

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CAMILA QUAGLIO NEVES

**MANIPULAÇÃO DA MICROBIOTA COM PROBIÓTICOS É MAIS
BENÉFICA QUE ANTIBIÓTICOS NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO
INTESTINAL**

Maringá

2022

CAMILA QUAGLIO NEVES

**MANIPULAÇÃO DA MICROBIOTA COM PROBIÓTICOS É MAIS
BENÉFICA QUE ANTIBIÓTICOS NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO
INTESTINAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor(a) em Ciências Biológicas.

Orientador: Nilza Cristina Buttow

Maringá

2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

N518m

Neves, Camila Quaglio

Manipulação da microbiota com probióticos é mais benéfica que antibióticos na isquemia e reperfusão intestinal / Camila Quaglio Neves. -- Maringá, PR, 2022.
85 f.: il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Nilza Cristina Buttow.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Morfológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2022.

1. Isquemia e reperfusão Intestinal. 2. Estresse oxidativo. 3. Microbiota. 4. Neurônios entéricos. I. Buttow, Nilza Cristina, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Morfológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). III. Título.

CDD 23.ed. 611.341

Márcia Regina Paiva - CRB-9/1267

CAMILA QUAGLIO NEVES

**MANIPULAÇÃO DA MICROBIOTA COM PROBIÓTICOS É MAIS
BENÉFICA QUE ANTIBIÓTICOS NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO
INTESTINAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Doutor(a) em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 26/08/2022

BANCA EXAMINADORA

Nilza Cristina Buttow
DCM/UEM

Maria Raquel Marçal Natali
DCM/UEM

Fernanda Losi Alves de Almeida
DCM/UEM

Eduardo José de Almeida Araújo
Departamento de Histologia/UEL

Stephanie Carvalho Borges
CAÁ Consultoria Ambiental Ltda ME

BIOGRAFIA

Camila Quaglio Neves nasceu em 18/11/1993. Graduada em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (UEM) em 2016. cursou mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular, concluído em 2018. Desde então, é aluna do mesmo programa, em nível de doutorado. Desenvolveu estudos em áreas temáticas relacionadas à isquemia e reperfusão intestinal, estresse oxidativo, neurônios entéricos e antioxidantes.

AGRADECIMENTO

Sem Deus, nada disso seria possível.

Agradeço imensamente a minha mãe Rosangela, meu pai Carlos e meu irmão Hugo pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões e desafios durante a vida. Minha avó Lazineira, precisa ser registrada aqui, por todo o seu amor.

Agradeço a minha orientadora Nilza, por todos esses anos sendo guia no meio acadêmico, me permitindo desenvolver o mestrado e o doutorado. Que segue firme nessa caminhada, mesmo com todas as dificuldades enfrentadas na pesquisa. É preciso muito querer e muito fazer para contornar os desafios dessa profissão.

A quem muito me ensinou profissional e pessoalmente, a Stephanie. Que desde o meu mestrado, me ensinou, com muita paciência, a maioria das técnicas que sigo desenvolvendo. Pedro que foi apoio e socorro desde os momentos difíceis com os animais, até a carga mental da escrita deste trabalho.

A todos os alunos, companheiros de orientadora e laboratório, pela valiosa ajuda e apoio nas coletas e ao longo dessa caminhada. Agradeço a Ana Paula Boromelo, pelo capricho e dedicação e a nossa técnica de laboratório Maria Angela.

Trago ainda nessa nova caminhada, o apoio, companheirismo e compreensão do Ricardo e da Caroline, me incentivando sempre.

Obrigada à CAPES, pelo apoio financeiro, permitindo a minha permanência no doutorado e o desenvolvimento desse trabalho. Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, ao laboratório de Histotécnica Animal e à Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade, suporte técnico e físico.

APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta por dois artigos científicos:

O primeiro artigo, intitulado “**Manipulação da microbiota intestinal de ratos com o uso de probióticos e antibióticos orais na isquemia e reperfusão intestinal reduz estresse oxidativo e inflamação**” teve o objetivo de comparar os efeitos da modulação da microbiota pelo tratamento com antibióticos e probióticos orais sobre o estresse oxidativo, inflamação, morfometria da parede e neurônios mientéricos do íleo de ratos *Wistar* submetidos à isquemia e reperfusão intestinal. Este artigo foi redigido, em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, de acordo com as normas do periódico “*Neurogastroenterology and Motility*”. ISSN: 1365-2982. Fator de Impacto 3.96.

O segundo artigo, intitulado “**Benefícios do uso de probióticos contra efeitos da isquemia e reperfusão intestinal em órgãos distantes**” teve o objetivo de avaliar o efeito da isquemia e reperfusão intestinal em órgãos distantes como pulmão, fígado e rim após a manipulação da microbiota intestinal pela administração de probióticos e antibióticos. Este artigo foi redigido, em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, de acordo com as normas do periódico “*Life Sciences*”. ISSN: 0024-3205. Fator de Impacto 6.78.

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO: Isquemia é o bloqueio parcial ou total do aporte sanguíneo que chega ao tecido, sendo a reperfusão, o posterior retorno do fluxo sanguíneo ao local. A isquemia e reperfusão (IR) intestinal pode acontecer pela oclusão da artéria mesentérica superior (AMS), em cirurgias em geral, transplantes de intestino, trombose, doenças inflamatórias intestinais, traumas, entre outros, estando associada à altas taxas de morbidade e mortalidade. A hipóxia estabelecida no momento da isquemia, favorece a quebra da homeostase do tecido, onde células não têm suas necessidades metabólicas supridas. No momento da reperfusão, o retorno do oxigênio nesse tecido favorece o estabelecimento de estresse oxidativo, de uma resposta inflamatória e de dano tecidual local. Nesse contexto, a barreira intestinal que age como proteção contra o meio externo, é danificada. A microbiota intestinal, em condições fisiológicas, vive em mutualismo com seu hospedeiro. A partir do momento da ruptura da barreira intestinal, bactérias e seus produtos sofrem a translocação bacteriana, atingindo linfonodos mesentéricos, circulação sistêmica e órgãos distantes. Nesse processo, a resposta inflamatória também é amplificada a níveis sistêmicos e órgãos como rins, pulmão e fígado podem sofrer alterações funcionais e estruturais. A composição da microbiota intestinal influencia processos de saúde e doença no hospedeiro. Algumas bactérias, como os *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*, são capazes de promover benefícios ao hospedeiro, sendo chamadas de probióticos. Por outro lado, algumas bactérias tem efeitos nocivos ao organismo, como *Escherichia coli* e *Salmonella*. Nesse sentido, antibióticos não absorvíveis de amplo espectro, podem modular a microbiota intestinal, reduzindo a quantidade de bactérias no ambiente luminal enquanto probióticos podem aumentar a densidade de bactérias benéficas ao hospedeiro.

OBJETIVO: Avaliar o efeito da manipulação da microbiota intestinal através da administração de antibióticos e probióticos sobre o estresse oxidativo, inflamação, morfometria do íleo, pulmão, rim e fígado, além de neurônios e células gliais mientéricas do íleo de ratos submetidos à IR intestinal.

MÉTODOS: Ratos *Wistar* foram distribuídos em quatro grupos sendo eles: (SC) falso operado (*sham*); (IRC) isquêmico controle; (IRA) isquêmico tratado com antibióticos; (IRP) isquêmico tratado com probióticos. A isquemia intestinal foi induzida nos animais dos grupos IRC, IRA e IRP mediante oclusão da AMS durante 45 minutos, seguida pela reperfusão de 72h. Os animais do grupo SC passaram pelos procedimentos cirúrgicos,

porém sem a oclusão da AMS. O tratamento com antibióticos no grupo IRA foi realizado diariamente, nas 72h antes e após a isquemia, do *mix* de antibióticos neomicina, metronidazol e vancomicina via gavagem e ampicilina na água de consumo. A administração de probióticos no grupo IRP ocorreu via gavagem, diariamente, durante 14 dias antes da isquemia e nas 72h posteriores, contendo *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis* e *B. bifidum*. Amostras do íleo, rins, fígado e pulmões foram destinadas para análises bioquímicas de estresse oxidativo e inflamação, além da histologia. O íleo ainda foi destinado à análise morfométrica de neurônios e quantitativa de neurônios e células da glia do plexo mientérico.

RESULTADOS: A IR intestinal resultou no estresse oxidativo e inflamação do íleo, refletindo em alterações na morfologia da parede intestinal, principalmente pela redução na altura de vilosidades, profundidade de criptas, espessura da submucosa, muscular e parede total. O dano intestinal estendeu-se ao plexo mientérico onde houve redução na densidade de neurônios da população geral e subpopulação nitrérgica, aumento do perfil celular desses neurônios e redução na densidade de células gliais S100⁺. A administração tanto de antibióticos quanto de probióticos foi benéfica quanto aos parâmetros bioquímicos analisados no íleo dos animais. Esses animais não apresentaram estabelecimento do estresse oxidativo e da inflamação. Apesar disso, apresentaram alterações na morfometria semelhantes ao grupo IRC. Quanto ao plexo mientérico, o grupo IRA permaneceu com alterações semelhantes ao grupo IRC, enquanto o grupo IRP apresentou somente redução na densidade de células gliais e aumento no perfil dos neurônios nitrérgicos. Além do dano local, pudemos perceber o efeito da IR intestinal à órgãos distantes através das alterações encontradas no grupo IRC nos pulmões, fígado e rins. Os três órgãos apresentaram aumento do estresse oxidativo e inflamação, sendo o principal deles, o pulmão. Além disso, alterações morfométricas pulmonares como redução na área alveolar, aumento da espessura da parede alveolar, redução na quantidade de colágeno, e alterações renais como redução na área dos corpúsculos, glomérulos e espaço de Bowman. A administração de antibióticos, de modo geral, resultou no mesmo quadro de estresse oxidativo e inflamação dos órgãos. A maioria das alterações morfométricas pulmonares e renais ainda foram observadas nesse grupo, além da redução da área de hepatócitos. Animais que receberam probióticos não apresentaram estresse oxidativo e inflamação hepática e renal, ainda que o pulmão tenha sofrido aumento nesses parâmetros, semelhante ao grupo IRC. O dano morfométrico pulmonar ainda foi observado nesse grupo, porém as alterações morfométricas renais foram amenizadas.

CONCLUSÃO: A IR intestinal é capaz de causar danos oxidativos, inflamatórios e histológicos intestinais que se estendem à órgãos distantes como pulmão, rins e fígado. A administração de antibióticos, apesar de melhorar os parâmetros bioquímicos intestinais, não impede o dano morfométrico e neuronal intestinal e nem o seu efeito à órgãos distantes. A administração de probióticos mostra efeitos benéficos contra os danos da IR intestinal à órgãos distantes, principalmente sobre fígado e rins, apontando que a manipulação da microbiota com probióticos é mais benéfica ao hospedeiro contra os efeitos da IR intestinal quando comparada a supressão da microbiota pelo uso de antibióticos de amplo espectro.

PALAVRAS-CHAVE: estresse oxidativo, hipóxia, inflamação, intestino

ABSTRACT

BACKGROUND: Ischemia is the partial or total blockage of the blood supply that reaches the tissue, with reperfusion, the subsequent return of blood flow to the site. Intestinal ischemia and reperfusion (IR) can occur due to occlusion of the superior mesenteric artery (SMA), in general surgeries, bowel transplants, thrombosis, inflammatory bowel diseases, trauma, among others, being associated with high rates of morbidity and mortality. The hypoxia established at the time of ischemia favors the breakdown of tissue homeostasis, where cells do not have their metabolic needs met. At the time of reperfusion, the return of oxygen in this tissue favors the establishment of oxidative stress, an inflammatory response and local tissue damage. In this context, the intestinal barrier that acts as a protection against the external environment is damaged. The intestinal microbiota, under physiological conditions, lives in mutualism with its host. From the moment of rupture of the intestinal barrier, bacteria and their products undergo bacterial translocation, reaching mesenteric lymph nodes, systemic circulation and distant organs. In this process, the inflammatory response is also amplified at systemic levels and organs such as kidneys, lungs and liver may undergo functional and structural changes. The composition of the gut microbiota influences health and disease processes in the host. Some bacteria, such as *Lactobacillus* and *Bifidobacteria*, are capable of promoting benefits to the host, being called probiotics. On the other hand, some bacteria have harmful effects on the body, such as *Escherichia coli* and *Salmonella*. In this sense, broad-spectrum non-absorbable antibiotics can modulate the intestinal microbiota, reducing the amount of bacteria in the luminal environment, while probiotics can increase the density of beneficial bacteria to the host.

OBJECTIVE: To evaluate the effect of manipulating the intestinal microbiota through the administration of antibiotics and probiotics on stress, inflammation and morphometry of the ileum, lung, kidney and liver, in addition to neurons and myenteric glial cells of the ileum of rats submitted to intestinal IR.

METHODS: Male *Wistar* rats were divided into four groups: (SC) false operated (sham); (IRC) ischemic control; ischemic (IRA) treated with antibiotics; (IRP) treated with probiotics. Intestinal ischemia was induced in the animals in the IRC, IRA and IRP groups by occluding the SMA for 45 minutes, followed by reperfusion for 72h. The animals in the SC group underwent surgical procedures, but without the occlusion of the SMA. Antibiotic treatment in the ARI group was performed daily, in the 72 hours before and

after ischemia, of the mix of antibiotics neomycin, metronidazole and vancomycin via gavage and ampicillin in drinking water.

Probiotics were administered in the IRP group via gavage, daily, for 14 days before ischemia and for 72 hours afterwards, containing *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis* and *B. bifidum*. Samples from the ileum, kidneys, liver and lungs were intended for biochemical analyzes of oxidative stress and inflammation, in addition to morphometry. The ileum was also used for morphometric analysis of neurons and quantitative analysis of neurons and glial cells of the myenteric plexus.

RESULTS: Intestinal IR resulted in oxidative stress and inflammation of the ileum, reflecting changes in intestinal wall morphometry, mainly due to a reduction in villus height, crypt depth, submucosal, muscular and total wall thickness. The intestinal damage extended to the myenteric plexus where there was a reduction in the density of neurons in the general population and nitrergic subpopulation, an increase in the cellular profile of these neurons and a reduction in the density of S100⁺ glial cells. The administration of both antibiotics and probiotics was beneficial in terms of the biochemical parameters analyzed in the ileum of the animals. These animals showed no establishment of oxidative stress and inflammation. Despite this, they presented changes in morphometry similar to the IRC group. As for the myenteric plexus, the IRA group remained with alterations similar to the IRC group, while the IRP group presented only a reduction in the density of glial cells and an increase in the profile of nitrergic neurons. In addition to the local damage, we could perceive the effect of intestinal IR to distant organs through the alterations found in the IRC group in the lungs, liver and kidneys. The three organs showed increased oxidative stress and inflammation, the main one being the lung. In addition, pulmonary morphometry changes such as reduction in alveolar area, increase in alveolar wall thickness, reduction in the amount of collagen, and renal changes such as reduction in the area of corpuscles, glomeruli and Bowman's space. The administration of antibiotics, in general, resulted in the same picture of oxidative stress and organ inflammation. Most of the pulmonary and renal morphometry changes were still observed in this group, in addition to the reduction in the area of hepatocytes. Animals that received probiotics did not show oxidative stress and hepatic and renal inflammation, although the lung showed an increase in these parameters, similar to the IRC group. Morphometric lung damage was still observed in this group, but renal morphometric changes were lessened.

CONCLUSION: Intestinal IR is capable of causing oxidative, inflammatory and intestinal histological damage that extends to distant organs such as lungs, kidneys and liver. The administration of antibiotics, despite improving intestinal biochemical parameters, does not prevent intestinal morphometric and neuronal damage or its effect on distant organs. The administration of probiotics shows beneficial effects against the damage of intestinal IR to distant organs, mainly on the liver and kidneys, indicating that the manipulation of the microbiota with probiotics is more beneficial to the host against the effects of intestinal IR when compared to the suppression of the microbiota by the use of probiotics. of broad-spectrum antibiotics.

KEYWORDS: oxidative stress, hypoxia, inflammation, gut

SUMÁRIO

Artigo 1: Manipulação da microbiota intestinal de ratos com o uso de probióticos e antibióticos orais na isquemia e reperfusão intestinal reduz estresse oxidativo e inflamação	15
Resumo	15
Introdução.....	16
Metodologia	18
Resultados	23
Discussão	28
Conclusão	34
Referências	35
Artigo 2: Benefícios do uso de probióticos contra efeitos da isquemia e reperfusão intestinal em órgãos distantes	41
Resumo	41
Introdução.....	42
Metodologia	43
Resultados	47
Discussão	53
Conclusão	59
Referências	60
Anexo 1 - Parecer de Aprovação do CEUA- UEM	65
Anexo 2 - Normas da revista Neurogastroenterology and Motility	66
Anexo 3 - Normas da revista Life Sciences	78

ARTIGO 1:**MANIPULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL DE RATOS COM O USO DE PROBIÓTICOS E ANTIBIÓTICOS ORAIS NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL REDUZ ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO**Camila Quaglio Neves¹Nilza Cristina Buttow²¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Maringá²Departamento de Ciências Morfológicas – Universidade Estadual de Maringá**RESUMO**

Introdução: O intestino é um órgão muito sensível à isquemia e reperfusão (IR) intestinal. Associada a graves complicações, essa patologia caracteriza-se pelo bloqueio do fluxo sanguíneo em determinada região do intestino e seu posterior restabelecimento, com oferta de oxigênio. Esse processo leva a geração de radicais livres, ativação da resposta inflamatória e comprometimento do tecido, causando disfunção do órgão. A microbiota intestinal tem importante relação com as células intestinais e com a resposta inflamatória tecidual e sistêmica do hospedeiro. A manipulação da microbiota através da administração oral de probióticos e antibióticos, pode conseqüentemente, alterar a resposta do tecido em desafios como a IR intestinal. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração oral de antibióticos ou probióticos sobre o estresse oxidativo, inflamação, morfometria da parede e neurônios mientéricos do íleo de ratos *Wistar* submetidos a IR intestinal. **Métodos:** A isquemia foi provocada pela oclusão da artéria mesentérica superior durante 45 minutos e a reperfusão estendeu-se por 72 horas. O mix de antibióticos foi administrado diariamente por 72 horas antes da isquemia e durante a reperfusão e o mix de probióticos foi administrado diariamente por 14 dias antes da isquemia e durante a reperfusão. **Resultados:** Ambos os tratamentos foram eficientes na redução do estresse oxidativo e inflamação local, causados pela IR intestinal. Os probióticos foram benéficos para o plexo mientérico, porém a administração de antibióticos não exerceu efeitos positivos sobre a morfometria intestinal e sobre o plexo mientérico dos animais. **Conclusão:** A manipulação da microbiota intestinal por probióticos e antibióticos se mostra benéfica contra alterações inflamatórias e oxidativas intestinais causadas pela IR intestinal, porém não oferecem proteção suficiente à parede

intestinal. Como os probióticos tem efeito positivo sobre o plexo mientérico, mostra-se como alternativa melhor para minimização dos efeitos da IR intestinal quando comparado aos antibióticos.

PALAVRAS-CHAVE: íleo, artéria mesentérica superior, plexo mientérico, hipóxia, mucosa intestinal

INTRODUÇÃO

Isquemia e reperfusão (IR) intestinal é uma patologia grave associada a altas taxas de mortalidade¹ com causas diversas como trombose, arterosclerose, doenças inflamatórias intestinais, hipovolemia² e cirurgias em geral, incluindo transplante de intestino.³ A oclusão de um vaso sanguíneo importante do intestino, como a artéria mesentérica superior, caracteriza a isquemia² por causar hipóxia e hiponutrição do tecido.⁴ O fluxo sanguíneo reduzido durante a isquemia é insuficiente para cumprir as necessidades metabólicas do tecido² resultando em disfunção mitocondrial e queda na produção de ATP e de agentes antioxidantes, induzindo a troca do metabolismo celular para anaeróbico.⁴ A atividade de enzimas citoplasmáticas é prejudicada e a célula apresenta falha nos canais de sódio/potássio e cálcio e desequilíbrio iônico, facilitando o influxo de água e consequente inchaço celular.⁴ Para o reestabelecimento hemodinâmico se faz necessário a reperfusão do tecido que sofreu isquemia, contudo, esse processo pode ser mais danoso que a própria isquemia, ocasionando danos locais e sistêmicos, principalmente pela ativação da resposta inflamatória.⁵ Nesse momento, quando há restauração do fluxo sanguíneo trazendo oxigênio, há grande produção de espécies reativas de oxigênio que se acumulam, induzindo a disfunção endotelial, dano no DNA⁴ em membranas lipídicas e proteínas⁶ e levando a morte celular.⁴ A resposta inflamatória local é então ativada, podendo tomar proporção sistêmica.⁷

Em casos de IR intestinal, o intestino apresenta danos teciduais. Neste processo primeiramente são atingidas as túnicas mucosa e submucosa² e também o Sistema Nervoso Entérico (SNE),⁸ cuja função é a de controlar a motilidade, absorção de nutrientes e a imunidade.⁹ A barreira intestinal é regulada por células do intestino, células imunes, SNE e a microbiota.¹⁰ Como a IR intestinal pode afetar esses componentes, essa patologia provoca disfunção da barreira intestinal,² permitindo a passagem de bactérias e endotoxinas luminiais, a chamada translocação bacteriana, afetando órgãos distantes¹¹ e provocando resposta inflamatória sistêmica,¹² por haver interação dessa microbiota ou

seus subprodutos, com as células de defesa em órgãos além do intestino.¹³ Essas bactérias luminais constituem a microbiota intestinal, que é composta por trilhões de bactérias essenciais para o correto funcionamento dos processos fisiológicos do hospedeiro.¹⁴ Tem função importante na manutenção da saúde do hospedeiro por ter influência sobre absorção de nutrientes, homeostase energética, controle do peso corporal, permeabilidade intestinal, respostas inflamatórias,¹⁵ digestão e imunidade.¹⁶ A composição da microbiota intestinal e os seus metabólitos influenciam na ocorrência, no desenvolvimento e no tratamento da IR intestinal, portanto, sua modulação e direcionamento pode ser uma abordagem terapêutica eficaz para o tratamento das complicações dessa patologia.¹⁷

Os probióticos são bactérias que quando administradas em doses adequadas conferem benefícios para a saúde do hospedeiro.^{18,19} Pertencem normalmente aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces*,²⁰ e são comumente usados na alimentação e/ou suplementação na busca da manutenção de microbiota saudável ou para sua restituição quando há distúrbios ou sintomas gastrointestinais.²¹ Alguns tipos de probióticos usados como forma de manipulação da microbiota, como os dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*,²² mostram ser boas estratégias no fortalecimento da função da barreira intestinal²³ tendo efeito tanto local quanto sistêmico, por agirem na regulação das respostas imune e inflamatória do hospedeiro²² e terem influência sobre processos metabólicos e neuro-endócrinos.²¹

Por outro lado, a supressão da microbiota intestinal através da administração de antibióticos, por reduzir a quantidade de bactérias luminais em contato com a barreira epitelial intestinal, limita a inflamação tanto local, quanto sistêmica²⁴ e pode reduzir sintomas intestinais como a diarreia em doenças inflamatórias intestinais.²⁵ Além disso, antibióticos de amplo espectro (neomicina, vancomicina, ampicilina e metronidazol) podem atenuar danos intestinais por amenizar inflamação e proteger a integridade intestinal.²⁶ Além da ação sobre a microbiota, antibióticos como o metronidazol, mostram efeitos antioxidantes sobre o cólon de ratos²⁷ e *in vitro* combatendo espécies reativas de oxigênio.²⁸ A depleção da microbiota com antibióticos (neomicina, vancomicina, ampicilina e metronidazol) já se mostra eficiente na proteção renal contra os danos causados pela IR renal por influenciar a resposta inflamatória, agindo na maturação de macrófagos.²⁹ E a administração de antibióticos (ampicilina, metronidazol e gentamicina) em animais neonatos também previne o desenvolvimento de enterocolite necrosante por proteger contra atrofia intestinal, inflamação e disfunções.³⁰

Dessa forma, sabendo que tanto antibióticos quanto probióticos tem a capacidade de modular a microbiota intestinal¹⁸ e que essas bactérias luminais estão relacionadas com as alterações histológicas e bioquímicas intestinais do hospedeiro, o objetivo desse estudo foi comparar os efeitos da modulação da microbiota pelo tratamento com antibióticos e probióticos orais sobre o estresse oxidativo, inflamação, histologia e neurônios mientéricos do íleo de ratos *Wistar* submetidos à IR intestinal.

METODOLOGIA

Animais

Este experimento foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEM) sob nº 2869200218. Foram utilizados ratos machos linhagem *Wistar* albinos (*Rattus norvegicus*) com peso entre 290 ± 4 g provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Ficaram alojados sob condições controladas de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo 12h claro/12h escuro) no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas da UEM. Receberam ração padrão (NUVILAB®, Colombo, Brasil) e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em 4 grupos (n=6), sendo eles: SC: falso operado tratado com veículo; IRC: submetido à isquemia intestinal pela oclusão da artéria mesentérica superior (AMS) e tratado com veículo; IRA: submetido à isquemia intestinal e tratado com mistura de antibióticos; IRP: submetido à isquemia intestinal e tratado com mistura de probióticos.

Isquemia e reperfusão intestinal

Após jejum de 15 horas, os animais dos grupos IRC, IRA e IRP foram anestesiados via intramuscular com a mistura de Ketamina® (100 mg/kg de peso corporal) (Sespo Indústria e Comércio LTDA, Paulínia, SP, Brasil) e Xilazina® (20 mg/kg de peso corporal) (Sespo Indústria e Comércio LTDA, Paulínia, SP, Brasil). Foram então submetidos à IR intestinal de acordo com Borges e colaboradores³¹. Passaram por laparotomia para exposição intestinal e isquemia da porção distal do íleo através da oclusão da AMS por um *clamp* microvascular e por amarrações laterais para evitar que o fluxo sanguíneo lateral irrigasse a região isquêmica. A isquemia estabeleceu-se durante 45 minutos e solução salina aquecida a 37°C foi utilizada para manutenção da temperatura e umidade da cavidade abdominal. Após esse período, o *clamp* e as amarrações foram retiradas e o abdome foi suturado, iniciando o período de reperfusão que persistiu por 72 horas. Os animais do grupo SC passaram pelo mesmo protocolo de jejum, anestesia,

laparotomia, exposição do intestino e sutura abdominal, mas não sofreram a isquemia intestinal.

Tratamentos

O tratamento com antibióticos foi realizado por 3 dias antes da isquemia e durante as 72h de reperfusão. Os animais receberam diariamente via gavagem a mistura de antibióticos metronidazol (100 mg/kg de peso corporal), neomicina (200 mg/kg de peso corporal) e vancomicina (100 mg/kg de peso corporal); e ampicilina na água de consumo (1 g/L). O tratamento com probióticos foi composto pela mistura de *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis* e *B. bifidum* ($8,3 \times 10^9$ UFC por animal), amido de milho e maltodextrina, conhecido pelo nome comercial SIMFORT® (Vitafor), que foi administrado diariamente via gavagem por 14 dias antes da isquemia e durante as 72h de reperfusão.

Coleta de órgãos

Após as 72h de reperfusão, os animais foram mortos por dose letal (120 mg/kg de peso) de Tiopental sódico® (Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, SP, Brasil) via intraperitoneal, para coleta do íleo distal e do ceco. O intestino delgado foi retirado e as placas de Peyer foram quantificadas em seu comprimento total através de observação macroscópica. O peso do ceco foi verificado. As amostras de íleo distal foram lavadas em Tampão Fosfato de Sódio (PBS) 0,1M (pH 7,4). Para imunohistoquímica e morfometria, os órgãos foram fixados em Paraformaldeído 4% (pH 7,4) durante 3h e 6h respectivamente. Para os ensaios de estresse oxidativo e inflamação, as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C até as análises.

Ensaio bioquímicos

Amostras de íleo foram submetidas às análises de parâmetros de estresse oxidativo e de inflamação, de acordo com Borges e colaboradores³¹. O tecido foi pesado e homogeneizado em tampão Fosfato de Potássio 200mM (pH 6,5). Parte do homogenato foi separado para a técnica de glutathiona reduzida e o restante foi centrifugado a 9000 rpm durante 20 minutos. Sobrenadante e pellet resultantes, foram utilizados para os outros ensaios. As análises foram realizadas em placa de 96 poços e as leituras feitas em espectrofotômetro.

- Níveis de glutathiona reduzida e de hidroperóxidos lipídicos

Para análise dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), ácido tricloroacético foi adicionado ao homogenato para precipitar proteínas. A amostra foi centrifugada a 9700 rpm por 15 minutos e adicionada ao GSH e ao ácido 2-nitrobenzóico. A leitura da reação foi a 412nm. Os valores foram interpolados em curva padrão de GSH e os resultados expressos em μg de GSH/g de tecido.

Os níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) no sobrenadante das amostras, foram avaliados de acordo com o método de Jiang e colaboradores³² levando em consideração o coeficiente de extinção molar de 4,3 mmolar/cm. A leitura foi realizada em 560 nm e os resultados foram expressos em mmol/mg de tecido.

- Atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathiona s-transferase

O sobrenadante foi utilizado para investigar a atividade da enzima catalase (CAT) através da reação de quebra do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A análise cinética adotou 240 nm como comprimento de onda das leituras, e os resultados foram expressos em mmol/min/mg de proteína. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi dosada a partir do sobrenadante das amostras, foi avaliada pelo método de Marklund e Marklund³³ que considera a capacidade da SOD de inibir a auto-oxidação do pirogalol. A leitura pontual foi realizada em 405nm e os resultados apresentados em U de SOD/ mg de proteína.

O método de Warholm e colaboradores³⁴ foi utilizado para analisar a atividade da enzima glutathiona s-transferase (GST). O coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos foi de 9,6 mmolar/cm. As leituras para a análise cinética foram realizadas em 340 nm e os resultados apresentados em mmol/min/mg de proteína.

- Atividade da n-acetilglicosaminidase e da mieloperoxidase

A atividade da n-acetilglicosaminidase (NAG) foi avaliada no pellet, na presença de tampão glicina e citrato. A leitura foi realizada a 405 nm e os resultados expressos em D.O/min/mg de proteína. No pellet também foi avaliada a atividade da mieloperoxidase (MPO) na presença de H_2O_2 e dimetilformamida. O resultado da reação foi lido em espectrofotômetro a 620 nm e os resultados expressos em D.O/min/mg de proteína.

- Espécies reativas de oxigênio

Para avaliar os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), uma porção do íleo foi homogeneizada em tampão Fosfato de Sódio 0,08M (pH 7,2). Toda a reação foi executada no escuro. O homogenato foi incubado em solução de diacetato de 2',7'-diclorofluorescina e dimetilsulfóxido. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 488 nm para excitação e 520 nm para emissão em placa escura. Os resultados foram expressos em unidade de fluorescência.

Morfometria

Uma porção do íleo distal de cada animal foi submetida ao processamento histológico convencional de desidratação, diafanização e emblocamento na parafina. Posteriormente foram realizados cortes semisseriados (6 μ m) em micrótomo e coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). Imagens foram capturadas em microscópio óptico (Olympus Bx41) na objetiva de 10x e analisadas utilizando o Software Image Pro-Plus. Foi realizada a morfometria da parede total, altura e largura das vilosidades, profundidade da cripta e espessura das camadas submucosa e muscular. Para cada parâmetro foram realizadas 60 medidas por animal. Os resultados foram expressos em μ m.

Imunohistoquímica

O íleo distal foi separado em porções transversais e aberto na borda mesentérica. Com apoio de estereomicroscópio as porções foram dissecadas para obtenção de preparados de membrana com exposição do plexo mientérico. Os preparados de membrana foram submetidos ao protocolo de imunohistoquímica para dupla marcação da população geral de neurônios (HuC/D⁺) e subpopulação de neurônios nitrérgicos (nNOS⁺) e marcação simples de S100 para as células gliais.

Os preparados de membrana foram lavados em PBS 0,1M (pH 7,4) e Triton X-100 (PBS-T) 0,5% por 3 vezes, durante 10 minutos cada. A incubação em solução de bloqueio foi realizada por 2 h contendo 3% de albumina de soro bovino (BSA) e 20% de soro de burro não imune em PBS-T 0,5%. As amostras foram então encubadas por 48h em solução de anticorpo primário contendo 2% de BSA e 2% de soro de burro em PBS-T 0,1%. Foi realizada dupla marcação com os anticorpos primários anti-HuC/D e anti-nNOS ou marcação simples para S100 (tabela 1). Os preparados de membrana foram lavados novamente com PBS-T 0,1% por 3 vezes durante 10 minutos e incubados em anticorpo secundário por 2h (tabela 1) ao abrigo de luz. Após a incubação, as membranas foram lavadas somente em PBS por 3 vezes durante 10 min e montadas em lâmina

histológica contendo Antifade (Life Technologies do Brasil Comm. Ind. Prod. Biotec. Ltda, SP, Brasil).

Tabela 1: Anticorpos primários e secundários utilizados na imunohistoquímica

Anticorpo primário	Hospedeiro	Diluição	Marca	Anticorpo secundário	Diluição	Marca
HuC/D	Camundongo	1:500	Invitrogen	anti-camundongo 488	1:500	Invitrogen
nNOS	Coelho	1:400	Invitrogen	anti-coelho 546	1:400	Invitrogen
S100	Coelho	1:400	Invitrogen	anti-coelho 488	1:400	Invitrogen

Análises morfoquantitativas dos neurônios e células da glia

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência e 30 imagens foram capturadas na objetiva de 20x, de cada animal para análises de quantificação e morfometria. Foram realizadas as medidas da área do perfil celular de 100 corpos celulares de neurônios imunomarcados com anticorpos anti-HuC/D⁺ e anti-nNOS⁺ para cada animal. Os resultados foram expressos em μm^2 . Para a análise quantitativa foram contados todos os neurônios e células gliais imunomarcadas para HuC/D⁺, nNOS⁺ e S100 nas 30 imagens capturadas. Os resultados foram expressos em quantidade de neurônios ou células da glia por cm^2 .

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas nos Softwares GraphPad Prim 7 e Statistica 10. Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade. Os dados de estresse oxidativo, inflamação, peso do ceco, placas de Peyer e quantificação de neurônios e células da glia, foram analisados por One-Way ANOVA seguido de pós-teste de *Tukey*, sendo os resultados expressos como média \pm erro padrão. Os dados de morfometria da parede intestinal e de neurônios foram analisados através do delineamento em blocos por modelos lineares generalizados usando ANOVA e pós-teste de Fisher. Os resultados foram expressos como mediana e intervalo de confiança. Para todos os casos, os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

As análises de estresse oxidativo no intestino (Figura 1) dos ratos mostraram que houve redução na atividade da CAT nos grupos IRC e IRA quando comparados ao grupo SC ($p<0,05$). Os três grupos isquêmicos apresentaram redução na atividade da SOD, sendo IRC ($p<0,01$), IRA ($p<0,001$) e IRP ($p<0,05$) em relação ao SC. Houve aumento das EROs e da LOOH somente no grupo que sofreu isquemia sem intervenção na microbiota (IRC) ($p<0,05$).

Quanto as análises de inflamação (Figura 1) observou-se que o grupo IRC apresentou aumento na atividade das duas enzimas analisadas em relação ao grupo SC, tanto da MPO ($p<0,001$) quanto da NAG ($p<0,05$). A manipulação da microbiota foi efetiva nesses parâmetros, pois os grupos IRA e IRP não apresentaram aumento na atividade da MPO e NAG.

O ceco sofreu aumento de peso nos animais tratados com antibiótico (grupo IRA) ($p<0,05$). Esse grupo também apresentou quantidade menor de placas de Peyer ($p<0,05$) em relação ao grupo SC (Figura 2). O grupo IRC apresentou aumento na quantidade de placas de Peyer quando comparado ao grupo SC ($p<0,05$).

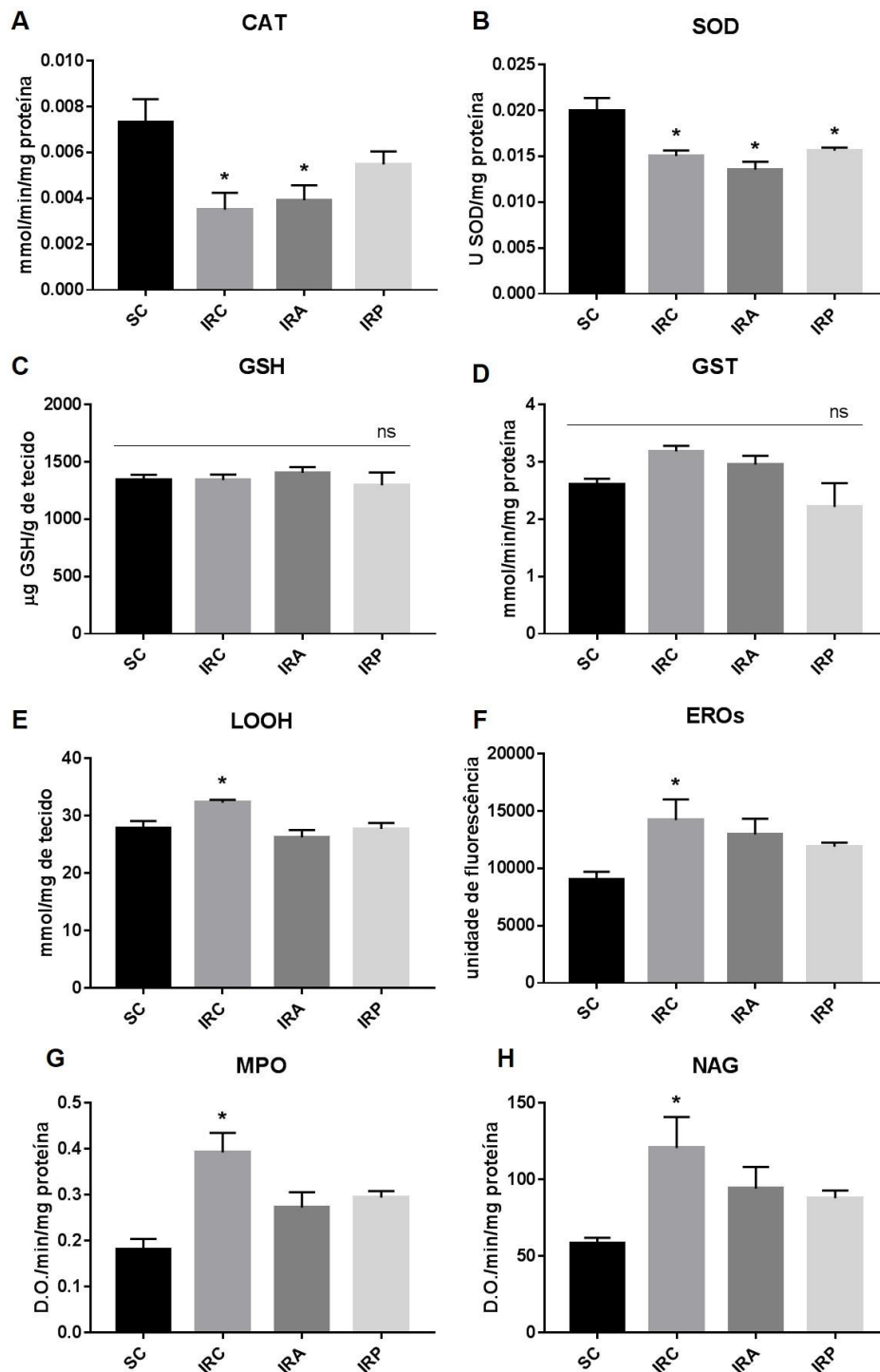


Figura 1: Análises bioquímicas de estresse oxidativo e inflamação do ileo de ratos *Wistar* submetidos à isquemia e reperfusão intestinal e tratados com antibióticos e probióticos. N=5 A: Atividade da catalase (CAT). B: Atividade da superóxido dismutase (SOD). C: Níveis da glutatona reduzida (GSH). D: Atividade da glutatona s- transferase (GST). E: Níveis de peroxidação lipídica (LOOH). F: Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). G: atividade da mieloperoxidase (MPO). H: Atividade da n-acetilglucosaminidase (NAG). Grupos SC: falso operado; IRC: isquêmico controle; IRA: isquêmico tratado com antibióticos; IRP: isquêmico tratado com probióticos. (*) diferença estatística em relação ao grupo SC. Valores apresentados como média \pm erro padrão.

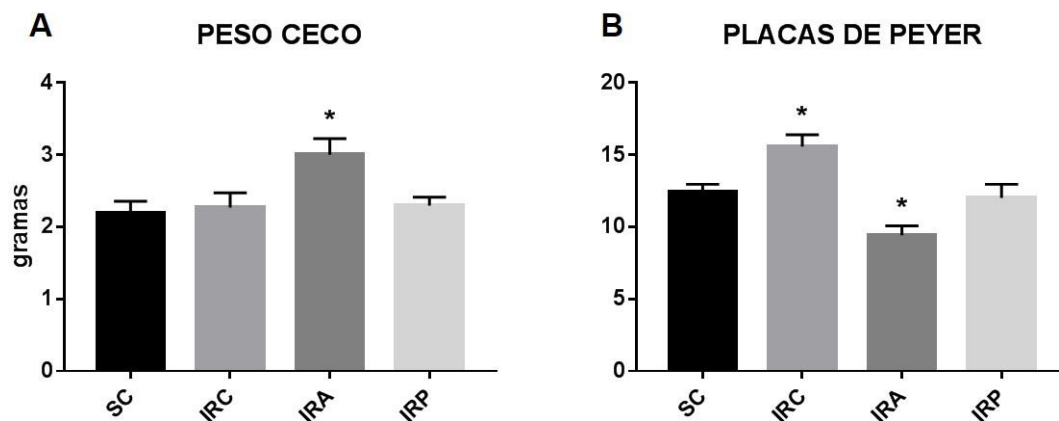


Figura 2: (A) Peso do ceco de ratos *Wistar* submetidos à isquemia e reperfusão intestinal e tratados com probióticos e antibióticos, n=6 (B) Quantidade de placas de Peyer no intestino delgado de ratos *Wistar* submetidos à isquemia e reperfusão intestinal e tratados com probióticos e antibióticos, n=7. Grupos SC: falso operado; IRC: isquêmico controle; IRA: isquêmico tratado com antibióticos; IRP: isquêmico tratado com probióticos. (*) diferença estatística em relação ao grupo SC Valores apresentados como média \pm erro padrão.

A figura 3 mostra os resultados da morfometria da parede do íleo dos animais. As vilosidades apresentaram altura reduzida nos três grupos isquêmicos (IRC, IRA e IRP) quando comparados ao grupo SC ($p < 0,0001$). A largura das vilosidades também foi reduzida nos grupos IRA ($p < 0,001$) e IRP ($p < 0,05$) em relação ao SC. A profundidade das criptas apresentou-se menor nos três grupos isquêmicos ($p < 0,0001$), assim como a espessura da submucosa IRC e IRP ($p < 0,0001$) e IRA ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo SC. A espessura da camada muscular reduziu nos grupos IRC ($p < 0,05$) e IRP ($p < 0,001$). Esse conjunto de alterações resultou na redução da espessura da parede total nos três grupos que sofreram isquemia ($p < 0,0001$) quando comparados ao grupo SC.

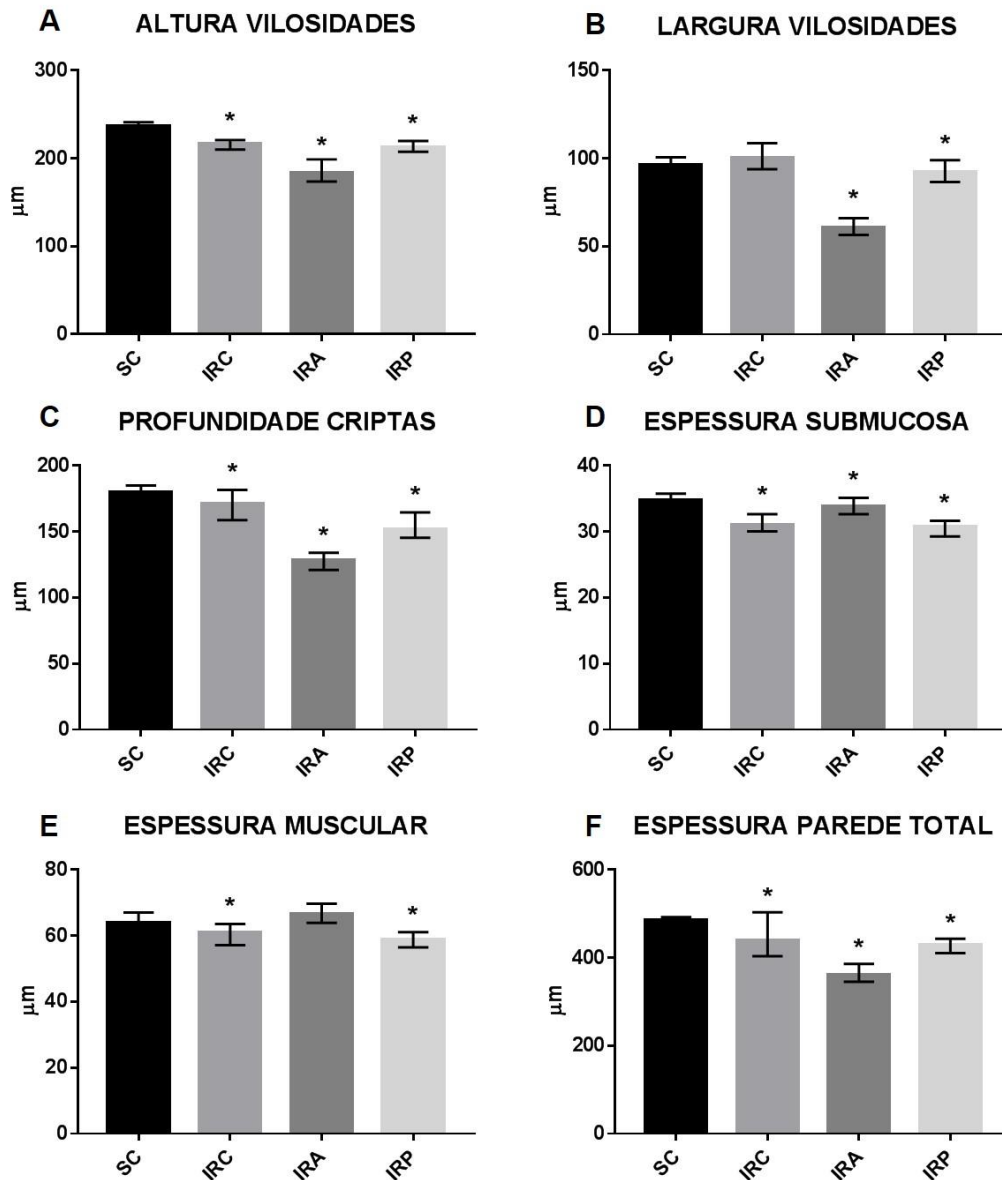


Figura 3: Parâmetros morfométricos do íleo de ratos *Wistar* submetidos à isquemia e reperfusão intestinal e tratados com probióticos e antibióticos. (A) Altura das vilosidades; (B) Largura das vilosidades; (C) Profundidade das criptas; (D) Espessura da submucosa. (E) Espessura da camada muscular; (F) Espessura da parede total. Grupos SC: falso operado; IRC: isquêmico controle; IRA: isquêmico tratado com antibióticos; IRP: isquêmico tratado com probióticos. (*) diferença estatística em relação ao grupo SC. Valores apresentados como mediana e intervalo de confiança.

Em relação às análises do plexo mientérico do íleo dos ratos (figura 4), houve redução na densidade da população geral de neurônios (HuC/D+) nos grupos IRC ($p < 0,05$) e IRA ($p < 0,01$) e da subpopulação nitrérgica (nNOS+) ($p < 0,05$) em relação ao grupo SC. O perfil da população geral de neurônios aumentou somente no grupo IRC ($p < 0,01$). Porém, quanto ao perfil dos neurônios nitrérgicos, observou-se aumento nos três grupos isquêmicos (IRC, IRA e IRP) ($p < 0,001$) em relação ao grupo SC. Células da

glia (S100+) também sofreram alterações pela IR, caracterizada pela redução na sua densidade nos grupos IRC, IRA e IRP ($p < 0,01$).

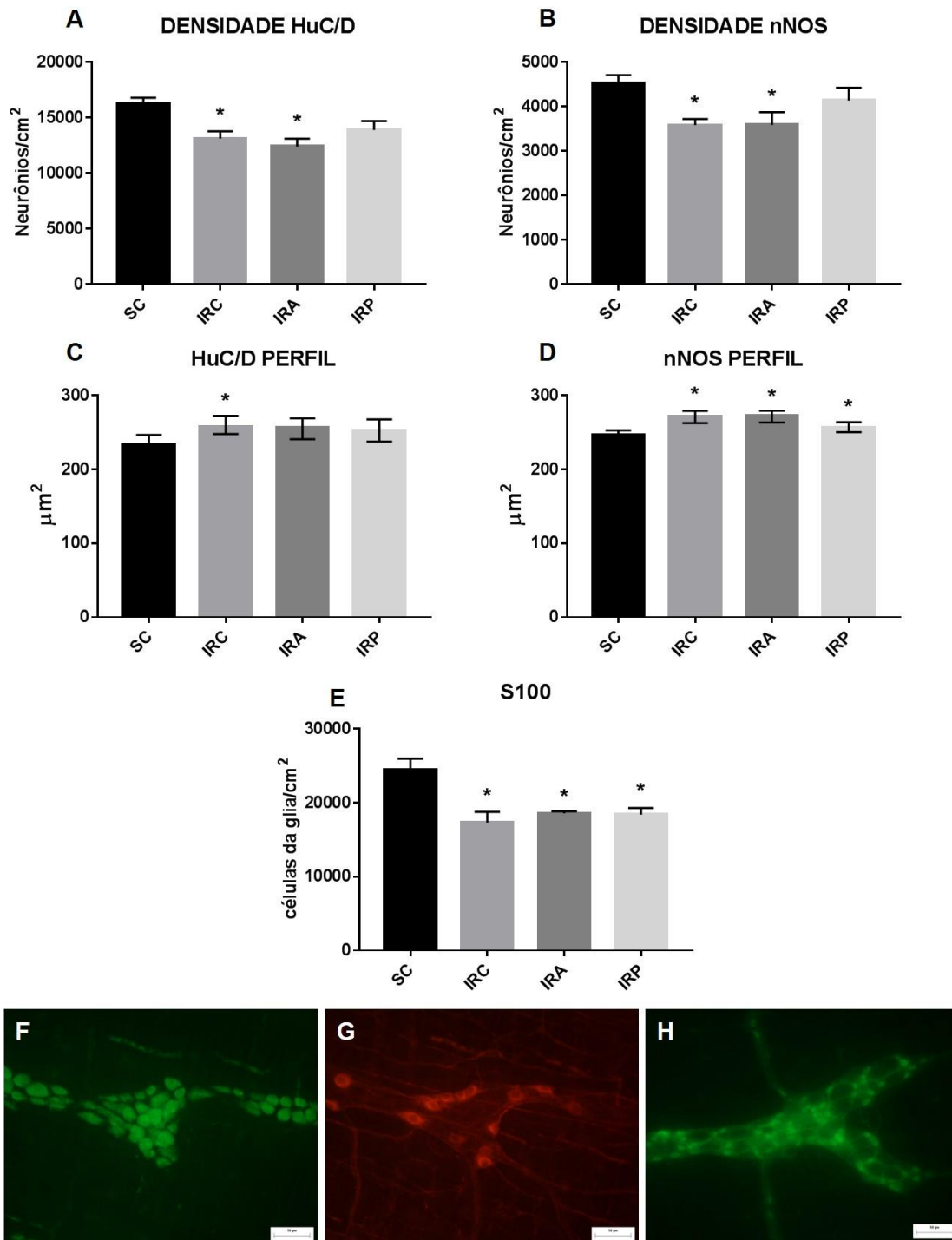


Figura 4: Análise dos neurônios e células da glia do plexo mientérico do íleo de ratos submetidos à IR intestinal e tratados com antibióticos e probióticos. N=5. A: Densidade da população geral de neurônios. B: densidade da subpopulação nitrérgica. C: Área do corpo celular da população geral de neurônios. D: Área do corpo celular da subpopulação nitrérgica. E: Densidade de células gliais. F: Imunofluorescência para neurônios HuC/D⁺. G: Imunofluorescência para neurônios nNOS⁺. H: Imunofluorescência para células da glia S100⁺. Aumento de 20x e escala = 50 μm. Grupos SC: falso operado; IRC: isquêmico

controle; IRA: isquêmico tratado com antibióticos; IRP: isquêmico tratado com probióticos. (*) diferença estatística em relação ao grupo SC. Valores de densidade apresentados como média \pm erro padrão e valores de perfil apresentados como mediana e intervalo de confiança.

DISCUSSÃO

A IR intestinal é uma condição clínica que causa importantes danos locais intestinais³⁵ e gera uma resposta sistêmica¹² que contribui para a sua gravidade e complexidade, principalmente por prejudicar a função da barreira intestinal.² Estudos demonstram que a modificação da microbiota intestinal através do uso de probióticos^{23,36,37} e antibióticos^{24,26} pode ter efeito positivo contra alterações intestinais e bioquímicas em diversas patologias. Isso ocorre devido a sua capacidade em modular o sistema imunológico e funções intestinais.¹⁴ Em nosso estudo, a manipulação da microbiota através de probióticos na isquemia intestinal mostrou efeitos positivos quanto aos parâmetros inflamatórios, oxidativos e neuronais. Porém as respostas morfométricas mostraram que alguns danos intestinais podem se manter mesmo com a melhora de outros parâmetros. Já a manipulação com antibióticos foi capaz de reduzir estresse oxidativo e inflamação intestinal nesse modelo experimental, porém sem benefícios quanto à proteção da parede intestinal e de neurônios mientéricos.

Inicialmente, as alterações causadas pela IR intestinal são observadas nos parâmetros de estresse oxidativo do íleo distal, principalmente quanto a redução na atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD e pelo aumento nos níveis de EROs e LOOH. Isso acontece porque durante o período de isquemia, a falta de disponibilidade de oxigênio, impede a realização de fosforilação oxidativa e o ATP disponível sofre depleção até hipoxantina. Com a reperfusão, a xantina oxidase oxida a hipoxantina acumulada, usando o oxigênio que voltou a ser ofertado. Essa reação resulta na produção aumentada de radicais livres de oxigênio³⁸ e consequente sobrecarga nas defesas antioxidantes, estabelecendo o quadro de estresse oxidativo.³⁹ Os radicais livres, sendo moléculas instáveis, são capazes de oxidar diversas biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, levando a alteração na composição dessas biomoléculas.⁴⁰ Sabendo que os lipídios de membrana e as lipoproteínas são os maiores alvos,⁴¹ o aumento na peroxidação lipídica, vista em nosso estudo no grupo IRC, pode resultar em alterações na composição, estrutura e dinâmica das membranas lipídicas celulares,⁴² levando dessa forma, a danos celulares e teciduais. Nesse contexto, quando os animais foram tratados com antibióticos ou com probióticos, as alterações sobre o estado oxidativo do íleo, causadas pela IR

intestinal, foram menores. O grupo tratado com antibióticos (IRA) apresentou redução na atividade da CAT e da SOD, porém sem o estabelecimento de dano lipídico e aumento significativo de EROs. Já no grupo dos probióticos (IRP), as alterações em relação ao grupo SC limitaram-se a redução somente da atividade da SOD. Essas observações mostram que ambos os tratamentos tem efeito positivo contra o estresse oxidativo no íleo após IR intestinal, de forma mais significativa, a administração de probióticos. Entre os antibióticos administrados, o metronidazol, após administração oral, mostrou ação antioxidante sobre a oxidação de proteínas no cólon de ratos²⁷ e na redução da peroxidação lipídica sérica de ratos que sofreram queimaduras.⁴³ Essa atividade antioxidante parece acontecer pela redução da geração e/ou inativação de espécies reativas de oxigênio.²⁸ O efeito benéfico dos probióticos está ligado à sua capacidade de fortalecer os mecanismos de defesa naturais do organismo e por evitar a formação de compostos tóxicos ou fazer a sua neutralização.⁴⁴ Especificamente, algumas bactérias probióticas, como *Lactobacillus acidophilus*, utilizada em nosso estudo, são bactérias ácido lácticas que já demonstraram efeito antioxidante em diferentes estratégias: como quelante de metais, neutralizando espécies reativas de oxigênio e apresentando atividade redutora.⁴⁵

Os processos de estresse oxidativo e inflamação estão intimamente relacionados e muitas vezes são encontrados simultaneamente em diversas patologias.⁴⁶ Nesse contexto, o estresse oxidativo no grupo IRC, foi acompanhado do aumento da atividade dos marcadores inflamatórios: MPO e NAG. A resposta inflamatória induzida pela IR está relacionada com a produção de metabólitos da microbiota e sua interação com o hospedeiro.⁴⁷ A IR intestinal pode causar a alteração em epítomos na superfície das células afetadas, de forma que anticorpos naturais se liguem a esses epítomos e estimulem a resposta inflamatória por ativar o sistema complemento, atraindo células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos.²⁶ A inflamação induzida pela IR intestinal conta com a ativação do sistema complemento, aumento de citocinas na circulação endotelial e ativação de neutrófilos. Essa resposta é estimulada tanto pelos componentes intracelulares que extravasaram após o dano celular e morte dessas células, que geram padrões moleculares associados à danos (DAMPs) e também pela microbiota e seus produtos, que através dos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) interagem com receptores e desencadeiam a resposta inflamatória.⁴⁸ Mobiliza inicialmente neutrófilos, que é seguido pelo recrutamento dos macrófagos,⁴⁹ sendo a MPO utilizada como marcador de atividade de neutrófilos no tecido e a NAG, como marcador da ativação de

macrófagos.⁵⁰ A produção de mediadores inflamatórios locais está relacionada com alterações na permeabilidade da parede intestinal e com a facilitação da translocação bacteriana, que podem resultar em uma resposta inflamatória sistêmica e afetar órgãos além do intestino.²² Essa resposta inflamatória induzida pela IR intestinal não foi vista nos animais que receberam antibióticos. A ação protetora dos antibióticos nesse caso se deve provavelmente à diminuição da carga bacteriana no ambiente luminal e consequentemente a quantidade de bactérias que entraram em contato com o sistema imune do hospedeiro no momento da quebra da barreira epitelial intestinal; resultando em controle da inflamação tanto local quanto sistêmica.²⁴ Estudos mostram a ação da depleção da microbiota, com a mesma mistura de antibióticos usados nesse trabalho, sobre a resposta inflamatória intestinal, reduzindo a ativação do sistema complemento e a presença de IgM e IgA no intestino²⁶ além da redução de subprodutos da microbiota, como ácidos graxos de cadeia curta, que interagem com sistema imune e contribuem para alterações patológicas.⁵¹ O metronidazol é capaz de reduzir a inflamação intestinal em animais que receberam transplante fecal de microbiota.⁴⁷ Dessa forma, mostrando que os antibióticos podem ser adjuvantes ao tratamento anti-inflamatório pela ação de supressão da microbiota intestinal.²⁵ Já o grupo que recebeu probióticos, não apresentou aumento na atividade da MPO e da NAG. A melhora do quadro inflamatório no grupo IRP, indica que os probióticos possuem a capacidade de modular as respostas imunes e inflamatórias do hospedeiro.^{21,37} A melhora parece acontecer por meio de um fator bioativo que pode ser um componente próprio das bactérias ou algum produto liberado por elas com efeito positivo inclusive sobre a barreira intestinal.⁵² Os probióticos mostram atividade anti-inflamatória *in vitro*, além de se mostrarem efetivos na redução da expressão de citocinas pro-inflamatórias principalmente através de sua ação sobre receptores Toll-like³⁷ e na redução da MPO.³⁶ Especificamente, os *Lactobacillus casei* apresentam essa ação anti-inflamatória *in vitro* mediada pela inibição da via do NF- κ B.⁵³ *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são capazes de reduzir a expressão de TNF- α .⁵⁴ A atividade dos probióticos sobre a resposta inflamatória tem também relação com a restauração da integridade da barreira intestinal após dano.²² Por isso o tratamento com probióticos vem sendo estudado em doenças crônicas³⁷ como as doenças inflamatórias intestinais.²¹

Além das alterações bioquímicas, alterações morfológicas foram observadas. A IR intestinal provocou aumento na quantidade de placas de Peyer intestinais no grupo IRC. O tratamento com antibióticos causou aumento no tamanho do ceco e redução na quantidade de placas de Peyer no grupo IRA. Essa é uma mudança observada pós-

supressão da microbiota por ingestão de antibióticos de amplo espectro,^{26,55} onde os animais acabam adquirindo características fenotípicas de animais *germ-free*.⁵⁶ O aumento do tamanho do ceco, está intimamente relacionado com a microbiota intestinal, sendo pela ausência dela ou pela supressão por administração de antibióticos.⁵⁶ Em nosso trabalho, o número de Placas de Peyer aumentou no grupo IRC. As placas de Peyer possuem grande relação com antígenos e bactérias luminais, sendo chamadas de sensores imunológicos do intestino. Elas controlam a tolerância imunológica e a defesa contra patógenos e se desenvolvem em resposta às bactérias comensais.⁵⁷ O fenótipo semelhante ao animal *germ-free*, com redução do número de placas de Peyer, aumento do ceco e diminuição na taxa de proliferação celular, são resultado da falta de estímulo dessas estruturas pelas bactérias comensais, já que estão em número reduzido. Essas características são reversíveis e modificáveis,⁵⁶ de acordo com a composição e manipulação da microbiota.

As alterações intestinais causadas pela IR intestinal não se limitam apenas ao estresse oxidativo e inflamação. As células epiteliais intestinais são responsáveis pela produção de proteínas, citocinas e hormônios e tem alta sensibilidade à hipóxia.⁵⁸ O tecido responde aos níveis variados de espécies reativas de oxigênio formadas durante a IR intestinal, de diversas formas, desde aumentando a proliferação celular, interrompendo ciclo celular e até recorrendo aos processos de apoptose e necrose.⁵⁹ Desse modo, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio⁶⁰ e a inflamação local⁶¹ levam ao dano celular e tecidual. De acordo com Lindstrom e Ekblad³⁵ a destruição das vilosidades pode ser vista logo nas primeiras horas de reperfusão e a recuperação da parede intestinal vai acontecendo ao decorrer do tempo de reperfusão. Pudemos observar que, após 72 horas de reperfusão não é mais possível observar a ruptura da barreira epitelial, no entanto, o dano histológico (grupo IRC) é caracterizado pela redução da altura das vilosidades, da profundidade de criptas, da espessura da submucosa e da muscular, resultando na redução da espessura da parede total nos animais isquêmicos controle. As alterações na parede intestinal foram semelhantes também nos animais que receberam antibióticos (grupo IRA) e probióticos (IRP). O grupo IRA apresentou redução em todos os parâmetros analisados, exceto na espessura da muscular e o IRP mostrou redução em todos os parâmetros. A microbiota intestinal tem íntima relação com as células intestinais e processos digestivos além do papel importante na regulação de genes do ciclo celular, tendo influência no controle da proliferação celular do epitélio intestinal. A administração de antibióticos afeta a atividade regenerativa das células do epitélio

intestinal⁵⁶ o que pode explicar a redução na espessura da parede intestinal e da morfometria das vilosidades. A manipulação da microbiota através do uso de vancomicina, ampicilina, metronidazol e neomicina tem efeito supressor sobre a expressão de genes mitocondriais e ribossomais. Os genes mitocondriais são de proteínas relacionadas à cadeia transportadora de elétrons⁶². A ação ocorre por depleção da microbiota (afeta mais a lâmina própria), ação direta dos antibióticos e também por ação da microbiota remanescente que é resistente aos antibióticos administrados (ambos agindo sobre vilosidades e criptas). Esse processo leva ao mau funcionamento das mitocôndrias e comprometimento das células intestinais⁶². Já o aumento na espessura da camada muscular tanto nos animais IRA, é esperado em animais tratados com antibióticos como parte da sua mudança de fenótipo⁵⁵. Apesar de estudos mostrarem que probióticos tem efeito positivo sobre a barreira intestinal, em nosso estudo isso não foi suficiente para proteger a parede intestinal dos danos sofridos pós IR intestinal. *Bifidobacterium bifidum* é capaz de promover a integridade das junções de oclusão através da maior produção de seus derivados: acetato e formato, melhorando a função da barreira intestinal, preservando a via paracelular.⁵⁴ *B. bifidum* também reduz o dano intestinal visto no modelo de enterocolite necrosante em ratos, patologia que também conta com o aumento da permeabilidade intestinal.⁶³ Além disso, tem efeito anti-apoptótico, preservando a integridade intestinal.⁶⁴ *Bifidobacterium lactis* parece acelerar a recuperação da mucosa após insulto.⁶⁵

Os eventos oxidativos e inflamatórios decorrentes da hipóxia tecidual e sua posterior reperfusão, podem resultar em danos neuronais e gliais mientéricos, além do já visto dano na mucosa intestinal. Em nosso trabalho, o grupo IRC apresentou redução na densidade de neurônios gerais e nitrérgicos, além do aumento do perfil neuronal da população geral e da subpopulação nitrérgica e redução na densidade de células gliais quando comparado ao grupo SC. Estudos mostram que IR intestinal causa danos nos neurônios entéricos^{8,66,67} inclusive sua redução em número.³⁵ Essa redução acontece de forma gradativa durante o tempo de reperfusão, estendendo-se por pelo menos 10 semanas,³⁵ sendo que os neurônios nitrérgicos mostram-se mais suscetíveis a neuropatias entéricas, como a causada pela IR intestinal, tendo relação com seu tipo de neurotransmissor.⁶⁸ Nesse modelo, um componente muito importante na fisiologia do SNE⁶⁹ é impactado: a microbiota. A microbiota intestinal tem relação com o SNE desde sua formação e desenvolvimento até a vida adulta.⁷⁰ Os produtos e metabólitos da microbiota agem como moléculas sinalizadoras sobre o SNE, inclusive modulando a

ativação glial e a neuroinflamação.⁷⁰ A interação entre microbiota e hospedeiro e sua consequente relação com o SNE se dá por meio de receptores Toll-like que percebem os produtos bacterianos e medeiam uma resposta. Esses receptores estão presentes também em células neuronais, musculares e gliais.⁷⁰ Dessa forma, alterações na microbiota são percebidas pelo SNE e causam alterações nesse sistema. Quando observamos os animais tratados com antibióticos (grupo IRA) podemos constatar que os danos neuronais permanecem os mesmos, provocados pela IR intestinal, exceto o perfil neuronal da população geral, que não sofreu alteração nesse grupo. Quando há ruptura da barreira intestinal e lesão na parede, o acesso às células neuronais é facilitado, tanto para as bactérias luminais ou administradas, quanto para o próprio antibiótico, deixando o SNE altamente exposto e contribuindo para o dano. Antibióticos de amplo espectro, podem apresentar atividade neuroativa e neurotóxica.⁷¹ A exposição do intestino a antibióticos, como a neomicina, causa alterações diretas ao SNE e a motilidade intestinal, pois o antibiótico tem ação sobre canais iônicos neuronais.⁷² Sendo assim, antibióticos podem alterar a função nervosa por ação indireta modificando a ecologia bacteriana e desregulando as vias de comunicação do intestino e por ação direta, agindo de forma neurotóxica.⁷¹ A diferenciação entre os efeitos neurotóxicos diretos e os efeitos devidos à atividade microbicida não é clara,⁷¹ já que a interação microbiota-neurônios é essencial para a sobrevivência neuronal⁷³ e a depleção exagerada desses microorganismos acabe impedindo essa interação. Alterações no SNE podem resultar em disfunções diversas, tendo em vista que esse sistema coordena digestão, motilidade, secreção, inflamação, função da barreira intestinal, resposta imune e circulação local,⁹ disfunções essas que podem permanecer de forma duradoura, afetando a qualidade de vida do indivíduo pós IR intestinal. A manipulação da microbiota através da administração de probióticos foi benéfica para o SNE contra os efeitos da IR intestinal. No grupo IRP, menor número de alterações foram observadas, sendo elas o aumento do perfil neuronal da subpopulação nitrérgica e redução na densidade células da glia. Probióticos vem sendo reconhecidos pela ação neuroprotetora, seja protegendo ou recuperando células, estruturas e função. Uma das funções que explica esse efeito é sua ação anti-inflamatória. São utilizados em diversas desordens neurológicas, incluindo do Sistema Nervoso Central.⁷⁴ A administração de probióticos, entre eles os *Lactobacillus* spp., tem ação protetora sobre neurônios do hipocampo de camundongos.⁷⁵

Como podemos observar, os efeitos intestinais da manipulação da microbiota através da administração de probióticos e antibióticos após IR intestinal variam de acordo

com o parâmetro observado. Do ponto de vista da resposta inflamatória local e do estresse oxidativo no tecido intestinal, ambos os tratamentos se mostraram benéficos, com ênfase nos probióticos. Por outro lado, nenhum dos dois tratamentos foi eficaz na proteção da parede intestinal. A respeito do plexo mientérico desses animais, os probióticos ofereceram certa proteção aos neurônios, fato não observado nos animais que receberam antibióticos. Sendo assim, a administração de antibióticos, precisa ser melhor avaliada e controlada, a fim de evitar o agravamento de danos teciduais e complicações. Já os probióticos, com a facilidade de serem uma estratégia já inclusa em diversos alimentos e dietas, mesmo não sendo capazes de proteger o intestino contra todos os danos causados pela IR intestinal, são capazes de trazer benefícios nessa patologia. Estudos complementares mostrando a avaliação da resposta de outros órgãos a esse tratamento ou a investigação da manipulação pontual da microbiota por tipos específicos de probióticos e antibióticos em casos de IR intestinal, podem auxiliar na busca por intervenções terapêuticas que reduzam as complicações dessa condição clínica.

CONCLUSÃO

A manipulação da microbiota realizada através da administração oral de antibióticos para supressão da microbiota ou de probióticos para aumento de bactérias benéficas no lúmen intestinal é vantajosa contra danos oxidativos e inflamatórios do íleo de ratos submetidos à IR intestinal. Porém, nenhum desses tratamentos é suficiente para proteger a parede intestinal contra o dano pós IR nesse tempo de reperusão. Como o mix de probióticos tem efeito positivo sobre o plexo mientérico, nesse modelo, mostra-se como melhor alternativa para minimização dos efeitos da IR intestinal quando comparado aos antibióticos.

REFERÊNCIAS

1. Nadatani Y, Watanabe T, Shimada S, Otani K, Tanigawa T, Fujiwara Y. Microbiome and intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Biochem Nutr.* 2018;63(1):26-32.
2. Clair DG, Beach JM. Mesenteric Ischemia. *The New England Journal of Medicine.* 2016;374(10):959-968.
3. Stringa P, Lausada N, Romanin D, Portiansky E, Zanuzzi C, Machuca M, Gondolesi G, Rumbo M. Pretreatment combination reduces remote organ damage secondary to intestinal reperfusion injury in mice: follow-up study. *Transplantation Proceedings.* 2016;48:210-216.
4. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol Biochemistry.* 2018;46:1650-1667.
5. Souza DG, Vieira AT, Soares AC, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, Teixeira MM. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *The Journal of Immunology.* 2004;173:4137-4146.
6. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DDH, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation.* 2002;73:493-499.
7. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *Journal of Pathology.* 2000;190:225-266.
8. Rivera LR, Thacker M, Castelucci P, Bron R, Furness JB. The reactions of specific neuron types to intestinal ischemia in the guinea pig enteric nervous system. *Acta Neuropathol.* 2009;118(2):261-70.
9. Nezami BG, Srinivasan S. Enteric nervous system in the small intestine: pathophysiology and clinical implications. *Curr Gastroenterol Rep.* 2010;12:358-365.
10. Snoek SA, Verstege MI, Boeckxstaens GE, Wijngaard RM, Jonge WJ. The enteric nervous system as a regulator of intestinal epithelial barrier unction in health and disease. *Expert Reviews Gastroenterology Hepatology.* 2010;4(5):637-651.
11. Tassopoulos A, Chalkias A, Papalois A, Iacovidou N, Xanthos T. The effect of antioxidant supplementation on bacterial translocation after intestinal ischemia and reperfusion. *Redox Report.* 2016,22(1):1-9.
12. Duranti A, Vivo V, Zini I, Milani C, Mangifesta M, Anzalone R, Mancabelli L, Viappiani A, Cantoni AM, Barocelli E, Sinderen D, Bertoni S, Turrone F. *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 alleviates intestinal ischemia/reperfusion injury. *Plos One.* 2018;13(8):1-16.
13. Ubeda C, Pamer EG. Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends in Immunology.* 2012;33(9):459-466.

14. Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2016;22(6):458-478.
15. Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ. Gut Microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *Journal of parenteral and enteral nutrition*. 2011;35(1):14S-20S.
16. Dhar D, Mohanty A. Gut microbiota and covid-19 possible link and implications. *Virus Research*. 2020;285:1-5.
17. Deng F, Zen-Bing L, Sun Q-S, Min Y, Zhang Y, Chen Y, et al. The role of intestinal microbiota and its metabolites in intestinal and extraintestinal organ injury induced by intestinal ischemia reperfusion injury. *Int J Biol Sci*. 2022;18(10):3981-3992.
18. Angelakis E, Merhej V, Raoult D. Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:889-899.
19. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2014;11(8):506-514.
20. Nieuwboer M, Claassen E. Dealing with the remaining controversies of probiotic safety. *Beneficial Microbes*. 2019;10(6):605-616.
21. Quigley EMM. Prebiotics and Probiotics in digestive Health. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2018;17(2):333-344.
22. Andrade MER, Araújo RS, Vieira de Barros PA, Soares ADN, Abrantes FA, Genneroso SV, Fernandes SOA, Cardoso VN. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. *Clinical Nutrition*. 2015;34:1080-1087.
23. Bron PA, Kleerebezem M, Brummer R, Cani PD, Mercenier A, MacDonald TT, Garcia-Ródenas CL, Wells JM. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *British Journal of Nutrition*. 2017;117:93-107.
24. Nuzzo A, Maggiori L, Paugam-Burtz C, Cazals-Hatem D, Ronot M, Huguet A, Becq A, Castier Y, Weiss E, Plessier A, Tran-Dinh A, Joly F, Panis Y, Bouhnik Y, Gault N, Corcos O. Oral Antibiotics Reduce Intestinal Necrosis in Acute Mesenteric Ischemia: A Prospective Cohort Study. *The American Journal of Gastroenterology*. 2018;114(2):348-351.
25. Wang F, Li Q, Wang C, Tang C, Li J. Dynamic alteration of the colonic microbiota in intestinal ischemia-reperfusion injury. *Plos One*. 2012;7(7):e42027.
26. Yoshiya K, Lapchak PH, Thai TH, Kannan L, Rani P, Lucca JJD, Tsokos GC. Depletion of gut commensal bacteria attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2011;301(6):G1020-G1030.

27. Péllisier MA, Marteau P, Pochart P. Antioxidant effects of metronidazole in colonic tissue. *Digestive Disease Sciences*. 2007;52:40-44.
28. Narayanan S, Hünerbein A, Getie M, Jäckel A, Neubert RHH. Scavenging properties of metronidazole on free oxygen radicals in a skin lipid model system. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007;59:1125-1130.
29. Emal D, Rampanelli E, Stroo I, Butter LM, Teske GJ, Claessen N, Sotkman G, Florquin S, Leemans JC, Dessing MC. Depletion of gut microbiota protects against renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2016;28(5):1450-1461.
30. Jensen ML, Thymann T, Cilieborg MS, Lykke M, Molbak L, Jensen BB, Schmidt M, Kelly D, Mulder I, Burrin DG, Sangild PT. Probiotics modulate intestinal immunity and prevent necrotizing enterocolitis in preterm neonatal piglets. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;306:G59-G71.
31. Borges SC, Ferreira PEB, Silva LM, Werner MFP, Irache JM, Cavalcanti OA, Buttow NC. Evaluation of the treatment with resveratrol-loaded nanoparticles in intestinal injury model caused by ischemia and reperfusion. *Toxicology*. 2018;396-397:13-22.
32. Jiang Z, Woollard ACS, Wolff S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an Iodometric Method. *Lipids*. 1991;26(10):853-856.
33. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 1974;47(3):469-474.
34. Warholm M, Guthenberg C, von Bahr C, Mannervik B. Glutathione transferases from human liver. *Methods Enzymol*. 1985;113:499-504.
35. Lindeström LM, Ekblad E. Structural and neuronal changes in rat ileum after ischemia with reperfusion. *Dig Dis Sci*. 2004;49(7-8):1212-22.
36. Philippe D, Heupel E, Blum-Sperisen S, Riedel CU. Treatment with *Bifidobacterium bifidum* 17 partially protects mice from Th1-driven inflammation in a chemically induced model of colitis. *International Journal of Food Microbiology*. 2011;1(49):45-49.
37. Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Vilchez-Padial LM, Gil A. Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotic and synbiotics in intestinal chronic diseases. *Nutrients*. 2017;9(555):1-19.
38. Bertoni S, Ballabeni V, Barocelli E, Tognolini M. Mesenteric ischemia-reperfusion: an overview of preclinical drug strategies. *Drug Discovery Today*. 2018;23(7):1416-1425.
39. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*. 2006;141:312-322.

40. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;1-19.
41. Ito F, Sono Y, Ito T. Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants*. 2019;8(72):1-28.
42. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;482:419-425.
43. Rao CM, Ghosh A, Raghothama C, Bairy KL. Does metronidazole reduce lipid peroxidation in burn injuries to promote healing? *Burns*. 2002;28:427-429.
44. Azcárate-Peril MA, Sikes M, Bruno-Bárcena JM. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;301:G401-G424.
45. Lin MY, Yen CL. Antioxidative Ability of Lactic Acid Bacteria. *J Agric Food Chem*. 1999;47:1460-1466.
46. Biswas SK. Does the Interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;1-10.
47. Strati F, Pujolassos M, Burrello C, Giuffrè MR, Lattanzi G, Caprioli F, et al. Antibiotic-associated dysbiosis affects the ability of the gut microbiota to control intestinal inflammation upon fecal microbiota transplantation in experimental colitis models. *Microbiome*. 2021;9(39):1-15.
48. Grootjans J, Lenaerts K, Derik JPM, Matthijsen RA, Bruine AP, Bijnen AA, Dam RM, Dejong CHC, Buurman WA. Human intestinal ischemia reperfusion-induced inflammation characterized. Experiences from a new translational Model. *The American Journal of Pathology*. 2010;176(5):2283-2291.
49. Zheng Z, Yenari MA. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurol Res*. 2004;26(8):881-92.
50. Coelho BA, Belo AV, Andrade SP, Amorim WC, Uemura G, Filho ALS. N-acetylglucosaminidase, myeloperoxidase and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2014;68:185-189.
51. Feng Y, Huang Y, Wang Y, Wang P, Song H, Wang F. Antibiotics induced intestinal tight junction barrier dysfunction is associated with microbiota dysbiosis, activated NLRP3 inflammasome and autophagy. *Plos One*. 2019;14(6):1-19.
52. Shiou SR, Yu Y, Guo Y, He SM, Andrew CHM, Hoenig J, Sun J, Petrof EO, Claud EC. Synergistic Protection of Combined Probiotic Conditioned Media against Neonatal Necrotizing Enterocolitis-Like Intestinal Injury. *Plos One*. 2013;8(5).

53. Tien MT, Girardin SE, Regnault B, Bourhis LL, Dillies MA, Coppée JY, Bourdet-Sicard R, Sansonetti PJ, Pédrón T. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *The Journal of Immunology*. 2006;176:1228-1237.
54. Hsieh CY, Osaka T, Date Y, Kikuchi J, Tsuneda S. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiological Reports*. 2015;3(3):1-17.
55. Caputti V, Marsilio I, Filpa V, Cerantola S, Orso G, Bistoletti M, Paccagnella N, De Martin S, Montopoli M, Dall'Aqua S, Crema F, Di Gangi IM, Galuppini F, Lante I, Bogianni S, Rugge M, Debetto P, Giaroni C, Giron C. Antibiotic-induced dysbiosis of the microbiota impairs gut neuromuscular function in juvenile mice. *British Journal of Pharmacology*. 2017;174:3623-3639.
56. Reikvan DH, Erofeev A, Sandvik A, Grcic V, Jahnsen FL, Gaustad P, McCoy KD, Macpherson AJ, Meza-Zepeda LA, Johansen FE. Depletion of Murine Intestinal Microbiota: Effects on Gut Mucosa and Epithelial Gene Expression. *Plos One*. 2011;6(3).
57. Jung C, Hugot JP, Barreau F. Peyer's Patches: the immune sensors of the intestine. *International Journal of Inflammation*. 2010;1-13.
58. Dai D, Chen J, Jin M, Zhang Z, Chen WH, Xu F. Dynamic metabolomic analysis of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2020;1-11.
59. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*. 2007;35(5):1147-1150.
60. Puertollano MA, Puertollano M, Cienfuegos GA, Pablo MA. Dietary Antioxidants: Immunity and Host Defense. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2011;11:1752-1766.
61. Reider F, Brenmoehl J, Leeb S, Scholmerich J, Rogler G. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut*. 2007;56:130-139.
62. Morgun A, Dzutsev A, Dong X, Greer RL, Sexton DJ, Ravel J, Schuster M, Hsiao W, Matzinger P, Shulzhenko N. Uncovering effects of antibiotics on the host and microbiota using transkingdom gene networks. *Gut*. 2015;64:1732-1743.
63. Khailova L, Dvorak K, Arganbright KM, Halpern MD, Kinouchi T, Yajima M, Dvorak B. *Bifidobacterium bifidum* improves intestinal integrity in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;297:G940-G949.
64. Khailova L, Patrick SKM, Arganbright KM, Halpern MD, Kinouchi T, Dvorak B. *Bifidobacterium bifidum* reduces apoptosis in the intestinal epithelium in necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299:G1118-G1127.
65. Lindfors K, Blomqvist T, Juuti-Uusitalo K, Stenman S, Venäläinen J, Mäiki M, Kaukinen K. Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects

induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. *Clinical and Experimental Immunology*. 2008;152:552-558.

66. Pontell L, Sharma P, Rivera LR, Thacker M, Tan YH, Brock JA, Furness JB. Damaging effects of ischemia/reperfusion on intestinal muscle. *Cell Tissue Res*. 2011;343:411-419.

67. Thacker M, Rivera LR, Cho HJ, Furness JB. The relationship between glial distortion and neuronal changes following intestinal ischemia and reperfusion. *Neurogastroenterology & Motility*. 2011;23:500-509.

68. Bódi N, Szalai Z, Bagyanski M. Nitrergic enteric neurons in health and disease – focus on animal models. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(2003):1-10.

69. Joly A, Leulier F, Vadder FD. Microbial modulation of the development and physiology of the Enteric Nervous System. *Trends in Microbiology*. 2021;29(8):686-699.

70. Heiss CN, Olofsson LE. The role of the gut microbiota in development, function and disorders of the central nervous system and the enteric nervous system. *Journal of Endocrinology*. 2019;31(5):e12684.

71. Champagne-Jorgensen K, Kunze WA, Forsythe P, Bienenstock J, Neufeld KAM. Antibiotics and the nervous system: More than just the microbes? *Brain, Behavior, and Immunity*. 2018;77:7-15.

72. Delungahawatta T, Amin JY, Stanisiz AM, Bienenstock J, Forsythe P, Kunze WA. Antibiotic Driven changes in gut motility suggest direct modulation of enteric nervous system. *Frontiers in Neuroscience*. 2017;11:588.

73. Anitha M, Vijay-kumar M, Sitaraman SV, Gewirtz AT, Srinivasan S. Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via toll-like receptor 4 signaling. *Gastroenterology*. 2012;143:1006-1016.

74. Lim SM, Ramli MZ, Alwi NAA, Mani V, Majeed ABA, Ramasamy K. Probiotics and neuroprotection. *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline*. 2015;859-868.

75. Sarkar SR, Mazumder PM, Banerjee S. Probiotics protect against gut dysbiosis associated decline in learning and memory. *Journal of Neuroimmunology*. 2020;348:577390.

ARTIGO 2:**BENEFÍCIOS DO USO DE PROBIÓTICOS CONTRA EFEITOS DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL EM ÓRGÃOS DISTANTES**Camila Quaglio Neves^aNilza Cristina Buttow^b^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Maringá^bDepartamento de Ciências Morfológicas – Universidade Estadual de Maringá**RESUMO**

Introdução: Isquemia e reperfusão (IR) intestinal tem efeitos não só locais, mas também em órgãos distantes. Está relacionada com a ocorrência de translocação de bactérias luminais e seus subprodutos e com a resposta inflamatória sistêmica, podendo causar complicações como a disfunção múltipla de órgãos. Como a microbiota intestinal influencia na resposta sistêmica do hospedeiro, o objetivo foi avaliar o efeito da manipulação da microbiota intestinal através de antibióticos e probióticos sobre o pulmão, rim e fígado de animais submetidos à IR intestinal. **Métodos:** Ratos *Wistar* foram submetidos à IR intestinal pela oclusão da artéria mesentérica superior durante 45 minutos e posterior reperfusão de 72 horas. O grupo IRA recebeu mix de antibióticos para depleção da microbiota e o grupo IRP recebeu mix de probióticos. Foram realizadas análises de estresse oxidativo, inflamação e histologia do pulmão, rim e fígado dos animais. **Resultados:** IR intestinal provocou estresse oxidativo e inflamação nos pulmões, rins e fígado dos animais, além de alterações morfométricas pulmonares e renais. A depleção da microbiota através de antibióticos não foi benéfica, tendo em vista que o grupo IRA apresentou o mesmo quadro de alterações que o IRC. Porém, os probióticos trouxeram benefícios, pois o grupo IRP não apresentou estresse oxidativo e inflamação hepático e renal e as alterações morfométricas renais foram amenizadas. **Conclusão:** A manipulação da microbiota intestinal reflete na resposta de órgãos distantes à IR intestinal, sendo a administração de probióticos benéfica, por amenizar os danos principalmente hepáticos e renais, e os antibióticos são ineficazes nessa situação.

PALAVRAS-CHAVE: microbiota; antibióticos; pulmão; rim; fígado; inflamação.

INTRODUÇÃO

A condição em que inicialmente há uma restrição do aporte sanguíneo ao órgão e posterior restauração desse fluxo, reoxigenando o tecido, é chamada de isquemia e reperfusão (IR). Esse processo causa um desequilíbrio entre oferta e demanda metabólica, resultando em hipóxia tecidual [1]. A IR intestinal está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade [2], sendo um dos maiores desafios enfrentados em cirurgias em geral, incluindo o transplante de órgãos [1].

A ocorrência de IR em um órgão tende a refletir em consequências em outros, principalmente pela ativação de resposta inflamatória [3]. No caso da IR intestinal, o dano na parede intestinal é inflamatório, oxidativo e metabólico, o que compromete a homeostase e sobrevivência de células intestinais [4]. Nesse contexto, ocorre a quebra da função da barreira epitelial intestinal, dano na microcirculação e translocação da microbiota [5]. A translocação bacteriana é a passagem de bactérias vivas da microbiota ou os seus subprodutos pela barreira epitelial intestinal [6]. Por isso, é possível observar um aumento na carga bacteriana em nódulos linfáticos mesentéricos, fígado, baço e corrente sanguínea de bactérias entéricas após IR intestinal [2]. Porém, além da passagem das bactérias, endotoxinas e antígenos do lúmen intestinal também atingem a circulação, provocando uma resposta inflamatória sistêmica que causa dano à órgãos além do intestino [6]. Dessa forma, a quebra da barreira intestinal e a translocação bacteriana estão relacionadas com complicações da IR intestinal como a síndrome da resposta inflamatória sistêmica e a disfunção múltipla de órgãos [7].

O intestino dos mamíferos aloja uma complexa comunidade bacteriana que traz benefícios ao hospedeiro [8], vivendo em relação de mutualismo com este, quando em condições fisiológicas [9]. A microbiota intestinal tem grande importância na maturação e modulação da imunidade e resposta inflamatória sistêmica [10]. Comunica-se ativamente com o hospedeiro e seus órgãos, como fígado, tecido adiposo, pâncreas, pulmão, cérebro e sistema cardiovascular, influenciando no estado de saúde e doença [11]. Existem bactérias com capacidade de afetar negativamente a homeostase da barreira intestinal, como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* e *Shigella* [12], enquanto outras como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacteria* trazem benefícios ao hospedeiro [13]. Sabendo que a IR intestinal promove a translocação da microbiota luminal para órgãos distantes como pulmões, fígado e rins [2, 14], com consequências sistêmicas, a manipulação da microbiota pode ser uma abordagem para redução desses danos. Seja pela depleção da microbiota através da administração de

antibióticos não absorvíveis de amplo espectro [15], ou pelo aumento de bactérias probióticas no lúmen intestinal. Nesse contexto, o objetivo foi avaliar o efeito da IR intestinal em órgãos distantes como pulmão, fígado e rim após a manipulação da microbiota intestinal pela administração de probióticos e antibióticos.

METODOLOGIA

Grupos experimentais

Seguindo o protocolo de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEM) nº 2869200218, ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* machos, com peso entre 290 ± 4 g permaneceram alojados em biotério da Universidade Estadual de Maringá sob condições controladas de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo 12h claro/12h escuro). Os animais receberam ração padrão NUVILAB e água *ad libitum*. Após adaptação, foram divididos em 4 grupos (n=6): SC: falso operado tratado com veículo (água); IRC: submetido à isquemia intestinal e tratado com veículo; IRA: submetido à isquemia intestinal e tratado com mix de antibióticos; IRP: submetido à isquemia intestinal e tratado com mix de probióticos.

Modelo de isquemia e reperfusão intestinal

A isquemia intestinal foi estabelecida através da oclusão da artéria mesentérica superior (AMS). Para isso, os animais dos grupos IRC, IRA e IRP, após jejum prévio de 15 horas, foram anestesiados com Ketamina® (100 mg/kg de peso corporal) (Sespo Indústria e Comércio LTDA, Paulínia, SP, Brasil) e Xilazina® (20 mg/kg de peso corporal) (Sespo Indústria e Comércio LTDA, Paulínia, SP, Brasil), via intramuscular. Foi realizada a laparotomia e exposição do íleo distal, para oclusão da artéria mesentérica superior (AMS) através de um *clamp* microvascular e amarrações laterais. A isquemia estendeu-se por 45 minutos, período no qual, solução salina a 37°C foi utilizada para manter a umidade e a temperatura intestinal. A reperfusão iniciou no momento da retirada do *clamp* e das amarrações e posterior sutura abdominal, perdurando por 72 horas. Os animais *sham* (grupo SC) passaram pelos mesmos procedimentos, porém sem oclusão da AMS.

Tratamentos

Foi realizado através da administração oral de antibióticos e probióticos. Os antibióticos metronidazol (100 mg/kg de peso corporal), neomicina (200 mg/kg de peso

corporal) e vancomicina (100 mg/kg de peso corporal) foram administrados via gavagem e a ampicilina na água de consumo (1 g/L), diariamente, nas 72h antes da isquemia e nas 72h de reperfusão, no grupo IRA. Os animais do grupo IRP, receberam via gavagem, o mix de probióticos de nome comercial SIMFORT® (Vitafor), composto por *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis* e *B. bifidum* ($8,3 \times 10^9$ UFC por animal), amido de milho e maltodextrina, diariamente durante 14 dias antes da isquemia e 72h de reperfusão.

Coleta dos órgãos

Os animais foram eutanasiados por dose letal, via intraperitoneal, de Tiopental Sódico® (120 mg/kg de peso) (Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, SP, Brasil). O fígado, os rins e os pulmões foram coletados lavados com Tampão Fosfato de Sódio (PBS) 0,1M (pH 7,4) e divididos para as análises bioquímicas e histológicas. Para as análises bioquímicas, uma porção de cada órgão foi congelada em nitrogênio líquido, permanecendo em temperatura -80°C até posterior processamento. Para as análises histológicas, outra porção de cada órgão foi fixada em Paraformaldeído 4% (pH 7,4). A porção específica de cada órgão destinada a cada técnica foi padronizada.

Análises bioquímicas

Para análise de parâmetros de estresse oxidativo e de inflamação, porções do rim, pulmão e fígado dos animais foram processados de acordo com Borges e colaboradores [16]. Esses órgãos foram homogeneizados separadamente em tampão Fosfato de Potássio 200mM (pH 6,5). Uma parte do homogenato foi retirado para análise da glutatona reduzida e o restante foi centrifugado a 9000 rpm durante 20 minutos para separação de sobrenadante e pellet que foram utilizados no restante das técnicas. Cada ensaio foi realizado com seu protocolo específico, pipetados em placa de 96 poços e, ao final, lidos em espectrofotômetro em comprimento de onda de acordo com cada técnica.

- *atividade da catalase (CAT), da glutatona s-transferase (GST), e da superóxido dismutase (SOD)*

Para essas análises foi utilizado o sobrenadante. A atividade da enzima CAT foi avaliada através da quebra do peróxido de hidrogênio pela enzima, observada através de análise cinética em comprimento de onda de 240 nm [17]. Os resultados foram expressos em $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. A leitura cinética da conjugação entre glutatona e 1-cloro-

2,4-dinitrobenzeno foi utilizada para a análise da atividade da enzima GST, adotando 340 nm como comprimento de onda [18]. Os resultados foram apresentados em $\mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. A atividade da SOD foi mensurada considerando a sua capacidade de inibir a auto-oxidação do pirogalol [19]. O comprimento de onda adotado para a leitura foi de 405nm e os resultados expressos em U de SOD/ mg de proteína.

- *níveis de glutathiona reduzida (GSH) e de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)*

O homogenato foi utilizado para análise dos níveis de GSH. Para isso, ácido tricloroacético (TCA) foi utilizado para precipitar proteínas. Após centrifugação, GSH e ácido 2-nitrobenzóico foram adicionados à amostra. Os valores obtidos na leitura realizada em comprimento de onda 412 nm, foram interpolados em curva padrão de GSH e os resultados expressos em μg de GSH/g de tecido. Para verificar os níveis de LOOH, o sobrenadante foi utilizado [20]. A leitura foi realizada em 560 nm e o coeficiente de extinção molar de 4,3 mmolar/cm foi utilizado nos cálculos, expressando os resultados como mmol/mg de tecido.

- *atividade da mieloperoxidase (MPO) e da n-acetilglicosaminidase (NAG)*

Para esses ensaios, o pellet foi utilizado. A atividade da MPO foi avaliada após adição de H_2O_2 e dimetilformamida. O comprimento de onda 620 nm foi utilizado na leitura, e os resultados expressos em mD.O/mg de proteína. Para a atividade da NAG, a amostra foi adicionada aos tampões glicina e citrato. A leitura foi realizada a 405 nm e os resultados expressos em mD.O/mg de proteína.

- *Espécies reativas de oxigênio (EROs)*

Para análise dos níveis de EROs, uma porção dos órgãos foi homogeneizada em tampão Fosfato de Sódio 0,08 M (pH 7,2) e incubada, no escuro, em sonda (diacetato de 2',7'-diclorofluorescina + dimetilsulfóxido). A leitura foi realizada em comprimento de onda 488 nm para excitação e 520 nm para emissão, com resultados expressos em unidade de fluorescência.

Morfometria

As porções de fígado, rim e pulmão fixadas em Paraformaldeído 4% (pH 7,4), passaram pelo processamento histológico de inclusão em parafina e corte semisseriado em micrótomo (5 μm). Lâminas com cortes histológicos dos três órgãos foram coradas

com Hematoxilina e Eosina (HE), sendo o pulmão, corado também com Picrosirius Red. Imagens das lâminas foram capturadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse 80i) e analisadas no software Image Pro-Plus.

Afim de analisar o fígado, as lâminas foram capturadas na objetiva de 40 x, em regiões de veias centro lobulares. Foi verificada a área de 60 hepatócitos e contado o total de hepatócitos em 24 imagens. Para essas análises, uma imagem escura de tamanho padrão foi posicionada sobre cada veia centro lobular, descontando essa área de todas as imagens. A área foi expressa em μm^2 e a quantificação em hepatócitos por cm^2 . Para o rim, foram capturadas 30 imagens por animal na objetiva de 20x da região cortical, para análise da morfometria dos corpúsculos, glomérulos e espaço de Bowman, além da quantificação dos corpúsculos renais. Foram medidas as áreas, em μm^2 , de 50 corpúsculos e glomérulos renais. A área do espaço de Bowman foi obtida através da diferença de área entre corpúsculos e glomérulos. A quantificação foi realizada através da contagem de todos os glomérulos presentes nas 30 imagens, sendo expressa em glomérulos por cm^2 .

Para análise morfométrica do pulmão, imagens foram capturadas das lâminas coradas em HE na objetiva de 40x. Foram analisados o perímetro, a área e a espessura da parede alveolar. Já as lâminas coradas com Picrosirius Red, foram capturadas com filtro de polarização, no aumento de 20x para a quantificação de colágenos tipo I e tipo III. Para o colágeno total, as duas quantificações (tipo I e III) foram somadas.

Análise Estatística

Os dados de estresse oxidativo, inflamação, densidade de hepatócitos e glomérulos foram submetidos ao teste de normalidade. Apresentando distribuição normal, foram analisados por One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey no GraphPad Prism 7. Nesse caso, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Os dados de morfometria do pulmão, rim e fígado foram analisados através do delineamento em blocos por modelos lineares generalizados usando ANOVA e pós-teste de Fisher no programa Statistica 10. Assim, os resultados foram expressos como mediana e intervalo de confiança. Para ambos os casos, os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Mortalidade

A maior taxa de mortalidade foi observada no grupo IRC (42%), seguida pelo IRA (37%), IRP (16%) e SC (9%).

Estresse oxidativo e inflamação pulmonar

Sobre os parâmetros de estresse oxidativo pulmonar (Figura 1), observou-se a redução na atividade da SOD nos três grupos isquêmicos (IRC, IRA e IRP) ($p < 0,05$). Houve também a redução dos níveis de GSH, em relação ao grupo SC, nos animais dos grupos IRC e IRA ($p < 0,05$). Quanto aos níveis de LOOH, os grupos IRC ($p < 0,05$), IRA e IRP ($p < 0,01$) apresentaram aumento em relação ao grupo SC. Esse aumento pôde ser observado também nos grupos IRC e IRA ($p < 0,05$) em relação ao SC, quanto aos níveis de EROs. Não houve diferença quanto à atividade da CAT e da GST. Os grupos IRC e IRP apresentaram aumento nos parâmetros inflamatórios (Figura 1), tanto em relação à atividade da NAG ($p < 0,05$), quanto na atividade da MPO ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) quando comparados com os animais do grupo SC.

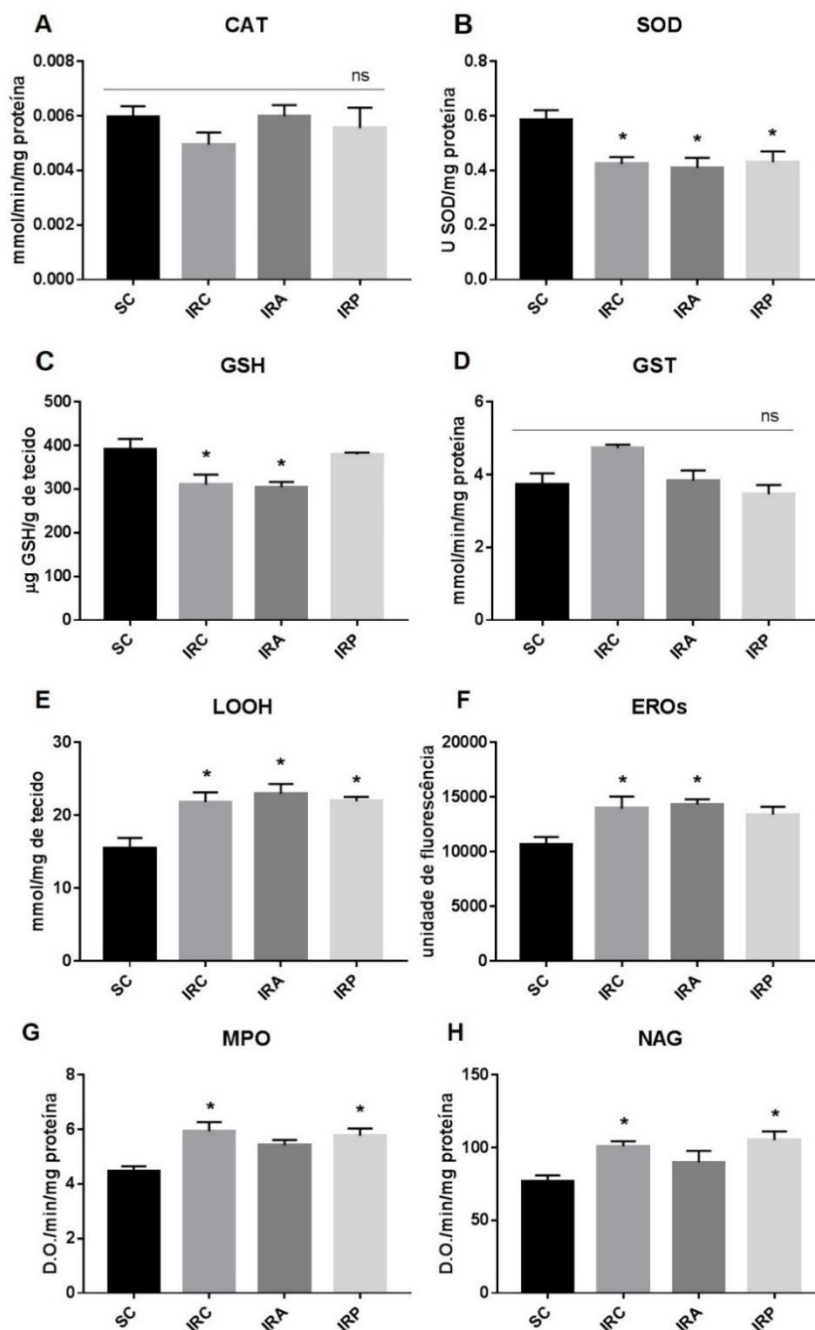


Figura 1: Estresse oxidativo e inflamação do pulmão de ratos *Wistar* submetidos à isquemia e reperfusão intestinal e tratados com antibióticos ou probióticos, n=5. (A) atividade enzimática da CAT; (B) atividade da SOD; (C) níveis de GSH; (D) atividade da GST; (E) níveis de LOOH; (F) níveis de EROs; (G) atividade da MPO; (H) atividade da NAG. SC: falso operado (*sham*); IRC: isquêmico; IRA: isquêmico tratado com antibióticos; IRP: isquêmico tratado com probióticos. Resultados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo SC.

Morfometria pulmonar

A área alveolar (Figura 2) apresentou redução nos grupos IRC ($p < 0,05$) e IRP ($p < 0,01$) e aumento no grupo IRA ($p < 0,001$), enquanto o perímetro alveolar apareceu reduzido no grupo IRP ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo SC. Em relação à

espessura da parede alveolar, todos os grupos apresentaram aumento em relação ao grupo SC ($p<0,0001$ para IRC e IRA; $p<0,001$ para IRP). Observou-se uma redução na quantidade de colágeno tipo I, encontrado nos pulmões dos animais dos grupos IRA ($p=0,01$) e IRC ($p<0,01$) quando comparados ao grupo SC. Quanto ao colágeno do tipo III, observou-se redução significativa no grupo IRC ($p<0,01$) em relação ao SC. Porém, ao observar o colágeno total, os três grupos isquêmicos (IRC, IRA e IRP) tiveram redução ($p<0,05$) quando comparados ao grupo SC.

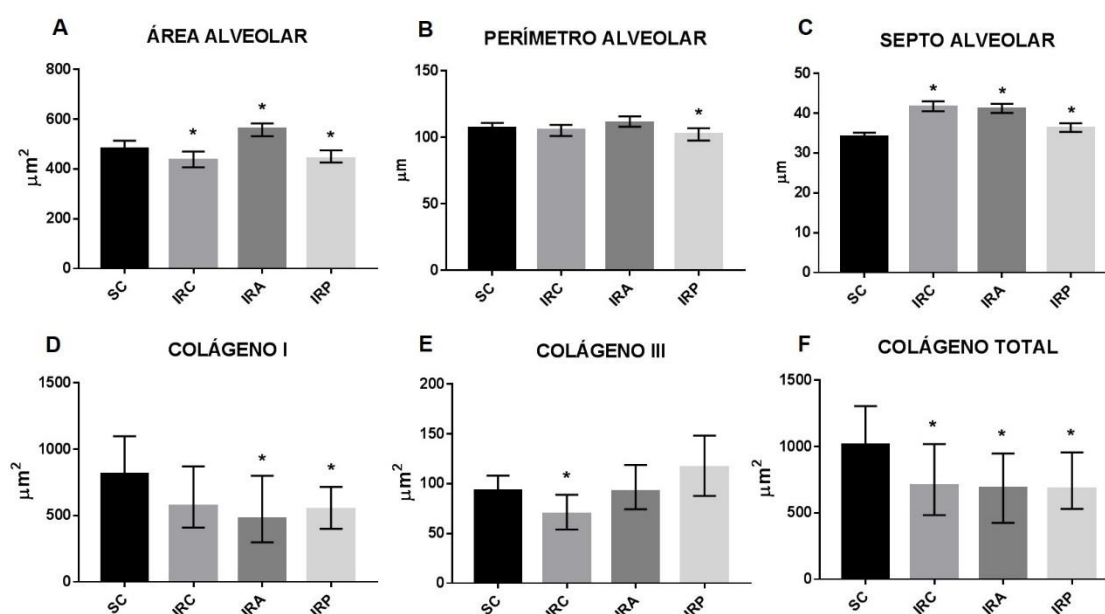


Figura 2: Morfometria pulmonar de ratos *Wistar* submetidos à isquemia e reperfusão intestinal e tratados com antibióticos ou probióticos, $n=6$. (A) Área dos alvéolos; (B) Perímetro dos alvéolos; (C) Espessura do septo alveolar; (D) quantificação de colágeno do tipo I; (E) quantificação de colágeno tipo III; (F) quantificação de colágeno total. Grupos SC: falso operado (*sham*); IRC: isquêmico; IRA: isquêmico tratado com antibióticos; IRP: isquêmico tratado com probióticos. Grupos SC: falso operado (*sham*); IRC: isquêmico; IRA: isquêmico tratado com antibióticos; IRP: isquêmico tratado com probióticos. Resultados expressos em mediana e intervalo de confiança. * $p<0,05$ em relação ao grupo SC.

Estresse oxidativo e inflamação renal

Nos rins (Figura 3), observou-se redução na atividade da enzima CAT nos grupos IRC ($p<0,05$) e IRA ($p<0,01$) em relação ao grupo SC. O grupo que recebeu antibióticos (IRA) apresentou redução também, na atividade da SOD ($p<0,05$) e nos níveis de GSH ($p<0,01$) quando comparados aos animais falso operados (SC). Ambos os grupos (IRC e IRA) apresentaram aumento na atividade da GST ($p<0,01$) e dos níveis de LOOH ($p<0,01$) em relação ao grupo SC. Os animais do grupo IRA ainda mostraram aumento de EROs ($p<0,01$) em relação ao SC. Embora não haja alteração significativa na atividade

da NAG entre os grupos analisados, o grupo IRC apresentou aumento na atividade da MPO em relação ao grupo SC ($p < 0,05$).

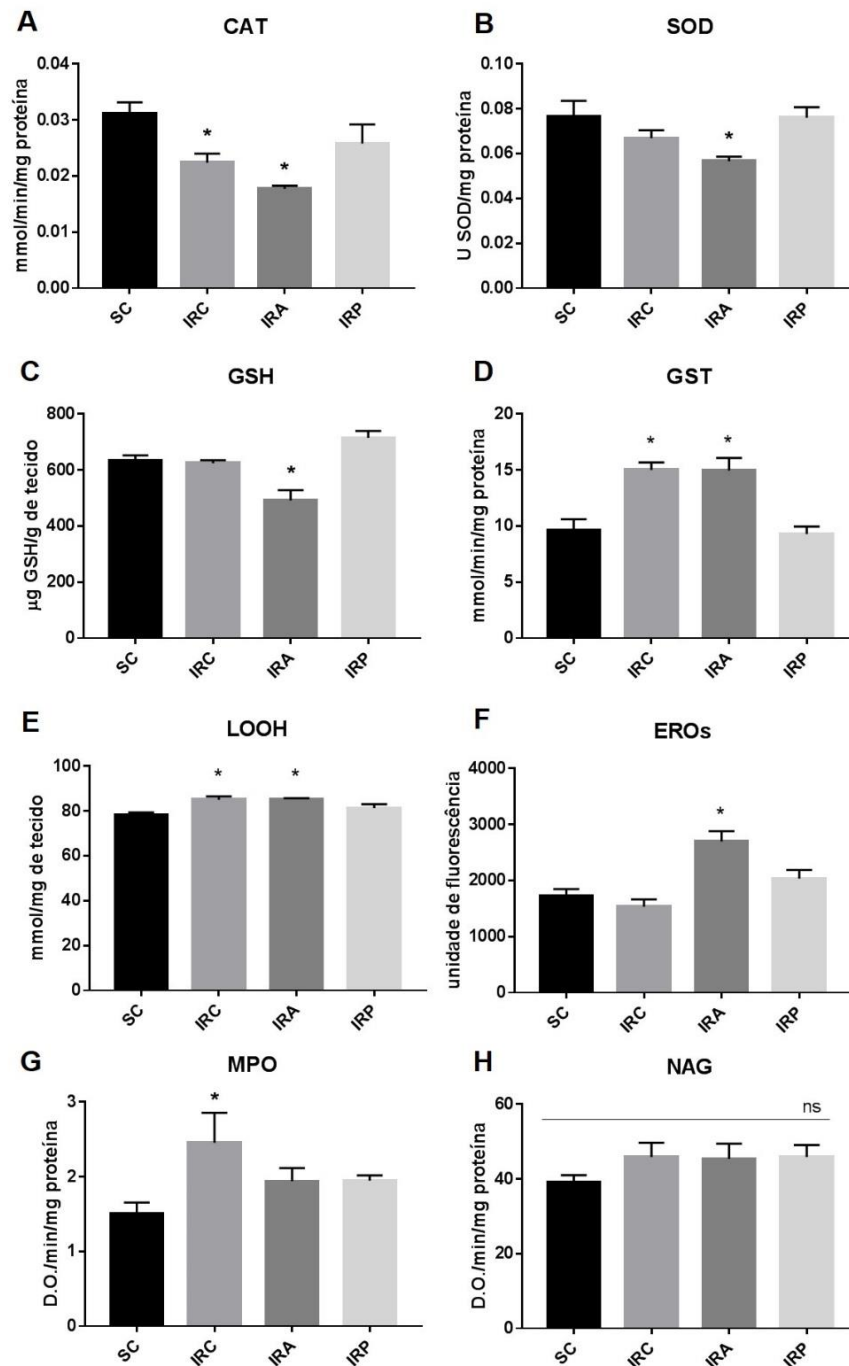


Figura 3: Estresse oxidativo do rim de ratos *Wistar* submetidos à isquemia e reperfusão intestinal e tratados com antibióticos ou probióticos, $n=5$ A) atividade enzimática da CAT; (B) atividade da SOD; (C) níveis de GSH; (D) atividade da GST; (E) níveis de LOOH; (F) níveis de EROs; (G) atividade da MPO; (H) atividade da NAG. SC: falso operado (*sham*); IRC: isquêmico; IRA: isquêmico tratado com antibióticos; IRP: isquêmico tratado com probióticos. Resultados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo SC.

Morfometria renal

Em relação à área dos corpúsculos renais, os grupos IRC ($p < 0,0001$) e IRA ($p < 0,01$) mostraram redução, quando comparados a área do grupo SC (Figura 4). Quando observada a área glomerular, todos os grupos isquêmicos apresentaram alteração, caracterizada pela redução da área nos grupos IRC ($p < 0,0001$) e IRA ($p < 0,01$) e aumento no grupo IRP ($p < 0,01$) em relação ao grupo *sham* (SC). O grupo IRC ainda apresentou redução do espaço de Bowman, quando comparado ao SC ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos na densidade de glomérulos.

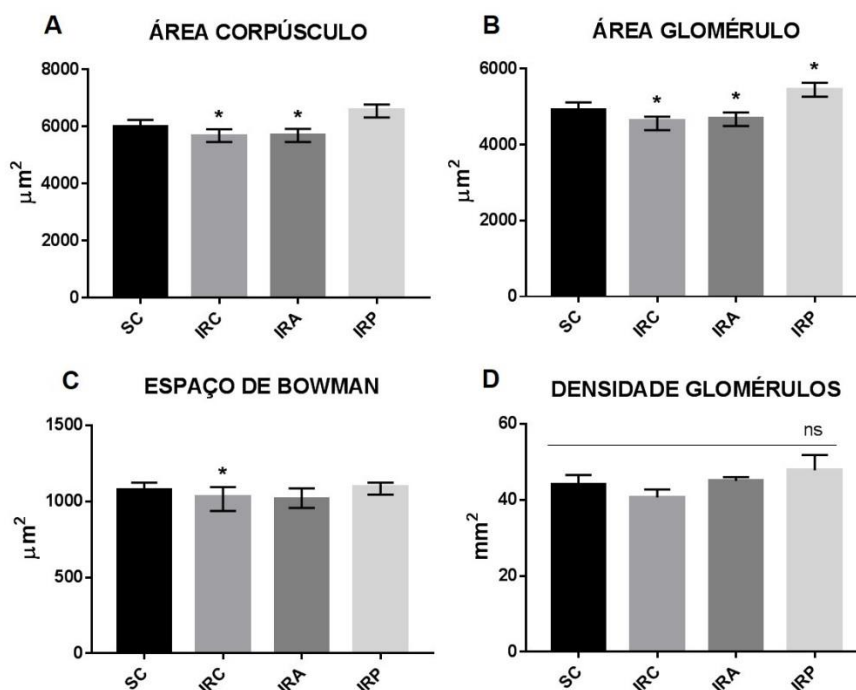


Figura 4: Morfometria renal de ratos *Wistar* submetidos à isquemia e reperfusão intestinal e tratados com antibióticos ou probióticos, $n=6$. (A) Área dos corpúsculos renais; (B) Área dos glomérulos renais; (C) Área do espaço de Bowman; (D) Densidade de glomérulos por mm^2 . Grupos SC: falso operado (*sham*); IRC: isquêmico; IRA: isquêmico tratado com antibióticos; IRP: isquêmico tratado com probióticos. Resultados expressos em mediana e intervalo de confiança em A, B e C; e em média \pm erro padrão em D. * $p < 0,05$ em relação ao grupo SC.

Estresse oxidativo e inflamação hepática

Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos quanto as enzimas CAT e SOD (Figura 5). O grupo IRC apresentou redução na GSH em relação ao SC ($p < 0,05$). Houve aumento na atividade da GST nos três grupos isquêmicos ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo SC. Além disso, observou-se aumento nas EROs nos grupos IRC e IRA ($p < 0,05$) e nos níveis de LOOH no grupo IRA ($p < 0,01$) quando comparados ao grupo SC. Em relação aos parâmetros inflamatórios hepáticos, observou-se aumento

da atividade da MPO no grupo que recebeu antibióticos (IRA) ($p<0,05$) e na atividade da NAG nos grupos IRC ($p<0,05$) e IRA ($p<0,01$) quando comparados ao grupo SC.

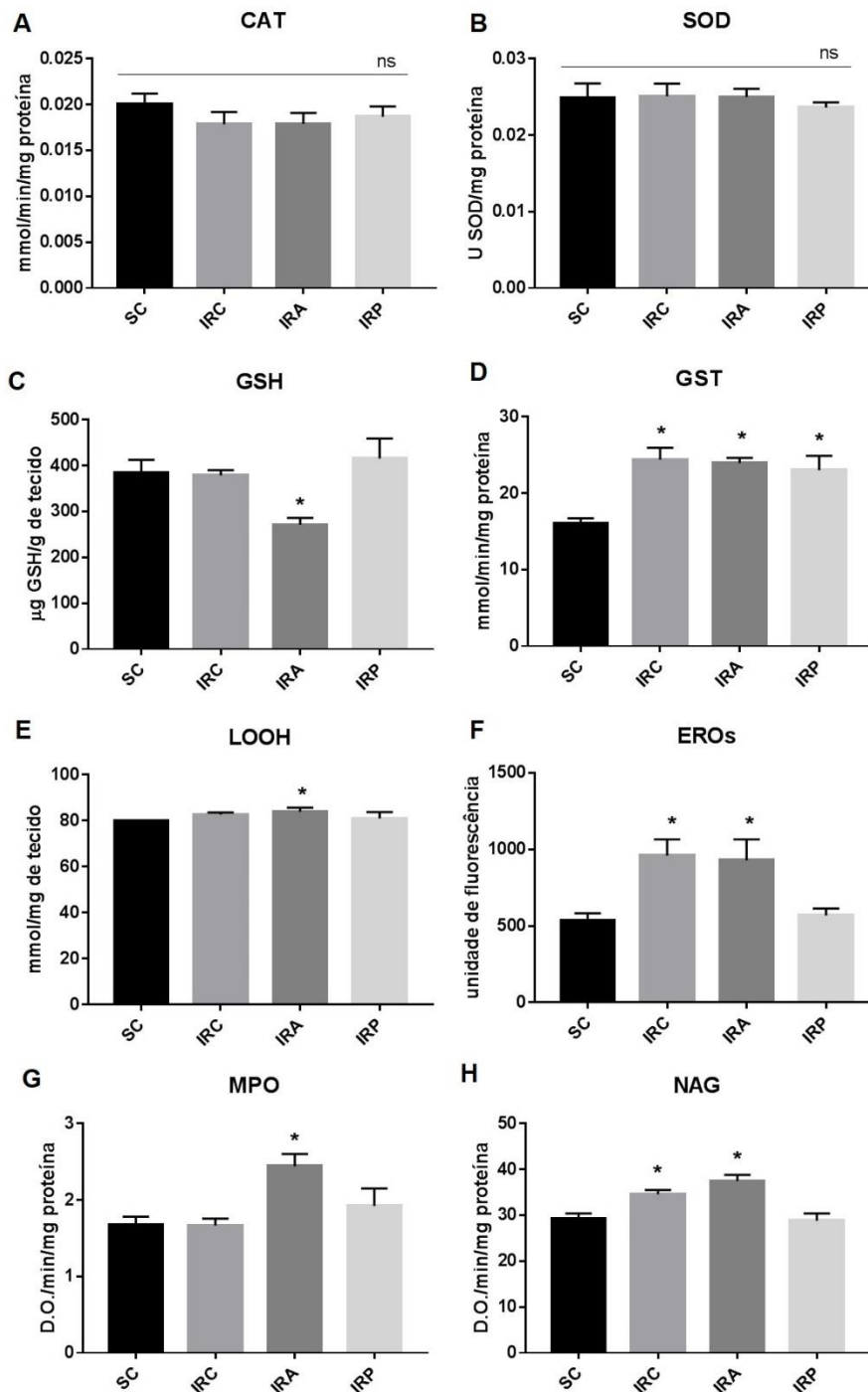


Figura 5: Estresse oxidativo do fígado de ratos *Wistar* submetidos à isquemia e reperfusão intestinal e tratados com antibióticos ou probióticos, $n=5$. (A) atividade enzimática da CAT; (B) atividade da SOD; (C) níveis de GSH; (D) atividade da GST; (E) níveis de LOOH; (F) níveis de EROs; (G) atividade da MPO; (H) atividade da NAG. SC: falso operado (*sham*); IRC: isquêmico; IRA: isquêmico tratado com antibióticos; IRP: isquêmico tratado com probióticos. Resultados expressos em média \pm erro padrão. * $p<0,05$ em relação ao grupo SC.

Morfometria hepática

Houve redução na área dos hepatócitos dos grupos IRA e IRP ($p < 0,0001$) quando comparados ao grupo SC, porém a densidade de hepatócitos foi mantida (Figura 6).

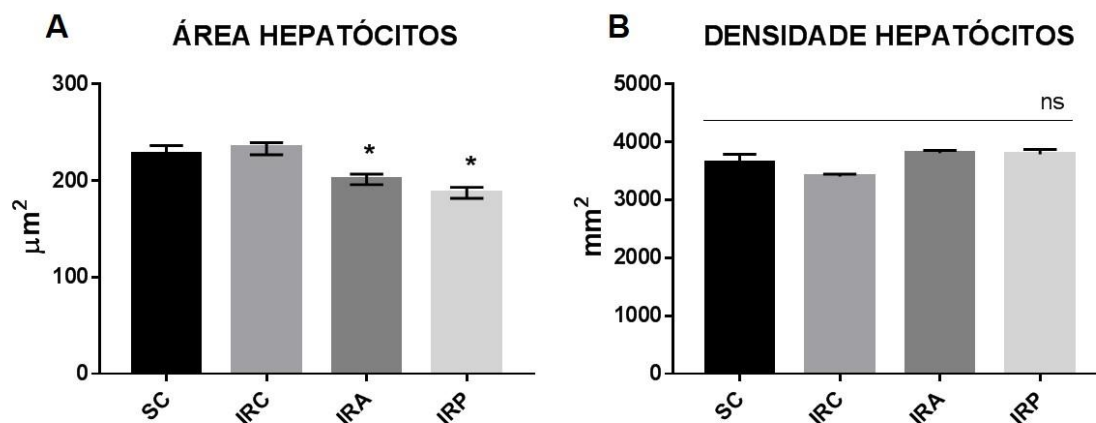


Figura 6: Morfometria hepática de ratos *Wistar* submetidos à isquemia e reperfusão intestinal e tratados com antibióticos ou probióticos, $n=5$. (A) Área dos hepatócitos; (B) Densidade de hepatócitos por mm^2 . Grupos SC: falso operado (*sham*); IRC: isquêmico; IRA: isquêmico tratado com antibióticos; IRP: isquêmico tratado com probióticos. Resultados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo SC.

DISCUSSÃO

Os efeitos da IR intestinal vão além do dano primário tecidual local. Os eventos secundários da quebra da barreira intestinal como a inflamação, translocação bacteriana, e liberação de endotoxinas, resultam no dano de outros órgãos além do intestino [21] entre eles fígado, pulmão e rins [4]. Neste estudo observamos que a IR intestinal causa estresse oxidativo, inflamação e alterações morfométricas nos pulmões, rins e fígado de ratos e que a manipulação da microbiota intestinal resulta em diferentes respostas desses órgãos. De uma forma geral, a administração de antibióticos agravou ou não interferiu no efeito sistêmico da IR e a administração de probióticos trouxe benefícios aos animais. A efetividade dos tratamentos variou de acordo com o órgão analisado.

O intestino, além de ser responsável pela absorção de nutrientes, tem importante papel como barreira com o meio externo, protegendo o ambiente interno contra patógenos e toxinas [22]. Durante a isquemia, a hipóxia vascular, provoca o aumento da permeabilidade vascular [1], lesão de células epiteliais intestinais [6] e disfunção da barreira intestinal, deixando o ambiente interno exposto aos componentes externos. Nesse contexto, as bactérias luminiais que não são destruídas por macrófagos na lâmina própria, entram no sistema venoso, passam para nódulos linfáticos mesentéricos e/ou vão

diretamente para a cavidade abdominal [23] atingindo outros órgãos, configurando a translocação bacteriana, que afeta o indivíduo de forma sistêmica [24]. Além da passagem de bactérias, a translocação bacteriana consiste também da passagem de endotoxinas, lipopolissacarídeos e peptidoglicanos pela barreira da mucosa intestinal [23]. Nesse contexto, a microbiota intestinal provoca infecções endógenas e endotoxemia, e dá início a respostas inflamatórias [24]. Ainda, o intestino exerce papel de órgão pró-inflamatório através da liberação de padrões moleculares associados à danos (DAMPs) que são carregados pelo sistema linfático até receptores localizados em diversos órgãos, que promovem vias pró-inflamatórias sistêmicas e o dano aos órgãos. Os DAMPs são liberados pelo intestino na linfa mesentérica em resposta à exposição da submucosa intestinal a bactérias intestinais e seus produtos [7], não carregando necessariamente essas bactérias. Sendo assim, substâncias inflamatórias e/ou tóxicas, produzidas pela parede intestinal em resposta ao processo de IR intestinal, também causam danos sistêmicos [22]. Em nosso trabalho, os três órgãos avaliados, pulmão, rim e fígado, sofreram danos pós IR intestinal.

Estudos mostram que os pulmões são órgãos bastante prejudicados pós IR intestinal [25,26,27] independente do tempo de isquemia e de reperfusão, favorecendo complicações respiratórias e contribuindo para o aumento da morbidade e mortalidade. Em nosso trabalho, os pulmões apresentaram alterações significativas pós IR intestinal. No grupo IRC, observamos a redução da atividade de SOD e dos níveis de GSH e aumento da peroxidação lipídica e níveis de ROS, estabelecendo o quadro de estresse oxidativo no órgão. Bringhenti e colaboradores encontraram resultados semelhantes quanto ao estabelecimento do estresse oxidativo e da inflamação pulmonar após isquemia e reperfusão de 72h, sendo o órgão mais afetado nessas condições [28]. A redução na atividade da CAT e aumento de produtos da oxidação lipídica são alterações observadas também no contexto da IR pulmonar, que refletem em danos histológicos [29]. O pulmão é o órgão que sofre diretamente com a IR intestinal, principalmente pela via inflamatória. Fatores inflamatórios, bactérias translocadas, metabólitos e endotoxinas acumulam-se nos vasos sanguíneos pulmonares, causando lesão a esse órgão [22]. Diversos estudos com diferentes tempos de oclusão e reperfusão da AMS, mostram ocorrência da inflamação pulmonar, avaliada principalmente pelo aumento da atividade da MPO [25,27,30]. Em nosso estudo a inflamação pulmonar foi caracterizada pelo aumento da atividade da MPO e NAG. O aumento da MPO nesse contexto, reflete a infiltração e ativação de neutrófilos no tecido, aumentando a permeabilidade microvascular pulmonar

e o dano nesse órgão [30,31]. Börjesson e colaboradores mostram que ocorre superativação de macrófagos pulmonares após IR intestinal, logo após 12 h de reperfusão [32]. A ativação de macrófagos alveolares, por citocinas, quimiocinas e bactérias luminiais também é vista, causando lesão pulmonar [23]. Ocorre também disfunção vasomotora pulmonar, com redução do conteúdo de sangue no órgão [32]. Essas alterações refletiram na morfometria pulmonar no grupo IRC, na redução da área alveolar e aumento da espessura da parede alveolar. Como o aumento da espessura da parede veio acompanhada pela menor quantidade de colágeno tipo III e total em sua estrutura, essa alteração pode ser sinal de edema alveolar. Esse edema é observado desde o início da reperfusão [33], por resposta à inflamação local [34]. O dano morfométrico pulmonar, ainda está relacionado com o excesso de EROs e com a ativação de neutrófilos. Esses neutrófilos e seus produtos enzimáticos são sequestrados pelo tecido pulmonar, resultando no desenvolvimento das alterações histológicas como edema perivascular e intersticial [35].

O dano renal pós IR intestinal tem grande relação com o estresse oxidativo no órgão [36]. Em nosso trabalho, observamos que os animais do grupo IRC apresentaram redução na atividade da CAT e aumento da atividade da GST e dos níveis de LOOH. Houve aumento da atividade da MPO em relação ao grupo SC. Essas alterações bioquímicas refletiram em menor área do corpúsculo, do glomérulo e do espaço de Bowman renais. Alterações renais são vistas em decorrência da IR intestinal, como o aumento da peroxidação lipídica, diminuição da atividade da SOD, aumento da inflamação por citocinas e alterações histológicas [37]. Mutlu e colaboradores observaram que o aumento da peroxidação lipídica nos rins após isquemia acontece já em 2h de reperfusão [36]. Mas permanece por pelo menos 72h de reperfusão, além do aumento da atividade da GST e da ativação de neutrófilos, vista pelo aumento da MPO [28]. Yurdakan e colaboradores relacionam o dano histológico renal pós IR intestinal com o aumento do estresse oxidativo e principalmente a peroxidação lipídica [38].

Estresse oxidativo e inflamação são dois processos importantes na lesão hepática pós IR intestinal [39]. Em nosso trabalho identificamos o aumento das EROs e da atividade da GST nos animais do grupo IRC, além do aumento da atividade da NAG. Porém, sem alteração significativa na morfometria hepática quanto a densidade e área de hepatócitos. O fígado é um órgão de exposição máxima à microbiota intestinal e seus metabólitos, pois intestino e fígado comunicam-se pela veia porta, vias biliares, circulação sistêmica [40], mediadores inflamatórios, hormônios e produtos da digestão e absorção [41]. Ademais a oclusão da AMS durante a isquemia intestinal também reduz o

fluxo sanguíneo para o fígado [42]. A microbiota e seus produtos podem sofrer translocação para o fígado pela veia porta, tendo influência nas funções hepáticas, sendo que alterações da microbiota intestinal costumam favorecer doenças hepáticas. É o fígado que recebe e filtra nutrientes, produtos bacterianos e toxinas [40]. A translocação bacteriana aumenta a exposição do fígado à padrões moleculares associados à patógenos, resultando em sinalização celular pró-inflamatória, principalmente através de citocinas IL-1, IL-6 e TNF-alfa, processo que promove a produção de espécies reativas de oxigênio e lesão hepática [40]. Células de Kupffer são ativadas no fígado para a secreção dessas citocinas pró-inflamatórias, e há aumento na quimiotaxia de neutrófilos na área [22]. Aqui observamos a inflamação através do aumento da NAG no grupo IRC, porém alterações morfológicas significativas não foram observadas nesse grupo após 72h de reperfusão. Liu e colaboradores mostraram que apesar de observar necrose de hepatócitos e alterações na arquitetura hepática após 75 min de isquemia e 6h de reperfusão, essas alterações são menos evidentes com o passar do tempo de reperfusão (72h) [43]. Bringhenti e colaboradores, após 72h de reperfusão, também observaram que o fígado foi o órgão que apresentou menores alterações, relacionando com a grande capacidade de reserva metabólica que possui, o que pode tornar esse órgão mais resistente aos efeitos da IR intestinal [28].

De um modo geral, pudemos observar em nosso trabalho, que os animais do grupo IRA apresentaram alterações semelhantes aos do grupo IRC ou tiveram sua condição agravada após a administração de antibióticos. A recomendação da Sociedade Europeia de Trauma e Emergência Cirúrgica é de que se utilize antibióticos de amplo espectro precocemente em casos de isquemia intestinal afim de reduzir as consequências da translocação bacteriana [44]. A descontaminação intestinal seletiva, através do uso de antibióticos é pautada na tendência de reduzir a sepse causada por bactérias intestinais, sendo focada muitas vezes na redução de bactérias gram-negativas [23], *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Acetobacter* e fungos (leveduras) [24]. Por isso o uso de vancomicina, neomicina e metronidazol por exemplo. Porém, pacientes já com disfunção múltipla de órgãos podem ter sua situação agravada pela administração desses antibióticos para a descontaminação seletiva, enfraquecendo a barreira intestinal e causando desequilíbrio da microbiota [24]. Além disso, mesmo sem uma patologia intestinal evidente, antibióticos tem a capacidade de interferir na homeostase fisiológica e resistência da parede intestinal, permitindo a disseminação de bactérias [45].

Observando o órgão mais afetado nesse estudo pela IR intestinal, o pulmão, identificamos que a manipulação da microbiota através do uso de antibióticos não resultou em diferenças entre os grupos IRA e IRC quanto aos parâmetros de estresse oxidativo. Porém, a utilização de antibióticos de amplo espectro teve resultado positivo sobre a inflamação, pois os animais do grupo IRA não apresentaram aumento da atividade da MPO e da NAG. A NAG é produzida por macrófagos ativados. Estas células parecem sofrer influência e modulação pela presença, ausência ou diferente composição da microbiota intestinal. No caso de manipulação da microbiota através da administração de neomicina, camundongos que passaram por IR pulmonar mostraram menor atividade inflamatória [46]. Nesse caso, a redução da carga bacteriana a qual o indivíduo foi exposto, pode ter sido o principal ponto no combate à inflamação pulmonar. Quanto à histologia, esses animais mantiveram o padrão de alterações do grupo IRC, porém apresentaram redução na quantidade de colágeno tipo I, e não de colágeno tipo III. Mostrando que mesmo melhorando padrões inflamatórios, o tecido pulmonar ainda sofreu com os efeitos sistêmicos da IR intestinal. O colágeno tem papel importante no suporte do parênquima pulmonar. Colágenos tipo I e III fornecem estrutura para a parede alveolar [47]. Alterações na quantidade de colágeno podem afetar a estrutura, suporte e homeostase pulmonar.

A administração de antibióticos nos rins agravou as alterações oxidativas, caracterizada por diferenças entre os grupos SC e IRA em todos os parâmetros oxidativos avaliados, caracterizando um quadro mais expressivo de estresse oxidativo que qualquer outro grupo, porém, sem caracterização de resposta inflamatória. A redução das áreas corpusculares e glomerulares permaneceu, porém sem alteração no espaço de Bowman. Esse efeito pode ser atribuído ao uso da vancomicina. A vancomicina, quando administrada por via intraperitoneal, tem ação nefrotóxica, causando dano ao tecido renal através do estresse oxidativo. Também provoca a redução da atividade da CAT e da SOD e aumento dos hidroperóxidos lipídicos [48]. Além disso, causa a redução dos níveis de GSH [49]. Ou seja, vancomicina induz estresse oxidativo, apoptose e dano tecidual renal [49]. Esse efeito pôde ser observado em nosso trabalho, mesmo pela administração oral desse antibiótico, tendo em vista que o quadro de IR intestinal favorece a exposição sistêmica do conteúdo luminal, pela quebra da barreira intestinal, mesmo sendo um medicamento não absorvido em condições normais.

O mesmo pôde ser observado no fígado, onde a depleção da microbiota intestinal (grupo IRA) resultou em além do aumento da atividade de GST e níveis de ROS, também

no aumento de LOOH e redução nos níveis de GSH. Houve um agravamento nos parâmetros inflamatórios, com aumento importante da atividade da MPO e da NAG. Essa piora do quadro oxidativo e inflamatório, refletiu na redução da área dos hepatócitos do grupo IRA. A microbiota intestinal tem importante papel na regeneração do fígado. Ampicilina tem como alvo tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas da microbiota intestinal, incluindo *Lactobacillus*. Essas bactérias tem grande importância para o fígado, principalmente em situações de regeneração hepática, pela interação com células imunes [50]. No caso específico da IR intestinal, a quebra da barreira intestinal abre caminho para que o conteúdo luminal entre em contato com o ambiente interno. Os antibióticos então utilizados para a depleção da microbiota, que a princípio não são absorvidos, acabam atingindo também outros tecidos. Como fígado e intestino estão ligados através da veia porta, esse pode ser um órgão afetado diretamente pelos antibióticos.

Por outro lado, o resultado da administração de probióticos contra os efeitos da IR intestinal em órgãos distantes foi diferente do observado com antibióticos. Na maioria dos órgãos e parâmetros avaliados, os probióticos, apresentaram efeitos benéficos ou não agravantes. O uso de probióticos tem como ação direta, a suplementação da microbiota intestinal normal, estimulando o crescimento dessas bactérias benéficas e inibindo competitivamente o crescimento de bactérias exógenas e patogênicas endógenas [24]. Estima-se que o tratamento com probióticos, previna a aderência das bactérias à parede intestinal e a translocação bacteriana, protegendo também contra inflamação [51]. Porém, no pulmão dos animais que receberam probióticos (grupo IRP), esses benefícios não foram observados. Apesar de alguns parâmetros de estresse oxidativo terem sido mantidos como o grupo SC (GSH e EROs), danos às membranas permaneceram, caracterizadas pelo aumento de LOOH. Além de persistir o processo inflamatório pela alta atividade das enzimas MPO e NAG. Quanto à morfometria, os animais do grupo IRP apresentaram redução da área e do perímetro alveolar, aumento da espessura da parede alveolar e redução na quantidade de colágeno do tipo I. Podemos observar que a manipulação com probióticos não foi suficiente para impedir as alterações no pulmão causadas pela IR intestinal.

Porém, os benefícios da manipulação da microbiota por probióticos, puderam ser observados nos rins dos animais. O grupo IRP apresentou melhora no quadro sistêmico, onde não houve alteração em nenhum dos parâmetros oxidativos e inflamatórios avaliados, quando comparados esses animais aos do grupo SC. A única diferença encontrada com o grupo SC foi o aumento na área glomerular. Dessa forma, a

administração de bactérias probióticas foi benéfica, especificamente para esse órgão. Estudos mostram que Bifidobactérias são capazes de reduzir a translocação bacteriana da microbiota para os rins [12,52]. A administração de *Lactobacillus casei* em animais que sofreram IR renal, reduziu o dano ao órgão, protegendo túbulos renais e controlando a inflamação no local através da modulação da resposta de macrófagos [53]. Um mix de Lactobacilos tem efeito anti-inflamatório, antioxidante e protetor sobre o tecido renal [54].

Da mesma forma, a administração de probióticos foi benéfica ao fígado, tendo em vista a ausência de inflamação e estresse oxidativo no órgão, sendo o único parâmetro bioquímico alterado, a atividade aumentada da GST. Porém, nesses animais, a área dos hepatócitos apresentou redução quando comparado ao grupo SC. Os probióticos são capazes de atenuar o dano hepático em modelo de disfunção da barreira intestinal, justamente por proteger a barreira intestinal, reduzindo translocação bacteriana e a secreção de citocinas inflamatórias, inclusive da TNF-alfa [55]. Pacientes que receberam suplementação oral de *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus plantarum* tiveram melhora da lesão hepática induzida por álcool, graças à restauração da microbiota intestinal [56]. Os efeitos antioxidante e anti-inflamatório observados nos rins e no fígado são descritos em trabalhos que usam diversas cepas de Lactobacilos e Bifidobacterias, induzindo a secreção de IL-10 [57], reduzindo a peroxidação lipídica *in vitro* [58] e fortalecendo a barreira intestinal, reduzindo a translocação bacteriana e os níveis de endotoxinas plasmáticas, TNF-alfa e IL-6 [12]. Mostrando que a suplementação com probióticos pode ser uma estratégia preventiva ou de tratamento em doenças em que há aumento da permeabilidade intestinal [59].

CONCLUSÃO

A manipulação da microbiota intestinal reflete na resposta de órgãos distantes aos efeitos da IR intestinal. A administração de probióticos é benéfica, por amenizar os danos inflamatórios, oxidativos e morfométricos principalmente hepáticos e renais. Por outro lado, a depleção da microbiota através de antibióticos não é eficiente nessa proteção, não impedindo o dano à órgãos distantes em ratos *Wistar*.

REFERÊNCIAS

- [1] H. Eltzschig, T. Eckle, Ischemia and reperfusion – from mechanism to translation, *Nature Medicine* 17 (11) (2011) 1391-1401.
- [2] S. Sozen, O. Topuz, A.S. Uzun, S. Çetinjunar, K. Das, Preventions of bacterial translocation using Glutamine and Melatonin in small bowel ischemia and reperfusion in rats, *Annali Italiani di Chirurgia* 83 (2) (2012) 143-148.
- [3] S.W. Park, M. Kim, K.M. Brown, V.D. D'Agati, H.T. Lee, Paneth Cell-Derived Interleukin-17A Causes Multiorgan Dysfunction After Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury, *Hepatology* 53 (5) (2011) 1662- 1675.
- [4] G. Li, Y. Zhang, Z. Fan, Cellular Signal Transduction pathways involved in acute lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2021) 1-9.
- [5] B. Vollmar, M.D. Menger, Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences, *Langenbecks Arch Surg.* 396 (2011) 13-29.
- [6] S. Balzan, C.A. Quadros, R. Cleva, B. Zilberstein, I. Ceconello, Bacterial translocation: Overview of mechanisms and clinical impact, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22 (2007) 464-471.
- [7] S.F. Assimakopoulos, C. Triantos, K. Thomopoulos, F. Fligou, I. Maroulis, M. Marangos, C.A. Gogos, Gut-origin sepsis in the critically ill patient: pathophysiology and treatment, *Infection* (2018).
- [8] J.S. Ayres, N.J. Trinidad, R.E. Vance, Lethal inflammasome activation by a multidrug-resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota, *Nature Medicine* 18 (5) (2012) 799-808.
- [9] J.M.M. Natividad, E.F. Verdu, Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications, *Pharmacological Research* 69 (2013) 42-51.
- [10] P. D'Amelio, F. Sassi, Gut Microbiota, Immune System, and Bone, *Calcif Tissue Inf.* 102 (2018) 415-425.
- [11] B.O. Schroeder, F. Backhed, Signal from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease, *Nature Medicine* 22 (10) (2016) 1079-1089.
- [12] H. Wang, W. Zhang, L. Zuo, W. Zhu, B. Wang, Q. Li, J. Li, Bifidobacteria may be beneficial to intestinal microbiota and reduction of bacterial translocation in mice following ischaemia and reperfusion injury, *British Journal of Nutrition* 109 (2013) 1990-1998.
- [13] S.A. Snoek, M.I. Verstege, G.E. Boeckxstaens, R. M. Wijngaard, W.J. Jonge, The enteric nervous system as a regulator of intestinal epithelial barrier unction in health and disease, *Expert Reviews Gastroenterology Hepatology* 4 (5) (2010) 637-651.
- [14] S.A. João, S.S.S Alencar, A.C. Medeiros, S.O.F Diniz, V.N. Cardoso, C.T. Brandt, Translocations of ^{99m}Tc labelled bacteria after intestinal ischemia and reperfusion, *Acta Cir Bras.* 19 (4) (2004) 328-333.
- [15] D.H. Reikvan, A. Erofeev, A. Sandvik, V. Grcic, F.L. Jahnsen, P. Gaustad, K.D. McCoy, A.J. Macpherson, L.A. Meza-Zepeda, F.E. Johansen, Depletion of Murine Intestinal Microbiota: Effects on Gut Mucosa and Epithelial Gene Expression, *Plos One* 6 (3) (2011).

- [16] S.C. Borges, P.E.B Ferreira, L.M. Silva, M.F.P. Werner, J.M. Irache, A.O. Cavalcanti, N.C. Buttow, Evaluation of the treatment with resveratrol-loaded nanoparticles in intestinal injury model caused by ischemia and reperfusion, *Toxicology* 1 (396-397) (2018) 13-22.
- [17] H. Aebi, Catalase in Vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121-126.
- [18] M. Warholm, C. Guthenberg, C. von Bahr, B. Mannervik, Glutathione transferases from human liver, *Methods Enzymol.* 113 (1985) 499-504.
- [19] S. Marklund, G. Marklund, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *European Journal of Biochemistry* 47(3) (1974) 469-474.
- [20] Z. Jiang, A.C.S. Woollard, S. Wolff, Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric Method, *Lipids* 26 (10) (1991) 853-856.
- [21] F. Deng, Z.B. Lin, Q.S. Sun, Y. Min, Y. Zhang, Y. Chen, W.T. Chen, J.J. Hu, K.X. Liu, The role of intestinal microbiota and its metabolites in intestinal and extraintestinal organ injury induced by intestinal ischemia reperfusion injury, *International Journal of Biological Sciences* 18 (10) (2022) 3981-3992.
- [22] Y. Chen, W. Pu, E. P. Maswikiti, P. Tao, X. Li, D. Wang, B. Gu, Y. Fu, L. Gao, C. Zhao, H. Chen. Intestinal congestion and reperfusion injury: damage caused to the intestinal tract and distal organs, *Bioscience Reports* 41 (2021) 1-11.
- [23] M. Gatt, B.S. Reddy, J. Macfie, Review article: bacterial translocation in the critically ill – evidence and methods of prevention, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 25 (2007) 741-757.
- [24] Y.H. Wang, Current progress of research on intestinal bacterial translocation, *Microbial Pathogenesis* 152 (2021) 1-9.
- [25] R. Wu, W. Dong, Y. Ji, M. Zhou, C.P. Marini, T.S. Ravikumar, P. Wang, Orexigenic Hormone Ghrelin Attenuates Local and Remote Organ Injury after Intestinal Ischemia-Reperfusion, *Plos One* 3 (4) (2008) 1-8.
- [26] A.N. Shafik, Febuxostat Improves the Local and Remote Organ Changes Induced by Intestinal Ischemia/Reperfusion in Rats, *Digestive Diseases and Science* 58 (2013) 650-659.
- [27] K. Wada, M.C. Montalto, G.L. Stahl, Inhibition of Complement C5 Reduces Local and Remote Organ Injury After Intestinal Ischemia/Reperfusion in the Rat, *Gastroenterology* 120 (2001) 126-133.
- [28] E. Bringhenti, S.C. Borges, C.Q. Neves, N.C. Buttow, Remote organs respond differently to curcumin treatment after intestinal ischemia/reperfusion injury, *Research Society and Development* 9 (11) (2020) 1-24.
- [29] Z. Fu, X. Liu, B. Geng, L. Fang, C. Tang, Hydrogen sulfide protects rat lung from ischemia-reperfusion injury, *Life Sciences* 82 (2008) 1196-1202.
- [30] Y. Ma, T. Zabell, A. Creasy, X. Yang, V. Chatterjee, N. Villalba, E.R. Kistler, M.H. Wu, S.Y. Yuan, Gut Ischemia Reperfusion Injury Induces Lung Inflammation via Mesenteric Lymph-Mediated Neutrophil Activation, *Frontiers in Immunology* 11 (2020) 1-12.

- [31] H. Ishii, M. Ishibashi, M. Takayama, T. Nishida, M. Yoshida. The role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 in neutrophil-mediated remote lung injury after intestinal ischemia/reperfusion in rats, *Respirology* 5 (2000) 325-331.
- [32] A. Borjerson, X. Wang, Z. Sun, R. Wallen, X. Deng, E. Johansson, R. Aanderson, Effects of n-acetylcysteine on pulmonary macrophage activity after intestinal ischemia and reperfusion in rats, *Digestive Surgery* 17 (2000) 379-389.
- [33] A. Guzel, M. Kanter, A. Guzel, A.F. Yucel, M. Erboğa, Protective effect of curcumin on acute lung injury induced by intestinal ischaemia/reperfusion, *Toxicology and Industrial Health* 29 (7) (2012) 633-642.
- [34] P.R.M. Rocco, A.B. Souza, D.S. Faffe, C.P. Passaro, F.B. Santos, E.M. Negri, J.G.M. Lima, R.S. Contador, V.L. Capelozzi, W.A. Zin, Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at an early phase of acute lung injury, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168 (2003) 677-684.
- [35] L.Q. Mo, Y. Chen, L. Song, G.M. Wu, N. Tang, Y.Y. Zhang, X.B. Wang, K.X. Liu, J. Zhou, Osteohelminth prevents intestinal ischemia-reperfusion-induced lung injury in a rodent model, *Journal of Surgical Research* 189 (2014) 285-294.
- [36] G. Mutlu, L. Abbasoglu, S. Dogru-Abbasoglu, S. Solakoglu, M. Bulut, Morphologic changes and lipid peroxidation in renal tissues of young rats following intestinal ischemia-reperfusion, *Pediatric Surgery International* 18 (2002) 337-340.
- [37] R. Chen, Z. Zeng, Y.Y. Zhang, C. Cao, H.M. Liu, W. Li, Y. Wu, Z.Y. Xia, D. Ma, Q.T. Meng, Ischemic postconditioning attenuates acute kidney injury following intestinal ischemia-reperfusion through Nrf2-regulated autophagy, anti-oxidation, and anti-inflammation in mice, *The FASEB Journal* 34 (2020) 8887-8901.
- [38] G. Yurdakan, I.O. Tekin, M. Comert, S. Acikgoz, E.Y. Sipahi, The presence of oxidized low-density lipoprotein and inducible nitric oxide synthase expression in renal damage after intestinal ischemia reperfusion, *Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 28 (2012) 16-22.
- [39] H.R. Jing, F.W. Luo, X.M. Liu, X.F. Tian, Y. Zhou, Fish oil alleviates liver injury induced by intestinal ischemia/reperfusion via AMPK/SIRT-1/autophagy pathway, *World J Gastroenterol.* 24 (7) (2018) 833-843.
- [40] C.A. Philips, P. Augustine, P.K. Yerol, G.N. Ramesh, R. Ahamed, S. Rajesh, T. George, S. Kumbar, Modulating the Intestinal Microbiota: Therapeutic Opportunities in Liver Disease, *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 8 (2020) 87-99.
- [41] J.S. Bajaj, P.B. Hylemon, Z. Younossi, The Intestinal Microbiota and Liver Disease, *The American Journal of Gastroenterology Supplements* 1 (1) (2012) 9-14.
- [42] Y. Horie, R. Wolf, M. Miysaka, D.C. Anderson, N. Granger, Leukocyte adhesion and hepatic microvascular responses to intestinal ischemia reperfusion in rats, *Gastroenterology* 111 (1996) 666-673.
- [43] J. Liu, G. Pan, T. Liang, P. Huang, HGF/c-Met signaling mediated mesenchymal stem cell-induced liver recovery in intestinal ischemia reperfusion model. *International Journal of Medical Sciences* 11 (6) (2014) 626-633.
- [44] J.V.T. Tilsed, A. Casamassima, H. Kurihara, D. Mariani, L. Martinez, J. Pereira, L. Ponchietti, A. Shamiyeh, F. Al-Ayoubi, L.A.B. Barco, M. Ceolin, A.J.G. D'Almeida, S. Hilario, A.L. Olavarria, M.M. Ozmen, L.F. Pinheiro, M. Poeze, G. Triantos, F.T. Fuentes,

- S.U. Sierra, K. Soreide, H. Yanar, ESTES guidelines: acute mesenteric ischaemia, *Eur J Trauma Emerg Surg.* 42 (2016) 253-270.
- [45] R.L. Fine, S.M. Vieira, M.S. Gilmore, M.A. Kriegel, Mechanisms and consequences of gut comensal translocation in chronic diseases, *Gut Microbes* 11 (2) (2020) 217-230.
- [46] A. Prakash, S.V. Sundar, Y.G. Zhu, A. Tran, J.W. Lee, C. Lowell, J. Hellman, Lung ischemia reperfusion (IR) is a sterile inflammatory process influenced by commensal microbiota in mice, *Shock* 44 (3) (2015) 272-279.
- [47] B. Suki, J. H.T. Bates, Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases, *Respiratory Physiology & Neurobiology* 163 (2008) 33-43.
- [48] F. Oktem, M.K. Arslan, F. Ozguner, O. Candir, H.R. Yilmaz, M. Ciris, E. Uz, In vivo evidences suggesting the role of oxidative stress in pathogenesis of vancomycin-induced nephrotoxicity: protection by erdosteine, *Toxicology* 215 (2005) 227-233.
- [49] F.M. Kandemir, S. Yildirim, S. Kucukler, C. Caglayan, A. Mahamadu, M.B. Dortbudak, Therapeutic efficacy of zingerone against vancomycin-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis and aquaporin 1 permeability in rat kidney, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 105 (2018) 981-991.
- [50] X. Wu, R. Sun, Y. Chen, X. Zheng, L. Bai, Z. Lian, H. Wei, Z. Tian, Oral ampicillin inhibits liver regeneration b breaking hepatic innate immune tolerance normally maintained by gut commensal bacteria, *Hepatology* 62 (1) (2015) 253-264.
- [51] J. Amar, C. Chabo, A. Waget, P. Klopp, C. Vachoux, L.G. Bermúdez-Humarán, N. Smirnova, M. Bergé, T. Sulpice, S. Lahtinen, A. Ouwehand, P. Langella, N. Rautonen, P.J. Sansonetti, R. Burcelin, Intestinal mucosal adherence and translocation of comensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment, *EMBO Molecular Medicine* 3 (2011) 559-572
- [52] A. Duranti, V. Vivo, I. Zini, C. Milani, M. Mangifesta, R. Anzalone, L. Mancabelli, A. Viappiani, A.M. Cantoni, E. Barocelli, D. Sinderen, S. Bertoni, F. Turroni, *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 alleviates intestinal ischemia/reperfusion injury, *Plos One* 13 (8) (2018) 1-16.
- [53] H. Zhu, C. Cao, Z. Wu, G. Xu, Y. Yao, R. Zeng, The probiotic *L.casei* Zhang slows the progression of acute and chronic kidney disease, *Cell Metabolism* 33 (2021) 1-17.
- [54] E. Sengul, S. U. Gelen, S. Yildirim, F. Çelebi, A. Çinar, Probiotic bacteria attenuates cisplatin – induced nephrotoxicity through modulation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 9 (3) (2019) 116-122.
- [55] J. Ewaschuk, R. Endersby, D. Thiel, H. Diaz, J. Backer, M. Ma, T. Churchill, K. Madsen, Probiotic Bacteria Prevent Hepatic Damage and Maintain Colonic Barrier Function in a Mouse Model of Sepsis, *Hepatology* 46 (3) (2007) 841-850.
- [56] I.A. Kirpich, N.V. Solovieva, S.N. Leikhter, N.A. Shidakova, O.V. Lebedeva, P.I. Sidorov, T.A. Bazhukova, A.G. Soloviev, S.S. Barve, C.J. Maclain, M. Cave, Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study, *Alcohol* 42 (2008) 675-682.
- [57] A.L. Hart, K. Lammers, P. Brigidi, B. Vitalo, F. Rizzello, P. Gionchetti, M. Campieri, M.A. Kamm, S.C. Knight, A.J. Stagg. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria, *Gut* 53 (2004) 1602-1609.

[58] M.Y. Lin, F.J. Chang, Antioxidative Effect of Intestinal Bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, Digestive Diseases and Sciences 45 (8) (2000) 1617-1622.

[59] E.C. Rose, J. Odle, A.T. Blikslager, A.L. Ziegler, Probiotics, Prebiotics and Epithelial Tight Junctions: A Promising Approach to Modulate Intestinal Barrier Function, Int. J. Mol. Sci, 22 (6729) (2021) 1-18.

Anexo 1 – Parecer de Aprovação do CEUA- UEM



Universidade Estadual de Maringá
 Comissão de Ética no
 Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "USO DE PROBIÓTICOS E ANTIBIÓTICOS NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL: EFEITO SOBRE O PLEXO MIENTÉRICO DO ÍLEO E ESTRESSE OXIDATIVO DO INTESTINO E ÓRGÃOS DISTANTES DE RATOS", protocolada sob o CEUA nº 2869200218 (ID 001642), sob a responsabilidade de **Nilza Cristina Buttow e equipe; Camila Quaglio Neves** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 16/04/2018.

We certify that the proposal "USE OF PROBIOTICS AND ANTIBIOTICS IN INTESTINAL ISCHEMIA AND REPERFUSION: EFFECT ON MIENTERIC PLEXUS OF ILEUM AND OXIDATIVE STRESS OF THE INTESTINE AND DISTANT ORGANS OF RATS", utilizing 126 Heterogenics rats (126 males), protocol number CEUA 2869200218 (ID 001642), under the responsibility of **Nilza Cristina Buttow and team; Camila Quaglio Neves** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 04/16/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 04/2018 a 03/2021

Área: Dcm-Ciências Morfológicas

Origem: Biotério Central da UEM

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 55 a 65 dias

N: 126

Linhagem: Wistar

Peso: 220 a 250 g

Local do experimento: Laboratório de histotécnica do departamento de Morfologia

Maringá, 26 de julho de 2022

Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
 Coordenadora da CEUA/UEM
 Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez
 Coordenador Adjunto da CEUA/UEM
 Universidade Estadual de Maringá



Anexo 2 - Normas da revista Neurogastroenterology and Motility SUBMISSION

Authors should kindly note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.

New submissions should be made via the **Research Exchange submission portal**. Should your manuscript proceed to the revision stage, you will be directed to make your revisions via the same submission portal. You may check the status of your submission at anytime by logging on to submission.wiley.com and clicking the “My Submissions” button. For technical help with the submission system, please review our FAQs or contact **submissionhelp@wiley.com**

Data protection

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at **<https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>**.

Preprint policy

This journal will consider for review articles previously available as preprints on non-commercial servers such as ArXiv, bioRxiv, psyArXiv, SocArXiv, engrXiv, etc. Authors may also post the submitted version of a manuscript to non-commercial servers at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

For help with submissions, please contact the editorial office at **NGM.Office@wiley.com**.

2. AIMS AND SCOPE

Neurogastroenterology & Motility only accepts submission at **<http://mc.manuscriptcentral.com/nmo>**. This enables rapid and effective peer review. Contributions will be acknowledged automatically by the editors and assigned a unique manuscript number that must be quoted in correspondence. Papers and Reviews are refereed by experts in the field; the Editors reserve the right to reject an article without review.

Full uploading instructions and support are available online from the submission site via the “Get Help Now” button. Please submit your covering letter or comments to the editor as well as the names of potential referees when prompted online.

Manuscripts that do not meet the formal criteria listed below will be returned for reformatting, which will delay the review process and possible acceptance. Exceptions to these guidelines may be made in certain circumstances, at the discretion of the Editors. If you require an exemption, please indicate this in your cover letter.

Over the past few years, *Neurogastroenterology & Motility* has become one of the leading journals in the field of gastroenterology and related areas of physiology. This is reflected by the steadily increasing number of high-quality manuscripts submitted to the Journal. The length of a manuscript needs to be closely adhered to, with any additional material

to be published as supporting information. Authors need not pay for the publication of figures in colour.

Manuscripts that do not meet these formal criteria will be returned for reformatting, which will delay the review process and possible acceptance.

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>

3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

Article types

Original Articles

Original Articles describe the results of basic or clinical studies, clinical trials or significant **Case Reports**. The length of an Original Article should be no longer than **5000** words, excluding acknowledgements and disclosures, references, tables, figures, table legends and figure legends, and to limit the number of figures and tables to a maximum of eight in the regular edition of the Journal (e.g. five figures and three tables) in normal circumstances, with any additional material to be published as supporting information.

We work together with Wiley's open access journal, *Clinical Case Reports*, to enable rapid publication of good quality case reports that we are unable to accept for publication in our journal. Authors of case reports rejected by our journal will be offered the option of having their case report, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by the *Clinical Case Reports* editorial team. Authors will not need to reformat or rewrite their manuscript at this stage, and publication decisions will be made a short time after the transfer takes place. *Clinical Case Reports* will consider case reports from every clinical discipline and may include clinical images or clinical videos. *Clinical Case Reports* is an open access journal, and article publication fees apply. For more information please go to www.clinicalcasesjournal.com.

Review Articles

Topical reviews of basic or clinical areas are commissioned by the Reviews Editor. Review Articles are focused topical accounts that highlight new and/or controversial areas. Manuscript length is limited to **5000** words. All Review articles are subject to review by experienced referees. The Journal welcomes un-solicited Reviews, but the Reviews Editor reserves the right to reject these without formal review. As Reviews are commissioned by the Editors far in advance of publication, if you wish to submit a non-commissioned review please contact the Reviews Editor, Stephen Vanner (vanners@hdh.kari.net) for consideration.

Letters to the Editor

Letters to the Editor offer opinions on papers published in *Neurogastroenterology & Motility*. Text should not exceed **400** words. Letters commenting on papers are sent to the authors of those papers for a response. Letters are selected for their importance, relevance, and originality; not all letters submitted can be published.

Technical Notes

Technical Notes papers are restricted to a maximum of **1500** words. The manuscript should focus on technique, validation of the technique, and include relevant references and up to two figures.

Book Reviews

Neurogastroenterology & Motility does not publish Book Reviews.

Revisions

To make it easier for re-review, we encourage authors to make the revisions in their manuscript using a colored font (blue or red) and/or a colored highlighter (yellow). They should also provide a point by point response to the editor of the changes that were made in a letter that describes the requested change and the responses.

The editors have designated two types of revision for manuscripts in the Journal: (i) Minor revisions: these in general require only changes to the manuscript or easily conducted experiments. Revised manuscripts must be submitted in their final form no later than four weeks of receipt of a revision letter from the Editor. (ii) Major revisions: these require changes to the manuscript and significant additional experiments. Revised manuscripts must be submitted in their final form within three months of receipt of a revision letter from the editor.

In all cases, resubmissions after the allotted time will be considered as new submissions.

Language

Please note that the Journal uses American spelling (e.g. 'esophagus', not 'oesophagus'). Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication. Authors of manuscripts with a poor standard of English will be directed towards the abovementioned editing services.

4. PREPARING YOUR SUBMISSION

Manuscripts can be uploaded either as a single document (containing the main text, tables and figures), or with figures and tables provided as separate files. Should your manuscript reach revision stage, figures and tables must be provided as separate files. The main manuscript file can be submitted in Microsoft Word (.doc or .docx) format.

Your main document file should include:

- A short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations
- The full names of the authors with institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
- Acknowledgments;
- Abstract structured (intro/methods/results/conclusion) or unstructured
- Up to seven keywords;
- Practitioner Points (optional) Authors will need to provide no more than 3 'key points', written with the practitioner in mind, that summarize the key messages of their paper to be published with their article.
- Main body: formatted as introduction, materials & methods, results, discussion, conclusion
- References;
- Tables (each table complete with title and footnotes);

- Figures: Figure legends must be added beneath each individual image during upload AND as a complete list in the text.

Cover Letters

A covering letter must be included, signed by the corresponding author and stating on behalf of all the authors that the work has not been published and is not being considered for publication elsewhere.

Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: main text file; figures.

The manuscript should be double-spaced with 30mm margins. Manuscripts must be numbered consecutively in the following sequence: Title Page; Abstract, if required; Main Body of Text; Acknowledgement; Reference List; Tables and Figure caption List.

- i. A short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's [Wiley's best practice SEO tips](#));
- ii. A short running title of less than 40 characters;
- iii. The full names of the authors;
- iv. The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
- v. Acknowledgments;
- vi. Abstract and keywords;
- vii. Graphical Abstract;
- viii. Main text;
- ix. References;
- x. Tables (each table complete with title and footnotes);
- xi. Figure legends;
- xii. Appendices (if relevant).

Figures and supporting information should be supplied as separate files.

Title page

On the title page, provide the complete title and a running title (not to exceed 45 characters and spaces). List each contributor's name and institutional affiliation. Provide the name, postal and e-mail address, fax and telephone number of the contributor responsible for the manuscript and proofs. This is the person to whom all correspondence will be sent. The corresponding author is responsible for keeping the editorial office updated with any change in details until the paper is published.

Authorship

Please refer to the journal's Authorship policy in the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on author listing eligibility.

Acknowledgments

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the 'Conflict of Interest' section in the Editorial Policies and Ethical Considerations section below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Abstract and Keywords

The abstract must not exceed 250 words. It should summarize the aim of the study and describe the work undertaken, results and conclusions. For Original Articles and Technical Notes, the abstract should be structured under four subheadings: **Background, Methods, Key Results and Conclusions & Inferences**. For Review Articles, the abstract should be structured under **Background and Purpose**. For Mini-review editorials, “Hot Topics” and Case Reports, the abstract should be unstructured, i.e. without the subheadings. In addition, you should list up to six keywords in alphabetical order. For ideas on optimising your abstract.

Graphical Abstract

A graphical summary is required for all original articles. It is recommended that the graphical summary is provided during the initial submission and is required during the revision stage. Please note that all accepted original articles must include a graphical summary before publication. **Wiley Editing Services** offers expert help with graphical abstract design if desired.

Keywords

Please provide 5-7 keywords. Keywords should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at <https://www.nlm.nih.gov/mesh/>.

Main body of text

Manuscripts should be typed in a standard, easy to read font, either 11 or 12pt in size. Manuscripts should be double-spaced, with 2.5cm (1 inch) margins on all sides and run in one single column. Please ensure that you have turned “track changes off” and removed any reviewing notes from your manuscripts else these will be visible throughout the review process. Place the page number and first author's last name in the upper right-hand corner of each page.

Review articles should be divided onto the following sections and appear in the following order: (1) title page (with short running page heading, title, authors names and affiliations), (2) abstract and keywords, (3) body of the article, (4) acknowledgments, funding, and disclosures; (5) references, (6) tables, (7) figure legends, and (8) figures.

Original articles should be divided into the following sections and appear in the following order: (1) title page (with short running page heading, title, authors names and affiliations) (2) abstract and keywords, (3) introduction, (4) materials and methods, (5) results, (6) discussion, (7) acknowledgments, funding, and disclosures, (8) references, (9) appendices, (10) supporting information, (11) tables, (12) figure legends, and (13) figures.

Methods and Materials

Animal preparation and experimentation should cite the approving governing body. Equipment and apparatus should cite the make and model number and the company name and address (town, state/city, country) at first mention.

Give all measurements in metric units and use negative indexing (mg mL^{-1} , not mg/mL). Use generic names of drugs. Symbols, units and abbreviations should be expressed as Système International (SI) units. In exceptional circumstances, others may be used, provided they are consistent. If necessary, please contact the editorial office for further advice.

Experimental Methods Reporting Checklist for Authors

References

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. Sample references follow:

Journal article:

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book:

2. Voet D, Voet JG. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

For more information about AMA reference style - [AMA Manual of Style](#).

Endnotes

Endnotes should be placed as a list at the end of the paper only, not at the foot of each page. They should be numbered in the list and referred to in the text with consecutive, superscript Arabic numerals. Keep endnotes brief; they should contain only short comments tangential to the main argument of the paper.

Footnotes

Footnotes should be placed as a list at the end of the paper only, not at the foot of each page. They should be numbered in the list and referred to in the text with consecutive, superscript Arabic numerals. Keep footnotes brief; they should contain only short comments tangential to the main argument of the paper and should not include references.

Tables

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Figures

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted. [Click here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

Data Citation

In recognition of the significance of data as an output of research effort, Wiley has endorsed In recognition of the significance of data as an output of research effort, Wiley has endorsed the [FORCE11 Data Citation Principles](#) and is implementing a mandatory data citation policy. Wiley journals require data to be cited in the same way as article, book, and web citations and authors are required to include data citations as part of their reference list.

Data citation is appropriate for data held within institutional, subject focused, or more general data repositories. It is not intended to take the place of community standards such as in-line citation of GenBank accession codes.

When citing or making claims based on data, authors must refer to the data at the relevant place in the manuscript text and in addition provide a formal citation in the reference list. We recommend the format proposed by the [Joint Declaration of Data Citation Principles](#):

- [dataset] Authors; Year; Dataset title; Data repository or archive; Version (if any); Persistent identifier (e.g. DOI)

Additional Files

Appendices

Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text.

Supporting Information

Supporting information is information that is not essential to the article but provides greater depth and background. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc.

Click here for Wiley's FAQs on supporting information.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

General Style Points

The following points provide general advice on formatting and style.

- Abbreviations: In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly, and the abbreviation is helpful to the reader. Initially, use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.
- Units of measurement: Measurements should be given in SI or SI-derived units. Visit the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) website for more information about SI units.
- Numbers: numbers under 10 are spelt out, except for: measurements with a unit (8mmol/l); age (6 weeks old), or lists with other numbers (11 dogs, 9 cats, 4 gerbils).
- Trade Names: Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used. Drugs should be referred to by their generic names. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name and the name and location of the manufacturer in parentheses.

Wiley Author Resources

Manuscript Preparation Tips: Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available **here**. In particular, we encourage authors to consult Wiley's best practice tips on **Writing for Search Engine Optimization**.

Article Preparation Support

Wiley Editing Services

*offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence. Also, check out our resources for **Preparing Your Article** for general guidance about writing and preparing your manuscript.*

5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS

Peer Review and Acceptance

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to our readership. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determine that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements.

Wiley's policy on confidentiality of the review process is available **here**.

Guidelines on Publishing and Research Ethics in Journal Articles Please review Wiley's policies surrounding human studies, animal studies, clinical trial registration, biosecurity, and research reporting guidelines [here](#).

Species Names

Upon its first use in the title, abstract, and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species, and authority) in parentheses. For well-known species, however, scientific names may be omitted from article titles. If no common name exists in English, only the scientific name should be used.

Genetic Nomenclature

Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines; see <http://varnomen.hgvs.org/>, where examples of acceptable nomenclature are provided.

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL, or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL, and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: 'These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345'. Addresses are as follows:

- DNA Data Bank of Japan (DDBJ) www.ddbj.nig.ac.jp
- EMBL Nucleotide Archive: ebi.ac.uk/ena
- GenBank www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank

Proteins sequence data should be submitted to either of the following repositories:

- Protein Information Resource (PIR): pir.georgetown.edu
- SWISS-PROT: expasy.ch/sprot/sprot-top

Conflict of Interest

The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to, patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

Funding

Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open Funder Registry for the correct nomenclature: <http://www.crossref.org/fundingdata/registry.html>

Authorship

The journal follows the **ICMJE definition of authorship**, which indicates that authorship be based on the following 4 criteria:

- Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
- Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND

- Final approval of the version to be published; AND
- Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

In addition to being accountable for the parts of the work he or she has done, an author should be able to identify which co-authors are responsible for specific other parts of the work. In addition, authors should have confidence in the integrity of the contributions of their co-authors.

All those designated as authors should meet all four criteria for authorship, and all who meet the four criteria should be identified as authors. Those who do not meet all four criteria should be acknowledged. These authorship criteria are intended to reserve the status of authorship for those who deserve credit and can take responsibility for the work. The criteria are not intended for use as a means to disqualify colleagues from authorship who otherwise meet authorship criteria by denying them the opportunity to meet criterion #s 2 or 3. Therefore, all individuals who meet the first criterion should have the opportunity to participate in the review, drafting, and final approval of the manuscript.

Data Sharing and Data Accessibility

The journal encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper.

Data Citation

Please also cite the data you have shared, like you would cite other sources that your article refers to, in your references section. You should follow the format for your data citations laid out in the Joint Declaration of Data Citation Principles, <https://www.force11.org/datacitationprinciples>:

- [dataset] Authors; Year; Dataset title; Data repository or archive; Version (if any); Persistent identifier (e.g. DOI)

Human subject information in databases. The journal refers to the **World Health Medical Association Declaration of Taipei on Ethical Considerations Regarding Health Databases and Biobanks**.

Publication Ethics

This journal is a member of the **Committee on Publication Ethics (COPE)**. Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read Wiley's Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors [here](#). Wiley's Publication Ethics Guidelines can be found [here](#).

ORCID

As part of our commitment to supporting authors at every step of the publishing process, *Cytopathology* requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. **Find more information**.

Correction to Authorship

In accordance with **Wiley's Best Practice Guidelines on Research Integrity and Publishing Ethics** and the **Committee on Publication Ethics' guidance**, *Neurogastroenterology & Motility* will allow authors to correct authorship on a submitted, accepted, or published article if a valid reason exists to do so. All authors – including those to be added or removed – must agree to any proposed change. To request a change to the author list, please complete the **Request for Changes to a Journal Article Author List Form** and contact either the journal's editorial or production office,

depending on the status of the article. Authorship changes will not be considered without a fully completed Author Change form. [Correcting the authorship is different from changing an author's name; the relevant policy for that can be found in [Wiley's Best Practice Guidelines](#) under "Author name changes after publication."]

Author Name Change Policy

In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

6. AUTHOR LICENSING

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or [open access](#) under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available [here](#). To review the Creative Commons License options offered under open access, please [click here](#). (Note that certain funders mandate that a particular type of CC license has to be used; to check this please [click here](#).)

Self-Archiving definitions and policies. Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please click [here](#) for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

Open Access fees: If you choose to publish open access you will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available [here](#).

Funder Open Access: Please click [here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Accepted article received in production

When your accepted article is received by Wiley's production team, you (corresponding author) will receive an email asking you to login or register with [Author Services](#). You will be asked to sign a publication license at this point.

Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online very soon after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only, are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked, and are indexed by PubMed. After publication of the final version article (the article of record), the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. Accepted Articles will be indexed by PubMed; submitting authors should therefore carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the

manuscript so it is correct for indexing. Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.

Proofs

Once the paper is typeset, the author will receive an email notification with full instructions on how to provide proof corrections. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process – authors should check proofs carefully. Note that proofs should be returned within 48 hours from receipt of first proof.

Publication Charges

Accepted Articles

This journal offers rapid publication via Wiley's Accepted Articles Service. Accepted Articles are published on Wiley Online Library within 5 days of receipt, without waiting for a copyright agreement (they are protected under a general copyright statement).

Early View The journal offers rapid publication via Wiley's Early View service. **Early View** (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before the article appears online, as Editors also need to review proofs. Before we can publish an article, we require a signed license (authors should login or register with Wiley Author Services). Once the article is published on Early View, no further changes to the article are possible. The Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations.

Citing this Article: eLocators

This journal now uses eLocators. eLocators are unique identifiers for an article that service the same function page numbers have traditionally served in the print world. When citing this article, please insert the eLocator in place of the page number. For more information, please visit the Author Services eLocator page [here](#).

8. POST PUBLICATION

Access and sharing

When your article is published online:

- The author receives an email alert (if requested).
- The link to the published article can be shared through social media.
- The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).
- For non-open access articles, the corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

Article Promotion Support

Wiley Editing Services offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

Measuring the Impact of your Work

Wiley also helps you measure the impact of your research through our specialist partnerships with **Kudos** and **Altmetric**.

Archiving Services

Portico and CLOCKSS are digital archiving/preservation services we use to ensure that Wiley content will be accessible to customers in the event of a catastrophic event such as Wiley going out of business or the platform not being accessible for a significant period of time. Member libraries participating in these services will be able to access content after such an event. Wiley has licenses with both Portico and CLOCKSS, and all journal

content gets delivered to both services as it is published on Wiley Online Library. Depending on their integration mechanisms, and volume loads, there is always a delay between content being delivered and showing as “preserved” in these products.

Anexo 3 - Normas da revista Life Sciences

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

Language

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). For language assistance, please see Language Services, above. Use decimal points (not decimal commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The

electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Organization of the manuscript

Beginning with the first page, present your manuscript in the order below:

1. Title: First letter capitalized, subsequent letters in lower case. Avoid abbreviations.
- 2a. Names of all authors.
- 2b. Affiliations of all authors. If necessary, use superscripted lowercase letters after the author's name to distinguish affiliations.
3. Author to whom proofs and correspondence should be sent, including name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address.
4. A structured abstract has to be submitted for research papers (not for reviews) of no more than 250 words. The following headings must be used:

Aims:

Main methods:

Key findings:

Significance:

5. Key words for indexing purposes (a maximum of six can be entered). In addition to key words from the title, please suggest other terms that help define the study. We encourage authors to test the relevance of their key words by using them for a database search and comparing the results with the topic of their own paper.

Word limits: In **full papers**, individual sections should be no longer than Abstract 250 words, Introduction 500 words, Discussion 1500 words, Conclusion 150 words. Materials and Methods and Results sections should be concise but there is no formal word limit.

Headings: Papers must include the major headings Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgments, and References. Include subheadings as appropriate. Review articles must contain Abstract and Introduction, with subsequent headings and subheadings as appropriate.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

Present the conclusions of the study in a short Conclusions section.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that

were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

The Graphical Abstract is optional for research articles, but mandatory for reviews. GAs should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Refer to the following website for more information <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts>.

Abbreviations

Abbreviations must be explained the first time they are used, both in the Abstract and again in the main text.

Abbreviations used as names of cell lines do not need to be explained, but the species and tissue of origin should be made clear in text the first time the cell line is mentioned. Examples: "the human colonic adenocarcinoma cell line Caco-2" or "the porcine renal endothelial cell line LLC-PK1".

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Please note that funding information must appear under the Acknowledgments heading.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.

- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A [detailed guide on electronic artwork](#) is available. **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here**

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
 EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
 TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
 TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not

Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.

- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing

services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinzon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*, Zenodo, March 25, 2020. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary Material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version. *Life Sciences* requires submission of the whole uncropped images of the original western blots in triplicate that contributed to the quantitative analysis, from which figures have been derived. Please submit as Supplementary Figure(s). **Please note that this is mandatory when western blots are shown.** Please see [Example of original western blot for three repeats](#)

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *Data in Brief*.

Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple *MethodsX* articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. *MethodsX*, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their *MethodsX* article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to *MethodsX* where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in *MethodsX*. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use the [methods template](#) or [protocol template](#) to prepare your *MethodsX* article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).