsideradas das análises.

Tabela 1 – Número de colônias isoladas dos meios nos diferentes dias de coleta nos meios seletivos e não-seletiv

Meio de cultura	Número de colônias			
	Dia 0	Dia 2	Dia 5	Dia 8
SSA	1	3	1	2
SMA	-	3	-	1
EMB	4	3	1	2
TSA	5	23	4	3

Tabela 2 – Número de colônias Gram-negativas isoladas de cada meio de cultura nos diferentes dias de coleta

Meio de cultura	Número de colônias Gram-negativas				Total
	Dia 0	Dia 2	Dia 5	Dia 8	
SSA	1	3	1	2	7
EMB	4	3	1	2	10
TSA	1	2	1	2	6

Determinação do número de bactérias heterotróficas

A determinação do número de bactérias heterotróficas foi realizada através da média de crescimento observado em cada diluição, com valores que se enquadravam nos limites detalhados em MATERIAIS E MÉTODOS (Tabela 3). Uma das placas referente ao dia 5 apresentou contaminação e foi desconsiderada dos cálculos.

Tabela 3 – Contagem de bactérias heterotróficas (UFC/mL) nos diferentes dias de coleta.

	Dia 0 – 1:10			Dia 2 – 1:1			Dia 5 – 1:1			Dia 8 – 1:100		
UFC	110	135	144	70	62	44	56	62	-	79	72	90
Média	129,66			58,66			59			80,33		
UFC/mL	1296,6			58,66			59			8033,3		

Identificação bacteriana

As provas de identificação bioquímica realizadas para as bactérias Gram-negativas apresentaram resultado semelhante nas seis colônias isoladas do meio TSA e nas sete colônias isoladas do meio SSA, que apontam para a espécie *Citrobacter rodentium* (Tabela 4). No meio EMB, além de *C. rodentium*, duas colônias obtidas no primeiro dia de coleta apresentaram resultados diferentes, que indicam às espécies *Yersinia intermedia* e *Escherichia coli* (Tabela 5).

Tabela 4 – Resultados obtidos nas provas de identificação bioquímica, representativos para todas as colônias isoladas dos meios SSA e TSA ao longo da indução

	TSA	SSA
Oxidase	-	-
Catalase	+	+
Vermelho de metila	+	+
Voges Proskauer	-	-
H ₂ S	-	-
Motilidade	-	-
Citrato	-	-
Produção de gás (glicose)	+	+
D-Glicose	+	+
Lactose	+	+
Manitol	+	+
Manose	+	+
Maltose	+	+
L-arabinose	+	+
	<i>Citrobacter rodentium</i>	<i>Citrobacter rodentium</i>

Tabela 5 – Resultados obtidos nas provas de identificação bioquímica para as três colônias isoladas do meio EMB. EMB-2 e EMB-3 foram encontrados somente no primeiro dia, enquanto EMB-1 é representativo das demais colônias identificadas.

	EMB – 1	EMB – 2 (Dia 0)	EMB – 3 (Dia 0)
Oxidase	-	-	-
Catalase	+	+	+
Vermelho de metila	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-
H ₂ S	-	-	-
Motilidade	-	+	-
Citrato	-	-	-
Produção de gás (glicose)	+	+	-
D-Glicose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Manitol	+	+	+
Manose	+	+	+
Maltose	+	+	+
L-arabinose	+	+	+
	<i>Citrobacter rodentium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Yersinia intermedia</i>

DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi analisada a composição da microbiota presente na região anal de um camundongo induzido a desenvolver colite ulcerativa pela administração de DSS, e como ela foi afetada ao longo da doença. Foi possível observar uma considerável diminuição no número de UFC/mL entre o dia 0 e o dia 5, seguida de aumento expressivo no dia 8 da indução da colite ulcerativa. Este valor, que representa quase seis vezes o número de UFC/mL do primeiro dia, poderia estar relacionado com a perda abundante de sangue no oitavo dia em decorrência do tratamento com DSS. Apesar do excesso de sangue ter sido removido, uma quantidade considerável foi transferida para o suabe. O sangue poderia estar trazendo consigo a microbiota luminal e aderida à mucosa do TGI pouco representada nos primeiros dias de coleta, e não apenas os micro-organismos encontrados na região anal do camundongo. Uma análise realizada com biópsias do cólon de 305 pacientes com DII apresentou maiores concentrações de UFC/mL na mucosa em comparação ao grupo controle (Swidsinski *et al.* 2002). Conte *et al.* (2006) registraram valores maiores de organismos aeróbicos e aeróbicos-facultativos associados à mucosa em biópsias de crianças com DII. Edmiston *et al.* (1982) não observaram diferença significativa no número total de micro-organismos anaeróbicos em amostras de cinco pacientes com DII em relação à uma porção normal do tecido. Por outro lado, Nemoto *et al.* (2012) obtiveram valores significativamente menores para o número total de bactérias nas fezes de pacientes com colite ulcerativa na forma ativa, em comparação aos indivíduos saudáveis.

É importante destacar que os trabalhos mencionados realizaram a comparação entre indivíduos saudáveis e afetados pela doença, e não ao longo do desenvolvimento da patologia. Outro fator que deve ser levado em consideração, refere-se à ausência dos micro-organismos anaeróbicos no presente estudo, visto que a metodologia empregada impossibilitava seu cultivo. A técnica de colonoscopia utilizada em muitos destes trabalhos, é

capaz de manter a anaerobiose e, conseqüentemente, os micro-organismos que predominantemente apresentam este tipo de metabolismo no tecido. Ao longo da evolução, a microbiota estabeleceu íntimas relações entre si e com o hospedeiro, tornando-os altamente dependentes de toda a rede metabólica de outros membros, dificultando o crescimento em culturas puras (Zoetendal *et al.* 2008). Apenas 20-30% das bactérias presentes no cólon são cultiváveis pelos métodos tradicionais devido ao ambiente extremamente complexo do tecido, representando uma limitação aos estudos que empregam esta abordagem (Nishikawa *et al.* 2009).

A identificação bioquímica das bactérias Gram-negativas apontou para as espécies de *Escherichia coli*, *Yersinia intermediata* e *Citrobacter rodentium*, apesar de a seleção de colônias através das diferentes morfologias ter apontado para maior diversidade. Esta baixa variedade de organismos identificados pode ser consequência da metodologia utilizada que focou na identificação de micro-organismos Gram-negativos e não foi capaz de incluir organismos anaeróbicos. *C. rodentium*, a única a se manter no curso de desenvolvimento da patologia, é o agente etiológico da hiperplasia colônica transmissível murina (HCTM), uma doença de ocorrência natural em camundongos de laboratório, que na maioria das linhagens, incluindo C57BL/6, representa pouco ou nenhum risco de morte (Mundy *et al.* 2005). Diferente de outras bactérias entero-invasivas, *C. rodentium* se adere à superfície apical das células epiteliais intestinais com interações moleculares bem definidas (Cellars *et al.* 2006), e a colonização da bactéria no TGI provoca a patologia caracterizada pela hiperproliferação das células no cólon descendente. (Luperchio & Schauer 2001, Cellars *et al.* 2006). Infecções enteropatogênicas e a inflamação intestinal induzida por ela, afetam diretamente no ecossistema do TGI. Como reflexo, pode ocorrer uma alteração na composição da microbiota, tanto em resposta à infecção por um organismo patogênico, quanto ao quadro inflamatório exibido pelo hospedeiro. Lupp *et al.* (2007) demonstraram resultados

semelhantes para o modelo de inflamação induzida por infecção com *C. rodentium* e o modelo quimicamente induzido por DSS. Em ambos os casos, ocorreu diminuição no número total de bactérias, e alteração na comunidade em relação aos controles, com aumento na proporção da família Enterobacteriaceae. No presente trabalho, a utilização de DSS para indução da colite ulcerativa e prevalência *C. rodentium* ao longo da doença, com desaparecimento das outras espécies identificadas, sugerem a possibilidade de uma atuação em conjunto deste dois fatores para o desenvolvimento da patologia e mudanças na organização da microbiota do TGI.

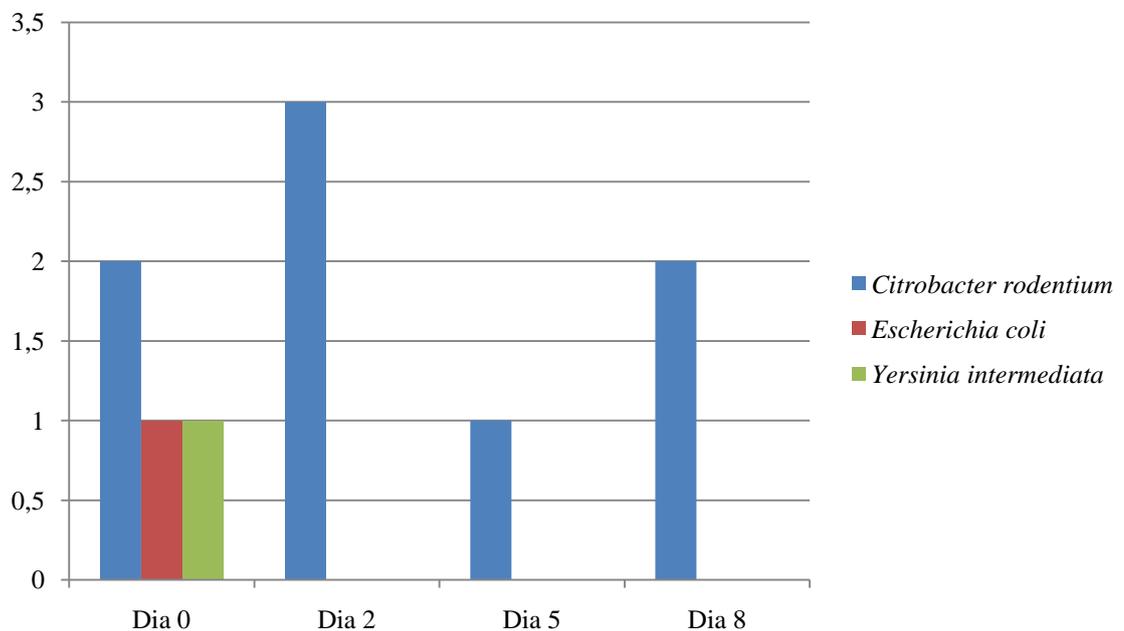


Figura 2 – Gráfico da distribuição das colônias isoladas das espécies identificadas ao longo do período de indução no meio seletivo EMB

Tomando como base a classificação de Gram, as colônias consideradas distintas morfológicamente e o desaparecimento de *Escherichia coli* e *Yersinia intermedia*, pode-se observar flutuações na composição da microbiota ao longo da indução da colite ulcerativa. Diversos trabalhos que fizeram uso de metodologias capazes de detectar de forma mais ampla a diversidade da comunidade microbiana, exibiram diferenças entre pacientes com DII e os indivíduos controles (Kleessen *et al.* 2002, Seksik *et al.* 2003, Ott *et al.* 2004, Manichanh *et*

al. 2006, Frank & Pace 2008). No entanto, visto que em cada estudo se observou perfis diferentes entre as alterações e que estas representavam a microbiota de indivíduos diferentes, nenhum organismo ou grupo específico pode ser identificado como indutor da colite ulcerativa e outras DII. Uma das hipóteses existentes para explicar a patologia destas doenças é que o rompimento da homeostase entre microbiota e sistema imune normal do hospedeiro é uma consequência das alterações no número e composição dos micro-organismos, não estando estas relacionadas ao efeito secundário do quadro inflamatório (Strober *et al.* 2007).

Existem ainda diversas evidências que apontam para a perda de barreiras epiteliais que impedem o contato direto da microbiota com as células da mucosa, permitindo uma interação excessiva do sistema imune associado ao tecido com os micro-organismos residentes. Johansson *et al.* (2013) estudaram diferentes modelos de colite ulcerativa em camundongos e em todos eles a camada de muco se apresentava deficiente. Além disso, constataram que as bactérias intestinais eram necessárias para que os animais desenvolvessem a doença. No caso do modelo utilizado no presente estudo, o efeito tóxico bem documentado do DSS às células epiteliais do cólon e à camada de muco que as separa da comunidade microbiana seria responsável por aumentar a permeabilidade da mucosa do cólon, permitindo a penetração das bactérias e induzindo a resposta imune exacerbada. (Johansson *et al.* 2010, Dong *et al.* 2013).

Células T efectoras que respondem aos antígenos da microbiota comensal passam por processo de seleção semelhante àquele exibido para os antígenos próprios do organismo, sofrendo anergia clonal ou deleção. Células T_{H3} supressoras também são estimuladas a produzir fator de crescimento e transformação β (TGF- β) e outras citocinas supressoras, mantendo a homeostasia. Já as CEI, reconhecem os micro-organismos e outras substâncias pela expressão de receptores tipo-Toll, que reconhecem padrões moleculares e, em condições apropriadas, reagem a estes organismos com a produção de citocinas e outros compostos com

propriedades anti-inflamatórias. Mudanças capazes de alterar este equilíbrio são possíveis causas da inflamação observada na mucosa nas DII, envolvendo diversos mecanismos do sistema imune. Estas doenças são quase sempre mediadas pelo excesso de duas possíveis vias: ou uma resposta T_H1 , com consequente aumento na secreção de IL-12, interferon- γ (IFN- γ) e/ou fator de necrose tumoral (TNF); ou uma resposta T_H2 com aumento da produção de IL-4, IL-5 e/ou IL-13. O padrão de resposta da colite ulcerativa parece ser mediado pelas células T_H2 , visto que além das citocinas mencionadas, existe uma grande produção de auto-anticorpos, como antitropomiosina e anticorpo citoplasmático anti-neutrófilo, que responde diretamente a antígenos bacterianos de *Bacteroides caccae* e *E. coli* (Bouma & Strober 2003, Sasaki & Klapproth 2012).

Nos modelos experimentais de colite, a inflamação pode também ser consequência de defeitos nas células T regulatórias (T_{REG}), visto que animais incapazes de produzir estas células ou citocinas regulatórias, como IL-10 ou TGF- β , desenvolvem colite ulcerativa (Bouma & Strober 2003). Dharmani *et al.* (2011) identificaram um aumento de 70-80 vezes nos níveis de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória produzida por monócitos, macrófagos e células T. O TNF- α poderia atuar sobre as células epiteliais, desencadeando a rede de citocinas envolvidas na doença. Observou-se também aumento na expressão de receptores do tipo-Toll, que contribui para a resposta exacerbada. Houve diminuição significativa na produção de citocinas regulatórias como IL-10 que leva à uma resposta mais agressiva dos macrófagos, e diminuição de TGF- β que regula a ativação das células T_H1 , T_H2 e T_H17 . A ativação de células T regulatórias, incluindo T_{REG} e T_H3 (secretoras de TGF- β e IL-10) é outro fator contribuindo na manifestação da patologia.

Neste trabalho foi possível observar a ocorrência de mudanças na estrutura da microbiota associada à mucosa de um camundongo induzido a desenvolver colite ulcerativa pela administração de DSS. Estas oscilações ocorreram tanto em número quando em

diversidade, e estão diretamente envolvidas nos múltiplos fatores que atuam na manifestação da doença. Muitos autores especulam se a disbiose atua como causa ou consequência do processo inflamatório exibido, e estudos que acompanhem o desenvolvimento temporal da patologia podem ser extremamente esclarecedores neste sentido. Para tanto, o uso de técnicas de identificação mais sensíveis e abrangentes com um número amostral maior, que possam incluir, também, a população anaeróbica predominante da região traria mais clareza sobre a participação da microbiota gastrointestinal no desenvolvimento da colite ulcerativa.

REFERÊNCIAS

- ANDOH, A., H. IMAEDA, T. AOMATSU, O. INATOMI, S. BAMBA, M. SASAKI, Y. SAITO, T. TSUJIKAWA, Y. FUJIYAMA 2011. Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Gastroenterology* 46(4): 479-486.
- ANNE-MARIE, C. O., E. R.-T. AMANDA, E. J. ALBERT, J. W. MICHAEL 2012. The Role of the Microbiota in Gastrointestinal Health and Disease.
- ANTUNES, G. S. 1995. Manual de diagnostico bacteriológico. *Porto Alegre, UFRGS*.
- BLUMBERG, R. S., L. J. SAUBERMANN, W. STROBER 1999. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Immunology* 11(6): 648-656.
- BOUMA, G., W. STROBER 2003. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 3(7): 521-533.
- CELLARS, L., W. K. MACNAUGHTON, P. M. SHERMAN, A. C. SKINN, N. VERGNOLLE, J. L. WALLACE, S. R. ZAMUNER 2006. Citrobacter rodentium infection causes iNOS-independent intestinal epithelial dysfunction in mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 84: 1301+.
- CONTE, M. P., S. SCHIPPA, I. ZAMBONI, M. PENTA, F. CHIARINI, L. SEGANTI, J. OSBORN, P. FALCONIERI, O. BORRELLI, S. CUCCHIARA 2006. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 55(12): 1760-1767.
- DAMIANI, C. R., C. A. F. BENETTON, C. STOFFEL, K. C. BARDINI, V. H. CARDOSO, G. DI GIUNTA, R. A. PINHO, F. DAL-PIZZOL, E. L. STRECK 2006. Estresse oxidativo e metabolismo em modelo animal de colite induzida por dextran sulfato de sódio. *Dissertação (Mestrado). Criciúma (RS): Curso de Pós-Graduação: Ciências da Saúde - Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2006*.
- DANESE, S., C. FIOCCHI 2011. Ulcerative Colitis. *New England Journal of Medicine* 365(18): 1713-1725.
- DHARMANI, P., P. LEUNG, K. CHADEE 2011. Tumor necrosis factor- α and Muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis. *PLos One* 6(9): e25058-e25058.
- DONG, F., L. ZHANG, F. HAO, H. TANG, Y. WANG 2013. Systemic Responses of Mice to Dextran Sulfate Sodium-Induced Acute Ulcerative Colitis Using ¹H NMR Spectroscopy. *Journal of Proteome Research* 12(6): 2958-2966.
- DONGQIAN, S., L. CHUAN, X. RAN, Z. FAXING 2012. Human Gut Microbiota: Dysbiosis and Manipulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2.

- EDMISTON, C. E., G. R. AVANT, F. A. WILSON 1982. Anaerobic bacterial populations on normal and diseased human biopsy tissue obtained at colonoscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 43(5): 1173-1181.
- ELSON, C. O., R. B. SARTOR, G. S. TENNYSON, R. H. RIDDELL 1995. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109(4): 1344-1367.
- FRANK, D. N., N. R. PACE 2008. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Current Opinion in Gastroenterology* 24(1).
- GAUDIO, E., G. TADDEI, A. VETUSCHI, R. SFERA, S. VISCONTI, G. RICCIARDI, R. CAPRILLI 1998. Dextran sulphate sodium (DSS) colitis in rats: A clinical, structural and ultrastructural aspects. *Gastroenterology* 114: A983.
- HOLT, J. G., N. R. KRIEG, R. G. E. MURRAY, D. J. BRENNER, M. P. BRYANT, J. W. MOULDER, P. N. P. H. SNEATH, J. T. STALEY 1984. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins.
- HOUTE, J., R. J. GIBBONS 1966. Studies of the cultivable flora of normal human feces. *Antonie van Leeuwenhoek* 32(1): 212-222.
- JOHANSSON, M. E. V., J. K. GUSTAFSSON, J. HOLMÉN-LARSSON, K. S. JABBAR, L. XIA, H. XU, F. K. GHISHAN, F. A. CARVALHO, A. T. GEWIRTZ, H. SJÖVALL, G. C. HANSSON 2013. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*.
- JOHANSSON, M. E. V., J. K. GUSTAFSSON, K. E. SJÖBERG, J. PETERSSON, L. HOLM, H. SJÖVALL, G. C. HANSSON 2010. Bacteria Penetrate the Inner Mucus Layer before Inflammation in the Dextran Sulfate Colitis Model. *PLoS One* 5(8): 9.
- KLEESSEN, B., A. J. KROESEN, H. J. BUHR, M. BLAUT 2002. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scandinavian Journal Of Gastroenterology* 37(9): 1034-1041.
- LEY, R. E., D. A. PETERSON, J. I. GORDON 2006. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell* 124(4): 837-848.
- LUPERCHIO, S. A., D. B. SCHAUER 2001. Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes and Infection* 3(4): 333-340.
- LUPP, C., M. L. ROBERTSON, M. E. WICKHAM, I. SEKIROV, O. L. CHAMPION, E. C. GAYNOR, B. B. FINLAY 2007. Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell host & microbe* 2(2): 119-129.
- MACPHERSON, A. J., N. L. HARRIS 2004. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 4(6): 478-485.

MANICHANH, C., L. RIGOTTIER-GOIS, E. BONNAUD, K. GLOUX, E. PELLETIER, L. FRANGEUL, R. NALIN, C. JARRIN, P. CHARDON, P. MARTEAU, J. ROCA, J. DORE 2006. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55(2): 205-211.

MAYNARD, C. L., C. O. ELSON, R. D. HATTON, C. T. WEAVER 2012. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489(7415): 231-241.

MCFALL-NGAI, M. 2007. Adaptive Immunity: Care for the community. *Nature* 445(7124): 153-153.

MUNDY, R., T. T. MACDONALD, G. DOUGAN, G. FRANKEL, S. WILES 2005. *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cellular Microbiology* 7(12): 1697-1706.

NEMOTO, H., K. KATAOKA, H. ISHIKAWA, K. IKATA, H. ARIMOCHI, T. IWASAKI, Y. OHNISHI, T. KUWAHARA, K. YASUTOMO 2012. Reduced Diversity and Imbalance of Fecal Microbiota in Patients with Ulcerative Colitis. *Digestive Diseases and Sciences* 57(11): 2955-2964.

NEUFERT, C., M. F. NEURATH, B. WEIGMANN, S. WIRTZ 2007. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature Protocols* 2: 541+.

NISHIKAWA, J., T. KUDO, S. SAKATA, Y. BENNO, T. SUGIYAMA 2009. Diversity of mucosa-associated microbiota in active and inactive ulcerative colitis. *Scandinavian Journal Of Gastroenterology* 44(2): 180-186.

NISHIO, J., K. HONDA 2012. Immunoregulation by the gut microbiota. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69(21): 3635-3650.

OKAYASU, I., S. HATAKEYAMA, M. YAMADA, T. OHKUSA, Y. INAGAKI, R. NAKAYA 1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98(3): 694-702.

OTT, S. J., M. MUSFELDT, D. F. WENDEROTH, J. HAMPE, O. BRANT, U. R. FÖLSCH, K. N. TIMMIS, S. SCHREIBER 2004. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53(5): 685-693.

QIN, J., R. LI, J. RAES, M. ARUMUGAM, K. S. BURGDORF, C. MANICHANH, T. NIELSEN, N. PONS, F. LEVENEZ, T. YAMADA, D. R. MENDE, J. LI, J. XU, S. LI, D. LI, J. CAO, B. WANG, H. LIANG, H. ZHENG, Y. XIE, J. TAP, P. LEPAGE, M. BERTALAN, J.-M. BATTO, T. HANSEN, D. LE PASLIER, A. LINNEBERG, H. B. NIELSEN, E. PELLETIER, P. RENAULT, T. SICHERITZ-PONTEN, K. TURNER, H. ZHU, C. YU, S. LI, M. JIAN, Y. ZHOU, Y. LI, X. ZHANG, S. LI, N. QIN, H. YANG, J. WANG, S. BRUNAK, J. DORE, F. GUARNER, K. KRISTIANSEN, O. PEDERSEN, J. PARKHILL, J. WEISSENBACH, P. BORK, S. D. EHRlich, J. WANG 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464(7285): 59-65.

SASAKI, M., J.-M. A. KLAPPROTH 2012. The Role of Bacteria in the Pathogenesis of Ulcerative Colitis. *Journal of Signal Transduction* 2012: 6.

SEKSIK, P., L. RIGOTTIER-GOIS, G. GRAMET, M. SUTREN, P. POCHART, P. MARTEAU, R. JIAN, J. DORÉ 2003. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 52(2): 237-242.

STROBER, W., I. FUSS, P. MANNON 2007. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Investigation* 117: 514+.

SWIDSINSKI, A., A. LADHOFF, A. PERNTHALER, S. SWIDSINSKI, V. LOENING-BAUCKE, M. ORTNER, J. WEBER, U. HOFFMANN, S. SCHREIBER, M. DIETEL, H. LOCHS 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122(1): 44-54.

THOMPSON, G. R., P. C. TREXLER 1971. Gastrointestinal structure and function in germ-free or gnotobiotic animals. *Gut* 12(3): 230-235.

WHITMAN, W. B., D. C. COLEMAN, W. J. WIEBE 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(12): 6578-6583.

XAVIER, R. J., D. K. PODOLSKY 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448(7152): 427-434.

ZOETENDAL, E. G., M. RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, W. M. DE VOS 2008. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* 57(11): 1605-1615.