

DENSITOMETRIA DO COLÁGENO NA REPARAÇÃO TECIDUAL DE ANASTOMOSE COLÔNICA DE RATOS WISTAR APÓS SUPLEMENTAÇÃO PRÉ-OPERATÓRIA COM PROBIÓTICO PROBIATOP®

Letícia Ganem Rillo Paz Barateiro (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ana Carolina Guidi, Larissa Miwa Kikuchi Ochikubo, Matheus Jacometo Coelho de Castilho, Eneri Vieira de Souza Leite Mello (Orientadora), e-mail: enerileite@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas - Morfologia

Palavras-chave: fibras colágenas, cicatrização, microbiota.

Resumo:

Comum no trato gastrointestinal, a anastomose é um procedimento cirúrgico que apresenta cicatrização lenta e altas taxas de complicações, podendo a dinâmica de depósito e maturação do colágeno alterar sua qualidade. Nesse contexto, os probióticos são compostos de microrganismos específicos que podem modificar benéficamente a microbiota do hospedeiro favorecendo a cicatrização. O objetivo desse projeto foi avaliar a densitometria do colágeno na reparação tecidual de anastomose colônica de ratos *Wistar*, após suplementação pré-operatória com probiótico Probiatop®. Foram utilizados 18 animais divididos em dois grupos (n=9). Além da ração padrão, durante sete dias antes da realização da anastomose, o grupo tratado recebeu 250mg/dia do probiótico e, o grupo controle, 250mg/dia de maltodextrina. Após a cirurgia, os animais voltaram a ser normoalimentados por mais 5 dias, quando foram eutanasiados. As amostras de tecido anastomótico foram coletadas e submetidas ao processamento histológico de rotina. Foram feitos cortes semi seriados, com 6 µm de espessura. As lâminas foram submetidas à coloração Picrosirius Red para avaliar a presença de colágeno, sua maturidade e o seu grau de ordenação, utilizando microscopia de polarização. Utilizou-se o programa Image Pro Plus para quantificar a porcentagem da área de colágeno ocupada. A análise estatística mostrou que não houve diferença na quantidade de ambos os colágenos no grupo tratado em relação ao controle. Portanto, conclui-se que o tratamento com o probiótico Probiatop® não interferiu na densitometria do colágeno.

Introdução

Probióticos podem ser considerados substâncias dietéticas que promovem alterações na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, que acabam por conferir benefícios à saúde do hospedeiro. Em um sentido *strictu*, probióticos são bactérias vivas ou leveduras específicas que atendem à critérios como: não patogenicidade e capacidade de antagonizar bactérias patogênicas, resistência à acidez gástrica ou lise pela bile, adesão ao epitélio, serem fonte de modulação da

imunidade do hospedeiro e possuem capacidade de permanecerem estáveis durante seu processamento e armazenamento (DIDARI *et al.*, 2015).

Na cicatrização das anastomoses colônicas, a pós-ressecção e a anastomose ocorrem de forma mais lenta e são acompanhadas de maiores taxas de complicações, como fístula e ruptura, se comparadas a outros sítios do trato gastrointestinal (BRASKÉN, 1991).

Dentro da reparação tecidual, o colágeno, seus subtipos e sua concentração nas áreas de reparação foram, ao longo do tempo, ganhando destaque e importância ao observarem que fatores que alterassem sua dinâmica de depósito e maturação podem alterar a qualidade da anastomose (VIZZOTTO-JR *et al.*, 2015). Contudo, são os colágenos I e III que apresentam importância maior no estudo da cicatrização anastomótica devido à sua predominância ao longo do processo cicatricial da anastomose, demonstrando uma boa correlação com a força de tração a partir do 3º dia (BRASKÉN, 1991).

Materiais e métodos

Delineamento experimental e suplementação

Este estudo foi desenvolvido no Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM). (Certificado de aprovação: CEUA nº 5684270616). Foram utilizados 18 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso corporal em torno de 250 gramas provenientes do Biotério Central da UEM. Após aclimação inicial, os ratos foram divididos em 2 grupos:

- Grupo controle (n=9) - alimentados com ração *ad libitum* e, separadamente, com a fórmula: requeijão 1 mL + maltodextrina 250mg/dia.
- Grupo tratado (n=9) – alimentados com ração *ad libitum* e, separadamente, com a fórmula: requeijão 1 mL + probióticos dose de 250mg/dia.

A suplementação com as fórmulas foi administrada via oral com auxílio de uma espátula de madeira, durante 7 dias anteriores ao procedimento cirúrgico. Os ratos voltaram a ser normoalimentados por mais 5 dias pós-cirúrgico, quando foram eutanasiados.

Procedimento cirúrgico

Após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados, via intramuscular, com a associação de Cloridrato de Cetamina 10% e Cloridrato de Xilazina 2%. O cólon foi seccionado e reconstruído por meio de anastomose término-terminal em plano único total com sutura interrompida (VIZZOTTO-JR *et al.*, 2015). Após a recuperação anestésica, cada animal foi reconduzido à caixa, recebendo água e ração *ad libitum*, permanecendo até o momento da eutanásia.

Eutanásia dos animais e análise histológica

Os animais foram eutanasiados com sobredosagem de tiopental sódico (120mg/kg) associado à lidocaína (10mg/ml) no quinto dia de pós-operatório. Na sequência, foi realizada a retirada de um segmento do cólon contendo a anastomose, seguida de sua fixação em paraformaldeído a 4%, para estudo da densitometria do colágeno.

As amostras fixadas foram submetidas ao processamento histológico de rotina com inclusão em blocos de parafina. O material foi submetido a cortes semi seriados com

6 µm de espessura, em micrótomo rotativo. As lâminas foram submetidas à coloração Picrosirius Red para avaliar a presença de colágeno, sua maturidade e o seu grau de ordenação, utilizando a microscopia de polarização. Foram analisados cinco cortes por animal, num total de 45 cortes por grupo.

As imagens foram capturadas em microscópio óptico Nikon® Eclipse 80i acoplado a uma câmera Nikon DS-FI1C cooled digital® com imagens transmitidas através do sistema D-DA simple analyzer, e digitalizadas por meio de computador Intel Pentium Processor® E 5700 LGA775. Para a captura das imagens, em cada corte histológico foram considerados 6 campos, determinados a partir da linha da sutura, utilizando objetiva de 20X.

A quantificação da área ocupada pelas fibras foi realizada por meio do programa Image Pro-Plus® (v. 4.5). As fibras verdes foram consideradas como tipo III (imaturas) e as vermelhas/amarelas como tipo I (maduras). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise estatística pelo Mann-Whitney test utilizando o programa GraphPad Prism® 5 (Copyright GraphPad Software, Inc.).

Resultados e Discussão

Em relação à área ocupada pelo colágeno, o colágeno tipo I (marcado em vermelho) esteve presente em aproximadamente 3,9% da área total no grupo tratado e 4,1% no controle. O colágeno tipo III (marcado em verde) correspondeu, em média, a 0,9% da área total em ambos os grupos (Figura 1).

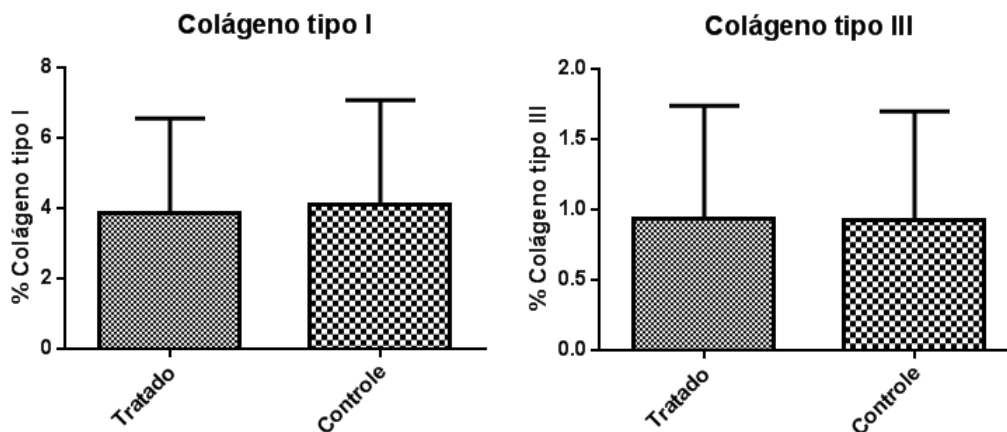


Figura 1 – Valores médios da área ocupada pelo colágeno tipo I e tipo III em ratos *Wistar* controles e suplementados com o probiótico Probiatop®

Em um trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa (ALMEIDA; CASTILHO; LEITE-MELLO, 2018) verificou-se que o tratamento com o probiótico PROBIATOP® nos períodos pré e pós-operatório levou a um aumento da porcentagem de colágenos I e III, na cicatrização da anastomose colônica em ratos *Wistar*. O colágeno do tipo I confere uma maior força de tensão do tecido conjuntivo na anastomose. Esse efeito do ponto de vista tecidual é muito importante, pois pode diminuir o risco de complicações e/ou rompimentos que podem agravar o quadro do paciente no pós-operatório (JONSSON; JIBORN; ZEDERFERLDT, 1983).

Didari *et al.* (2015), também relatam que os probióticos mostraram eficácia na redução de índices de complicações cirúrgicas infecciosas ao melhorar a barreira intestinal ao ser administrado nos períodos pré e pós-cirúrgico de pacientes.

Os resultados obtidos neste presente estudo mostraram que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratado e controle. Portanto, a suplementação com PROBIATOP® apenas no período pré-operatório não foi eficaz em alterar a síntese de colágeno durante o processo de reparação anastomótica.

Conclusões

O tratamento pré-operatório com o probiótico Probiatop® não interferiu na densitometria do colágeno quando comparado ao grupo controle, na cicatrização de anastomose colônica.

Agradecimentos

À orientadora pela oportunidade de trabalhar nessa pesquisa, a todos do Laboratório de Histologia da UEM pela parceria e aos órgãos financiadores.

Referências

A ALMEIDA, G. D. R.; CASTILHO, T. J. V.; LEITE-MELLO, E. V. S. Avaliação do índice de maturação do colágeno em anastomoses colônicas de ratos suplementados com probióticos. In: **27º Encontro Anual de Iniciação Científica, 2018. Anais...** Maringá. Disponível em <http://www.eaic.uem.br/eaic2018/portal/index.php?op=trabalhos>;

BRASKÉN, P. Healing of experimental colonic anastomosis. **The European journal of surgery. Supplement.**, Stockholm, suppl.66, p. 1-51, 1991;

DIDARI, T. *et al.* Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: updated systematic review with meta-analysis. **World Journal of Gastroenterology**, Pleasanton, v. 21, p. 3072–3084, 2015;

JONSSON, K.; JIBORN, H.; ZEDERFERLDT, B. Breaking strength of small intestinal anastomoses. **The American Journal of Surgery**, New York, v. 145, p. 800-803, 1983;

VIZZOTTO-JÚNIOR, A.O. *et al.* Influence of preoperative supplementation of omega-3 fatty acid in the healing of colonic anastomoses in malnourished rats receiving paclitaxel. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 42, n. 2, p. 116-123; 2015.