

## ANÁLISE DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO EM ANASTOMOSES COLÔNICAS DE RATOS SUPLEMENTADOS COM PROBIÓTICOS.

Gustavo Henrique Doná Rodrigues Almeida (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Tiago Jacometo Coelho de Castilho (Colaborador), Eneri Vieira de Souza Leite Mello (Orientador), e-mail: henrique.gustavo1436@gmail.com.

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

**Área e subárea do conhecimento:** Biologia Geral – Morfologia – Histologia.

**Palavras-chave:** Probiatop®, reparo tecidual, inflamação.

### Resumo

Probióticos são substâncias dietéticas que promovem alterações na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal que acabam por conferir benefícios à saúde do hospedeiro. O objetivo desse trabalho foi analisar o processo de cicatrização de ratos Wistar o processo de cicatrização de anastomoses colônicas de ratos suplementados com o probiótico Probiatop®. Os animais foram divididos em dois grupos (n=12): o grupo CONTROLE, que recebeu maltodextrina (placebo) e o grupo TRATADO suplementado com probiótico, ambos tratados por 12 dias. Após 7 dias de tratamento foi realizado procedimento cirúrgico para realização das anastomoses no cólon. Cinco dias após a cirurgia, os animais foram mortos e o material coletado foi submetido a processamento histológico de rotina. As lâminas foram coradas por meio da técnica de Hematoxilina Eosina para análise da intensidade dos achados histológicos. A análise estatística revelou uma diminuição do infiltrado inflamatório, aumento da fibrose e diminuição na área do processo inflamatório no grupo tratado em relação ao grupo controle. O desenvolvimento de edema intersticial, presença de congestão vascular e de tecido de granulação no processo cicatricial das anastomoses não apresentou diferença estatística entre os grupos. Portanto, pôde-se concluir que a suplementação com probióticos permitiu um maior depósito fibrótico na área seccionada, sendo benéfico para o processo de reparo e também mostrou uma provável ação imunomoduladora sobre a instalação do processo inflamatório.

### Introdução

Probióticos, em uma definição ampla, 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. 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 (Didari et al., 2015). Os benefícios dos probióticos advêm principalmente da promoção do balanço da microbiota intestinal, havendo evidências

crescentes de que probióticos exercem uma imunomodulação de grande importância (BORCHERS et al, 2009). Devido a evidências de que probióticos podem exercer funções imunomoduladoras em ambientes desfavoráveis, bem como de sua ação em trofismo do sistema gastrointestinal, acreditamos que a suplementação com probióticos possa levar a uma melhora na cicatrização das anastomoses colônicas tanto nos aspectos clínicos, como nos histológicos.

## Materiais e métodos

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.

Após aclimatação inicial, os ratos foram divididos em 2 grupos:

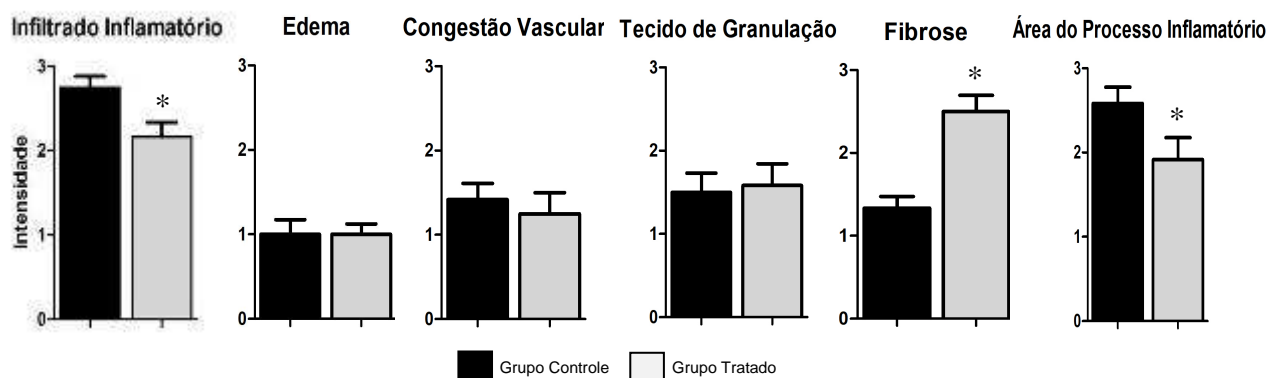
- Grupo controle (n=12) - ratos sem suplementação de probióticos.
- Grupo tratado (n=12) – ratos com suplementação de probióticos.

O grupo controle foi suplementado com maltodextrina (placebo) e o grupo tratado foi suplementado com probiótico. Ambos foram tratados por 12 dias: 7 dias antes do procedimento cirúrgico e por mais 5 dias pós-cirúrgico, quando foram mortos. A administração de probiótico ou placebo foi feita via oral, com auxílio de uma espátula.

Para procedimento cirúrgico, após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com a associação de lidocaína associada à tiopental. O cólon foi seccionado e reconstruído por meio de anastomose término-terminal em plano único (Castilho et al, 2015). No pós-operatório, cada animal foi reconduzido à caixa, onde recebeu água e ração ad libitum associada ou não ao probiótico, permanecendo até o momento da eutanásia. Os animais foram mortos com sobredosagem de anestésicos. Na sequência, foi realizada a retirada de um segmento do cólon contendo a anastomose, seguida de sua fixação em paraformaldeído a 4% e submetidos ao processamento histológico utilizando a coloração pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) em cortes semi-seriados de 6 µm de espessura. Foi avaliado o grau de intensidade da reação inflamatória (infiltrado polimorfonuclear e mononuclear), do edema intersticial, da congestão vascular, do tecido de granulação e da fibrose, os quais foram classificados em acentuado, moderado, discreto e ausente, de acordo com a intensidade em que foram encontrados, e transformados em variáveis quantitativas através da atribuição de índice aos achados histológicos da seguinte maneira: ausente, índice 0; discreto, índice 1; moderado, índice 2 e acentuado, índice 3 (VIZZOTO *et al.*, 2003 modificado). A área do processo inflamatório foi avaliada da mesma forma. Foram avaliados cinco cortes por animal, num total de 60 cortes por grupo, por meio de microscópio óptico da marca Nikon® Eclipse 80i (Nikon, Tóquio, Japão), em aumento de 200 vezes. Os resultados foram analisados pelo Programa GraphPad Prism 5 com um nível de significância de  $p < 0,05$  utilizando teste t de Student para análises paramétricas e teste de Mann-Whitney para não-paramétricos.

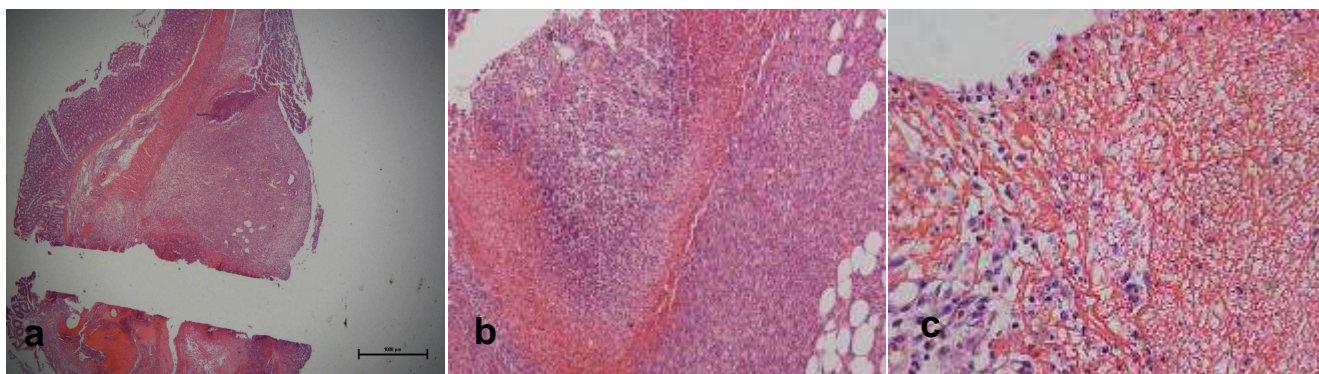
## Resultados e Discussão

Os resultados dos achados histológicos estão expressos na Figura 1, nas quais seis parâmetros foram analisados: infiltrado inflamatório, presença de edema intersticial, congestão vascular, presença de tecido de granulação, fibrose e área ocupada pelo processo inflamatório (Figura 2). O índice de atividade celular, o qual foi chamado de infiltrado inflamatório neste estudo, apresentou uma redução significativa no grupo TRATADO em relação ao CONTROLE ( $p < 0,05$ ). Também foi observado um aumento evidente de colágeno no tecido em reparo no grupo TRATADO quando comparado ao grupo placebo. Quando analisada a área ocupada pelo processo inflamatório na anastomose colônica, nota-se uma diminuição da mesma no grupo TRATADO em relação ao CONTROLE. A presença de edema intersticial, tecido de granulação e congestão vascular não apresentaram diferença estatística entre os grupos.



**Figura 1** – Intensidade dos achados histológicos no tecido corado utilizando a técnica de Hematoxilina & Eosina nos grupos CONTROLE e Tratado (\* $p < 0,05$ ).

Esses dados revelam que a suplementação com probióticos pode estar envolvida numa maior estimulação de fibroblastos e miofibroblastos na síntese de fibras, principalmente colágenas, intensificando o processo de reparo. Já os achados inflamatórios de infiltrado leucocitário e área ocupada pelo mesmo sugerem uma atividade imunomoduladora da resposta imune, diminuindo sua exacerbação para não ter um efeito danoso no tecido em processo de reparo (VIZZOTO-JUNIOR et al., 2015; MASAHIRO et al., 2011).



**Figura 2** – Fotomicrografias de cortes histológicos de anastomoses colônicas de ratos coradas pela técnica de Hematoxilina & Eosina. **a.** aumento de 40x; **b.** aumento de 100x; **c.** aumento de 400x.

## Conclusões

A utilização do probiótico Probiotop® permitiu um maior depósito de colágeno na área seccionada, sendo benéfico para o processo de reparo e também mostrou uma provável ação imunomoduladora sobre a instalação do processo inflamatório.

## Agradecimentos

Agradeço a Deus, nosso Senhor; agradeço à minha orientadora, Professora Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello; ao Me. Tiago Jacometo e ao CNPq pelo apoio financeiro a este projeto.

## Referências

BORCHERS, A. T.; SELMI, C.; MEYERS, F. J.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Probiotics and immunity. **J Gastroenterol**, Pleasanton, v. 44, p. 26-46, 2009.

DIDARI T.; MOZAFFARI S.; NIKFAR S.; ABDOLLAHI M. Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: Updated systematic review with meta-analysis. **World J Gastroenterol**, Pleasanton, v. 21, p. 3072–3084, 2015.

MASAHIRO, I.; KONNO, S. Wound healing of intestinal epithelial cells. **World J Gastroenterol**, Pleasanton, v.17, p. 2161-2171, 2011.

VIZZOTTO-JÚNIOR A.O, A. O.; NORONHA, L., SCHEFFEL, D. L. H.; CAMPOS, A.C. L. Effect of the cisplatin applied before and after the surgical procedure on the healing of colonic anastomoses in rats. **J Bras Pathol Med Lab.**, v. 39, p. 143-149, 2003.

VIZZOTTO-JÚNIOR A.O, CAMPOS A.C.L., LEITE-MELLO E.V.S., CASTILHO T.J. Influence of preoperative supplementation of ômega-3 fatty acid in the healing of colonic anastomoses in malnourished rats receiving paclitaxel. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.42, p. 116-123, 2015.