

MANIPULAÇÃO DA MICROBIOTA PELO USO DE ANTIBIÓTICOS AMENIZA AS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PULMONARES CAUSADAS PELA ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL EM RATOS

Izabella Ruella Martinoti (PIBIC/CNPq/Uem), 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 e da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas: Morfologia e Histologia

Palavras-chave: Translocação bacteriana, probióticos, alvéolo.

Resumo:

A isquemia e reperfusão (IR) intestinal é uma patologia causada pela redução ou total bloqueio do fluxo sanguíneo no intestino, e seu subsequente retorno. Esse processo causa distúrbios na homeostase celular e favorece o aumento da permeabilidade da barreira intestinal, que por sua vez, permite que ocorra a translocação de bactérias luminiais e seus produtos para outros órgãos, como os pulmões, causando uma resposta inflamatória sistêmica e alterações morfológicas. Nesse contexto, a manipulação da microbiota intestinal pode ser uma estratégia para redução de danos em órgãos além do intestino, resultantes da translocação bacteriana. Dessa forma, o objetivo foi analisar o efeito dos tratamentos com antibióticos e probióticos sobre a histologia pulmonar de ratos *Wistar* submetidos a IR intestinal. Os animais foram submetidos a isquemia intestinal de 45 minutos por oclusão da artéria mesentérica superior (AMS) e reperfusão de 72 horas, recebendo tratamento com mix de probióticos ou antibióticos. A isquemia causou aumento da espessura da parede alveolar e redução da área e perímetro alveolares. A administração de probióticos resultou em alterações semelhantes ao grupo isquêmico, enquanto a administração do mix de antibióticos amenizou as alterações pulmonares, apresentando aumento somente na espessura da parede alveolar, e área e perímetro semelhantes aos animais controle. Dessa forma, a manipulação da microbiota intestinal através da administração de antibióticos ameniza as alterações histológicas pulmonares resultantes da IR intestinal em ratos.

Introdução

A isquemia é caracterizada pela redução ou total bloqueio do fluxo sanguíneo para um órgão que resulta em um estado de privação de oxigênio tecidual e o retorno do fluxo sanguíneo é denominado reperfusão. A privação de oxigênio durante a isquemia, resulta em distúrbios na homeostase celular (Cerqueira et al., 2005) que causam dano e morte celular (Gonzalez et al., 2015). Sendo assim, a reperfusão é necessária, porém contribui para o aumento do dano tecidual e da inflamação (Grootjans et al., 2016). Pois o

retorno repentino e em excesso do oxigênio, favorece o estabelecimento do estresse oxidativo (Haglund et al., 1999), acompanhado por uma resposta inflamatória sistêmica que pode levar ao mau funcionamento de outros órgãos, como os pulmões (Berlanga et al., 2002). Esse processo favorece a translocação bacteriana, que pode ser definida como a passagem de bactérias viáveis e endotoxinas do lúmen intestinal para outros tecidos como nódulos linfáticos mesentéricos e órgãos distantes (Cerqueira et al., 2005). Sabendo que a translocação de bactérias luminais é um evento importante na IR intestinal, a manipulação da microbiota intestinal surge como uma alternativa de estudo contra os efeitos da IR intestinal em órgãos distantes. Os probióticos são bactérias capazes de exercer efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro, fortalecendo a barreira intestinal, reduzindo a apoptose e as citocinas pro-inflamatórias (Salim et al., 2013) resultando em menor risco de translocação bacteriana. Já os antibióticos, são capazes de modular a microbiota intestinal mostrando efeitos positivos na redução do dano causado na parede intestinal pós IR e da resposta inflamatória (Yoshiya et al., 2011), além de reduzir a carga de bactérias translocadas. Pensando que IR intestinal é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente quando evolui para septicemia (Grootjans et al., 2016) e disfunção múltipla de órgãos (Gonzalez et al., 2015), o objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da manipulação da microbiota intestinal através de probióticos e antibióticos sobre o pulmão de ratos submetidos a I/R intestinal.

Materiais e métodos

Este estudo teve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEM) sob nº 2869200218. Ratos machos *Wistar* com peso de 290 ± 4 g, foram alojados no Biotério do Departamento de Ciências Morfológicas da UEM, receberam ração padrão e água *ad libitum* e permaneceram em ambiente controlado com iluminação (ciclo 12 horas claro/12 horas escuro) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Após adaptação, os animais foram distribuídos em 7 grupos, sendo eles: controle (C), *sham* controle (SC), *sham* antibióticos (SA), *sham* probióticos (SP), isquêmico controle (IRC), isquêmico antibióticos (IRA) e isquêmico probióticos (IRP). Para o estabelecimento da isquemia intestinal, os animais dos grupos IRC, IRA e IRP foram anestesiados com Ketamina (100mg/kg de peso corporal) + Xilazina (20mg/kg de peso corporal), submetidos à laparotomia, exposição do íleo e oclusão da AMS por meio de um *clamp* microvascular e amarrações laterais. A isquemia teve duração de 45 minutos e a reperfusão, 72 horas. Os grupos *sham* passaram pelos mesmos procedimentos, porém sem a oclusão da AMS.

Quanto ao tratamento, 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 a reperfusão. Já os grupos SP e IRP receberam, via gavagem, os probióticos: *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 durante a reperusão.

Após o período experimental, os animais foram eutanasiados com dose letal de Tiopental Sódico® (120mg/kg), via intraperitoneal, e o pulmão direito foi coletado e fixado em Paraformaldeído 4% pH 7,4. O material passou pelo procedimento de embebição em parafina, corte semi-seriado em micrótomo ($5\mu\text{m}$) e coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). Imagens das lâminas foram capturadas de forma aleatória, em 40x e as análises morfométricas de perímetro, área e espessura da parede alveolar foram feitas no software Image Pro Plus. A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 7 adotando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e não apresentando distribuição normal, foram analisados por Kruskal Wallis e pós-teste de Dunns.

Resultados e Discussão

Intestino e pulmão formam um eixo de comunicação bidirecional, onde alterações em um desses órgãos reflete em alterações também no outro, inclusive quanto a composição da sua microbiota e função (Bingula et al., 2017). Quando falamos em alterações intestinais, o reflexo pulmonar será dado principalmente via resposta imune, através da transferência de bactérias luminais e seus produtos para os nódulos linfáticos mesentéricos que estimulam a produção de células imunes que agem tanto no local, como sistematicamente em órgãos distantes levadas pelo sistema linfático e sanguíneo. Ou de forma direta, quando essa microbiota ou seus produtos conseguem atingir os pulmões, provocando a mesma resposta imune, só que agora diretamente no local (Bingula et al., 2017). Esse evento pode ser visto inclusive nos grupos *sham* (Figura 1), tendo em vista que somente a manipulação do intestino já é capaz de causar alterações pulmonares, provavelmente como um reflexo das alterações locais.

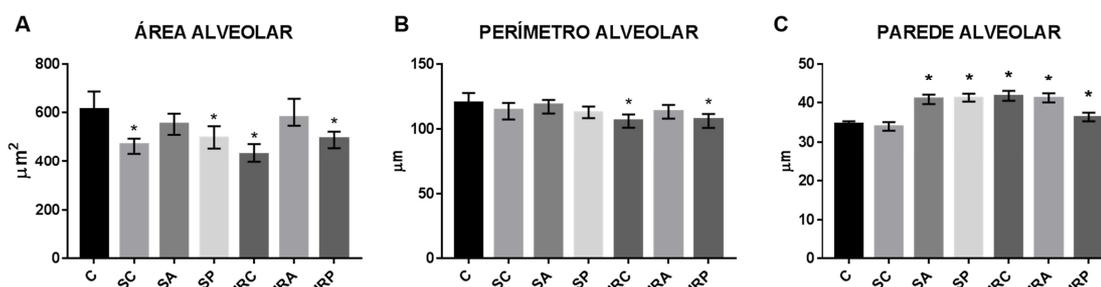


Figura 1- Análise morfométrica do pulmão de ratos *Wistar* submetidos à IR intestinal e tratados com probióticos e antibióticos. A: área alveolar; B: perímetro alveolar; C: espessura da parede alveolar. Grupos: controle (C); *sham* controle (SC); *sham* antibiótico (SA); *sham* probiótico (SP); isquêmico controle (IRC); isquêmico antibiótico (IRA); isquêmico probiótico (IRP). Resultados expressos como mediana e desvio padrão. Valor de $p < 0,05^*$.

A IR intestinal é responsável por causar alterações na arquitetura pulmonar, vistas de várias formas como por exemplo: presença de edema, hemorragia,

aumento da parede alveolar e presença de infiltrado de células inflamatórias (Guzel et al., 2012). Em nosso trabalho essas alterações foram vistas no grupo IRC como redução da área e do perímetro alveolar e aumento da parede alveolar, quando comparado ao grupo C. Em relação à manipulação da microbiota, a administração de antibióticos mostrou efeito melhor quando comparado aos probióticos, reduzindo as alterações pulmonares observadas, apresentando valores semelhantes aos do controle tanto de área quanto de perímetro alveolar. Essa melhora pode ser relacionada à redução da carga bacteriana presente no lúmen, susceptível a translocação bacteriana no momento da quebra da barreira intestinal causada pela IR intestinal. Dessa forma, menor volume de bactérias e seus produtos provocaram a resposta imune pulmonar, evitando alterações em sua histologia.

Conclusões

A isquemia e reperfusão intestinal é capaz de causar alterações na histologia pulmonar que se mantêm quando a microbiota intestinal é manipulada através da administração de probióticos. Porém, a depleção da microbiota pela administração de antibióticos ameniza os danos histológicos pulmonares resultantes da IR intestinal em ratos *Wistar*.

Agradecimentos

Agradecimento ao CNPq pelo aparato disponibilizado para o desenvolvimento e conclusão desta pesquisa. À professora Dra. Nilza, minha orientadora e à Camila pela oportunidade de ter ingressado nesse projeto e os ensinamentos que compartilharam comigo.

Referências

- Berlanga J, et al. **Prophylactic use of epidermal growth factor reduces ischemia/reperfusion intestinal damage.** Am J Pathol. 2002. 161: 373-379.
- Bingula R, et al. **Desired turbulence? Gut-lung axis, immunity, and lung cancer.** Journal of Oncology, 2017. 1-16.
- Cerqueira NF, et al. **Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review.** Acta Cir Bras. 2005. 20(4): 336-346.
- Gonzalez LM, et al. **Animal models of ischemia-reperfusion-induced intestinal injury: progress and promise for translational research.** Physiology In Medicine, 2015. 308(2): G63-G75.
- Grootjans J, et al. **Life and death at the mucosal-luminal interface: New perspectives on human intestinal ischemia-reperfusion.** World Journal of Gastroenterology 2016. 22(9): 2760-2770.
- Guzel A, et al. **Protective effect of curcumin on acute lung injury induced by intestinal ischaemia/ reperfusion.** Toxicology and Industrial Health, 2012. 29(7) 633-642.
- Haglund U, Bergqvist D. **Intestinal ischemia – the basics.** Langenbeck´s Archives of Surgery, 1999. 384(9): 233-238.

Salim SY, et al. **VSL#3 probiotics provide protection against acute intestinal ischaemia/reperfusion injury**. Beneficial Microbes, 2013. 4(4): 357-365.

Yoshiya K, et al. **Depletion of gut commensal bacteria attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury**. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2011. 301(6): G1020-G1030.