X EPCC
Encontro Internacional de Produção Científica
24 a 26 de outubro de 2017
ISBN 978-85-459-0773-2

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA PAREDE INTESTINAL DO DUODENO DE RATOS SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL

Mariana Conceição da Silva[1], *Amanda Modena Alves*[2], *Anne Caroline Santa Rosa*[3], *Julia Estuani*[4] *Nilza Cristina Buttow*[5], *Carmem Patrícia Barbosa*[5]

[1]Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da UNICESUMAR; [2]Acadêmica do curso de Educação Física da Universidade Estadual de Maringá (UEM); [3]Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da UEM; [4]Mestranda em Biologia Celular e Molecular (UEM); [5]Profesoras Doutoras do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM) da UEM.

RESUMO

O cérebro e o intestino conectam-se amplamente por meio do chamado eixo cérebro-intestino. Assim, afecções que prejudicam o sistema nervoso central podem modificar o funcionamento do próprio sistema nervoso entérico e por isso pesquisas recentes têm correlacionado o trato gastrointestinal a distúrbios do sistema nervoso central. A isquemia e a reperfusão tecidual são caracterizadas, respectivamente, pela interrupção e reestabelecimento do fluxo sanguíneo a uma determinada população celular. Ambas predispõem a alterações bioquímicas que desencadeiam danos celulares, de forma que a destruição tecidual a elas associada é denominada lesão por isquemia e reperfusão (I/R). A I/R cerebral é frequentemente observada em condições clínicas diversas e doenças humanas comuns. Por isso, o presente estudo intenciona compreender como a lesão por I/R cerebral pode influenciar na morfometria da parede intestinal do duodeno de ratos sujeitos a este modelo experimental. O modelo será induzido em *Rattus novergicus* da linhagem Wistar os quais serão comparados a animais controle. O intestino será coletado e preparado por técnicas histológicas a fim de viabilizar as análises da parede intestinal (profundidade das criptas, altura das vilosidades e altura da parede total). Sua realização se justifica pela grande incidência de lesão por I/R e pela íntima relação cérebro-intestino. Esperamos que nossos resultados revelem se de fato a I/R cerebral é capaz de alterar importantes aspectos morfométricos do duodeno dos animais submetidos a este modelo experimental.

PALAVRAS-CHAVE: Intestino; plexo mientérico; isquemia e reperfusão.

1 INTRODUÇÃO

O cérebro e o intestino se conectam amplamente por um eixo bidirecional conhecido como eixo cérebro-intestino, o qual permite a condução de informações aferentes do trato gastrointestinal para o sistema nervoso central (SNC) e informações eferentes do SNC ao trato gastrointestinal (MULAK e BONAZ, 2004). Adicionalmente, a organização estrutural do cérebro e do sistema nervoso entérico muito se assemelham em relação à morfologia de seus neurônios e de suas células gliais, assim como pela abundante comunicação interneuronal que apresentam (SCHEMANN, 2005).

Pesquisas recentes têm correlacionado o trato gastrointestinal a uma série de distúrbios do SNC. De acordo com Roos e Pawlina (2012), por exemplo, alterações patológicas que ocorrem nos neurônios do cérebro podem afetar negativamente as células do sistema nervoso entérico. Complementarmente, estudos de Ghaisas e colaboradores (2015) têm demonstrado que pacientes portadores da doença de Parkinson apresentam cronicamente uma resposta inflamatória de baixa intensidade no intestino, evidenciando ainda mais a correlação cérebro-intestino.

Uma causa relativamente comum de lesão nos neurônios do cérebro é a isquemia seguida da reperfusão. Enquanto a primeira é caracterizada como a interrupção parcial ou total do fluxo sanguíneo para uma determinada população celular, a segunda ocorre concomitantemente ao reestabelecimento do fluxo sanguíneo em áreas isquêmicas e se dá em função do retorno abrupto de oxigênio a tais áreas. Ambas os processos causam alterações enzimáticas, metabólicas, bioquímicas e inflamatórias que comprometem a oferta de substratos essenciais ao funcionamento celular culminando em danos celulares irreversíveis, disfunção e morte da célula (MENDES et al.,

ISBN 978-85-459-0773-2

2013; MIGUEL, MENEZES e ARAÚJO, 2012). Assim, a destruição tecidual e as lesões associadas à isquemia e à reperfusão são denominadas lesão por I/R, cuja patogênese têm sido associada a diversos mecanismos como, por exemplo, o estresse oxidativo que decorre da formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MIGUEL; MENEZES; ARAÚJO, 2012; BARBOSA, et. al.; 2010).

A I/R cerebral é frequentemente observada em casos de parada cardíaca, hipotensão arterial, choque séptico, asfixia, cirurgias cardíacas ou carotídeas complexas, hipoglicemia, embolia, trombose, ateroma e vários outros (MENDES et. al.; 2013). Pulsinelli e Brierley (1979) foram prógonos nos estudos experimentais de isquemia e reperfusão cerebral ao descreverem um modelo em animais no qual as artérias carótidas e vertebrais são ocluídas. Suas pesquisas serviram de base para inúmeros trabalhos futuros correlacionando os efeitos da I/R sobre o tecido cerebral mostrando, por exemplo, que a I/R cerebral pode desencadear enfraquecimento ou paralisia de vários órgãos do corpo, perda da coordenação motora e do raciocínio, além de severos problemas emocionais (FRAZÃO, 2017).

Por todo o exposto, o objetivo deste estudo é compreender como a lesão por I/R cerebral pode influenciar na morfologia da parede intestinal do duodeno de ratos submetidos a este modelo experimental.

2 JUSTIFICATIVA

As condições de isquemia e reperfusão cerebral seguidas de lesões imitam condições de uma lista crescente de condições clínicas e doenças humanas, e que podem levar a várias complicações fisiológicas. A inflamação sistêmica induzida pela lesão cerebral tem sido associada a danos em vários órgãos, inclusive o intestino. Dada a correlação entre cérebro e intestino, este campo merece maior atenção a fim de melhor compreender os impactos causados pela isquemia e reperfusão cerebral sobre o sistema nervoso entérico.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da isquemia e reperfusão cerebral sobre a parede intestinal, onde serão avaliadas as alturas das vilosidades, da camada mucosa, da camada submucosa, da túnica muscular e da parede total do duodeno, bem como a profundidade das criptas destes animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento será conduzido com *Rattus novergicus* da linhagem Wistar, com idade de 70 dias e peso aproximado de 250g, os quais serão divididos em dois grupos (n=10) sendo um grupo que sofre I/R cerebral e outro um grupo controle. Os animais do grupo I/R serão submetidos à indução da isquemia cerebral global e transitória (ICGT, modelo 4-VO) por um período de 15 minutos, conforme a rotina do Laboratório de Isquemia Cerebral e Neuroproteção da UEM, baseada no método de oclusão dos 4 vasos (“4-VO”) (PULSINELLI e BRIERLEY, 1979).

Sob anestesia por inalação de uma mistura de oxigênio e isofluorano, as artérias vertebrais serão eletrocoaguladas ao nível da primeira vértebra cervical. Em seguida, os ramos comuns das artérias carótidas serão expostos e isolados dos tecidos adjacentes através de um fio de seda, cujas extremidades ficarão exteriorizadas.

ISBN 978-85-459-0773-2

A incisão será fechada e o animal será deixado sob temperatura de 30ºC para se recuperar da anestesia. Mais tarde, os ratos serão submetidos à oclusão das artérias carótidas por 15 minutos, mediante tração dos fios de seda. Durante a oclusão, os sinais de perda do reflexo de endireitamento, midríase, estiramento tônico das patas e ausência de respostas à estimulação tátil serão considerados indicativos de uma isquemia efetiva.

A eutanásia será realizada com dose letal de 120 mg/kg de peso corporal de Pentobarbital Sódico®, onde será feita a coleta do duodeno. Após ser lavado em Tampão Fosfato de Sódio (PBS 0,1M, pH 7,4) e fixado por 3 horas em solução de Paraformaldeído 4% (pH 7,4), o segmento deverá ser aberto ao longo da borda mesentérica e lavado novamente em PBS para a remoção do excesso de fixador. Posteriormente, este segmento será mantido em etanol 70%, desidratado em álcoois, diafanizado em xilol e incluído em parafina. Secções semi-seriadas de 5 µm de espessura serão realizadas e os cortes serão submetidos aos métodos de coloração com Hematoxilina-Eosina (H.E.).

Realizaremos uma análise morfométrica da parede intestinal, onde será avaliada a altura das vilosidades, a profundidade das criptas, a altura da mucosa, da camada submucosa, da túnica muscular e da parede total do duodeno destes animais. Para tanto, serão realizadas 50 mensurações aleatórias por animal, usando imagens obtidas de uma câmara de alta resolução (*Q Color 3 Olympus® American, Burnaby, BC, Canadá*) acoplada a um microscópio *Olympus*® BX 41 (*Tokio, Japan*). Subsequentemente, estas imagens serão transmitidas a um computador usando o programa *Q Capture Pro* 5.1® e analisadas com o auxílio do programa de análise de imagem *Image Pro Plus* 4.5® (*Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA*).

A análise estatística dos dados obtidos será realizada por meio do programa *GraphPad Prism*® V.5 *software* sendo expressos como média ± erro padrão, com intervalo de confiança de 95%. Para a comparação entre os grupos, serão realizadas análises de variância *One-way* ANOVA, seguida de pós-teste de *Tukey*.

5 RESULTADOS ESPERADOS

Embora de extrema importância, estudos que avaliem diretamente os efeitos da I/R cerebral sobre o sistema nervoso entérico ainda são escassos. Desta forma, espera-se com a realização deste estudo ampliar o entendimento sobre como este modelo experimental pode de fato influenciar aspectos morfométricos (como a altura das vilosidades, da mucosa, da camada submucosa, da túnica muscular e da parede total, bem como a profundidade das criptas) do duodeno destes animais. Adicionalmente, intenciona-se melhor compreender a comunicação entre cérebro e intestino e quiçá ajudar em futuros possíveis tratamentos das complicações ocasionada por esta condição clínica.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição,** 2010.

FRAZÃO, A. **Isquemia cerebral**. Disponível em < https://www.tuasaude.com/isquemia-cerebral/>. Acesso em: 05 abr.2017.

GHAISAS, S.; MAHER, J.; KANTHASAMY, A. Gut microbiome in health and disease: linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases. **Pharmacology & therapeutics,** v.158, p.52- 62, 2016.

ISBN 978-85-459-0773-2

MENDES, F.F. et al. Isquemia cerebral em cães e gatos. **Enciclopédia Biosfera,** v. 9, n.16, 2013.

MIGUEL, M.P.; MENEZES, L.B.; ARAÚJO, E.G. Fisiopatologia do estresse oxidativo após isquemia e reperfusão cerebral e potencial neuroproteção do pequi (caryocar brasiliense). **Enciclopédia Biosfera,** v.8, n.15, 2012.

MULAK, A.; BONAZ, B. Irritable bowel syndrome: a model of the brain-gut interactions. **Med Sci Monit,** v.10, n.4, p.55-62, 2004.

PULSINELLI, W.A.; BRIERLEY, J.B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. **American Heart Association,** v.10, n.3, 1979.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas em correlação com a biologia celular e molecular.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

SCHEMANN, M. Controle da Motilidade Gastrointestinal pelo Cérebro do Intestino - O Sistema Nervoso Entero. **Revista de Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição**, v. 41, 2005.