

## PROBIÓTICOS PROMOVEM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ANTIBIÓTICOS PROTEGEM OS RINS DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL

Ana Paula Boromelo (PIBIC/CNPq/Uem), Camila Quaglio Neves (Doutoranda/PBC/Uem), Nilza Cristina Buttow (Orientadora), e-mail: ncbuttow@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas/Maringá, PR.

### Ciências Biológicas: Morfologia/Histologia

**Palavras-chave:** translocação, microbiota, barreira intestinal

#### Resumo:

A isquemia/reperfusão (I/R) é uma condição grave que ocorre em vários casos clínicos. Durante este processo ocorrem alterações celulares que favorecem a geração de radicais livres e o dano na função da barreira intestinal, o que pode levar ao comprometimento fisiológico de vários outros órgãos como rins, fígado e pulmão. A injúria a órgãos distantes se deve ao favorecimento da translocação bacteriana da microbiota intestinal e à resposta inflamatória e oxidativa sistêmica. Desse modo, o objetivo foi analisar o efeito dos antibióticos e probióticos na histologia renal e estresse oxidativo dos rins de ratos *Wistar* submetidos a IR intestinal. A isquemia de 45 minutos da artéria mesentérica superior foi seguida por reperfusão de 72 horas. O grupo isquêmico apresentou alteração na quantidade e tamanho de corpúsculos e no tamanho de glomérulos. O tratamento com probióticos normalizou a quantidade de glomérulos, porém alterou o tamanho dos corpúsculos renais e do espaço de Bowman. Os animais tratados com antibióticos mantiveram-se semelhantes ao grupo controle em todos os aspectos analisados. Foram observadas alterações nas enzimas superóxido dismutase e glutathione S-transferase em diferentes grupos, porém não foi possível observar o estabelecimento do estresse oxidativo nesse tempo de reperfusão. Nessa patologia, a administração de antibióticos promoveu uma proteção maior contra danos na morfologia renal, se comparado à administração de probióticos.

#### Introdução

A isquemia e reperfusão (IR) intestinal é uma condição grave que ocorre em vários casos clínicos. A isquemia é estabelecida quando o fluxo sanguíneo para o intestino é prejudicado devido ao bloqueio parcial ou total, geralmente, de uma artéria. Porém, o grau de severidade do dano aumenta a partir da reperfusão, onde a artéria é desobstruída. Quando o sangue e o oxigênio retornam, e o fluxo se reestabelece bruscamente no tecido já lesado pela isquemia, há o favorecimento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GONZALEZ et al., 2015). Durante o processo de IR intestinal, ocorrem alterações celulares e geração de radicais livres, o que pode levar ao comprometimento fisiológico do intestino e de órgãos distantes como fígado, rins e pulmão. Além disso, a microbiota intestinal também desempenha papel fundamental na lesão de IR intestinal devido a destruição da função da barreira da mucosa intestinal e o aumento da permeabilidade vascular, favorecendo a

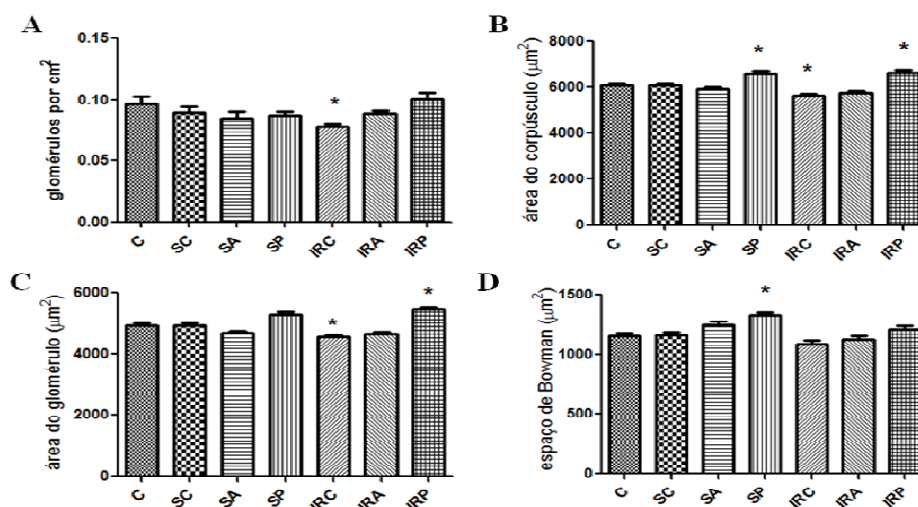
translocação bacteriana, que provoca uma resposta sistêmica (GROOTJANS et al., 2010). Devido a isso, a manipulação da microbiota pela utilização de antibióticos e probióticos são candidatos para o tratamento das complicações decorridas da IR intestinal. A avaliação dos efeitos da manipulação da microbiota intestinal pela administração de antibióticos e probióticos sobre os rins após IR intestinal foi o objetivo deste estudo.

### **Materiais e métodos**

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEM) sob nº 2869200218. Foram utilizados ratos machos *Wistar* (230g-250g), que foram distribuídos em 7 grupos: controle (C), *sham* controle (SC), *sham* tratado com antibiótico (SA), *sham* tratado com probiótico (STP), isquêmico (IRC), isquêmico tratado com antibiótico (IRA), isquêmico tratado com probiótico (IRP). Os animais dos grupos isquêmicos foram anestesiados com Ketamina (100mg/kg de peso corporal) + Xilazina (20mg/kg de peso corporal) e submetidos à isquemia intestinal por oclusão da artéria mesentérica superior (AMS). A isquemia teve duração de 45 minutos e a reperfusão estendeu-se por 72 horas. Os animais dos grupos *sham* passaram pelos mesmos procedimentos, porém sem a oclusão da AMS. Os grupos SA e IRA receberam via gavagem o mix de antibióticos: metronidazol (100 mg/kg de peso corporal), neomicina (200 mg/kg de peso corporal), vancomicina (100 mg/kg de peso corporal) e ampicilina (1 g/l de água) diariamente por 72 horas antes da cirurgia e durante o tempo de reperfusão. Já os grupos SP e IRP receberam via gavagem os probióticos: *Lactobacillus paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* (8,3x10<sup>9</sup> UFC), durante 14 dias antes da cirurgia e nas 72 horas de reperfusão. Os animais foram eutanasiados por dose letal de Tiopental Sódico® (120mg/kg) e os rins coletados. Para histologia, após fixação em Paraformaldeído 4%, as amostras passaram por embebição em parafina, corte em micrótomo (5µm) e coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram capturadas em microscópio óptico (Olympus Bx41) no aumento de 20x com 30 imagens por animal e observadas em software Image Pro-Plus a fim de analisar a morfometria dos corpúsculos, glomérulos e espaço de Bowman, além da quantificação dos corpúsculos renais. Outra porção do rim foi congelada em nitrogênio líquido e homogeneizada em Tampão Fosfato de Potássio 200 mM. Parte do homogenato foi utilizado na técnica de grupos sulfídricos não proteicos (GSH). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante dividido entre as técnicas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione s-transferase (GST), lipoperoxidação (LOOH) e proteínas. O pellet restante foi usado para as técnicas: mieloperoxidase (MPO), n-acetilglicosaminidase (NAG) e proteínas. As análises foram realizadas em placa de 96 poços e a leitura em espectrofotômetro (FlexStation 3, Molecular Devices). As análises estatísticas foram realizadas em software GraphPad Prism adotando  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo. Os dados com distribuição normal foram analisados por One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, sendo os resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão. Os dados que não apresentaram distribuição normal, passaram pelo teste Kruskal-wallis seguido pelo pós teste de Dunns.

### **Resultados e Discussão**

Alterações na histologia renal dos animais foram encontradas entre os grupos. Em relação à quantidade de corpúsculos renais por  $\text{cm}^2$ , somente o grupo IRC mostrou alteração quando comparado ao grupo C. Esses animais apresentaram 12,7% menos corpúsculos renais na área analisada (Fig 1A). O grupo IRC também apresentou redução (6,4%) na área dos corpúsculos e diminuição de 8,1% na área dos glomérulos quando comparado ao grupo C. Essas alterações mostram que IR intestinal pode afetar os rins. Isso pode estar relacionado com o enfraquecimento da função da barreira da mucosa intestinal que ocorre nessa patologia (QUE et al, 2018). O tratamento com probióticos manteve a densidade de glomérulos, porém alterou a área dos corpúsculos renais que apresentaram aumento de 6,8% no grupo SP e de 8,7% no IRP quando comparados ao grupo C (Fig 1B). A área dos glomérulos renais também aumentou no grupo IRP (11%) em relação ao grupo C (Fig 1C). Já em relação ao espaço de Bowman somente o grupo SP apresentou aumento de 16,4% quando comparado ao grupo C (Fig 1D). O aumento no espaço de Bowman pode estar relacionado à hiperfiltração glomerular acentuada (HENEGAR et al., 2001), tendo em vista a alteração na área dos glomérulos. Os animais tratados com antibióticos mantiveram-se semelhantes ao grupo controle em todos os aspectos analisados, mostrando que nessa patologia, a administração de antibióticos promove uma proteção maior contra as alterações na morfologia renal, se comparado ao grupo controle e à administração de probióticos.



**Figura 1.** Análise morfométrica do rim de ratos submetidos a IR intestinal e tratados com antibióticos e probióticos. Grupos controle (C), sham (SC), sham tratado com antibiótico (SA), sham tratado com probiótico (SP), isquêmico (IRC), isquêmico tratado com antibiótico (IRA) e isquêmico tratado com probiótico (IRP). A: gráfico referente a quantidade de glomérulos presentes em  $1\text{cm}^2$ ; B: área dos glomérulos renais em  $\mu\text{m}$ ; C: área dos corpúsculos renais em  $\mu\text{m}$ ; D: área do espaço de Bowman em  $\mu\text{m}$ . \*p<0,05.

A atividade da superóxido dismutase, enzima antioxidante, apresentou-se aumentada no grupo SP (56%) quando comparado ao grupo C. A atividade da enzima glutatona s-transferase mostrou-se aumentada nos grupos IRC (65%) e IRA (79%) em relação ao grupo C, já o grupo IRP apresentou atividade semelhante ao grupo C (Tabela 1). Com o tempo de 72 horas de reperfusão não foi possível observar alteração nos outros parâmetros relacionados ao estresse oxidativo.

**Tabela 1.** Estresse oxidativo do rim de ratos submetidos à IR intestinal e tratados com antibióticos e probióticos.

	C	SC	SA	SP	IRC	IRA	IRP
<b>CAT</b> µm/min/mg de proteína	0,02365± 0,0012	0,02763± 0,0012	0,02443± 0,0016	0,02705± 0,0027	0,02514± 0,0015	0,01959± 0,0019	0,02055± 0,0031
<b>GSH</b> µg/g de tecido	664,3± 27,25	607,1± 28,09	595,0± 50,94	648,6± 22,03	649,1± 15,05	590,1± 40,17	622,3± 30,99
<b>GST</b> µmol/min/ mg de proteína	8,071± 0,683	14,09± 0,863*	11,55± 0,916	12,99± 0,666	13,38± 0,535*	14,45± 1,242*	9,553± 1,494
<b>LOOH</b> mmol/mg de tecido	87,15± 0,836	82,44± 1,411	83,47± 2,361	80,98± 2,099	84,75± 2,101	84,05± 0,968	84,70± 2,797
<b>SOD</b> U/mg de proteína	0.04915± 0.004122	0.06835± 0.007945	0.07612± 0.007371	0.07671± 0.008775 *	0.06691± 0.007713	0.06279± 0.007110	0.07728± 0.007683
<b>MPO</b> D.O./min/mg de proteína	1.549± 0.07679	1.971± 0.1624	1.755± 0.2339	1.510± 0.1817	1.590± 0.2335	1.702± 0.2686	1.933± 0.1308
<b>NAG</b> mD.O./mg	36.67± 0.6588	49.93± 2.776	45.51± 5.374	37.85± 1.397	40.94± 1.687	41.44 ±4.362	47.89 ±3.062

\*p<0,05

## Conclusões

A isquemia intestinal de 45 minutos seguida de reperfusão de 72 horas provoca alterações histológicas renais. O tratamento com antibióticos promove uma proteção contra essas alterações morfológicas, sendo mais eficiente que o tratamento com probióticos, que ainda permite injúria morfológica renal. Não é possível observar o estabelecimento do estresse oxidativo após o tempo de reperfusão.

## Agradecimentos

Agradecimento ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo aparato disponibilizado para o desenvolvimento e conclusão dessa pesquisa. À professora Dra. Niza, minha orientadora e à Camila, por todos os ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

## Referências

- Gonzalez, L. M.; Moeser, A. J.; Bliklager, A. T. Animal models of ischemia-reperfusion-induced intestinal injury: progress and promise for translational research. **Physiology In Medicine**, 2015. 308(2): G63-G75.
- Grootjans, J.; Lenaerts, .; Derikx, J.; Matthijsen, R.; Bruine, A.; Bijnen, A.; Dam, R.; Dejong, C.; Buurman, W. Human Intestinal Ischemia-Reperfusion-Induced Inflammation Characterized. **The American Journal of Pathology**, 2010. 176 (5).
- Henegar, J. R.; Bigler, S. A.; Henegar, I. K.; Tyagi, S. C.; Hall, J. E. Functional and Structural Changes in the Kidney in the Early Stages of Obesity. **J Am Soc Nephrol** 12: 1211–1217, 2001.
- Que, Y.; Gu, M.; Ji, F.; Zhou, X. Effect of lactobacillus on Toll-like receptors expression and bacterial translocation in antibiotic diarrhea rats. **Int J Clin Exp Med** 2018;11(2):1233-1239.