

**ARISTIDES SCHIER DA CRUZ**

**ALTERAÇÕES DOS ÁCIDOS BILIARES NA DIARRÉIA AGUDA E  
PERSISTENTE E ENTEROPATIA AMBIENTAL ASSINTOMÁTICA**

**Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para  
obtenção do Título de Doutor em Medicina.**

**São Paulo  
1997**

**ORIENTADOR:**

**Prof. Dr. ULYSSES FAGUNDES NETO**

**Área: Gastroenterologia Pediátrica**

**Trabalho realizado na Disciplina de Gastroenterologia Pediátrica do  
Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo - Escola  
Paulista de Medicina**

**Apoio financeiro: Capes**

*Ciência é a busca incessante da verdade e da razão.  
Cientista é o homem que procura incansavelmente separar o fenômeno casual da genuína relação causa-efeito, depositando, um a um, novos conhecimentos sobre o gigantesco acervo do saber humano. Agradeço profundamente ao meu orientador, que fez crescer em mim o amor pela ciência e o instinto de um cientista.*

***Dedico esta tese a duas pessoas: minha  
esposa Cristina e meu filho João Vitor -  
são ambos minha alegria de viver.***

## **AGRADECIMENTOS**

---

Ao **Prof. Dr. Eduardo da Silva Carvalho**, Chefe do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

Ao **Prof. Dr. Ulysses Fagundes Neto**, Coordenador do Curso de Pós-Graduação da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

Ao **Prof. Dr. Nelson Lourenço Machado**, do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, que me transmitiu todos os conhecimentos bioquímicos necessários para o desenvolvimento da técnica de cromatografia de ácidos biliares.

A **José Nelson Esteves do Corral**, biomédico do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina,, cujo permanente apoio técnico foi indispensável para a realização das cromatografias de ácidos biliares.

À **Prof<sup>a</sup> Yara Juliano e Prof. Neil Ferreira Novo**, pela orientação na análise estatística deste trabalho.

Aos professores da Disciplina de Gastroenterologia Pediátrica da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, **Dr. Jamal Wehba**. **Dr. Mauro Batista de Moraes**, **Dra. Élide Helena Guidolin da Rocha Medeiros** e **Dra. Elizabete Kawakami**, que auxiliaram em minha formação especializada.

Aos **colegas e amigos** da Disciplina de Gastroenterologia Pediátrica da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, especialmente ao

*Dr. Carlos Alberto Garcia Oliva, pelos cuidados aos 19 pacientes deste trabalho internados no Hospital Umberto I.*

*À Dra. Maria Ceci do Vale Martins, que na ocasião de sua pesquisa para mestrado, estocou gentilmente as amostras de secreção intestinal dos 34 pacientes portadores de enteropatia ambiental incluídos neste trabalho.*

*Aos professores do Departamento de Pediatria da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, Dr. José Weniger, Dr. José Leon Zindeluk, Dr. Manuel Muños Vazquez, Dr. Arnaldo Beraldi, Dr. Rubens Kliemann, Dra. Evanguelia A. Shwetz, Dr. Paulo Fernando Speling e Dra. Carmem Marcondes Ribas, os quais primeiro foram meus mestres, e que são atualmente meus colegas na estimulante jornada do ensino da clínica pediátrica.*

*Ao colega Dr. Gilberto Pascolat, preceptor junto comigo da Residência de Pediatria do Hospital Evangélico de Curitiba, por ter assumido o controle diário das atividades da Residência, deixando-me tempo livre para trabalhar nesta tese.*

*Ao Prof. Dr. Coriolano Caldas da Mota, Diretor da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná e um reconhecido incentivador da evolução acadêmica dos professores de medicina.*

*A todos os alunos da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná e aos Residentes da Pediatria do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, motivação de todo meu esforço acadêmico, e a quem procuro transmitir, além das funções técnicas de um pediatra, a maneira de dar ao paciente aquilo que ele mais deseja: interesse, dedicação, amor e respeito.*

# SUMÁRIO

---

<b>Resumo</b> .....	ix
<b>I. Introdução</b> .....	01
Proliferação de Enterobactérias no Intestino Delgado.....	01
Fisiologia dos Ácidos Biliares.....	03
Mecanismos de Diarréia Induzida por Ácidos Biliares.....	07
<b>II. Objetivos</b> .....	17
<b>III. Pacientes e Métodos</b> .....	18
1. Pacientes.....	19
2. Métodos.....	21
2.1. Intubação Naso-Duodenal para Coleta de Aspirado Intestinal.....	22
2.2. Cultura e Contagem de Colônias do Aspirado Intestinal.....	22
2.3. Cromatografia de Camada Delgada para Detecção de Ácidos Biliares.....	25
2.4. Métodos Estatísticos.....	29
<b>IV. Resultados</b> .....	31
1. Características Gerais dos Pacientes.....	32
2. Cultura e Contagem de Colônias do Aspirado Intestinal.....	34
3. Cromatografia de Ácidos Biliares.....	37
<b>V. Discussão</b> .....	44
Validade do Método de Cromatografia Utilizado.....	45
Ácidos Biliares Conjugados com Glicina e Taurina.....	47
Ácidos Biliares Desconjugados.....	49
Proliferação Bacteriana no Intestino Delgado e Ácidos	

Biliares Desconjugados.....	56
Considerações Finais.....	60
<b>VI. Conclusões.....</b>	<b>65</b>
<b>Summary.....</b>	<b>67</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>68</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>83</b>



## RESUMO

---

A proliferação de enterobactérias no intestino delgado (ID), especialmente anaeróbias, promove reações enzimáticas que modificam a estrutura dos ácidos biliares conjugados. Através de desconjugação e  $7\alpha$ -desidroxilação, formam-se ácidos biliares capazes de provocar alterações funcionais e morfológicas na mucosa intestinal.

Foram colhidas amostras de aspirado duodenal de 74 lactentes: 23 com diarreia aguda (Grupo I), 17 com diarreia persistente (Grupo II) e 34 com enteropatia ambiental assintomática (Grupo III). As amostras foram submetidas a cultura e contagem de colônias de enterobactérias e cromatografia de camada delgada para ácidos biliares.

Nos 3 grupos a incidência de proliferação de enterobactérias no ID foi muito alta. Dos 74 lactentes estudados, 19 (25,7%) apresentavam ácidos biliares desconjugados no intestino delgado: 4 (17,4%) no Grupo I, 5 (29,4%) no Grupo II e 10 (29,4%) no Grupo III, sem haver diferença significativa entre os 3 grupos. Os ácidos biliares desconjugados encontrados foram: ácido cólico (14 casos); ácido quenodeoxicólico (4 casos); ácido deoxicólico (1 caso); ácido litocólico (5 casos). Não houve correlação entre os isolamentos bacterianos no ID e presença de ácidos biliares desconjugados.

Conclui-se que ácidos biliares desconjugados e  $7\alpha$ -desidroxilados por enterobactérias frequentemente estão presentes no duodeno em grupos de lactentes com alta incidência de proliferação bacteriana no ID. Notavelmente, este fenômeno ocorreu mesmo em lactentes assintomáticos portadores de enteropatia ambiental, sendo este um dos prováveis mecanismos responsáveis pela desnutrição infantil nas comunidades carentes.

# **I. INTRODUÇÃO**

Em consequência de doenças diarréicas, estima-se atualmente que morrem por ano ao menos 3,3 milhões de crianças com menos de cinco anos de idade, nos países do Terceiro Mundo (BERN et al., 1992). Em termos de morbidade, ocorrem anualmente aproximadamente 2,6 episódios de diarréia para cada criança abaixo de cinco anos nestes países, totalizando 1 bilhão de episódios de diarréia por ano no mundo todo. A situação é ainda mais grave entre crianças abaixo de 1 ano de idade, com aproximadamente 5 episódios anuais de diarréia para cada lactente (BERN et al., 1992). A grande maioria destes quadros diarréicos correspondem a episódios de diarréia aguda. Nas diversas regiões do mundo, 3 a 16% dos episódios de diarréia aguda se prolongam por mais de 14 dias, caracterizando-se como diarréia persistente (SNYDER & MERSON, 1982; LIMA & GUERRANT, 1992).

Diante de números tão gigantescos em relação à epidemiologia da diarréia infantil, tornam-se bem vindos todos os conhecimentos no que diz respeito a etiologia, fisiopatogenia, clínica e tratamento da diarréia, devendo ser estimulada sua pesquisa.

## **PROLIFERAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS NO INTESTINO DELGADO**

O lumen do intestino delgado no duodeno e jejuno, quando não é estéril do ponto de vista microbiológico, pode conter concentrações variáveis de bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e leveduras. Estas bactérias encontradas no intestino delgado de indivíduos sadios formam uma

flora transitória, composta por germes provenientes da orofaringe e ingeridos com os alimentos, sendo resistentes ao poder bactericida da acidez gástrica. Foram isoladas no aspirado duodenal de aproximadamente 50% dos adultos sadios (GORBACH et al., 1967; DRASAR et al., 1969) e das crianças híidas (CHALLACOMBE et al., 1974a; FAGUNDES NETO et al., 1980).

Inúmeros fatores podem ser responsáveis pela quebra do equilíbrio natural que mantém a integridade microbiológica neste segmento do intestino. Quando isto ocorre, pode-se instalar a proliferação bacteriana no intestino delgado, situação na qual uma ou mais enterobactérias, habitualmente colonizadoras do intestino grosso e do íleo terminal, proliferam no duodeno e jejuno. Neste caso, os microrganismos presentes no lumen podem ser bactérias anaeróbias dos gêneros *Bacteroides*, *Clostridium*, *Veillonella*, *Bifidobacterium*, cocos anaeróbios, entre outros, ou bactérias aeróbias facultativas, tais como *E. coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Proteus sp*, *Pseudomonas sp* e *S. faecalis*. Transtornos nas funções digestivo-absortivas ocorrem secundariamente a esse fenômeno, caracterizando a síndrome do sobrecrecimento bacteriano no intestino delgado (SIMON & GORBACH, 1984), ou síndrome do intestino delgado contaminado (GRACEY, 1971).

Em sua fisiopatogenia, esta síndrome caracteriza-se pela ocorrência de má absorção de vitamina B<sub>12</sub>, gorduras e carboidratos e secreção de água e eletrólitos. As manifestações clínicas, muito variáveis, incluem desnutrição, anemia, deficiências vitamínicas, esteatorréia e diarréia secretora.

Muitas situações clínicas, cirúrgicas ou sociais, são predisponentes para a ocorrência de proliferação bacteriana no intestino delgado

(KING & TOSKES, 1979). Em crianças e lactentes, as investigações microbiológicas do aspirado duodenal têm revelado alta prevalência de proliferação de enterobactérias nos pacientes com diarreia aguda e persistente (FAGUNDES-NETO et al., 1980; HILL et al., 1983; PENNY et al., 1986; CHALLACOMBE et al., 1974b; FERNÁNDEZ et al., 1982).

A presença de proliferação bacteriana no intestino delgado em crianças assintomáticas, em sua maioria desnutridas, e que vivem em condições sócio-econômicas precárias em países do Terceiro Mundo, é um fenômeno conhecido e bastante frequente. Testemunham a favor disto os estudos realizados na Guatemala (MATA et al., 1972), Austrália (GRACEY et al., 1973), Índia (ALBERT et al., 1978), Etiópia (STINTZING & MÖLLBY, 1982) e Nigéria (OMOIKE & ABIODUM, 1989). Até mesmo entre adultos indianos assintomáticos foi encontrada alta incidência de proliferação bacteriana no intestino delgado (BHAT et al., 1972). Apenas em Porto Rico, KLIPSTEIN et al. (1973) obtiveram achados discordantes, pois adultos assintomáticos vivendo nas mesmas condições precárias possuíam microflora normal no intestino delgado.

## **FISIOLOGIA DOS ÁCIDOS BILIARES**

A molécula dos ácidos biliares tem sua estrutura baseada na do ácido colânico, com 24 carbonos. É um núcleo esteróide de 4 anéis e uma cadeia lateral de 5 carbonos, terminada num ácido carboxílico (FIGURA 1). São presentes apenas nos seres vertebrados. No homem sadio, os principais ácidos biliares presentes na bile são ácido cólico, ácido quenodeoxicólico e ácido deoxicólico. Em muito menor concentração são encontrados ácido litocólico e ácido

ursodeoxicólico. O ácido cólico é um ácido biliar trihidroxilado, pois apresenta 3 radicais hidroxila no núcleo esteróide, nas posições  $3\alpha$ ,  $7\alpha$  e  $12\alpha$  (Figura 1). Já o ácido quenodeoxicólico é dihidroxilado, pois apresenta 2 radicais hidroxila, nas posições  $3\alpha$  e  $7\alpha$  (COLEMAN, 1987; TAVOLONI, 1988).

Em condições fisiológicas, os ácidos biliares estão na forma ionizada e o grupo carboxílico localizado no fim da cadeia lateral é conjugado com o aminoácido taurina ou glicina. Na figura 1 pode ser vista a estrutura molecular do ác. taurocólico.

Os ácidos biliares primários conjugados apresentam uma configuração espacial semelhante à de uma colher de cabo curto (Figura 2). No ventre da colher ficam os grupos hidroxila e o aminoácido, os quais são de poder hidrofílico. Quanto maior o número de hidroxilas, maior é o poder hidrofílico da molécula. O dorso da colher, sem elementos substituíveis, forma a superfície de poder hidrofóbico.

Portanto, os ácidos biliares são moléculas anfipáticas, o que lhes confere poder de detergência. O lado hidrofílico fica sempre voltado para a água, enquanto o lado hidrofóbico fica sempre voltado para o óleo, o ar ou o mesmo lado de um ácido biliar vizinho. Esta propriedade confere aos ácidos biliares a capacidade de formar micelas mistas com gorduras, conforme está representado na Figura 3.

Para cada tipo de molécula de ácido biliar existe um equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico próprio. Este equilíbrio aumenta na seguinte ordem: monohidroxilado < dihidroxilado < trihidroxilado desconjugado < conjugado com glicina < conjugado com taurina. Estes últimos são os de maior capacidade de formação de micelas mistas, enquanto que esta capacidade é pequena entre os primeiros.

A síntese dos ácidos biliares se dá nos hepatócitos, a partir de diversas reações enzimáticas sobre a molécula de colesterol. Esta é a forma como se originam os ácidos biliares primários: ácido cólico e ácido quenodeoxicólico. Antes de serem secretados na bile, os ácidos biliares primários são conjugados com a glicina e a taurina. No organismo humano maduro os ácidos biliares conjugados com a glicina predominam sobre os conjugados com a taurina numa proporção de 3:1.

A síntese de ácidos biliares secundários se dá no lúmen intestinal, a partir do metabolismo dos ácidos biliares primários, acionado por enzimas bacterianas. Assim se formam o ácido deoxicólico, o ácido litocólico, os ácidos biliares cetônicos e o ácido ursodeoxicólico.

A bile é composta por ácidos biliares, colesterol e fosfolípidios. A vesícula biliar concentra os componentes da bile e despeja-os no intestino delgado ao se contrair, por estímulo ocorrido durante as refeições. Os ácidos biliares da bile drenados para o intestino delgado, no adulto sadio, são 60 a 80% compostos por ácidos biliares primários e 20 a 30% por ácidos biliares secundários (em torno de 25% ácido deoxicólico e 1% ácido litocólico).

Assim se inicia a circulação êntero-hepática dos ácidos biliares. No íleo terminal, a quase totalidade dos ácidos biliares conjugados com glicina e taurina são absorvidos por transporte ativo. Os ácidos biliares desconjugados, primários ou secundários, são absorvidos por transporte passivo ao longo de todo o intestino delgado e nos cólons.

A pequena fração de ácidos biliares não absorvida no íleo atinge os cólons. Uma parte desta fração sofre desconjugação e  $7\alpha$ -desidroxilação por enterobactérias anaeróbias, sendo absorvidos na forma de ácido deoxicólico e ácido litocólico. Outra parte, que corresponde a 1 a 4% do total diário de ácidos biliares drenados com a bile para o intestino, é excretada com as fezes. Esta perda é diariamente compensada pela síntese hepática de ácidos biliares a partir do colesterol.

Os ácidos biliares absorvidos vão pela circulação porta até o fígado, onde, na quase totalidade, são captados pelos hepatócitos, conjugados novamente com glicina ou taurina e excretados na bile. Assim se completa a circulação êntero-hepática dos ácidos biliares.

Estando íntegra a circulação êntero-hepática dos ácidos biliares, estes podem exercer adequadamente suas funções principais no intestino:

- a) modulação da hidrólise de gorduras pelas lipases;
- b) solubilização dos produtos da lipólise através da formação de micelas mistas;
- c) liberação de ácidos graxos e monoglicerídeos para a superfície de absorção dos enterócitos, sendo carreados concomitantemente fosfolipídeos, colesterol e as vitaminas lipossolúveis A, D, E e K.



Os efeitos fisiológicos dos ácidos biliares no intestino delgado são produzidos apenas quando estes se encontram em concentração acima da concentração micelar crítica, que varia entre 2 e 8 mM/l, conforme o tipo de ácido biliar (HOFMANN & SMALL, 1967).

A esteatorréia fisiológica do recém-nascido a termo e ainda mais intensa do prematuro, é explicada, em parte, pela baixa concentração intraluminal de ácidos biliares nestas situações (WATKINS et al., 1973). Ao nascer, predominam os ácidos biliares conjugados com taurina, em relação aos conjugados com glicina (CHALLACOMBE et al., 1975; JÖNSSON, et al., 1995). Com poucas semanas de vida os ácidos biliares ultrapassam a concentração micelar crítica e logo a relação glicina: taurina se encontra em torno de 2 a 3 para 1. (CHALLACOMBE et al., 1975; NIESSEN, 1979; HEUBI et al., 1982).

## **MECANISMOS DE DIARRÉIA INDUZIDA POR ÁCIDOS BILIARES**

A integridade da circulação êntero-hepática dos ácidos biliares é rompida quando ocorrem disfunções intestinais que deturpam seu metabolismo ou sua absorção, ou disfunções hepáticas que alteram sua captação do sangue, sua síntese ou excreção.

As consequências extraintestinais destas alterações envolvem a formação de cálculos de colesterol na vesícula biliar e os cálculos de oxalato nos rins (BALISTRERI, 1993), além de aterosclerose e prurido intenso. É reconhecido o poder carcinogênico do ácido deoxicólico, tanto no cólon como no trato digestivo alto (DOMELLÖF et al., 1980).

Em 1960, DAWSON & ISSELBACHER foram os primeiros a sugerir que as bactérias colônicas presentes no intestino delgado poderiam metabolizar os ácidos biliares conjugados e através desse mecanismo danificar a absorção de gorduras. A esteatorréia nestes casos poderia se dar por dois mecanismos: a) os ácidos biliares desconjugados por bactérias seriam tóxicos para a mucosa intestinal, ou b) haveria redução da concentração intraluminal de ácidos biliares conjugados.

A partir daquele ano, inúmeras pesquisas clínicas e experimentais foram desenvolvidas, de maneira que vários mecanismos de diarreia induzida por ácidos biliares são hoje conhecidos.

### **1) Proliferação Bacteriana no Intestino Delgado**

Nas últimas 3 décadas foram exaustivamente estudadas, *in vivo* e *in vitro*, as reações enzimáticas, mediadas por enterobactérias colônicas, que metabolizam os ácidos biliares e modificam sua estrutura química (MIDTVEDT, 1974; MACDONALD et al., 1983).

A enzima coliglicina hidrolase, que desconjuga a taurina ou glicina dos ácidos biliares conjugados, foi purificada e caracterizada por NAIR et al. (1967). Cerca de 99% das bactérias presentes no intestino humano são anaeróbios restritos e são estes os principais desconjugadores da fração de ácidos biliares que chega ao intestino grosso. As principais bactérias produtoras desta enzima são as dos gêneros *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Veillonella* e *Bifidobacterium* (HILL & DRASAR, 1968; MACDONALD et al., 1983). Cada espécie tem especificidade para desconjugar ácidos biliares conjugados com

glicina, ou com taurina ou os dois tipos. No hepatócito estes ácidos biliares são novamente conjugados com o aminoácido.

A  $7\alpha$ -desidroxilase é uma enzima bacteriana que promove desidroxilação na posição  $7\alpha$  do ácido cólico, originando o ácido deoxicólico, ou do ácido quenodeoxicólico, originando o ácido litocólico. MIDTVEDT & NORMAN (1968) foram os primeiros a cultivar bactérias produtoras desta enzima. A princípio, classificaram estas bactérias como lactobacilos. Sabe-se hoje que são enzimas produzidas por anaeróbios restritos, especialmente dos gêneros *Eubacterium*, *Clostridium* e *Lactobacillus* (MIDTVEDT, 1974; HIRANO et al., 1981b; MACDONALD et al., 1983). Ao que tudo indica, *Bacteroides* não são capazes de realizar esta transformação (HIRANO et al., 1981b). Estes ácidos biliares secundários não são reconvertidos no fígado em ácidos biliares primários.

Na Figura 4 estão esquematizadas as duas reações enzimáticas bacterianas descritas acima que metabolizam os ácidos biliares conjugados primários.

Outras reações enzimáticas bacterianas são importantes e bem conhecidas (MIDTVEDT, 1974; MACDONALD et al., 1983). Há enzimas, produzidas por enterobactérias aeróbias e anaeróbias (*E. coli*, *Enterobacter*, *Bacteroides*), que oxidam os grupos hidroxila e formam ácidos biliares cetônicos. Estes são reconvertidos em ácido biliar primário por uma enzima hepática, de modo que esta modalidade de ácido biliar não é encontrada no intestino humano sadio.

Outra reação bacteriana é a  $3\alpha$  e  $7\alpha$ -epimerização dos grupos hidroxila do ácido biliar primário, modificando estes para posição  $3\beta$  e  $7\beta$ . O principal

produto desta reação é o ácido ursodeoxicólico, que existe em muito pequena concentração na bile humana (HIRANO et al., 1981a).

No homem sadio, todas estas reações enzimáticas se dão normalmente no intestino grosso (JÖNSSON et al., 1995), onde há elevadas concentrações de enterobactérias, especialmente anaeróbias. Porém, é pequena a fração de ácidos biliares que sofre ação bacteriana, uma vez que a maior parte dos ácidos biliares é absorvida antes de chegar ao intestino grosso.

Por outro lado, nas situações clínicas e cirúrgicas que cursam com proliferação bacteriana no intestino delgado, a desconjugação e  $7\alpha$ -desidroxilação dos ácidos biliares primários e conjugados se faz de modo abundante e já nos primeiros segmentos do intestino.

As propriedades físico-químicas dos ácidos biliares mudam drasticamente ao serem hidrolisados e  $7\alpha$ -desidroxilados. Ocorre perda da polaridade da face hidrofílica da molécula, com consequente perda de seu poder de detergência. Portanto, o aumento da porcentagem de ácidos biliares desconjugados e secundários no lúmen (ácido cólico, ácido quenodeoxicólico, ácido deoxicólico e ácido litocólico), associado à queda da concentração de ácidos biliares primários conjugados, abaixo da concentração micelar crítica, tem como efeito adverso a má absorção de gorduras e vitaminas lipossolúveis.

Ácidos biliares desconjugados e secundários em altas taxas e baixa concentração de ácidos biliares primários conjugados no líquido aspirado do intestino delgado foram achados em diversas investigações em pacientes adultos portadores de problemas cirúrgicos ou clínicos que cursam com proliferação

bacteriana no intestino delgado (ROSENBERG et al., 1967; TABAQCHALI et al., 1968; AMENT et al., 1972; MALLORY et al., 1973; NORTHFIELD et al., 1973; TANDON et al., 1977). Em quase todos estes estudos, além das alterações metabólicas nos ácidos biliares e da proliferação no intestino delgado de enterobactérias anaeróbias e aeróbias, foi demonstrada laboratorialmente a presença de esteatorréia. Os mesmos achados foram constatados por LIFSHITZ et al. (1978), em ratos com proliferação bacteriana no intestino delgado induzida experimentalmente.

Foram de fato poucos os estudos que avaliaram a microflora do intestino delgado em crianças e lactentes e ao mesmo tempo pesquisaram os ácidos biliares nas amostras obtidas. A associação entre proliferação bacteriana no intestino delgado com as alterações metabólicas nos ácidos biliares descritas acima foi investigada por CHALLACOMBE et al. (1975) em lactentes com diarréia protraída, e por KOCOSHIS et al. (1987) em 7 crianças portadoras de diversos tipos de enteropatias. Outros importantes estudos demonstraram em crianças e lactentes a presença no lumen intestinal de elevadas porcentagens de ácidos biliares desconjugados e queda na concentração de ácidos biliares conjugados (SCHNEIDER & VITERI, 1974b; CHALLACOMBE et al., 1979).

Outro mecanismo através do qual os ácidos biliares desconjugados e  $7\alpha$ -desidroxilados podem induzir a ocorrência de diarréia é o potencial lesivo que estas moléculas exercem sobre a mucosa. LOW-BEER et al. (1970) demonstraram através de perfusão de ácidos biliares desconjugados no intestino delgado de animais, a ocorrência de lesões morfológicas na mucosa do intestino em seus vários níveis, o que não ocorreu com a perfusão de ácidos biliares

conjugados. FAGUNDES-NETO et al. (1981a) e TEICHBERG et al. (1981) demonstraram que a perfusão de ácido deoxicólico (0,5 mM/l) em ratos desnutridos, promove invasão de macromoléculas protéicas na mucosa intestinal, além de secreção de sódio e danos morfológicos nas células epiteliais. Estes efeitos não ocorrem em ratos nutridos perfundidos da mesma maneira e em ratos nutridos ou desnutridos não perfundidos. FASANO et al. (1994) estudaram o transporte *in vitro* de eletrólitos e nutrientes na mucosa jejunal e ileal de coelho após perfusão de 1 mM de ácido quenodeoxicólico e ácido ursodeoxicólico, observando que no íleo a absorção de sódio e cloro é quase abolida, aumenta a secreção de bicarbonato e ocorre inibição na absorção de glicose e alguns aminoácidos. Estes efeitos no jejuno são menos intensos.

Estes achados parecem ajudar a explicar as alterações morfológicas encontradas na estrutura e na ultraestrutura da mucosa do intestino delgado em 3 pacientes adultos relatados por AMENT et al. (1972), portadores de proliferação bacteriana e de altas concentrações de ácidos biliares desconjugados no intestino delgado.

O mecanismo de diarreia induzida por ácidos biliares mais recentemente descrito, tem correlação com o aumento da concentração de ácidos biliares desconjugados e  $7\alpha$ -desidroxilados na serosa intestinal. BERANT et al. (1988) demonstraram experimentalmente em cães, que a infusão na artéria mesentérica de 5 a 8  $\mu$ M/l de ácido deoxicólico e de 12  $\mu$ M/l de ácido cólico, provoca má absorção intestinal de água, sódio, glicose e glicina, sem danos morfológicos à mucosa. Possivelmente este é mais um mecanismo de diarreia induzida por ácidos biliares, uma vez que pacientes com proliferação bacteriana no intestino delgado

tiveram concentrações séricas de ácidos biliares desconjugados mais elevadas que os níveis de infusão aplicados neste experimento (LEWIS et al., 1969). Os ácidos biliares desconjugados são rapidamente absorvidos por transporte passivo no duodeno e no jejuno (HOFMANN, 1976), e isto explica porque sua concentração sérica se eleva nestes casos. Níveis séricos elevados de ácidos biliares foram também encontrados por DEMERS et al. (1978) em lactentes com diarreia protraída e por EJDERRHAMN et al. (1992) em crianças com doença celíaca.

## **2) Perda da Função Ileal:**

Nos casos em que ocorre lesão de mucosa ileal ou ressecção cirúrgica do íleo, os ácidos biliares conjugados deixam de ser absorvidos no íleo e chegam em altas concentrações nos cólons, onde sofrem ação de enzimas de enterobactérias e são metabolizados como descrito acima.

HOFMANN & POLEY (1972) demonstraram que na ressecção ileal ocorre grande perda de ácidos biliares nas fezes e esta perda é muito mais grave e irreparável quando a ressecção ileal ultrapassa 1 metro de comprimento.

O mesmo fenômeno se dá em doenças acompanhadas de lesão da mucosa ileal, como na doença de Crohn (PEDERSEN et al., 1973). CHALLACOMBE et al. (1979) postularam que mesmo na diarreia protraída em lactentes há lesão ileal suficiente para impedir a absorção de grande parte dos ácidos biliares. Os achados de BALISTRERI et al. (1977) e de HEUBI et al. (1979), em lactentes portadores de diarreia protraída, corroboram com esta hipótese.

MEKHJIAN et al. (1971), através de perfusão de soluções com ácidos biliares no intestino grosso em voluntários adultos, demonstraram que o

aumento da concentração intraluminal de ácidos biliares dihidroxilados desconjugados nos cólons induz a secreção de água, sódio e cloro pela mucosa. Isto ocorre quando a concentração de ácido deoxicólico ultrapassa 3mM/l e a de ácido quenodeoxicólico ultrapassa 5mM/l.

RAMAKRISHNA & MATHAN (1987) realizaram perfusão colônica em 10 adultos indianos com espru tropical e compararam com 9 adultos saudáveis. A excreção fecal de ácidos biliares foi significativamente maior nos pacientes do que nos controles (1mM/l contra menos que 0,4mM/l), mas mesmo assim ficou muito abaixo da concentração demonstrada por MEKHJIAN et al. (1971) como necessária para provocar secreção de água e eletrólitos no cólon. Como os pacientes tiveram má absorção de água e sódio nos cólons, e ao mesmo tempo apresentaram elevadas concentrações de ácidos graxos no intestino grosso, em comparação aos controles, os autores concluíram que a ação específica de ácidos graxos insaturados não absorvidos foi a causa da má absorção hidro-eletrolítica naqueles pacientes.

Assim, o principal efeito deletério provocado pela perda de função ileal, parece mesmo ser a grande perda fecal de ácidos biliares, acima da capacidade de síntese compensatória por parte do fígado, a partir do colesterol. Deste modo, há redução drástica do pool total de ácidos biliares na circulação entero-hepática, e sua concentração intraluminal no intestino delgado cai abaixo da concentração micelar crítica. Com isto, o paciente apresenta esteatorréia e má absorção de vitaminas lipossolúveis. Todos estes fenômenos foram comprovados em pacientes com ressecção ileal (HOFMANN & POLEY, 1972), e em lactentes com diarreia protraída (BALISTRERI et al., 1977; HEUBI et al., 1979).



O número muito pequeno de investigações clínicas a respeito do metabolismo dos ácidos biliares nas diversas doenças do aparelho digestivo deixa uma grande lacuna na melhor compreensão de todas as implicações fisiopatogênicas daí decorrentes. Isto limita bastante o horizonte futuro no que diz respeito à pesquisa e conquista de recursos terapêuticos mais racionais. Todavia, pode ser considerado ainda mais alarmante a escassez de investigações do metabolismo dos ácidos biliares nas doenças gastrointestinais de pacientes pediátricos.

## **II. OBJETIVOS**

Foram realizadas culturas bacterianas e cromatografia de camada delgada para ácidos biliares no aspirado duodenal de lactentes portadores de diarreia aguda e persistente e enteropatia ambiental assintomática com os seguintes objetivos:

1. Estudar a correlação entre a proliferação de enterobactérias no intestino delgado e a composição dos ácidos biliares intraluminais.
2. Analisar comparativamente a composição dos ácidos biliares na secreção duodenal destes grupos de pacientes.

### **III. PACIENTES E MÉTODOS**

## 1. PACIENTES

Foram estudados 74 lactentes de forma consecutiva, de ambos os sexos, com idade inferior a 12 meses, e distribuídos em 3 grupos a saber:

GRUPO I: diarreia aguda (23 lactentes).

GRUPO II: diarreia persistente (17 lactentes).

GRUPO III: enteropatia ambiental assintomática (34 lactentes).

Os pacientes com diarreia aguda e diarreia persistente estavam internados nas enfermarias de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital São Paulo e do Hospital Umberto I, para tratamento de desequilíbrios hidroeletrólíticos e intolerâncias alimentares.

Os pacientes com enteropatia ambiental assintomática foram atendidos ambulatorialmente no posto de saúde Cruz de Malta do município de São Paulo.

### **Definições:**

Diarreia aguda: processo sindrômico com duração inferior a 14 dias, de etiologia provavelmente infecciosa, induzindo má absorção de água e eletrólitos, gerando aumento do fluido fecal diário e acarretando ao paciente depleção hidro-salina de intensidade variável (SNYDER & MERSON, 1982).

Diarreia persistente: processo sindrômico de origem inicial provavelmente infecciosa, com duração superior a 14 dias, acarretando ao paciente agravo do estado nutricional (W.H.O., 1988).

Enteropatia ambiental assintomática: lactentes com ausência de sintomas gastrointestinais por pelo menos 30 dias antes da participação no estudo, vivendo em condições de habitação precárias, com saneamento básico inadequado, grande concentração humana domiciliar e renda familiar baixa. Nestas condições há expectativa de uma elevada taxa de contaminação ambiental, favorecendo a instalação de eventos fisiopatogênicos que prejudicam a absorção dos alimentos. Quando desmamados precocemente, mesmo que estejam assintomáticos, a prevalência de desnutrição deve ser alta dentro deste grupo de lactentes (MARTINS et al., 1991).

### **Caracterização dos grupos:**

Para caracterização dos grupos foram analisados em cada paciente:

- a) idade;
- b) sexo;
- c) desmame precoce: definido neste trabalho como a perda total do leite materno em idade inferior a 6 meses;
- d) condições desfavoráveis de vida: habitação precária, saneamento básico incompleto e renda familiar abaixo de 1 salário mínimo per capita;
- e) internações prévias;
- f) duração da diarreia;
- g) estado nutricional: critério de Gomez (1956) - índice peso/idade (P/I):  
eutrofia =  $P/I > 90\%$ ; desnutrição leve =  $P/I$  entre 75 e 90%; desnutrição moderada =  $P/I$  entre 60 e 75%; desnutrição grave =  $P/I < 60\%$ ;
- h) enteropatógenos nas fezes

## **2. MÉTODOS**

### **2.1. Intubação naso-duodenal para coleta de aspirado intestinal:**

Para os 40 pacientes dos grupos I e II, utilizou-se tubo de polietileno, reaproveitável, flexível e transparente, com 1,8 mm de diâmetro externo, e 1,2 mm de diâmetro interno e 75 cm de comprimento, acoplado numa de suas extremidades a uma oliva metálica de 14 mm de comprimento por 7 mm de diâmetro, com um orifício distal e dois laterais. O tubo e material acessório foram esterilizados em solução de glutaraldeído a 2%. O procedimento foi sempre realizado com cuidados cirúrgicos de assepsia.

Após período de jejum mínimo de 4 horas, realizou-se a passagem do tubo por via nasal, conforme a técnica de TOCCALINO & O'DONNELL (1962). A passagem da oliva metálica, do estômago para o duodeno, foi executada de acordo com a técnica descrita por CRUZ & FAGUNDES-NETO (1993). Também de acordo com esta última publicação, a confirmação do posicionamento do tubo no intestino delgado foi feita conforme as características do líquido aspirado, sem realização de radioscopia. Assim, líquido com pH acima de 6,0 e de coloração amarelada, denunciando a presença de bile, foi considerado proveniente de duodeno ou jejuno. Após 15 minutos de se atingir o intestino delgado, iniciou-se a coleta das seguintes amostras:

a) 1,0 ml inicial: desprezado, devido a possível contaminação com saliva e secreção gástrica.

b) 1,0 ml em seringa estéril, estocado em freezer a 20°C negativos para posterior realização de cromatografia de camada delgada para ácidos biliares.

c) 0,5 ml em seringa estéril para cultura e contagem de colônias de microrganismos aeróbios.

d) 0,5 ml em seringa estéril, isenta de bolhas de ar, para cultura e contagem de colônias de microrganismos anaeróbios.

As duas amostras para cultura foram processadas no laboratório de microbiologia num prazo máximo de duas horas após sua coleta.

Conforme descrito por MARTINS et al. (1991), os 34 pacientes do grupo III foram submetidos à passagem para o intestino delgado de tubo estéril acoplado a uma cápsula de Watson-Crosby, modelo pediátrico, para biópsia intestinal.

## **2.2. Cultura e contagem de colônias do aspirado intestinal:**

Tanto para as bactérias aeróbias quanto para as anaeróbias, o líquido aspirado foi quantitativamente cultivado de acordo com a técnica de SCHAEDLER et al. (1965).

### **2.2.1. Anaeróbios**

Amostra de 0,5 ml de aspirado duodenal, isenta de bolhas de ar, foi diluída em 4,5 ml de solução salina tamponada (meio pré-reduzido salina-



"PRAS"). A solução obtida foi submetida a diluições logarítmicas seriadas, de  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ . De cada diluição, 0,1 ml foi semeado em ágar sangue suplementado com vitamina K<sub>1</sub> acrescido de hemina (AS vit K-H). As placas de Petri semeadas foram incubadas no interior de jarras de anaerobiose (GAS PAK). No interior da jarra foi produzida atmosfera de baixo teor de oxigênio com uso de envelope descartável (ANAEROBAC) gerador de dióxido de carbono e hidrogênio.

Após incubação a 37°C durante 2 a 4 dias, as jarras foram abertas para processar a identificação dos microrganismos isolados. Esta foi feita por intermédio de análise morfológica das colônias, coloração de gram, teste de respiração e provas bioquímicas, de acordo com as normas do Virginia Polytechnic Institute Laboratory Manual (HOLDEMAN & MOORE, 1977). Para verificação de esporulação, as colônias suspeitas foram submetidas a choque térmico de 80°C por 10 minutos.

A contagem de colônias por mililitro foi feita a partir da placa possuidora de colônias representativas que tivesse a maior diluição do material coletado. Como exemplo, quando colônias de *Bacteroides sp* estavam presentes nas placas com diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , e ausente nas demais placas, considerava-se a concentração de *Bacteroides sp* superior a  $10^4$  organismos/ml.

### **2.2.2. Aeróbios**

Amostra de 0,5 ml de aspirado duodenal foi adicionada a 4,5 ml de solução salina 0,9%. A solução obtida sofreu diluições logarítmicas seriadas,

de  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ . De cada diluição, 0,1 ml foi semeado em dois meios de cultura: ágar-sangue e Bioágar Teague Azul de Metileno. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C (TRABULSI & TOLEDO, 1989).

A identificação dos microrganismos isolados foi feita por intermédio de análise morfológica das colônias, coloração de gram e provas bioquímicas e sorológicas específicas. Na identificação de bactérias gram negativas foram utilizados teste de fermentação de lactose, meios EPM-MILI e Ágar Citrato de Simmons, incubados durante 18 a 24 horas a 37°C (KELLY et al., 1985).

Processou-se a contagem de colônias do mesmo modo descrito para os anaeróbios.

As amostras de 32 pacientes portadores de enteropatia ambiental assintomática foram submetidas a cultura e contagem de colônias para bactérias aeróbias, de acordo com a descrição original de MARTINS et al. (1991). Estas amostras não foram submetidas à cultura de bactérias anaeróbias.

### **2.2.3. Interpretação da microflora intestinal**

Considerou-se a presença de proliferação bacteriana no intestino delgado quando na amostra foram isoladas, em qualquer concentração,

enterobactérias aeróbias ou anaeróbias:

a) Enterobactérias aeróbias: *Lactobacillus sp*, *Streptococcus faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Pseudomonas sp*, *Proteus sp*.

b) Enterobactérias anaeróbias: *Bacteroides sp*, *Clostridium sp*, *Veillonella sp*, *Bifidobacterium sp*, *Peptococcus sp*, *Peptostreptococcus sp*.

Não foram levadas em consideração bactérias componentes da flora transitória, habitantes naturais da naso-orofaringe e trato respiratório.

### **2.3. Cromatografia de camada delgada para detecção de ácidos biliares:**

Para separação e identificação dos ácidos biliares das amostras de líquido intestinal realizou-se cromatografia de camada delgada pelo método de GOSWAMI & FREY (1974).

#### **a) Material Utilizado**

- \* placas de vidro 20x20 cm recobertas com sílica gel F-254 em fina camada de 0,25 mm de espessura (Merck 60 F-254).
- \* 2 (duas) câmaras cromatográficas.
- \* solução solvente I: isooctano - álcool isopropil - etil acetato - ácido acético (40:20:10:10, v/v).
- \* solução solvente II: clorofórmio - metanol - água (65:35:4, v/v).
- \* reagente específico: um pedaço de arame de cobre é colocado em solução de 0,5g de mobilidato de amônio em 2 ml de água destilada. A mistura é esfriada e adiciona-se 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Agita-se a solução azul obtida. Esta mistura é deixada por duas horas em

temperatura ambiente, agitando-se ocasionalmente. Oitenta mililitros de água destilada é então acrescentada e agitada. A cor muda de azul escuro para marrom claro. O arame de cobre é removido e 6,4ml de ácido sulfúrico concentrado é adicionado à mistura. Este reagente pode ser estocado por até uma semana no refrigerador.

- \* pool de ácidos biliares conjugados (padrão 1), contendo 10mg de cada um dos seguintes componentes: ác. taurocólico, ác. tauroquenodeoxicólico, ác. taurodeoxicólico, ác. glicocólico, ác. glicoquenodeoxicólico e ác. glicodeoxicólico.
- \* pool de ácidos biliares desconjugados (padrão 2), contendo 10mg de cada um dos seguintes componentes; ác. cólico, ác. quenodeoxicólico, ác. deoxicólico e ác. litocólico.

## **b) Preparo das Amostras**

Amostras de 0,5 ml de aspirado intestinal de cada paciente foram centrifugadas a 5.000 r.p.m. durante 20 minutos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante foi adicionado de metanol, num volume 3 vezes maior. Esta solução foi aquecida a 90°C em banho maria até restar volume residual equivalente a 1/3 do original, contendo os ácidos biliares concentrados.

## **c) Procedimento**

Foi demarcada previamente nas laterais da placa de Sílica-Gel Merck F-254, a linha zero, calculada para ficar 1,5 cm acima da superfície da

solução solvente da câmara. Outras demarcações laterais foram feitas 6,0 cm acima da linha zero e 13,0 cm acima da linha zero (FIGURA 5).

Após ativação da placa à temperatura de 100°C durante uma hora, alíquotas de 5mL obtidas com micropipeta do padrão 1 e do padrão 2 e alíquotas de 20mL dos concentrados de aspirado intestinal de 4 pacientes, foram aplicadas sobre a linha zero, com distâncias de 3 cm entre cada ponto de aplicação.

A placa foi então colocada na câmara de cromatografia saturada com a solução solvente I, à temperatura ambiente. Quando a linha do solvente subiu até 13 cm acima da linha zero, a placa foi retirada da câmara e secada com ar frio corrente durante 3 minutos. A placa foi a seguir colocada na segunda câmara cromatográfica, saturada com a solução solvente II, e ali mantida até a linha do solvente subir à marca de 6 cm acima da linha zero. Retirou-se a placa, que foi a seguir mantida por 1 a 2 minutos numa estufa a 70 a 80°C. Em seguida, a placa foi borrifada com spray do reagente específico. A placa foi então aquecida na estufa a 70 a 80°C, por 10 a 20 minutos, tempo no qual a manchas coloridas dos vários componentes biliares foram se tornando visíveis.

A determinação da presença de cada ácido biliar nas 4 amostras de pacientes foi através da avaliação do valor Rf e da coloração de cada mancha, comparados com os valores Rf e colorações das manchas obtidas sobre os padrões 1 e 2. O valor Rf foi calculado como a porcentagem da distância percorrida pelo ácido biliar desde a linha zero até a mancha, em relação aos 13 cm percorridos pelo solvente I.

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida}}{13\text{cm}} \times 100$$

A Tabela 1 revela os valores Rf e cores dos ácidos biliares obtidos nas placas de cromatografia na linha dos padrões 1 e 2.

Como os ácidos quenodeoxicólico e deoxicólico conjugados à taurina e à glicina apresentam valores Rf semelhantes, sua presença era detectada pela coloração da mancha, vermelho ou verde. Quando ambos estivessem presentes, esperava-se observar uma mistura das duas cores (vermelho-esverdeada).

Apenas foram levadas em conta as manchas de intensidade média e forte. Aquelas de intensidade fraca e duvidosa foram desconsideradas durante a observação.

TABELA 1. Valores Rf e cores dos ácidos biliares observados na placa de cromatografia na linha dos padrões 1 e 2.

ÁCIDO BILIAR	Rf (%)	COR
ác. taurocólico	10	verde
ác. tauroquenodeoxicólico	14	vermelho
ác. taurodeoxicólico	16	verde
ác. glicocólico	23	verde
ác. glicoquenodeoxicólico	30	vermelho
ác. glicodeoxicólico	32	verde
ác. cólico	47	amarelo
ác. quenodeoxicólico	58	vermelho
ác. deoxicólico	62	amarelo
ác. litocólico	74	vermelho claro

## **d) Interpretação dos achados**

### **d.1. Ácidos Biliares Conjugados:**

- \* primários conjugados com taurina: ác. taurocólico -  
ác. tauroquenoodeoxicólico
- \* primários conjugados com glicina: ác. glicocólico - ác.  
glicoquenoodeoxicólico
- \* secundários conjugados: ác. taurodeoxicólico - ác.  
glicodeoxicólico

### **d.2. Ácidos Biliares Desconjugados:**

- \* primários desconjugados: ác. cólico - ác. quenoodeoxicólico
- \* secundários desconjugados: ác. deoxicólico - ác. litocólico

## **2.4. Métodos Estatísticos**

Para análise dos resultados foram utilizados testes não paramétricos, devido à natureza das distribuições ou variabilidade dos valores das medidas observadas. Foi aplicado o teste do quiquadrado para tabelas RxS (SIEGEL, 1975) com a finalidade de comparar os três grupos em relação à presença de proliferação de enterobactérias aeróbias e em relação à presença de ácidos biliares desconjugados no intestino delgado. Foi aplicado o teste do quiquadrado para tabelas 2x2, e quando necessário o teste exato de Fisher (SIEGEL, 1975), com a finalidade de estudar as associações entre as diversas variáveis analisadas.

Em todos os testes fixou-se em 0,05 ou 5% ( $\alpha < 0,05$ ) o nível para rejeição da hipótese de nulidade.



## **IV. RESULTADOS**

## 1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PACIENTES:

Na Tabela 2 são demonstradas, para os 3 grupos de pacientes, as médias e variações de idade, distribuição do sexo, incidência de desmame precoce, internações prévias, estado nutricional de acordo com o critério de Gomez, tempo de diarreia no momento da inclusão no estudo e presença de enteropatógenos na coprocultura.

TABELA 2. Características gerais dos pacientes do grupo I (diarreia aguda), grupo II (diarreia persistente) e grupo III (enteropatia ambiental assintomática).

Características Gerais	GRUPO I n=23	GRUPO II n=17	GRUPO III n=34
idade (meses)- média (DP)	3,8 (2,7)	4,3 (2,2)	6,1 (2,1)
sexo masculino	13 (57%)	10 (59%)	14 (41%)
desmame precoce	todos	todos	todos
condições desfavoráveis de vida	19 (83%)	14 (82%)	todos (100%)
internações prévias	10 (43%)	9 (53%)	11 (33%)
tempo médio de diarreia (dias)	6,6	23,4	-
estado nutricional (Gomez)			
* eutrofia	1 (4%)	2 (12%)	7 (21%)
* desnutrição grau I	5 (22%)	5 (29%)	14 (41%)
* desnutrição grau II	10 (44%)	3 (18%)	10 (29%)
* desnutrição grau III	7 (30%)	7 (41%)	3 (9%)
enteropatógenos nas fezes	11 (48%)	8 (47%)	5 em 27 (19%)

A média de idade no grupo com enteropatia ambiental assintomática foi 2 meses superior em relação aos 2 grupos de portadores de diarreia (6,1 meses contra 3,8 e 4,3 meses). O sexo masculino predominou nos dois grupos com diarreia, enquanto o sexo feminino predominou no grupo assintomático.

No momento da participação no estudo, todos os lactentes dos 3 grupos haviam sido precocemente desmamados. Condições desfavoráveis de vida (habitação precária, saneamento básico incompleto e renda familiar abaixo de 1 salário mínimo per capita) estavam presentes em 83% dos pacientes do grupo I, em 82% dos pacientes do grupo II e em todos os pacientes do grupo III. O número de pacientes com internações prévias, principalmente por diarreias e infecções respiratórias, foi grande nos 3 grupos, maiormente no grupo II, onde mais de 50% haviam sido hospitalizados previamente.

O tempo de diarreia, no momento da inclusão no estudo, variava de 2 a 13 dias (média de 6,6 dias) no grupo I e de 14 a 67 dias (média de 23,4 dias) no grupo II. No grupo III os pacientes estavam assintomáticos.

A incidência de desnutrição foi elevada nos 3 grupos, predominando as formas de desnutrição moderada no grupo I (44% dos pacientes), grave no grupo II (41% dos pacientes) e leve no grupo III (41% dos pacientes). A coprocultura demonstrou a presença de enteropatógenos com maior frequência nos pacientes portadores de diarreia, em comparação com os pacientes assintomáticos.

## 2. CULTURA E CONTAGEM DE COLÔNIAS DO ASPIRADO

### INTESTINAL:

Nos anexos I, II e III são apresentados os achados microbiológicos da cultura do aspirado intestinal respectivamente dos pacientes dos grupos I, II e III.

Proliferação de enterobactérias aeróbias esteve presente no intestino delgado em 18/23 (78%) lactentes com diarreia aguda (grupo I), em 12/17 (71%) lactentes com diarreia persistente (grupo II) e em 20/32 (63%) lactentes com enteropatia ambiental assintomática (grupo III), não havendo diferença significativa entre os 3 grupos ( $p > 0,05$ ) (TABELA 3).

TABELA 3. Presença de proliferação de enterobactérias aeróbias no intestino delgado entre os pacientes do grupo I, grupo II e grupo III.

GRUPO	aeróbios presentes	aeróbios ausentes	total
I	18 (78,3%)	5 (21,7%)	23
II	12 (70,6%)	5 (29,4%)	17
III	20 (62,5%)	12 (37,5%)	32
total	50 (69,4%)	22 (30,6%)	72

#### QUI QUADRADO

$$X^2 = 1,58 \quad X^2 = (2\text{gl}; 5\%) = 5,99$$

$$p > 0,05$$

Proliferação de enterobactérias anaeróbias no intestino delgado esteve presente em 10/23 (44%) dos lactentes do grupo I e em 7/17 (41%)

lactentes do grupo II, não havendo diferença significativa entre os 2 grupos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4).

TABELA 4. Presença de proliferação de enterobactérias anaeróbias no intestino delgado entre os pacientes dos grupo I e II.

GRUPO	anaeróbios presentes	anaeróbios ausentes	total
I	10 (43,5%)	13 (56,5%)	23
II	7 (41,2%)	10 (58,8%)	17
total	17 (42,5%)	23 (57,5%)	40

#### QUI QUADRADO

$$X^2 = 0,02 \quad X^2 = (1gl; 5\%) = 3,84$$

$$p > 0,05$$

Na figura 6 são apresentados os achados microbiológicos e contagem de colônias de enterobactérias aeróbias e anaeróbias no aspirado duodenal dos pacientes do grupo I, e na figura 7 os mesmos achados referentes ao grupo II.

Na figura 8 são apresentados os achados microbiológicos e contagem de colônias de enterobactérias aeróbias no aspirado intestinal de 32 dos 34 pacientes do grupo III.



FIGURA 8. Enterobactérias aeróbias isoladas e contagem de colônias no aspirado duodenal dos lactentes do grupo III.

enterobactéria	N = 32	contagem de colônias (org/ml)								
	número de casos	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>
<i>E. coli</i>	5									
<i>Klebsiella sp</i>	1									
<i>Enterobacter sp</i>	3									
<i>Pseudomonas sp</i>	12									
<i>Proteus sp</i>	2									
<i>Citrobacter sp</i>	1									

Os aeróbios mais isolados nos 3 grupos foram *E. coli* em 28 pacientes, *Pseudomonas sp* em 14, *Klebsiella sp* em 13 e *Enterobacter sp* em 9.

Os anaeróbios mais isolados nos grupos I e II foram *Bacteroides sp* em 9 casos, *Veillonella sp* em 5 e *Clostridium sp* em 3. *Lactobacillus sp*, pesquisado nestes 2 grupos e presente em 12 pacientes, cresceu sempre melhor nas placas de cultura para anaeróbios estritos.

### 3. CROMATOGRAFIA DE ÁCIDOS BILIARES

Nos anexos IV, V e VI estão sinalizados os ácidos biliares isolados qualitativamente através de cromatografia de camada delgada, respectivamente referentes aos pacientes dos grupos I, II e III.

As figuras 9, 10 e 11 (p. 49, 50 e 51) permitem observar imagens representativas de 3 das 19 placas de cromatografia processadas, sendo este o modo como elas ficaram após a realização do procedimento.

Na Tabela 5 estão listados os ácidos biliares conjugados e desconjugados achados nos grupos I, II e III e no total de pacientes.

TABELA 5. Ácidos biliares conjugados e desconjugados encontrados no intestino delgado dos pacientes dos grupos I, II, III e no total.

Ácidos biliares	grupo I n=23	grupo II n=17	grupo III n=34	total n=74
ác. taurocólico	7	2	10	19
ác. tauroquenodeoxicólico	12	10	16	38
ác. taurodeoxicólico	0	0	0	0
ác. glicocólico	19	11	27	57
ác. glicquenodeoxicólico	19	11	28	58
ác. glicodeoxicólico	1	0	1	2
ác. cólico	3	4	7	14
ác. quenodeoxicólico	2	0	2	4
ác. deoxicólico	0	0	1	1
ác. litocólico	1	1	3	5
número (%) de pacientes com ácidos biliares desconjugados	4 (17,4%)	5 (29,4%)	10 (29,4%)	19 (25,7%)

Os ácidos biliares primários conjugados com taurina (ác. taurocólico e ác. tauroquenodeoxicólico) estiveram significativamente menos presentes ( $p < 0,001$ ) nos 74 pacientes do que os ácidos biliares primários conjugados com glicina (ác. glicocólico e ác. glicquenodeoxicólico) (TABELA 6). Na tabela 5 pode-se ver que esta proporção foi absolutamente similar nos 3 grupos. Ácidos biliares secundários conjugados foram detectados na forma de ác. glicodeoxicólico em 2 pacientes, 1 do grupo I e 1 do grupo III.



Em relação aos ácidos biliares metabolizados por bactérias, houve presença de ác. cólico em 14 pacientes, ác. quenodeoxicólico em 4 pacientes, ác. deoxicólico em 1 paciente e ác. litocólico em 5 pacientes (TABELA 5).

TABELA 6. Comparação de achados de ácidos biliares primários conjugados com taurina (57 em 148 possíveis) com achados de conjugados com glicina (115 em 148 possíveis), nos 74 pacientes.

	presentes	ausentes	total máximo possível
conjugados com taurina	57 (38,5%)	91 (61,5%)	148
conjugados com glicina	115 (77,7%)	33 (22,3%)	148
total	172 (58,1%)	124 (41,9%)	296

#### QUI QUADRADO

$$X^2 = 46,687 \quad * \quad X^2 = (1 \text{ gl}; 5\%) = 3,841$$

$$p < 0,001$$

A Tabela 7 demonstra o número e porcentagem de pacientes que apresentaram ácidos biliares desconjugados e  $7\alpha$ -desidroxilados nos 3 grupos de pacientes. Dos 74 lactentes, 19 (25,7%) revelaram presença de ácidos biliares desconjugados, sendo da seguinte forma sua distribuição nos 3 grupos: 4 (17,4%) dos 23 pacientes do grupo I; 5 (29,4%) dos 17 pacientes do grupo II; 10 (29,4%) dos 34 pacientes do grupo III. Apesar dos grupos II e III apresentarem maior incidência de pacientes portadores de ácidos biliares metabolizados por bactérias no intestino delgado (29,4% em cada) em relação ao grupo I (17,4%), não houve diferença significativa na comparação entre os grupos II e III e o grupo I ( $p > 0,05$ ).

Nos 40 pacientes dos grupos I e II, submetidos à cultura de anaeróbios no aspirado intestinal, foi avaliada a correlação entre o isolamento de enterobactérias anaeróbias e presença de ácidos biliares desconjugados (Tabela 8).

Os ácidos biliares desconjugados estiveram presentes em 4 (23,5%) dos 17 pacientes que mostraram crescimento de bactérias anaeróbias e em 5 (21,7%) dos 23 pacientes isentos de bactérias anaeróbias na cultura, não havendo diferença significativa entre as duas situações ( $p>0,05$ ).

TABELA 7. Número de pacientes portadores de ácidos biliares desconjugados no intestino delgado nos grupos I, II e III.

GRUPO	com AB desconjugados	sem AB desconjugados	total
I	4 (17,4%)	19 (82,6%)	23
II	5 (29,4%)	12 (70,6%)	17
III	10 (29,4%)	24 (70,6%)	34
total	19 (25,7%)	55 (74,3%)	74

QUI QUADRADO

$$X^2 = 1,20 \quad X^2 = (2gl; 5\%) = 5,99$$

$p>0,05$

TABELA 8. Correlação entre presença de enterobactérias anaeróbias no aspirado intestinal e achado de ácidos biliares desconjugados, nos pacientes dos grupos I e II.

anaeróbios	com AB desconjugados	sem AB desconjugados	total
presentes	4 (23,5%)	13 (76,5%)	17
ausentes	5 (21,7%)	18 (78,3%)	23
total	9 (22,5%)	31 (77,5%)	40

Teste Exato de Fisher

$$p = 0,5936$$

Analisou-se a correlação entre o isolamento de enterobactérias anaeróbias e/ou *Lactobacillus sp* nos grupos I e II com a presença de ácidos biliares desconjugados (Tabela 9). Estes ácidos biliares estiveram presentes no aspirado intestinal de 6 (26,1%) dos 23 pacientes portadores destes microrganismos e em 3 (17,7%) dos 17 pacientes negativos para estas bactérias ( $p>0,05$ ).

TABELA 9. Correlação entre presença de enterobactérias anaeróbias e/ou *Lactobacillus sp* no aspirado intestinal e achado de ácidos biliares desconjugados, nos pacientes dos grupos I e II.

anaeróbios e/ou <i>Lactobacillus sp.</i>	com AB desconjugados	sem AB desconjugados	total
presentes	6 (26,1%)	17 (73,9%)	23
ausentes	3 (17,6%)	14 (82,4%)	17
total	9 (22,5%)	31 (77,5%)	40

Teste de Fisher  
 $p = 0,4064$

Nos 74 pacientes dos 3 grupos foi avaliada a correlação entre o isolamento de enterobactérias aeróbias no intestino delgado e a presença de ácidos biliares desconjugados (Tabela 10). Estes estiveram presentes em 13 (26%) dos 50 pacientes que revelaram crescimento de enterobactérias aeróbias e em 6 (25%) dos 24 pacientes nos quais não houve isolamento destas bactérias no intestino delgado ( $p > 0,05$ ).

TABELA 10. Correlação entre presença de enterobactérias aeróbias no intestino delgado e achado de ácidos biliares desconjugados, nos 74 pacientes dos 3 grupos.

aeróbios	com AB desconjugados	sem AB desconjugados	total
presentes	13 (26,0%)	37 (74,0%)	50
ausentes	6 (25,0%)	18 (75,0%)	24
total	19 (25,7%)	55 (74,3%)	74

Qui Quadrado  
 $X^2 = 0,008$        $X^2 = (1gl; 5\%) = 3,841$   
 $p > 0,05$

A análise do mesmo tipo de correlação, dentro dos grupos I e II (TABELA 11), revelou que ácidos biliares desconjugados estiveram presentes em 7 (23,3%) dos 30 pacientes que revelaram crescimento de enterobactérias aeróbias e

em 2 (20%) dos 10 pacientes nos quais não houve isolamento destas bactérias no intestino delgado ( $p>0,05$ ).

TABELA 11. Correlação entre presença de enterobactérias aeróbias no intestino delgado e achado de ácidos biliares desconjugados, nos 40 pacientes dos grupos I e II.

Aeróbios	com AB desconjugados	sem AB desconjugados	total
presentes	7 (23,3%)	23 (76,7%)	30
ausentes	2 (20,0%)	8 (80,0%)	10
total	9 (22,5%)	31 (77,5%)	40

Teste Exato de Fisher  
 $p = 0,6014$

No grupo III, ácidos biliares desconjugados foram detectados em 6 (30%) dos 20 pacientes que revelaram crescimento de enterobactérias aeróbias e em 4 (33,3%) dos 12 pacientes nos quais não houve isolamento destas bactérias no intestino delgado ( $p>0,05$ ) (Tabela 12). Os 2 pacientes nos quais a cultura do aspirado não foi realizada não apresentaram ácidos biliares desconjugados em suas amostras.

Em 7 pacientes, 3 do grupo I, 2 do grupo II e 2 do grupo III, não foram observadas manchas nítidas referentes a qualquer ácido biliar. Em todos estes casos foram observados apenas traços duvidosos, não tendo sido, deste modo, levados em consideração.

TABELA 12. Correlação entre presença de enterobactérias aeróbias no intestino delgado e achado de ácidos biliares desconjugados, nos 32 pacientes do grupo III.

aeróbios	com AB desconjugados	sem AB desconjugados	total
presentes	6 (30,0%)	14 (70,0%)	20
ausentes	4 (33,3%)	8 (66,7%)	12
total	10 (31,3%)	22 (68,7%)	32

Teste Exato de Fisher  
 $p = 0,5727$

## **V. DISCUSSÃO**

### **VALIDADE DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA UTILIZADO:**

As técnicas tradicionais de cromatografia de camada delgada, para separação e identificação de ácidos biliares na secreção intestinal, são métodos qualitativos que apresentam duas limitações principais: 1) não conseguem separar, por apresentarem o mesmo valor Rf, ácidos biliares dihidroxilados (ácido quenodeoxicólico e ácido deoxicólico), conjugados com glicina ou taurina (CHALLACOMBE et al., 1979); 2) a sensibilidade é baixa e não permite detectar visualmente os ácidos biliares presentes em concentrações abaixo de certos limites (VAN DEN ENDE et al., 1983).

Vários métodos de semiquantificação dos ácidos biliares separados por cromatografia de camada delgada foram utilizados até hoje. Destacam-se entre eles o método enzimático (AMENT et al., 1972; MALLORY et al., 1973; NORTHFIELD et al., 1973; SENGER et al., 1986), o método de espectrofotometria (TABAQCHALI et al., 1968; SCHNEIDER & VITERI, 1974b; NIESSEN et al., 1984) e o método de fluorimetria (HEUBI et al., 1981).

Segundo BEHER et al. (1982), a semiquantificação de ácidos biliares a partir da cromatografia de camada delgada é difícil de ser feita com precisão por dois motivos: a) geralmente vários ácidos biliares estão presentes em quantidades muito pequenas no cromatograma; b) em amostras biológicas há diversas impurezas que interferem na precisão do método.

Por outro lado, as técnicas de cromatografia líquido-gasosa, apesar de mais sensíveis e precisas na quantificação, são muito complexas e

dispendiosas, além de não poderem diferenciar os ácidos biliares conjugados com glicina e taurina (VAN DEN ENDE et al., 1982).

Deste modo, justificou-se a adoção da cromatografia de camada delgada na presente investigação, sem recursos de quantificação dos ácidos biliares. A aplicação do método de GOSWAMI & FREY (1974), diferentemente de outros métodos de cromatografia de camada delgada, permite a distinção entre os ácidos biliares dihidroxilados (ácido quenodeoxicólico e ácido deoxicólico), conjugados com glicina ou taurina, uma vez que as cores estampadas por ambos são diferentes.

A outra limitação do método, que diz respeito a determinação apenas de presença ou ausência de cada ácido biliar, não anula de modo nenhum o valor da pesquisa. NORTHFIELD et al. (1973) demonstraram que os aspectos qualitativos da cromatografia de camada delgada são satisfatórios. Naquele estudo, o achado de ácidos biliares desconjugados e/ou  $7\alpha$ -desidroxilados sempre correspondeu à presença de alta concentração destes, evidenciada na quantificação. Falsos-positivos não ocorrem. Por outro lado, em 11 pacientes com elevada concentração de ácidos biliares desconjugados, comprovada por quantificação, apenas em um caso não houve evidência visual na placa de cromatografia, caracterizando apenas um falso-negativo em onze.

Os estudos nos quais foram relatadas avaliações qualitativas da cromatografia de camada delgada para ácidos biliares, na secreção de intestino delgado, constataram que em indivíduos sadios nunca é detectada a presença de ácidos biliares desconjugados e  $7\alpha$ -desidroxilados. Deste modo, os ácidos biliares desconjugados, primários ou secundários, estiveram visualmente ausentes em



todos os adultos e crianças saudáveis nas seguintes investigações: 8 adultos avaliados por ROSENBERG et al. (1967); 11 adultos por NORTHFIELD et al. (1973); 8 adultos por TANDON et al. (1977); 16 adultos por TANGERMAM et al. (1986); 20 recém-nascidos e 14 lactentes entre 10 dias e 7 meses de vida, por CHALLACOMBE et al. (1975); e 8 lactentes e 24 crianças maiores por NIESSEN et al. (1979), sendo que estes últimos investigadores quantificaram em 0,5% do total de ácidos biliares, a parte que diz respeito aos ácidos biliares desconjugados.

Fica portanto evidente que em todos os casos nos quais qualitativamente se detecta a presença de ácidos biliares desconjugados em amostra de intestino delgado, existe de fato importante aumento na concentração dos mesmos, caracterizando um desequilíbrio metabólico na circulação êntero-hepática. Sendo assim, dispensou-se neste trabalho a formação de grupo controle, composto por lactentes sadios, eutróficos e de boas condições sócio-econômicas, nos quais sempre haveria ausência de ácidos biliares desconjugados.

### **ÁCIDOS BILIARES CONJUGADOS COM GLICINA OU TAURINA:**

Nos 74 pacientes deste estudo, foi constatada a presença duas vezes mais frequente de ácidos biliares primários conjugados com glicina (ácido glicocólico e ácido glicoquenodeoxicólico), do que de ácidos biliares primários conjugados com taurina (ácido taurocólico e ácido tauroquenodeoxicólico). Nos 3 grupos de pacientes esta relação foi absolutamente igual.

Fisiologicamente, o achado de ácidos biliares conjugados com glicina predominando sobre os conjugados com taurina é o habitual. A relação de concentração glicina/taurina em lactentes saudáveis varia de 1,7 a 3,0/1, conforme estudos de CHALLACOMBE et al. (1979), NIESSEN et al. (1984) e SENGER et al. (1986). A maioria dos estudos em crianças e adultos portadores de doenças que cursam com proliferação bacteriana no intestino delgado, demonstram que a perda de ácidos biliares conjugados com taurina é maior que a perda dos conjugados com glicina e, deste modo, aumenta ainda mais a relação glicina/taurina (TABAQCHALI et al., 1968; MALLORY et al., 1973; SCHNEIDER & VITERI, 1974b; CUPELLO et al., 1979).

STELLWAG & HYLEMON (1976), demonstraram que cada enterobactéria produz enzimas com características físico-químicas próprias, possuindo poder de hidrólise diferente. Ao que tudo indica, na proliferação bacteriana no intestino delgado, as enterobactérias anaeróbias hidrolisam mais facilmente os conjugados de taurina que os conjugados de glicina, fazendo aumentar a relação glicina/taurina.

No presente estudo, este aumento não pôde ser confirmado, por dois motivos: a) ausência de um grupo controle para comparação com os três grupos enfermos; b) a detecção qualitativa dos ácidos biliares conjugados com glicina e taurina não permite conhecer sua concentração, e deste modo a relação matemática não pode ser conhecida.

Dos 74 lactentes estudados, ácido glicodeoxicólico, um ácido biliar secundário conjugado com glicina, foi encontrado em apenas dois pacientes,

um com diarreia aguda e um com enteropatia ambiental assintomática. Ácido taurodeoxicólico não esteve presente em nenhum paciente.

HEPNER et al. (1973) demonstraram que a reação enzimática de 7 $\alpha$ -desidroxilação promovida por bactérias é facilmente realizada sobre o ácido cólico, formando-se comumente ácido deoxicólico. Ocasionalmente ocorre esta reação sobre o ácido glicocólico, formando-se ácido glicodeoxicólico. Não conseguiram, no entanto, demonstrar esta reação sobre o ácido taurocólico, de modo que não se forma, em condições naturais, ácido taurodeoxicólico. GOSWAMY & FREY (1974) encontraram ácido glicodeoxicólico na bile de alguns adultos, porém o ácido taurodeoxicólico não foi detectado em nenhum caso. MIDTVEDT & NORMAN (1968) não encontraram bactérias capazes de 7 $\alpha$ -desidroxilar o ácido glicocólico e o ácido taurocólico, não conseguindo obter *in vitro* ácido glicodeoxicólico e ácido taurodeoxicólico.

Além disso, STELLWAG & HYLEMON (1976) demonstraram que enzimas bacterianas têm grande afinidade por hidrolisar conjugados de glicina ou taurina com o ácido deoxicólico, sendo mais fraca esta afinidade com o ácido cólico. Isto indica que o pouco ácido glicodeoxicólico que se forma é rapidamente desconjugado pelas bactérias.

### **ÁCIDOS BILIARES DESCONJUGADOS:**

Os ácidos biliares desconjugados primários (ácido cólico e ácido quenodeoxicólico) e secundários (ácido deoxicólico e ácido litocólico), estiveram presentes na secreção intestinal em 19 (25,7%) dos 74 lactentes

estudados. Entre os 23 pacientes com diarreia aguda houveram 4 casos positivos (17,4%), entre os 17 com diarreia persistente 5 casos (29,4%) e entre os 34 pacientes com enteropatia ambiental assintomática 10 casos (29,4%). Em relação à porcentagem de presença de ácidos biliares desconjugados, não houve diferença significativa entre os grupos estudados, mesmo ao se comparar a soma dos grupos II e III, com 29,4% de amostras positivas, e o grupo I, com 17,4% de amostras positivas.

Ácido cólico esteve presente em 14 pacientes, ácido quenodeoxicólico em 4, ácido deoxicólico em 1 e ácido litocólico em 5.

NIESSEN et al. (1984) demonstraram que nas doenças em que aumenta a formação de ácido litocólico, é alta sua concentração na forma sulfatada, a qual necessita técnica especial de cromatografia para sua detecção. Devido ao grande efeito tóxico do ácido litocólico, altamente lesivo para as membranas celulares, o fígado desempenha com eficiência a importante função de sulfatação deste ácido biliar monohidroxilado, de modo a inibir seus efeitos lesivos (NIESSEN et al., 1984).

O ácido deoxicólico nos adultos corresponde a aproximadamente 24% do total de ácidos biliares na circulação entero-hepática (HOFMAN, 1976). Em crianças, no entanto, atinge porcentagem muito mais baixa em relação ao total de ácidos biliares. Sua proporção foi de 8,5% no estudo de HEUBI et al. (1980) e entre 3 a 13% no estudo de NIESSEN et al. (1984). Talvez por este motivo tenha sido evidenciado em apenas 1 paciente dos 74 aqui estudados. TABAQCHALI et al. (1968) sugeriram que a raridade de achados de ácido quenodeoxicólico e ácido deoxicólico no aspirado intestinal, quando comparados ao

ácido cólico, se deve ao fato de que os ácidos biliares dihidroxilados são absorvidos muito rapidamente no duodeno, o que não ocorre com o ácido cólico.

a) ÁCIDOS BILIARES DESCONJUGADOS NA DIARRÉIA AGUDA:

Os 23 lactentes com diarréia aguda aqui apresentados, estavam internados para tratamento de complicações hidroeletrólíticas. Seu estado nutricional denunciava predomínio de desnutrição moderada. O desmame precoce em todos os casos, as condições sócio-econômicas geralmente precárias e um índice de 43% de hospitalizações anteriores, são características semelhantes às dos outros dois grupos deste estudo. Neste grupo, apenas 4 pacientes apresentaram ácidos biliares desconjugados na secreção intestinal.

REDMOND et al. (1972), na África do Sul, realizando cromatografia de camada delgada, detectaram ácidos biliares desconjugados no intestino delgado em duas dentre 10 crianças com diarréia aguda grave. CUPELLO et al. (1977), no México, demonstraram que na diarréia aguda por EPEC ou sem enteropatógenos identificados, a porcentagem de ácidos biliares desconjugados corresponde em média a 26% do total de ácidos biliares no intestino, ou seja, muito mais do que os 3% do total de ácidos biliares nas crianças assintomáticas. Não foram encontrados na literatura outros estudos de ácidos biliares no intestino delgado na diarréia aguda, seja em crianças ou em adultos.

b) ÁCIDOS BILIARES DESCONJUGADOS NA DIARRÉIA PERSISTENTE:

Os 17 lactentes portadores de diarréia persistente estavam internados devido à difícil manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico e seu estado

nutricional, mais deteriorado, denunciava predomínio de desnutrição grave. Do mesmo modo que nos outros dois grupos, todos os pacientes sofreram desmame precoce, era alta a incidência de condições sócio-econômicas precárias e 53% deles haviam sofrido internação prévia. Cinco destes pacientes apresentaram ácidos biliares desconjugados na secreção intestinal.

NAHMOD et al. (1980), na Argentina, realizando cromatografia de camada delgada, detectaram ácidos biliares desconjugados nas amostras intestinais em 7 dentre 10 lactentes e crianças portadoras de diarreia persistente, com mais de 21 dias de duração. CHALLACOMBE et al. (1979), estudando 5 lactentes com diarreia protraída, com mais de 14 dias de duração, detectaram a presença de ácido biliar desconjugado em apenas um paciente. Os achados um pouco discordantes destes 2 estudos, o pequeno número de pacientes estudados e a falta de outras investigações em crianças com diarreia persistente, resultam na pobreza de conhecimentos atuais a respeito da associação entre estes dois fenômenos.

SCHNEIDER & VITERI (1974a), realizando cromatografia de camada delgada e semiquantificação de ácidos biliares no intestino delgado em crianças internadas com diarreia e desnutrição grave, demonstraram que a concentração de ácidos biliares desconjugados foi em torno de 1,7mM/l. Nas mesmas crianças, em uma fase já sem diarreia, a concentração foi de 0,8mM/l. No entanto, o achado mais notável naquele estudo foi a grande diminuição na concentração total de ácidos biliares conjugados, que esteve em torno de 3,0mM/l nas crianças com diarreia e em torno de 8,3mM/l nas mesmas crianças já recuperadas da diarreia.

c) ÁCIDOS BILIARES DESCONJUGADOS NA ENTEROPATIA AMBIENTAL ASSINTOMÁTICA:

Os 34 pacientes com enteropatia ambiental assintomática, provinham de famílias de baixo nível sócio-econômico, com más condições de habitação. Faziam parte do estudo previamente publicado por MARTINS et al. (1991), em que 40 lactentes residentes em favela, em aleitamento artificial e sem manifestações gastrointestinais, foram submetidos a avaliação de alterações funcionais e morfológicas da mucosa jejunal. Os transtornos funcionais da mucosa intestinal foram demonstrados pela presença de D-Xilosemia na primeira hora com média de  $21,0 \pm 10 \text{mg\%}$ , pelo método de ROE & RICE (1948), significativamente inferior aos valores obtidos em crianças normais ( $46,0 \pm 14 \text{mg\%}$ ) (SILVESTRINI et al., 1981). As alterações morfológicas da mucosa foram observadas por biópsia de intestino delgado, com achados de atrofia vilositária variando de grau I a grau IV, conforme os critérios de SCHENK & KLIPSTEIN (1972). Em 22 (55%) dos 40 lactentes a atrofia vilositária foi de grau II, III ou IV.

Em outro estudo complementar (GUSMÃO et al., 1993), foram avaliadas as alterações ultra-estruturais por microscopia eletrônica, na mucosa intestinal de 28 dos mesmos 40 pacientes portadores de enteropatia ambiental assintomática. Demonstrou-se em 19 (67,8%) destas 28 biópsias a presença de uma ou mais das seguintes alterações: 1) encurtamento e alargamento das microvilosidades; 2) redução do número de microvilosidades; 3) microvilosidades em “tufos”, ou fundidas, ou fragmentadas, ou ausentes; 4) intensa vacuolização do

citoplasma; 5) alterações na estrutura das mitocôndrias, lisossomos e retículo endoplasmático; 6) ausência de glicocálix.

Estes 34 lactentes assintomáticos foram desmamados precocemente e um terço deles haviam sofrido hospitalização prévia. Seu estado nutricional era deficiente, predominando desnutrição leve. Vinte (63%) dos 32 pacientes deste grupo que foram submetidos à cultura e contagem de colônias do aspirado duodenal, revelaram-se portadores de proliferação de enterobactérias aeróbias no intestino delgado.

A pesquisa de ácidos biliares desconjugados no intestino delgado nos 34 pacientes com enteropatia ambiental assintomática resultou 10 amostras positivas (29,4%), sendo 7 pacientes portadores de ácido cólico, 2 de ácido quenodeoxicólico, 1 de ácido deoxicólico e 3 de ácido litocólico.

REDMOND et al. (1972), na África do Sul, realizaram pesquisa qualitativa de ácidos biliares desconjugados por cromatografia de camada delgada nas amostras de intestino delgado de 20 crianças com Kwashiorkor, sendo que 8 amostras (40%) resultaram positivas. Com metodologia semelhante, TANDON et al. (1977) detectaram ácidos biliares desconjugados nas amostras de aspirado duodenal em 2 de 5 adultos indianos assintomáticos, portadores de *Giardia lamblia* e enterobactérias no intestino delgado.

SCHNEIDER & VITERI (1974b), na Guatemala, estudando uma comunidade com más condições sócio-econômicas, realizaram cromatografia de camada delgada e semiquantificação de ácidos biliares em amostras de secreção duodenal de 18 crianças internadas com diarréia e desnutrição. Foram



colhidas amostras também na fase em que as crianças estavam sem diarreia e desnutridas e na fase em que estavam sem diarreia e em recuperação nutricional, ou recuperadas. Comparou-se os achados com 4 crianças eutróficas e assintomáticas da mesma comunidade, tomadas como controle. A concentração de ácidos biliares conjugados não estava muito diminuída nas crianças desnutridas, em relação aos controles. A concentração de ácidos biliares desconjugados não era muito diferente entre as duas situações nutricionais e os controles. A porcentagem de ácidos biliares desconjugados em relação ao total de ácidos biliares correspondia em média a 13% nos desnutridos, 8% nos recuperados ou em recuperação nutricional e 6% nas 4 crianças controle. Notoriamente, todas estas porcentagens médias são muito altas, pois NIESSEN et al. (1979) demonstraram em crianças que vivem em boas condições sócio-econômicas que os ácidos biliares desconjugados no intestino delgado giram em torno de 0,5% do total de ácidos biliares.

As crianças estudadas por SCHNEIDER & VITERI (1974a) eram portadoras de má absorção de gorduras, com baixa concentração micelar de lipídeos no aspirado intestinal. MATA et al. (1972) estudaram a microflora intestinal destas mesmas crianças e demonstraram alta incidência de proliferação bacteriana no intestino delgado nas crianças desnutridas, nas que estavam em recuperação nutricional e até mesmo nas 4 crianças eutróficas, tomadas como controle. SCHNEIDER & VITERI (1972) realizaram biópsias de intestino delgado nestas crianças e encontraram alta incidência de alterações morfológicas na mucosa, estando presentes estas alterações mesmo entre as 4 crianças tomadas como controle. Com base nestes estudos, concluíram os referidos autores que provavelmente a proliferação de enterobactérias no intestino delgado, as alterações nos ácidos biliares, a má absorção de gorduras e as lesões na mucosa intestinal,

presentes mesmo em crianças assintomáticas daquela comunidade, refletem as condições ecológicas desfavoráveis na Guatemala.

### **PROLIFERAÇÃO BACTERIANA NO INTESTINO DELGADO E ÁCIDOS BILIARES DESCONJUGADOS:**

Proliferação de enterobactérias aeróbias no intestino delgado ocorreu em 18 (78%) dos 23 pacientes com diarreia aguda e em 12 (71%) dos 17 pacientes com diarreia persistente. Nestes dois grupos foram feitas culturas também para enterobactérias anaeróbias, e a proliferação destas no intestino delgado ocorreu em 10 (44%) dos 23 pacientes do grupo I e em 7 (41%) dos 17 pacientes do grupo II. Esta semelhança na microflora intestinal entre lactentes e crianças portadoras de diarreia aguda e persistente foi também demonstrada nos estudos de STINTZING & MÖLLBY (1982), na Etiópia, e de BHAN et al. (1985, 1989), na Índia. Disso se conclui que as características qualitativas e quantitativas da microflora duodenal em crianças com diarreia independem da duração da doença.

Tentou-se correlacionar a presença de proliferação de anaeróbios no intestino delgado com a positividade de ácidos biliares desconjugados nas amostras duodenais dos 40 pacientes dos dois grupos com diarreia. Dos 17 pacientes portadores de enterobactérias anaeróbias no intestino delgado, 4 foram positivos para ácidos biliares desconjugados (23,5%), enquanto que dos 23 pacientes negativos para anaeróbios, 6 (21,7%) foram positivos para

ácidos biliares desconjugados, não havendo portanto correlação entre o isolamento de anaeróbios e o achado de ácidos biliares desconjugados no intestino delgado.

*Lactobacillus sp* sempre cresceram melhor nas placas para anaeróbios, podendo em alguns casos corresponder ao gênero *Eubacterium*, de difícil diferenciação com aqueles. Por isto tentou-se correlacionar o achado de ácidos biliares desconjugados com proliferação de *Lactobacillus sp* e/ou anaeróbios no intestino delgado, porém também aqui não houve qualquer indício de associação entre as duas situações.

Analisados em conjunto os 74 pacientes dos três grupos, foram detectados ácidos biliares desconjugados em 13 (26%) dos 50 pacientes portadores de enterobactérias aeróbias no intestino delgado e em 6 (25%) dos 24 pacientes sem estas bactérias. O mesmo tipo de análise feito separadamente nos grupos I e II e no grupo III, demonstrou não haver qualquer correlação entre o isolamento de aeróbios no intestino delgado e presença de ácidos biliares desconjugados.

São várias as explicações para os frequentes achados de proliferação bacteriana no intestino delgado com ausência de ácidos biliares desconjugados nas amostras dos lactentes estudados:

- 1) A intubação naso-duodenal é realizada no segmento mais proximal do intestino delgado e as enterobactérias, ou os ácidos biliares desconjugados, podem estar localizados abaixo deste ponto. CHALLACOMBE et al. (1979) sugeriram que a coleta de amostras deveria ser feita em vários segmentos do intestino delgado ao mesmo tempo, para aumentar as chances de achado de ácidos biliares desconjugados.

2) No momento da coleta a bile pode ter sido recém excretada, não tendo havido tempo para ação enzimática das bactérias sobre os ácidos biliares. Ou então, ao contrário, os ácidos biliares desconjugados já se formaram, mas estão ausentes por serem muito rapidamente absorvidos por transporte passivo no intestino delgado (TABAQCHALI et al., 1968).

3) Amostras colhidas em jejum, como neste estudo, são mais pobres em ácidos biliares desconjugados do que amostras pós-prandiais, como demonstrado por NORTHFIELD et al. (1973).

4) Desprezou-se, neste estudo, as manchas de intensidade fraca, ou duvidosas, e estas poderiam corresponder à presença de ácidos biliares desconjugados em razoável concentração, porém não suficiente para tingir a camada de sílica gel de modo evidente.

Por outro lado, há outro tipo de justificativa para os casos em cujas amostras se detecta a presença de ácidos biliares desconjugados mas as culturas são negativas para enterobactérias, especialmente anaeróbias. ROSENBERG et al. (1967) já haviam demonstrado haver pouca correlação entre o isolamento de enterobactérias em amostra única de aspirado intestinal e a existência de um real quadro sindrômico de proliferação bacteriana no intestino delgado. Ou seja, as alterações fisiopatogênicas que determinam o quadro sindrômico podem estar presentes sem que se isole as enterobactérias em amostra única.

Diversos estudos foram realizados com amostras duodenais de adultos portadores de síndrome de alça cega, cujo cultivo comprovava a presença

de proliferação de enterobactérias (TABAQCHALI & BOOTH, 1966; TABAQCHALI et al., 1968; AMENT et al., 1972; MALLORY et al., 1973; NORTHFIELD et al., 1973). Nestes pacientes foram frequentes os achados de concentrações elevadas de ácidos biliares desconjugados. No entanto, não foram incluídos nestes estudos pacientes enfermos cujo cultivo da secreção intestinal era negativo.

Estudo de KOCOSHIS et al. (1987), através de cromatografia líquido-gasosa, demonstrou elevada porcentagem de ácidos biliares desconjugados entre as 3 crianças com proliferação bacteriana anaeróbia no intestino delgado. Esta porcentagem não foi tão alta entre as 4 crianças portadoras de proliferação de enterobactérias aeróbias no intestino delgado. Foi ainda menos elevada entre as crianças sem enterobactérias no aspirado intestinal, porém com várias enfermidades do aparelho digestivo. Todavia, mesmo nestas crianças sem proliferação bacteriana identificada na cultura, a porcentagem total de ácidos biliares desconjugados foi muito acima do normal para crianças e lactentes saudáveis. Com isto, pode-se especular que crianças portadoras de enfermidades do aparelho digestivo, mesmo com cultura negativa na amostra do aspirado intestinal, podem possuir ácidos biliares desconjugados no intestino delgado em alta concentração.

Fora este estudo, não há outras publicações que relatem simultaneamente resultados de cultura e de cromatografia de ácidos biliares na secreção intestinal de crianças portadoras de diarreia ou enteropatia ambiental.

As amostras de secreção intestinal de 7 pacientes deste estudo, distribuídos igualmente nos três grupos, foram negativas para a presença de ácidos biliares. Não tem fundamento a argumentação de nestes casos ter havido mal posicionamento da extremidade do tubo, com coleta de secreção do estômago,

pois amostras de dois pacientes do grupo III foram negativas para ácidos biliares e, nestes casos, o posicionamento intestinal do tubo foi confirmado por radioscopia.

Uma hipótese para estes achados é a de que amostra duodenal de jejum, em alguns casos, pode-se encontrar com muito baixa concentração de ácidos biliares, pois, como demonstrado por NORTHFIELD et al. (1973), é no momento pós-prandial que os ácidos biliares estão em concentração mais alta. O mais provável, no entanto, é que em alguns casos haja grande queda no pool total de ácidos biliares devido a lesão da mucosa ileal, com grande perda fecal de ácidos biliares. HEUBI et al. (1979), em uma criança com diarréia protraída e TAZUME et al. (1990), em 9 crianças com diarréia aguda, demonstraram haver grande perda de ácidos biliares conjugados nas fezes destes pacientes. Se a perda é muito grande, ultrapassa a capacidade de síntese compensatória do fígado e, como resultado, cai a concentração de ácidos biliares em todos os níveis da circulação êntero-hepática.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS:**

A técnica de cromatografia de camada delgada empregada no presente trabalho, não é capaz de detectar ácidos biliares cetônicos. KOCOSHIS et al. (1987) demonstraram que na presença de proliferação de enterobactérias aeróbias no intestino delgado em crianças, os ácidos biliares cetônicos correspondem em média a um terço do total de ácidos biliares no duodeno. A

formação de ácidos biliares cetônicos também representa perda do poder de detergência, de modo a favorecer a ocorrência de esteatorréia.

Vários autores, por meio de administração de antimicrobianos por via oral, tentaram demonstrar a influência da proliferação bacteriana no intestino delgado na gênese de alterações nos ácidos biliares e esteatorréia. TABAQCHALI & BOOTH, (1966), ROSENBERG et al. (1967), TABAQCHALI et al. (1968) e AMENT et al. (1972) em adultos, e KOCOSHIS et al. (1987) em crianças, demonstraram em suas investigações que ao tratar pacientes portadores de proliferação bacteriana no intestino delgado com antimicrobianos por via oral, ocorre aumento na concentração de ácidos biliares conjugados, cai a concentração de ácidos biliares desconjugados, e a esteatorréia diminui ou desaparece. Os antimicrobianos administrados nestes vários estudos foram tetraciclina, ampicilina, sulfametoxazol e trimetoprim, colestina e metronidazol.

Quanto aos lactentes com diarréia aguda e persistente, investigados neste trabalho, notou-se que o perfil social de aproximadamente 80% deles era semelhante ao do grupo com enteropatia ambiental. Clinicamente sua situação era mais dramática, ficando claro que quanto maior a duração da diarréia mais comprometido é o estado nutricional do lactente, com predomínio de desnutrição mais grave entre os portadores de diarréia persistente. A incidência de hospitalizações anteriores foi maior no grupo com diarréia persistente, os quais eram em média um mês mais velhos que os pacientes do grupo com diarréia aguda. Talvez isto indique que muitos lactentes com diarréia persistente estejam num estágio mais avançado, tendo já passado pela mesma situação em que se encontram os pacientes com diarréia aguda.

As alterações morfológicas da mucosa intestinal em lactentes na vigência de diarreia são bastante pronunciadas e, em grande parte, isto pode ser atribuído à ação de agentes enteropatogênicos, como demonstrado por FAGUNDES NETO et al. (1985) e FAGUNDES NETO et al. (1989). Todavia, os mecanismos de lesão de mucosa nestes casos podem se dar também por ação prolongada de ácidos biliares desconjugados presentes no intestino delgado, já que muitos destes pacientes viviam em condições propícias para desenvolver enteropatia ambiental.

Na diarreia aguda, TAZUME et al. (1990) demonstraram haver grande perda fecal de ácidos biliares conjugados, o mesmo sendo observado por HEUBI et al. (1979) na diarreia protraída, talvez por lesão ileal e perda da capacidade de absorção dos mesmos. Com esta grande perda fecal de ácidos biliares conjugados, acima da capacidade compensatória de síntese hepática, estes pacientes desenvolvem esteatorreia porque sua concentração no intestino delgado cai abaixo da concentração micelar crítica, conforme demonstrado por SCHNEIDER & VITERI (1974a) e KOCOSHIS et al. (1987).

As características clínicas e laboratoriais dos 34 pacientes com enteropatia ambiental neste estudo foram: ausência de diarreia, alta incidência de desnutrição, D-xilosemia baixa, atrofia de vilosidades intestinais, alterações na ultra-estrutura dos enterócitos, proliferação bacteriana no intestino delgado e presença de ácidos biliares desconjugados na secreção duodenal. Eram lactentes desmamados precocemente, provenientes de famílias com baixa renda familiar e vivendo em condições de saneamento básico deficiente. FAGUNDES-NETO et al. (1981b) demonstraram ocorrer também má absorção de lipídeos em crianças com o mesmo perfil social.



Lactentes que vivem nestas condições e que desenvolvem sintomatologia exuberante, com diarreia crônica, diarreias agudas recidivantes e desnutrição grave, constituem a ponta do iceberg, conforme o modelo de enteropatia ambiental proposto por KLIPSTEIN, em 1967. Todo o contingente submerso do iceberg é composto por indivíduos assintomáticos, com anormalidades funcionais e morfológicas no intestino delgado.

A grande maioria da população infantil nas favelas dos grandes centros urbanos apresenta um quadro de desnutrição marginal e apatia social, com surtos ocasionais de diarreia. Foi a esta população que se destinaram os estudos de MARTINS et al. (1991), de GUSMÃO et al. (1993) e o presente estudo. Ácidos biliares desconjugados, primários ou secundários, em altas concentrações no intestino delgado, foram encontrados em vários destes pacientes. Se for considerado que a concentração elevada destas moléculas pode variar muito de um momento para outro e em cada segmento do intestino, é possível que todos estes lactentes sofram seus efeitos nocivos frequentemente. Pode-se especular que as transformações bacterianas dos ácidos biliares primários conjugados, no intestino delgado destas crianças, exerçam influência importante na gênese da desnutrição nestes lactentes.

Os mecanismos já descritos de achatamento de vilosidades e lesão de enterócitos provocado por ácidos biliares desconjugados podem explicar as alterações morfológicas encontradas nestes pacientes. A síndrome de má absorção daí decorrente, com má absorção ileal dos ácidos biliares conjugados, é possivelmente responsável pela queda da concentração destes no intestino delgado. Desta forma, a esteatorréia já documentada nestas populações se deve

aos ácidos biliares conjugados abaixo da concentração micelar crítica e à lesão de mucosa intestinal absorvedora. A expressão clínica de tudo isto é a carência de calorias para desempenho das funções orgânicas básicas e desvio das proteínas para outras funções, em detrimento do crescimento infantil, resultando em desnutrição crônica e apatia social.

Este quadro não se resolve com fornecimento gratuito de alimentos à população carente, através de programas governamentais de suplementação alimentar. Estes programas são ineficazes no que diz respeito à recuperação nutricional das crianças. Para que esta situação seja radicalmente revertida torna-se imperiosa a implementação de medidas político-sociais que modifiquem as condições de saneamento e de cuidados higiênicos destas populações.

## **VI. CONCLUSÕES**

1. Em grupos de lactentes com alta incidência de proliferação de enterobactérias no intestino delgado, como ocorre na diarreia aguda, diarreia persistente e enteropatia ambiental assintomática, o achado de ácidos biliares desconjugados e  $7\alpha$ -desidroxilados na secreção intestinal é muito frequente.

2. Não houve correlação direta entre o isolamento de enterobactérias aeróbias e/ou anaeróbias e presença de ácidos biliares desconjugados no lúmen do intestino delgado nestes grupos de pacientes, quando realizada análise qualitativa por cromatografia de camada delgada.

3. A alta frequência de achados de ácidos biliares desconjugados e  $7\alpha$ -desidroxilados, no duodeno de lactentes portadores de enteropatia ambiental assintomática, é muito provavelmente devida a proliferação de enterobactérias no intestino delgado neste grupo de pacientes. Este fenômeno é reflexo das condições sócio-econômicas e ambientais desfavoráveis, e representa um dos mecanismos mais importantes de má digestão-absorção e desnutrição nos países do Terceiro Mundo.

## VII. SUMMARY

---

Small-bowel (SB) bacterial overgrowth, mainly when anaerobes are present, leads to enzymatic reactions that modify the structure of conjugated primary bile acids. By deconjugation and  $7\alpha$ -dehydroxylation, bile acids capable of promoting functional and morphological derangements in the intestinal mucosa are formed.

Samples of duodenal fluid were collected from 74 infants: 23 with acute diarrhea (group I), 17 with persistent diarrhea (group II), and 34 with asymptomatic environmental enteropathy (group III). All samples were submitted to culture and colony counting for enterobacteriaceae, and bile acid thin-layer chromatography.

The incidence of overgrowth of enterobacteriaceae in the SB was very high in the 3 groups. Unconjugated bile acids were found in the SB in 19 (25,7%) of the 74 infants studied: 4 (17,4%) in group I, 5 (29,4%) in group II, and 10 (29,4%) in group III. The unconjugated bile acids found were: cholic acid (14 cases); chenodeoxycholic acid (4 cases); deoxycholic acid (1 case); lithocholic acid (5 cases). There was no correlation between bacterial isolates in the SB and the presence of unconjugated bile acids.

In conclusion, deconjugated and  $7\alpha$ -dehydroxylated bile acids are frequently present in duodenum of groups of infants with high incidence of SB bacterial overgrowth. Interestingly, this situation was present even in asymptomatic environmental enteropathic infants, and probably this is one of the mechanisms responsible by the poor nutritional state of children living in developing countries.

## **VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALBERT, M.J.; BHAT, P.; RAJAN, D.; MAIYA, P.P.; PEREIRA, S.M.; MATHAN, M.; BAKER, S.J. - Jejunal microbial flora of southern Indian infants in health and with acute gastroenteritis. **J. Med. Microbiol.**, **11**: 433-40, 1978.
- AMENT, M.E.; SHIMODA, S.S.; SAUNDERS, D.R.; RUBIN, C.E. - Pathogenesis of steatorrhea in three cases of small intestinal stasis syndrome. **Gastroenterology**, **63**: 728-47, 1972.
- ARGAO, E.A. & BALISTRERI, W.F. - Bile acid physiology and alterations in the enterohepatic circulation. In: WYLLIE, R. & HYAMS, J.S. - **Pediatric gastrointestinal disease: pathophysiology, diagnosis, management**. 1st. ed. Philadelphia, W.S. Saunders Company, 1993. p 31-45.
- BALISTRERI, W.F.; PARTIN, J.C. & SCHUBERT, W.K. - Bile acid malabsorption - a consequence of terminal ileal dysfunction in protracted diarrhea of infancy. **J. Pediatr.**, **90**: 21-8, 1977.
- BEHER, W.T.; STRADNIEKS, S. & LIN, G.J. - Thin-layer separation and quantification of bile acids. **Steroids**, **39**: 313-23, 1982.
- BERANT, M.; DIAMOND, E.; ALON, U.; MORDOCHOVITZ, D. - Effect of infusion of bile salts into the mesenteric artery in situ on jejunal mucosal transport function in dogs. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, **7**: 588-93, 1988.
- BERN, C.; MARTINES, J.; ZOYSA, I.; GLASS, R.I. - The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. **Bull. World Health Organ.**, **70**: 705-14, 1992.

- BHAT, P.; SHANTAKUMARI, S.; RAJAN, D.; MATHAN, V.I.; KAPADIA, C.R.; SWARNABAI, C.; BAKER, S.J. - Bacterial flora of the gastrointestinal tract in southern Indian control subjects and patients with tropical sprue. ***Gastroenterology*, 62**: 11-21, 1972.
- CHALLACOMBE, D.N.; RICHARDSON, J.M. & ANDERSON, C.M. - Bacterial microflora of the upper gastrointestinal tract in infants without diarrhoea. ***Arch. Dis. Child.*, 49**: 264-9, 1974a.
- CHALLACOMBE, D.N.; RICHARDSON, J.M.; ROWE, B.; ANDERSON, C.M. - Bacterial microflora of the upper gastrointestinal tract in infants with protracted diarrhoea. ***Arch. Dis. Child.*, 49**: 270-7, 1974b.
- CHALLACOMBE, D.N.; EDKINS, S. & BROWN, G.A. - Duodenal bile acids in infancy. ***Arch. Dis. Child.*, 50**: 837-43, 1975.
- CHALLACOMBE, D.N.; BROWN, G.A. & EDKINS, S. - Duodenal bile acids in infants with protracted diarrhoea. ***Arch. Dis. Child.*, 54**: 131-4, 1979.
- COLEMAN, R. - Bile salts and biliary lipids. ***Biochem. Soc. Trans.*, 15 (suppl.)**: 68s-80s, 1987.
- CRUZ, A.S. & FAGUNDES-NETO, U. - Técnica simples e rápida de intubação para obtenção de secreção jejunal. ***Arq. Gastroent.*, 30**: 69-72, 1993.
- CUPELLO, J.L.; RODRÍGUES, J.T.; FLORES, F.N.; HUAN, T.L.; SORIANO, H.; NICHOLS, B.L. - Motilidad, flujo intestinal y patrón de ácidos biliares en niños con síndrome diarreico. ***Rev. Chil. Pediatr.*, 48**: 27-33, 1977.



- DAWSON, A.M. & ISSELBACHER, K.J. - Studies on lipid metabolism in the small intestine with observations on the role of bile salts. *J. Clin. Invest.*, **39**: 730-40, 1960.
- DEMERS, L.M. & LLOYD-STILL, J.D. - Serum bile acids levels in protracted diarrhea of infancy. *Am. J. Dis. Child.*, **132**: 1001-3, 1978.
- DOMELLÖF, L.; REDDY, B.S. & WEISBURGER, J.H. - Microflora and deconjugation of bile acids in alkaline reflux after partial gastrectomy. *Am. J. Surg.*, **140**: 291-5, 1980.
- DRASAR, B.S.; SHINER, M. & MC LEOD, G.M. - Studies on the intestinal flora. I. the bacterial flora of the gastrointestinal tract in health and achlorhydric persons. *Gastroenterology*, **56**: 71-9, 1969.
- EJDERHAMN, J.; SAMUELSON, K. & STRANDVIK, B. - Serum primary bile acids in the course of celiac disease in children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **14**: 443-9, 1992.
- FAGUNDES-NETO, U.; REIS, M.H.L.; WEHBA, J.; SILVESTRINI, W.S.; TRABULSI, L.R. - Small bowel bacterial flora in normal and in children with acute diarrhea. *Arq. Gastroent.* **17**: 103-8, 1980.
- FAGUNDES-NETO, U.; TEICHBERG, S.; BAYNE, M.A.; MORTON, B.; LIFSHITZ, F. - Bile salt-enhanced rat jejunal absorption of macromolecular tracer. *Lab. Invest.*, **44**: 18-26, 1981a.

FAGUNDES-NETO, U.; VIARO, T.; WEHBA, J.; MACHADO, N.L.; PATRÍCIO, F.R.S.; MICHALANY, J. - Enteropatia tropical: alterações morfológicas e funcionais do intestino delgado e suas repercussões sobre o estado nutricional. **Arq. Gastroent., 18**: 177-82, 1981b.

FAGUNDES-NETO, U.; WEHBA, J.; VIARO, T.; MACHADO, N.L.; PATRÍCIO, F.R.S. - Protracted diarrhea in infancy: clinical aspects and ultrastructural analysis of the small intestine. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 4**: 714-22, 1985.

FAGUNDES-NETO, U.; FERREIRA, V.C.; PATRÍCIO, F.R.S.; MOSTAÇO, V.L.; TRABULSI, L.R. - Protracted diarrhea: the importance of the enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains and *Salmonella* in its genesis. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 8**: 207-11, 1989.

FASANO, A.; VERGA, M.C.; RAIMONDI, F.; GUANDALINI, S. - Effects of deconjugated bile acids on electrolyte and nutrient transport in the rabbit small intestine in vitro. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 18**: 327-33, 1994.

FERNÁNDEZ, C.C.; SASTRE, J.L.; GUTIÉRREZ, A.M.; ALVAREZ, R.M.; HERNÁNDEZ, M.C. - Flora bacteriana duodenal en niños malnutridos con diarrea aguda, intolerancia a carbohidratos e intolerancia a proteínas de la leche de vaca. **An. Esp. Pediatr., 16**: 312-7, 1982.

GOMEZ, F. - Desnutrición. **Bol. Med. Infant. Mex., 3**: 543-51, 1956.

GORBACH, S.L.; PLAUT, A.G.; NAHAS, L.; WEINSTEIN, L. - Studies of intestinal microflora. II. microorganisms of the small intestine and their relations to oral and fecal flora. **Gastroenterology, 53**: 856-67, 1967.

- GOSWAMI, S.K. & FREY, C.F. - A novel method for the separation and identification of bile acids and phospholipids of bile on thin-layer chromatograms. **J. Chromatogr. A**, **89**: 87-91, 1974.
- GRACEY, M. - Intestinal absorption in the "contaminated small-bowel syndrome". **Gut**, **12**: 403-10, 1971.
- GRACEY, M.; SUHARJONO; SUNOTO; STONE, D.E. - Microbial contamination of the gut: another feature of malnutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, **26**: 1170-4, 1973.
- GUSMÃO, R.H.P.; MARTINS, M.C.V.; GUSMÃO, S.R.B.; FAGUNDES NETO, U. - Enteropatia ambiental: estudo ultra-estrutural da mucosa jejunal de crianças assintomáticas. **J. Pediatr. (Rio de Janeiro)**, **69**: 21-6, 1993.
- HEPNER, G.W.; STURMAN, J.A.; HOFMAN, A.F. & THOMAS, P.J. - Metabolism of steroid and amino acid moieties of conjugated bile acids in man. III. cholytaurine (taurocholic acid). **J. Clin. Invest.**, **52**: 433-40, 1973.
- HEUBI, J.E.; BALISTRERI, W.F.; PARTIN, J.C.; SCHUBERT, W.K.; McGRAY, C.A. - Refractory infantile diarrhea due to primary bile acid malabsorption. **J. Pediatr.**, **94**: 546-51, 1979.
- HEUBI, J.E. & BALISTRERI, W.F. - Bile salt metabolism in infants and children after protracted infantile diarrhea. **Pediatr. Res.**, **14**: 943-46, 1980.
- HEUBI, J.E.; BALISTRERI, W.F. & SUCHY, F.J. - Bile salt metabolism in the first year of life. **J. Lab. Clin. Med.**, **100**: 127-36, 1982.

- HILL, I.D.; MANN, M.D.; MOORE, L.; BOWIE, M.D. - Duodenal microflora in infants with acute and persistent diarrhoea. *Arch. Dis. Child.*, **58**: 330-4, 1983.
- HILL, M.J. & DRASAR, B.S. - Degradation of bile salts by human intestinal bacteria. *Gut*, **9**: 22-7, 1968.
- HIRANO, S.; MASUDA, N.; ODA, H.; IMAMURA, T. - Transformation of bile acids by mixed microbial cultures from human feces and bile acid transforming activities of isolated bacterial strains. *Microbiol. Immunol.*, **25**: 271-82, 1981a.
- HIRANO, S.; NAKAMA, R.; TAMAKI, M.; MASUDA, N.; ODA, H. - Isolation and characterization of thirteen intestinal microorganisms capable of 7 $\alpha$ -dehydroxylating bile acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**: 737-45, 1981b.
- HOFMANN, A.F. - The enterohepatic circulation of bile acids in man. *Adv. Intern. Med.*, **21**: 501-34, 1976.
- HOFMANN, A.F. & POLEY, R. - Role of bile acid malabsorption in pathogenesis of diarrhea and steatorrhea in patients with ileal resection: I. response to cholestyramine or replacement of dietary long chain triglyceride by medium chain triglyceride. *Gastroenterology*, **62**: 918-34, 1972.
- HOFMANN, A.F. & SMALL, D.M. - Detergent properties of bile salts correlation with physiological function. *Ann. Rev. Med.*, **18**: 333-76, 1967.
- HOLDEMAN, L.V. & MOORE, W.E.C. - *Anaerobe laboratory manual*. 4 ed. Virginia Polytechnic Institute and State University. Virginia, 1977, 152p.

- JÖNSSON, G.; MIDTVEDT, A.C.; NORMAN, A.; MIDTVEDT, T. - Intestinal microbial bile acid transformation in healthy infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **20**: 394-402, 1995.
- KELLY, M.T.; BRENNER, D.J. & FARMER, J.J. - Enterobacteriaceae. In: LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER Jr., W.J.; SHADOMY, H.J. - *Manual of clinical microbiology*. 4 ed. Washington, D.C., ASM - American Society for Microbiology, 1985. p 263-77.
- KING, C.E. & TOSKES, P.P. - Small intestine bacterial overgrowth. *Gastroenterology*, **76**: 1035-55, 1979.
- KLIPSTEIN, F.A. - Tropical sprue: an iceberg disease? *Ann. Intern. Med.*, **66**: 622-3, 1967.
- KLIPSTEIN, f.A.; HOLDEMAN, L.V., CORCINO, J.J.; MOORE, E.C. - Enterotoxigenic intestinal bacteria in tropical sprue. *Ann. Intern. Med.*, **79**: 632-41, 1973.
- KOCOSHIS, S.A.; SCHLETEWITZ, K.; LOVELACE, G.; LAINE, R.A. - Duodenal bile acids among children: keto derivatives and aerobic small bowel bacterial overgrowth. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **6**: 686-96, 1987.
- LEWIS, B.; PANVELIWALLA, D.; TABAQCHALI, S.; WOOTON, I.D.P. - Serum-bile-acids in the stagnant-loop syndrome. *Lancet*, **2**: 219-20, 1969.
- LIFSHITZ, F.; WAPNIR, R.A.; WEHMAN, H.J.; DIAZ-BENUSSEN, S.; PERGOLIZZI, R. - The effects of small intestinal colonization of fecal and colonic bacteria on intestinal function in rats. *J. Nutr.*, **108**: 1913-23, 1978.

- LIMA, A.A.M. & GUERRANT, R.L. - Persistent diarrhea in children: epidemiology, risk factors, pathophysiology, nutritional impact, and management. **Epidemiol. Rev.**, **14**: 222-42, 1992.
- LOW-BEER, T.S.; SCHNEIDER, R.E. & DOBBINS, W.O. - Morphological changes of the small-intestinal mucosa of guinea pig and hamster following incubation *in vitro* and *in vivo* with unconjugated bile salts. **Gut**, **11**: 486-92, 1970.
- MACDONALD, I.A.; BOKKENHEUSER, V.D.; WINTER, J.; McLERNON, A.M.; MOSBACH, E.H. - Degradation of steroids in the human gut. **J. Lipid Res.**, **24**: 675-700, 1983.
- MALLORY, A.; KERN, F.; SMITH, J.; SAVAGE, D. - Patterns of bile acids and microflora in the human small intestine: I. bile acids. **Gastroenterology**, **64**: 26-33, 1973.
- MARTINS, M.C.V; LIMA, F.M.L.S.; PATRÍCIO, F.R.S.; TOLEDO, M.R.F.; MACHADO, N.L.; FAGUNDES NETO, U. - Enteropatia ambiental assintomática: alterações funcionais e morfológicas na mucosa jejunal decorrentes do ambiente desfavorável. **J. Pediatr. (Rio de Janeiro)**, **67**: 87-91, 1991.
- MATA, L.J.; JIMÉNEZ, F.; CORDÓN, M.; ROSALES, R.; PRERA, E.; SCHNEIDER, R.E.; VITERI, F. - Gastrointestinal flora of children with protein-calorie malnutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, **25**: 1118-26, 1972.

- MEKHJIAN, H.S.; PHILLIPS, S.F. & HOFMANN, A.F. - Colonic secretion of water and electrolytes induced by bile acids: perfusion studies in man. **J. Clin. Invest.**, **50**: 1569-77, 1971.
- MIDTVEDT, T. & NORMAN, A. - Parameters in  $7\alpha$ -dehydroxylation of bile acids by anaerobic lactobacilli. **Acta Path. et Microbiol. Scandinav.**, **72**: 313-29, 1968.
- MIDTVEDT, T. - Microbial bile acid transformation. **Am. J. Clin. Nutr.**, **27**: 1341-7, 1974.
- NAHMOD, H.; LITWIN, N.H.; LICASTRO, R.; CERVETTO, J.L. - Diarrheas prolongadas en la infancia: efecto de los acidos biliares deconjugados y accion de la colestiramina. **Acta. Gastroent. Lat. Amer.**, **10**: 49-56, 1980.
- NAIR, P.P.; GORDON, M. & REBACK, J. - The enzymatic cleavage of the carbon-nitrogen bond in  $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihydroxy- $5\beta$ -cholan-24-oyl glycine. **J. Biol. Chem.**, **243**: 7-11, 1967.
- NIESSEN, K.H. - (Bile acids in duodenal juice of infants and children. Normal values, lognormal distribution, and age-dependence of the total quantity and the distribution of bile acids). **Monatsschr. Kinderheilkd.**, **127**: 29-36, 1979.
- NIESSEN, K.H.; TEUFEL, M. & BRÜGMANN, G. - Sulphated bile acids in duodenal juice of healthy infants and children compared with sulphated bile acids in paediatric patients with various gastroenterological diseases. **Gut**, **25**: 26-31, 1984.

- NORTHFIELD, T.C.; DRASAR, B.S. & WRIGHT, J.T. - Value of small intestinal bile acid analysis in the diagnosis of the stagnant loop syndrome. **Gut**, **14**: 341-7, 1973.
- OMOIKE, I.U. & ABIODUN, P.O. - Upper small intestinal microflora in diarrhea and malnutrition in Nigerian children. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, **9**: 314-21, 1989.
- PEDERSEN, L.; ARNFRED, T. & THAYSEN, E.H. - Rapid screening of increased bile acid deconjugation and bile acid malabsorption by means of the glycine-1-[<sup>14</sup>C] cholyglycine assay. **Scand. J. Gastroent.**, **8**: 665-72, 1973.
- PENNY, M.E.; SILVA, D.G.H. & McNEISH, A.S. - Bacterial contamination of the small intestine of infants with enteropathogenic *Escherichia coli* and other enteric infections: a factor in the aetiology of persistent diarrhoea? **Brits. Med. J.**, **292**: 1223-6, 1986.
- RAMAKRISHNA, B.S. & MATHAN, V.I. - Role of bacterial toxins, bile acids, and free fatty acids in colonic water malabsorption in tropical sprue. **Dig. Dis. Sci.**, **32**: 500-5, 1987.
- REDMOND, A.O.B.; HANSEN, D.L. & McHUTCHON, B. - Abnormal bile salt metabolism in kwashiorkor. **S. Afr. Med. J.**, **46**: 617-8, 1972.
- ROE, J.R. & RICE, E.W. - A photometric method for the determination of free pentoses in animal tissues. **J. Biol. Chem.**, **173**: 507-12, 1948.



ROSENBERG, I.H.; HARDISON, W.G. & BULL, D.M. - Abnormal bile-salt patterns and intestinal bacterial overgrowth associated with malabsorption. **New Eng. J. Med.**, **276**, 1391-7, 1967.

SCHAEDLER, R.W.; DUBOS, R. & COSTELLO, R. - The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. **J. Exp. Med.**, **122**: 59-66, 1965.

SCHENK, E.A. & KLIPSTEIN, F.A. - A protocol for the evaluation of small bowel biopsies. **Amer. J. Clin. Nutr.**, **25**: 1108-17, 1972.

SCHNEIDER, R.E. & VITERI, F.E. - Morphological aspects of the duodenojejunal mucosa in protein-calorie malnourished children and during recovery. **Am. J. Clin. Nutr.** **25**: 1092-102, 1972.

SCHNEIDER, R.E. & VITERI, F.E. - Luminal events of lipid absorption in protein-calorie malnourished children; relationship with nutritional recovery and diarrhea. I. capacity of the duodenal content to achieve micellar solubilization of lipids. **Amer. J. Clin. Nutr.**, **27**: 777-87, 1974a.

SCHNEIDER, R.E. & VITERI, F.E. - Luminal events of lipid absorption in protein-calorie malnourished children; relationship with nutritional recovery and diarrhea. II. alterations in bile acid content of duodenal aspirates. **Amer. J. Clin. Nutr.**, **27**: 788-96, 1974b.

SENGER, H.; BOHEM, G.; BEYREISS, K.; BRAUN, W. - Bile acids in the serum and duodenal content of newborn infants of different classification. **Biomed. Biochim. Acta**, **45**: 931-9, 1986.

SIEGEL, S. - **Estadística no Paramétrica**. Ed. Trillas México - 1975. 346p.

SILVESTRINE, W.S.; KAWAKAMI, E.; STUMP, M.U.; WEHBA, J.; MACHADO, N.L.; FAGUNDES NETO, U. - Utilização da prova de absorção da D-xilose na caracterização de má absorção. **J. Pediatr. (Rio de Janeiro)**, **51**: 95-108, 1981.

SIMON, G.L. & GORBACH, S.L. - Intestinal flora in health and disease. **Gastroenterology**, **86**: 174-93, 1984.

SNYDER, J.D. & MERSON, M.H. - The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. **Bull. World Health Organ.**, **60**: 605-13, 1982.

STELLWAG, E.J. & HYLEMON, P.B. - Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*. **Biochim. Biophys. Acta**, **452**: 165-76, 1976.

STINTZING, G. & MÖLLBY, R. - Colonization of the upper jejunum by enteropathogenic and enterotoxigenic *Escherichia coli* in paediatric diarrhoea. **Acta Paediatr. Scand.**, **71**: 457-65, 1982.

TABAQCHALI, S. & BOOTH, C.C. - Jejunal bacteriology and bile-salt metabolism in patients with intestinal malabsorption. **Lancet**, **2**: 12-5, 1966.

TABAQCHALI, S.; HATZIOANNOU, J. & BOOTH, C.C. - Bile-salt deconjugation and steatorrhoea in patients with the stagnant-loop syndrome. **Lancet**, **2**: 12-6, 1968.

- TANDON, B.N.; TANDON, R.K.; SATPATHY, B.K.; SHRINIWAS - Mechanism of malabsorption in giardiasis: a study of bacterial flora and bile salt deconjugation in upper jejunum. **Gut**, **18**: 176-81, 1977.
- TANGERMAM, A.; SCHAIK, A. & HOEK, E.W. - Analysis of conjugated and unconjugated bile acids in serum and jejunal fluid of normal subjects. **Clin. Chim. Acta**, **159**: 123-32, 1986.
- TAVOLONI, N. - Inhibition of intestinal absorption by bile acids: should we include a serosal effect? **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, **7**: 479-85, 1988. editorials.
- TAZUME, S.; TAKESHI, K.; SAIDI, S.M.; ICHOROH, C.G.; MUTUA, W.R.; WAIYAKI, P.G.; OZAWA, A. - Ecological studies on intestinal microbial flora of Kenyan children with diarrhoea. **J. Trop. Med. Hyg.**, **93**: 215-21, 1990.
- TEICHBERG, S.; FAGUNDES NETO, U.; BAYNE, M.A., LIFSHITZ, F. - Jejunal macromolecular absorption and bile salt deconjugation in protein-energy malnourished rats. **Am. J. Clin. Nutr.**, **34**: 1281-91, 1981.
- TOCCALINO, H. & O'DONNELL, J.O. - Técnica para la introducción de la sonda capsula de Crosby en niños. **Rev. Hosp. Niños (Buenos Aires)**, **12**: 29-30, 1962.
- TRABULSI, L.R. & TOLEDO, M.R.F. - Generalidades sobre enterobacterias. In TRABULSI, L.R. - **Microbiología**. Rio de Janeiro. São Paulo, Livraria Atheneu, 1989. p. 134-8.

VAN DEN ENDE, A.; RÄDECKER, C.E. & MAIRUHU, W.M. - Microanalysis of free and conjugated bile acids by thin-layer chromatography and *in situ* spectrofluorimetry. **Anal. Biochem.**, **134**: 153-62, 1983.

WATKINS, J.B.; INGALL, D.; SZCZEPANIK, P.; KLEIN, P.D.; LESTER, R. - Bile-salt metabolism in the newborn: measurement of pool size and synthesis by stable isotope technic. **New Engl. J. Med.**, **288**: 431-4, 1973.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - Persistent diarrrheal in children in developing countries: memorandum from a WHO Meetiting. **Bull. World Health Organ.**, **66**: 709-17, 1988.

## ANEXOS

---

ANEXO 1. Cultura e contagem de colônias de enterobactérias aeróbias e anaeróbias no aspirado duodenal dos 23 lactentes portadores de diarreia aguda (GRUPO I).

<b>AERÓBIOS</b> (organismos/ml)	<b>ANAERÓBIOS</b> (organismos/ml)
1. ....	<i>Clostridium sp</i> (10 <sup>5</sup> ) <i>Lactobacillus sp</i> (10 <sup>4</sup> )
2. <i>E. coli</i> (10 <sup>5</sup> )	.....
3. ....	<i>Lactobacillus sp</i> (10 <sup>3</sup> )
4. <i>E. coli</i> (10 <sup>4</sup> ) <i>Klebsiella sp</i> (10 <sup>4</sup> )	<i>Veillonella</i> (10 <sup>2</sup> )
5. <i>E. coli</i> (10 <sup>3</sup> )	.....
6. <i>Enterobacter sp</i> (10 <sup>3</sup> ) <i>Lactobacillus sp</i> (10 <sup>3</sup> )	<i>Bacteroides sp</i> (10 <sup>5</sup> ) <i>Lactobacillus sp</i> (10 <sup>5</sup> )
7. <i>Enterobacter sp</i> (10 <sup>8</sup> )	.....
8. <i>E. coli</i> (10 <sup>7</sup> ) <i>Klebsiella sp</i> (10 <sup>7</sup> )	<i>Bacteroides sp</i> (10 <sup>7</sup> ) <i>Lactobacillus sp</i> (10 <sup>7</sup> )
9. <i>E. coli</i> (10 <sup>9</sup> ) <i>Klebsiella sp</i> (10 <sup>5</sup> )	<i>Bacteroides sp</i> (10 <sup>3</sup> )
10. ....	.....
11. ....	<i>Lactobacillus sp</i> (10 <sup>2</sup> )
12. <i>Klebsiella sp</i> (10 <sup>4</sup> ) <i>Enterobacter sp</i> (10 <sup>4</sup> )	<i>Bacteroides sp</i> (10 <sup>4</sup> ) <i>Veillonella sp</i> (10 <sup>4</sup> ) <i>Peptostreptococcus sp</i> (10 <sup>3</sup> )
13. <i>E. coli</i> (10 <sup>1</sup> )	<i>Bacteroides sp</i> (10 <sup>4</sup> )
14. <i>E. coli</i> (10 <sup>2</sup> )	<i>Bifidobacterium sp</i> (10 <sup>2</sup> )
15. <i>Klebsiella sp</i> (10 <sup>5</sup> )	<i>Lactobacillus sp</i> (10 <sup>2</sup> )
16. <i>E. coli</i> (10 <sup>5</sup> )	.....

17. *Klebsiella sp* ( $10^3$ ) .....
18. *E. coli* ( $10^4$ ) .....  
*Pseudomonas sp.* ( $10^4$ ) .....  
*Klebsiella sp* ( $10^4$ ) .....
19. *E. coli* ( $10^4$ ) .....  
*Klebsiella sp* ( $10^4$ ) .....
20. .... ..
21. *E. coli* ( $10^2$ ) .....  
*Pseudomonas sp* ( $10^2$ ) .....  
*Klebsiella sp* ( $10^2$ ) .....
22. *E coli* ( $10^1$ ) *Bacteroides sp* ( $10^7$ )
23. *E. coli* ( $10^5$ ) *Bifidobacterium sp* ( $10^1$ )

ANEXO 2. Cultura e contagem de colônias de enterobactérias aeróbias e anaeróbias no aspirado duodenal dos 17 lactentes portadores de diarreia persistente (GRUPO II).

<b>AERÓBIOS</b> (organismos/ml)	<b>ANAERÓBIOS</b> (organismos/ml)
1. <i>E. coli</i> (10 <sup>3</sup> )	<i>Clostridium sp</i> (10 <sup>7</sup> ) <i>Veillonella sp</i> (10 <sup>2</sup> ) <i>Peptococcus sp</i> (10 <sup>2</sup> )
2. <i>E. coli</i> (10 <sup>4</sup> )	<i>Veillonella sp</i> (10 <sup>9</sup> )
3. ....	.....
4. <i>E. coli</i> (10 <sup>5</sup> )	<i>Bacteroides sp</i> (10 <sup>5</sup> ) <i>Lactobacillus sp</i> (10 <sup>5</sup> )
5. <i>E. coli</i> (10 <sup>2</sup> )	.....
6. <i>E. coli</i> (10 <sup>4</sup> )	<i>Veillonella sp</i> (10 <sup>2</sup> ) <i>Lactobacillus sp</i> (10 <sup>7</sup> )
7. ....	.....
8. ....	.....
9. <i>E. coli</i> (10 <sup>5</sup> )	<i>Lactobacillus sp</i> (10 <sup>3</sup> )
10. <i>Klebsiella sp</i> (10 <sup>2</sup> ) <i>Enterobacter sp</i> (10 <sup>2</sup> )	<i>Lactobacillus sp</i> (10 <sup>1</sup> )
11. <i>E. coli</i> (10 <sup>7</sup> )	.....
12. <i>E. coli</i> (10 <sup>5</sup> )	<i>Lactobacillus sp</i> (10 <sup>5</sup> )
13. <i>Klebsiella sp</i> (10 <sup>1</sup> )	<i>Bacteroides sp</i> (10 <sup>3</sup> )
14. <i>E. coli</i> (10 <sup>4</sup> ) <i>Enterobacter sp</i> (10 <sup>4</sup> ) <i>Proteus mirabilis</i> (10 <sup>4</sup> )	<i>Clostridium sp</i> (10 <sup>2</sup> )
15. ....	<i>Bacteroides sp</i> (10 <sup>2</sup> ) <i>Lactobacillus sp</i> (10 <sup>2</sup> )
16. ....	.....
17. <i>E. coli</i> (10 <sup>2</sup> )	.....

ANEXO 3. Cultura e contagem de colônias de enterobactérias aeróbias no aspirado duodenal dos 34 lactentes portadores de enteropatia ambiental assintomática (GRUPO III).

**AERÓBIOS  
(organismos/ml)**

1. *Pseudomonas sp* ( $10^2$ )
2. ....
3. *Proteus mirabilis* ( $10^2$ )
4. ....
5. *Enterobacter sp* ( $10^5$ )
6. ....
7. ....
8. *E. coli* ( $10^4$ )
9. ....
10. *Pseudomonas sp* ( $10^3$ )
11. *Pseudomonas sp* ( $10^3$ )
12. *E. coli* ( $10^3$ )  
*Pseudomonas sp* ( $10^3$ )  
*Enterobacter sp* ( $10^3$ )
13. *Pseudomonas sp* ( $10^3$ )
14. *Klebsiella sp* ( $10^3$ )
15. ....
16. *Pseudomonas sp* ( $10^9$ )
17. *Pseudomonas sp* ( $10^4$ )
18. ....
19. *Pseudomonas sp* ( $10^2$ )
20. ....



21. *E. coli* ( $10^2$ )  
*Pseudomonas sp* ( $10^2$ )
22. *Enterobacter sp* ( $10^2$ )
23. (não realizado)
24. *E. coli* ( $10^4$ )  
*Proteus mirabilis* ( $10^4$ )
25. (não realizado)
26. *Citrobacter sp* ( $10^2$ )
27. *Pseudomonas sp* ( $10^4$ )
28. ....
29. ....
30. ....
31. *Pseudomonas sp* ( $10^2$ )
32. *Pseudomonas sp* ( $10^2$ )
33. ....
34. *E.coli* ( $10^9$ )

ANEXO 4. Ácidos biliares detectados no aspirado duodenal dos 23 lactentes portadores de diarreia aguda (GRUPO I).

paciente	TC	TQDC	TDC	GC	GQDC	GDC	C	QDC	DC	LC
1.	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
2.	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
3.	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
4.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
6.	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
7.	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
8.	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
9.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
10.	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
11.	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
12.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
13.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
14.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
15.	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
16.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
17.	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
18.	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
19.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20.	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
21.	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
22.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23.	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+

legenda:

TC - ác. taurocólico  
TQDC - ác. tauroquenodeoxicólico  
TDC - ác. taurodeoxicólico  
GC - ác. glicocólico  
GQDC - ác. glicoquenodeoxicólico  
GDC - ác. glicodeoxicólico  
C - ác. cólico  
QDC - ác. quenodeoxicólico  
DC - ác. deoxicólico  
LC - ác. litocólico

ANEXO 5. Ácidos biliares detectados no aspirado duodenal dos 17 lactentes portadores de diarreia persistente (GRUPO II).

paciente	TC	TQDC	TDC	GC	GQDC	GDC	C	QDC	DC	LC
1.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
3.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
4.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
6.	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
7.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
8.	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
9.	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
10.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
11.	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
12.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13.	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
14.	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
15.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
16.	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
17.	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+

legenda:

TC - ác. taurocólico

TQDC - ác. tauroquenodeoxicólico

TDC - ác. taurodeoxicólico

GC - ác. glicocólico

GQDC - ác. glicoquenodeoxicólico

GDC - ác. glicodeoxicólico

C - ác. cólico

QDC - ác. quenodeoxicólico

DC - ác. deoxicólico

LC - ác. litocólico

ANEXO 6. Ácidos biliares detectados no aspirado duodenal de lactentes portadores de enteropatia ambiental assintomática (GRUPO III).

paciente	TC	TQDC	TDC	GC	GQDC	GDC	C	QDC	DC	LC
1.	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
2.	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
3.	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
4.	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
5.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
6.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
7.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
8.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
9.	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
10.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
11.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
12.	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
13.	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
14.	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
15.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
16.	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
17.	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
18.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19.	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
20.	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
21.	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-
22.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
23.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
24.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
25.	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
26.	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
27.	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
28.	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
29.	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
30.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31.	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
32.	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
33.	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
34.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

legenda:

TC - ác. taurocólico

TQDC - ác. tauroqueno-deoxicólico

TDC - ác. taurodeoxicólico

GC - ác. glicocólico

GQDC - ác. glicoueno-deoxicólico

GDC - ác. glicodeoxicólico

C - ác. cólico

QDC - ác. queno-deoxicólico

DC - ác. deoxicólico

LC - ác. litocólico