

EFEITO DE ANTIBIÓTICOS E PROBIÓTICOS SOBRE O FÍGADO DE RATOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL

Luana Lopes de Oliveira Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Camila Quaglio Neves (PBC/UEM), Nilza Cristina Buttow (Orientador), e-mail: luana.bischoff18@gmail.com.

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas II / Morfologia / Histologia.

Palavras-chave: translocação, microbiota, hepatócitos

Resumo

A isquemia e reperfusão intestinal está relacionada a altas taxas de mortalidade, ocorrendo em cirurgias ou traumas, além de estar ligada a diversas doenças. A paralisação e retorno do fluxo sanguíneo no intestino causam respostas inflamatórias e o estabelecimento do estresse oxidativo, modificando a permeabilidade da barreira intestinal e desta forma possibilitando a translocação bacteriana, atingindo órgãos distantes como o fígado. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos no fígado de ratos *Wistar* tratados com probióticos e antibióticos submetidos a isquemia e reperfusão intestinal. Na metodologia adotada os animais foram tratados com probióticos e antibióticos e submetidos à isquemia e reperfusão intestinal. A morfologia dos hepatócitos e o estresse oxidativo do órgão foram avaliados. Todos os grupos analisados apresentaram diminuição na área dos hepatócitos e a maioria das alterações nos parâmetros de estresse oxidativo deram-se no grupo isquêmico tratado com antibiótico. Entre os principais resultados e contribuições da pesquisa é possível concluir que o tratamento com antibiótico afetou significativamente o fígado e os probióticos foram mais eficientes em protegê-lo.

Introdução

O estudo das consequências da isquemia e reperfusão (IR) intestinal é de grande importância considerando as altas taxas de mortalidade. A IR intestinal pode ocorrer em decorrência de cirurgias, embolia, trombose, doenças intestinais inflamatórias e utilização de fármacos vasoativos. A isquemia é a diminuição ou interrupção do fluxo sanguíneo em uma determinada área, gerando uma consequente baixa no fornecimento de oxigênio e nutrientes, por um período de tempo (RIBEIRO e WINSTON, 2005).. A reperfusão, por sua vez, é a recuperação do fluxo sanguíneo. Os maiores problemas causados na IR intestinal ocorrem nessa fase, pois o retorno do fluxo sanguíneo acontece com pressão muito maior e com uma concentração grande de oxigênio, favorecendo a geração de radicais livres que influenciam no estabelecimento do estresse oxidativo e de citocinas inflamatórias (RIBEIRO e WINSTON, 2005). Essas alterações podem causar respostas sistêmicas, que juntamente com a translocação bacteriana, que ocorre por causa da permeabilidade

aumentada do intestino, acometem outros órgãos além do intestino, podendo até mesmo causar falência múltipla de órgãos como fígado, rins e pulmões.

Na microbiota intestinal existem bactérias classificadas como benéficas, que atuam facilitando a digestão e absorção de nutrientes, além de melhorar o sistema imunológico (QUE et al, 2018). Outras bactérias podem ser nocivas ao funcionamento do organismo hospedeiro. A administração de antibióticos e probióticos afetam a composição da microbiota intestinal e podem ter relação com as respostas à órgãos distantes, principalmente em patologias que alteram a permeabilidade da barreira intestinal. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos tratamentos com probióticos e antibióticos sobre o estresse oxidativo do fígado e sua morfologia em ratos submetidos à IR intestinal.

Materiais e métodos

De acordo com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEM) sob nº 2869200218, foram usados ratos machos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)*, divididos em 7 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).

Os animais dos grupos SA e IRA foram tratados, via gavagem, com os 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. Os grupos SP e IRP receberam, via gavagem, os probióticos: *Lactobacillus paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* (8,3x10⁹ UFC), durante 14 dias antes da cirurgia e durante as 72 horas de reperfusão.

O procedimento de IR intestinal iniciou com anestesia através de Ketamina (100mg/kg de peso corporal) e Xilazina (20mg/kg de peso corporal), em seguida foi feita laparotomia expondo a porção distal do íleo para oclusão da artéria mesentérica superior (AMS) com um *clamp*, por 45 minutos. Após esse período, deu-se início à reperfusão de 72 horas. Os grupos *sham* passaram pelos mesmos procedimentos com exceção da oclusão da AMS. Por fim, foi administrado uma dose letal de Tiopental Sódico e o fígado foi coletado.

Uma porção do fígado foi utilizada para a histologia, esta foi fixada em Paraformaldeído 4% pH 7,4. Utilizou-se a metodologia padrão de embebição em parafina, cortes de 5µm em micrótomo e coloração com Ácido Periódico de Schiff (PAS). Foram capturas 30 imagens por lâmina para as análises de morfometria dos hepatócitos no programa Image Pro-Plus. Outra porção do fígado foi congelada em nitrogênio líquido, triturada e homogeneizada em tampão Fosfato de Potássio. O material foi centrifugado e dividido entre as técnicas de estresse oxidativo. O homogenato foi utilizado para análise dos grupos sulfídricos não proteicos (GSH). O sobrenadante foi separado entre as técnicas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidação lipídica (LOOH) e glutathione s-transferase (GST). O pellet restante foi utilizado para observações de mieloperoxidase (MPO) e n-acetilglicosaminidase (NAG). Todas as técnicas foram realizadas em placa de 96 poços e as leituras feitas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda

correspondentes. A análise estatística foi feita por One-Way ANOVA seguida de pós teste de Tukey. O software GraphPad Prism foi usado, adotando $p < 0,05$ como valor estatisticamente significativo, com resultados expressos como média $\pm$ erro padrão.

Resultados Discussão

Os resultados relacionados à área dos hepatócitos (μm^2) estão demonstrados na Figura 1. Verificou-se que houve diminuição na medida da área dos hepatócitos em todos os grupos em relação ao grupo controle (C). As porcentagens de diminuição são: SC 8,3%, SA 11,8%, SP 13,3%, IRC 15,2%, IRA 18,8% e IRP 21,3%, quando comparados ao grupo C. Dessa forma, é possível observar que os procedimentos de manipulação e IR intestinal afetam os hepatócitos e os tratamentos não foram capazes de inibir esses efeitos em nenhum dos casos.

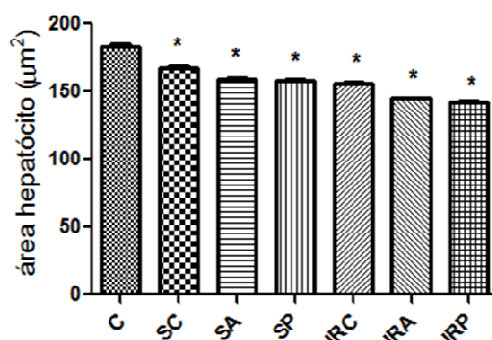


Figura 1 – Área dos hepatócitos em μm^2 de ratos submetidos à IR intestinal e tratados com antibióticos e probióticos. Grupos controle (C), sham (SC), sham tratado com antibiótico (SA), sham tratado com probiótico (SP), isquêmico (IRC), isquêmico tratado com antibiótico (IRA) e isquêmico tratado com probiótico (IRP). * $p < 0,05$

Com relação aos resultados do estresse oxidativo, como apontado na Figura 2 os resultados demonstraram um aumento significativo de 41,3% e 36% de GSH e GST respectivamente no grupo IRA quando comparado ao grupo C. Os níveis de SOD aumentaram nos grupos SP (45,1%), IRC (66,2%) e IRA (54,3%) quando comparados ao grupo C. Não houve alteração na peroxidação lipídica (LOOH) em nenhum grupo. Sobre os parâmetros inflamatórios, NAG apresentou aumento somente no grupo IRA de 12,9% comparado ao grupo C, já MPO não apresentou diferenças entre os grupos. Nos Gráficos a seguir é possível observar essas diferenças. Assim, é possível observar que nos grupos tratados com antibióticos obteve-se uma maior produção de GSH e SOD sendo que, segundo Ferreira e Matsubara (1997) agem como antioxidantes sobre agentes oxido-redutores que causam lesão ao tecido, sendo a SOD, a principal dentre eles a atuar no fígado em casos de IR. Segundo estes dados, é possível que a ruptura da barreira epitelial ocasionada pela IR (QUE et al., 2018) possibilitou a absorção dos antibióticos os quais tiveram um efeito tóxico sobre o fígado.

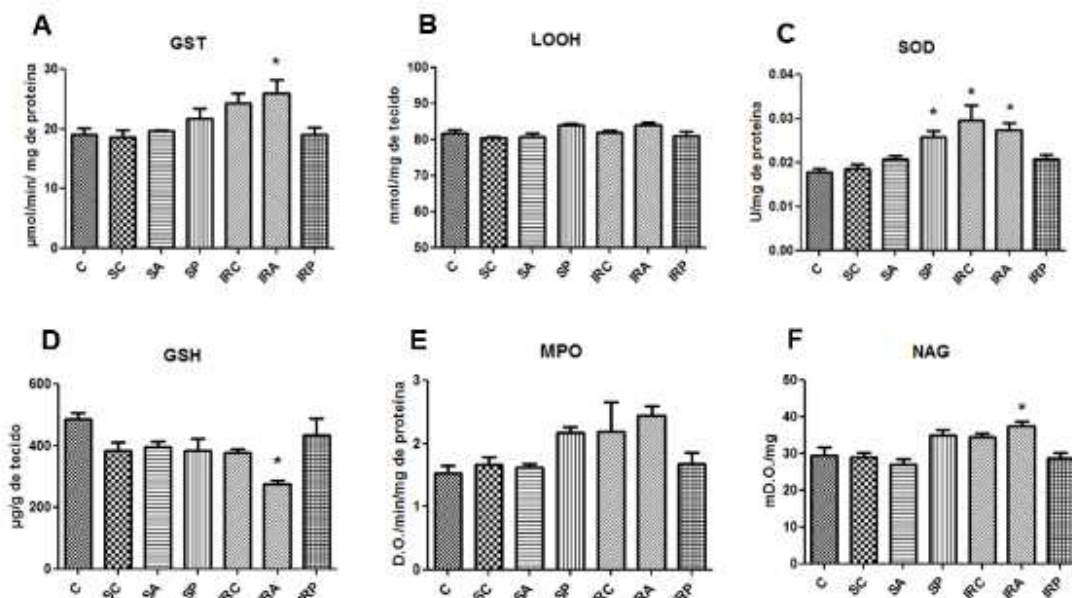


Figura 2 - Parâmetros de estresse oxidativo do fígado de ratos submetidos à IR intestinal e tratados com antibióticos e probióticos. A: glutatona s-transferase; B: hidroperóxidos lipídicos; C: superóxido dismutase; D: grupos sulfídricos não proteicos; E: mieloperoxidase; F: n-acetilglicosaminidase. Grupos controle (C), sham (SC), sham tratado com antibiótico (SA), sham tratado com probiótico (SP), isquêmico (IRC), isquêmico tratado com antibiótico (IRA). *p<0,05

Conclusões

Estes resultados nos permitem concluir que o tratamento com antibióticos foi prejudicial, alterando de forma mais significativa os parâmetros de estresse oxidativo. No entanto, os probióticos foram capazes de amenizar esses danos causados pela IR intestinal.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq, à Fundação Araucária, ao Departamento de Histologia da UEM.

Referências

- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, Jan./Mar. 1997.
- 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**, Augusta, USA, v.11, n.2, p.1233-1239, Fev. 2018.
- RIBEIRO, M. E.; WINSTON, B. Y. Lesões intestinais decorrentes de isquemia e reperfusão: fisiopatologia e modelos experimentais. **J. Vasc. Br.**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 183-194, Jun. 2005.