

TRATAMENTO COM ANTIBIÓTICOS AGRAVA E O TRATAMENTO COM PROBIÓTICOS TEM EFEITO PROTETOR SOBRE AS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DECORRENTES DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL NO ÍLEO DE RATOS

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: intestino, microbiota, vilosidades

Resumo:

A Isquemia e reperfusão (IR) intestinal ocorre em diversos casos clínicos devido ao bloqueio ou prejuízo no suprimento sanguíneo do intestino e posteriormente sua retomada com grande quantidade de oxigênio no local. Esta patologia resulta em alterações celulares e teciduais intestinais e na geração de radicais livres, causando danos à função da barreira intestinal, podendo provocar inflamação sistêmica. Nesse contexto, o objetivo foi analisar o efeito da manipulação da microbiota através da administração de antibióticos e probióticos na histologia da parede do íleo distal de ratos *Wistar* submetidos a IR intestinal. A isquemia de 45 minutos da artéria mesentérica superior (AMS) foi seguida por reperfusão de 72 horas. Os animais isquêmicos tratados com antibióticos (IRA) apresentaram redução da espessura da parede total, altura e largura de vilosidades, profundidade de criptas e aumento da espessura da camada muscular em relação ao grupo controle e ao grupo isquêmico controle. Já os animais isquêmicos tratados com probióticos (IRP) mostraram redução somente na largura das vilosidades e na espessura da camada submucosa em relação aos animais controle. Desta forma, a administração de probióticos promove maior proteção contra o dano histológico intestinal e a administração de antibióticos coopera para o agravamento das alterações histológicas causadas pela IR intestinal.

Introdução

O comprometimento do fluxo sanguíneo para o intestino na IR intestinal pode ter diversas causas como embolia, trauma, trombose, choque e transplante intestinal. A interrupção do fluxo sanguíneo compromete a chegada de oxigênio no intestino, o retorno do sangue e oxigênio na reperfusão favorece a produção de espécies reativas de oxigênio causando ainda mais danos e morte celular e tecidual (Gonzalez et al., 2015). O comprometimento da mucosa intestinal a partir da lesão por IR, promove destruição da barreira, o que leva ao aumento da permeabilidade vascular, seguido da translocação bacteriana, e a partir

desse cenário, provoca uma resposta sistêmica (Grootjans et al., 2010). Nesse contexto, a manipulação da microbiota pela utilização de antibióticos e probióticos são candidatos promissores visando a redução das complicações decorridas da IR intestinal. Estudos com a administração de probióticos antes ou durante a injúria intestinal, mostraram bons resultados no fortalecimento da barreira intestinal, reduzindo a translocação bacteriana e resposta inflamatória sistêmica e local (Andrade et al. 2015). Nuzzo e colaboradores (2018) afirmam que o tratamento com antibióticos tem efeito protetor, atenuando a ocorrência de necrose transmural e protegendo a parede intestinal dos efeitos da IR. O conhecimento sobre a melhor forma de tratamento visando amenizar os danos da IR intestinal são extremamente úteis. Desta forma, o objetivo do nosso estudo foi avaliar os efeitos da administração de antibióticos ou probióticos sobre a histologia do íleo de ratos submetidos à IR intestinal.

Materiais e métodos

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEM) de nº 2869200218. Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*) pesando 290 ± 4 g. Os animais foram distribuídos em 7 grupos: controle (C), *sham* controle (SC), *sham* tratado com antibióticos (SA), *sham* tratado com probióticos (SP), isquêmico controle (IRC), isquêmico tratado com antibióticos (IRA), isquêmico tratado com probióticos (IRP). Os animais dos grupos isquêmicos foram anestesiados com Ketamina (100mg/kg de peso corporal) + Xilazina (20mg/kg de peso corporal) e submetidos à laparotomia, exposição do íleo e isquemia por oclusão da AMS durante 45 minutos e posterior reperfusão por 72 horas. Os animais dos grupos *sham* passaram pelos mesmos procedimentos, exceto a oclusão da AMS. Os grupos SA e IRA receberam via gavagem o mix de antibióticos: Metronidazol, neomicina, vancomicina (100, 200 e 100 mg/kg de peso corporal, respectivamente), 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 (Simfort®): *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis* e *B. bifidum* ($8,3 \times 10^9$ UFC por animal), durante 14 dias antes da cirurgia e nas 72 horas de reperfusão. Os animais foram eutanasiados com dose letal de Tiopental Sódico® (120mg/kg) e a porção distal do íleo foi coletada, e fixada em Paraformaldeído 4%, embebidos em parafina, foram feitos cortes semisseriados em micrótomo (6 μ m) e coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). Imagens das lâminas foram capturadas em microscópio óptico (Olympus Bx41) e analisadas em software Image Pro-Plus para morfometria: da parede total, altura e largura de vilosidades, espessura de submucosa e muscular e profundidade de criptas. Foram adotadas 60 medidas para cada parâmetro. As análises estatísticas foram realizadas adotando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Os dados após teste de normalidade passaram pelo teste de Kruskal-wallis seguido pelo pós-teste de Dunns, sendo os resultados expressos como mediana e intervalo de confiança.

Resultados e Discussão

Os resultados das análises morfométricas realizadas podem ser observados na figura 1. A espessura da parede total nos grupos SC e SP apresentou aumento em relação ao grupo C ($p < 0,01$), enquanto no grupo IRA houve diminuição quando comparado ao grupo C e ao IRC ($p < 0,0001$). A altura das vilosidades foi maior nos grupos sham (SC e SA: $p < 0,0001$ e SP: $p < 0,001$) quando comparados ao grupo C. Já os animais do grupo IRA apresentaram redução na altura das vilosidades em relação ao grupo C ($p < 0,01$) e também ao IRC ($p < 0,001$). As alterações histológicas encontradas nos grupos sham mostram que apenas a manipulação do intestino já é capaz de provocar alterações nos animais e por isso a importância de existirem esses grupos.

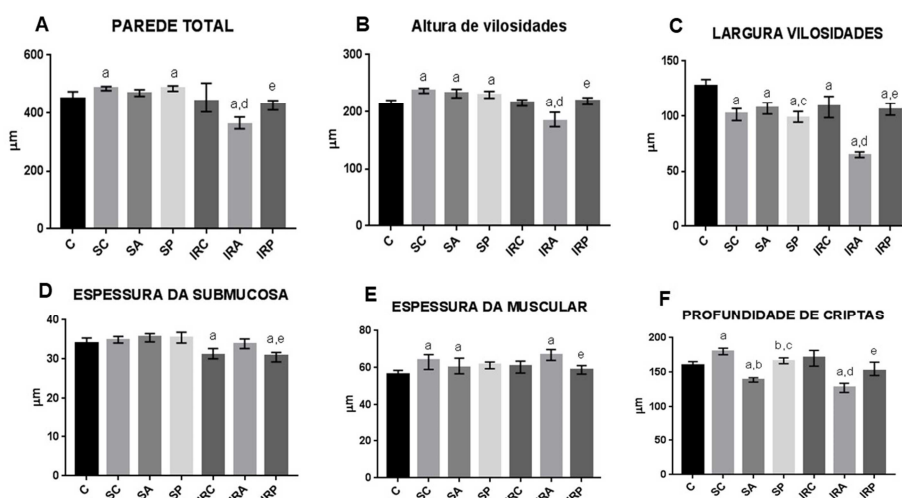


Figura 1: Morfometria do íleo de ratos *Wistar* tratados com antibióticos e probióticos e submetidos a IR intestinal. (A) espessura da parede total; (B) altura de vilosidades; (C) largura de vilosidades; (D) espessura da submucosa; (E) espessura da muscular; (F) profundidade de criptas. Grupos C: controle; SC: falso operado; SA: falso operado tratado com antibióticos; SP: falso operado tratado com probióticos; IRC: isquêmico controle; IRA: isquêmico tratado com antibióticos; IRP: isquêmico tratado com probióticos. As letras representam diferença estatística: (a) é diferente de C, (b) é diferente de SC, (c) é diferente de SA, (d) é diferente de IRC, (e) é diferente de IRA. Valores apresentados como mediana e intervalo de confiança.

Todos os grupos mostraram diminuição na largura das vilosidades, quando comparados ao grupo C ($p < 0,0001$). No grupo IRA a redução foi ainda maior, também em relação aos grupos IRC e IRP ($p < 0,0001$). A espessura da camada submucosa reduziu nos grupos IRC ($p = 0,001$) e IRP ($p < 0,0001$) em relação ao grupo C. Sendo assim, as camadas mucosa e submucosa foram as mais afetadas no grupo IRC, mostrando que as vilosidades são sensíveis a IR intestinal e que a mucosa sofre com a redução do suprimento sanguíneo na isquemia e se agrava com a subsequente reperfusão, destruindo enterócitos e com isso afetando a barreira intestinal e resposta inflamatória (Grootjans et al., 2010). Houve aumento da espessura da camada muscular nos grupos SC ($p < 0,05$), SA ($p < 0,01$) e IRA ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo C. A profundidade das criptas também sofreu aumento, no grupo SC em relação ao grupo C ($p < 0,0001$). Já nos grupos SA e IRA houve redução em relação ao grupo C ($p < 0,0001$) nesse parâmetro.

Como demonstrado, o grupo tratado com antibióticos (IRA) apresentou alterações em quase todos os parâmetros analisados. O uso de antibióticos

está relacionado com o afinamento da camada protetora de muco, propiciando o aumento do contato entre as células epiteliais e a microbiota, refletindo na estimulação imune e inflamatória no intestino (Ubeda e Pamer, 2012) e consequentemente nas alterações observadas na parede intestinal. Já a administração de probióticos (grupo IRP) mostrou melhores efeitos sobre a histologia do íleo dos animais, mostrando alterações somente na largura das vilosidades e na espessura da camada submucosa. Os probióticos tem relação com o fortalecimento da barreira intestinal, diminuindo a resposta inflamatória local e sistêmica, reduzindo as possíveis complicações da IR intestinal (Andrade et al., 2015) e consequentemente o dano histológico.

Conclusões

A isquemia intestinal de 45 minutos seguida de reperfusão de 72 horas provoca alterações histológicas intestinais em ratos *Wistar* principalmente nas vilosidades e na submucosa. Os antibióticos promovem maiores alterações histológicas, enquanto o tratamento com probióticos se mostrou mais efetivo contra o dano histológico provocado pela IR intestinal.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro. À minha orientadora prof. Nilza, e à Camila, por todo o apoio, ensinamentos, experiências e conhecimentos compartilhados.

Referências

ANDRADE, M. E. R.; ARAÚJO, R.S.; BARROS, P. A. V.; SOARES, A. D. N.; ABRANTES, F. A.; GENEROSO, S. V.; FERNANDES, S. O. A.; CARDOSO, V. N. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. **Clinical Nutrition**. v. 34, p.1080 – 1087, 2015.

GONZALEZ, L. M.; MOESER, A. J.; BLIKSLAGER, A. T. Animal models of ischemia-reperfusion-induced intestinal injury: progress and promise for translational research. **Physiology in Medicine**, v. 308, (2), p.63-75, 2015.

GROOTJANS, J.; LENAERTS.; DERIKX, J.; MATTHIJSEN, R.; BRUIJNE, A.; BIJNEN, A.; DAM, R.; DEJONG, C.; BUURMAN, W. Human Intestinal Ischemia-Reperfusion-Induced Inflammation Characterized: Experiences from a New Translational Model. **The American Journal of Pathology**, v.176, (5), 2010.

NUZZO, A.; MAGGIORI, L.; BURTZ C. P.; HATEM D. C.; RNOT, M.; HUGUET, A.; et al. O. Oral Antibiotics Reduce Intestinal Necrosis in Acute Mesenteric Ischemia: A Prospective Cohort Study. **The American Journal of Gastroenterology**. p.1- 5, 2018.

UBEDA, C.; PAMER, E. G. Antibiotics, microbiota, and immune defense. **Trends in Immunology**, v.33, (9), 2012.