

Influência da Esplenectomia Total na Microbiota Intestinal, na Translocação Bacteriana e na Evolução da Sepse em Modelo Experimental

Influence of Total Splenectomy on Intestinal Microbiota, Bacterial Translocation and Sepsis Evolution in Experimental Model

Kedma de Magalhães Lima^{a*}; Melissa Negro-Dellacqua^b; André de Lima Aires^c; Leandro Ricardo Rodrigues de Lucena^d; Célia Maria Machado Barbosa de Castro^e

^aUniversidade Federal do Vale do São Francisco, Curso de Enfermagem, Pernambuco, Brasil.

^bUniversidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciências da Saúde, Santa Catarina, Brasil.

^cUniversidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

^dUniversidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

^eUniversidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Nutrição, Pernambuco, Brasil

*E-mail: kedma.biom@gmail.com

Recebido em 27/07/2016 Aceito em : 18/11/2016

Resumo

A esplenectomia diminui a atividade de células imunes e pode estar relacionada com translocação bacteriana (TB) e sepse. Investigou-se a presença de TB e sepse em camundongos esplenectomizados, por meio de análises de peso, de sexo, de alterações da microbiota digestória e mucosa duodenal. 20 fêmeas e 20 machos de camundongos Swiss webster com 125 dias foram divididos em dois grupos: esplenectomizados e controles. Os animais foram pesados diariamente. Após sete dias da esplenectomia total convencional, os animais foram eutanasiados para estudo da TB, microbiota e morfometria intestinais. Para microbiota, foram coletadas as fezes da região média do intestino delgado, que foi seccionado para análise morfométrica. Após o preparo dos tubos com amostras fecais nas diferentes diluições, foram inoculados 0,1 mL de cada na superfície de placas contendo meios cromogênicos. Fragmentos do fígado e linfonodos mesentéricos foram macerados e homogeneizados, separadamente, em placas de Petri estéreis, posteriormente, adicionadas a caldo cérebro coração (BHI) na proporção de 1:5 e incubados em estufa a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, alças de caldo foram semeadas em placas de Petri com diferentes meios de culturas. Os camundongos esplenectomizados apresentaram redução da evolução ponderal e maior prevalência de coproculturas positivas. A análise morfométrica duodenal revelou redução na altura e da área das vilosidades dos grupos esplenectomizados comparados aos seus controles. Os machos esplenectomizados apresentaram maiores taxas de TB e sepse. A asplênia aumenta a suscetibilidade à TB e, consequentemente, as doenças de origem séptica em camundongos. Sexo e alterações da mucosa duodenal podem influenciar no aumento deste fenômeno.

Palavras-chave: Esplenectomia. Translocação Bacteriana. Baço.

Abstract

Splenectomy diminishes the immune cells activity and may be related to bacterial translocation (BT) and sepsis. The BT and sepsis presence in splenectomized mice was investigated through analyzes of weight, sex, changes in the digestive microbiota and duodenal mucosa. Swiss Webster mice (20 females/20 males) were divided into two equal groups: splenectomized and controls, aged 125 days of life. Total splenectomy was performed in splenectomized group. The animals were weighed every day. After seven days, the animals were euthanized for the study of TB, microbiota and intestinal morphology. For microbiota study, stools were collected from the middle region of the small intestine, which was sectioned for morphometric analysis. After the tubes preparation with fecal samples at different dilutions, 0.1 mL of each sample was inoculated on the surface of plates containing chromogenic media. Fragments of the liver and mesenteric lymph nodes were macerated and homogenized separately in sterile Petri dishes, subsequently added to a brain/heart broth (BHI) in concentration 1:5 and incubated in an oven at 37 °C for 24 hours. Subsequently, the broths were seeded in Petri dishes with different culture media. The splenectomized mice presented a reduction in the ponderal evolution and a higher prevalence of positive coprocultures. Duodenal morphometric analysis revealed a reduction in the height and villus area of the splenectomized groups compared to their controls. Splenectomized males had higher BT and sepsis rates. Asplenia increases susceptibility to BT, and consequently septic diseases in mice. Sex and duodenal mucosa alterations may influence the increase of this phenomenon.

Keywords: Splenectomy. Bacterial Translocation. Spleen.

1 Introdução

Esplenectomia é um procedimento cirúrgico comum realizado, principalmente, em casos de trauma, mas também usado para tratar doenças hematológicas, imunológicas, metabólicas e oncológicas¹. Estudos sobre a importância do baço como órgão linfóide secundário permitiram descobrir sua importância diante dos processos infecciosos e a elevada prevalência de infecções e sepse associadas com a asplenia a médio e longo prazo^{2,3}.

A sepse pós-esplenectomia é causada, principalmente, por bactérias encapsuladas, como: pneumococos, meningococos e hemófilos influenza⁴⁻⁶. Em pacientes imunodeprimidos as infecções são provocadas, principalmente, por bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*⁷. Estas bactérias se deslocam do lúmen intestinal para nódulos linfáticos mesentéricos e demais órgãos estéreis (fígado e baço)^{8,9}, por meio de um processo chamado translocação bacteriana.

As três causas principais de translocação bacteriana são: a) alteração da microbiota intestinal e crescimento bacteriano; b) alterações físicas da barreira intestinal e, principalmente; c) deficiência do sistema imunológico do hospedeiro¹⁰. A prevalência de translocação bacteriana é de 14% em pacientes submetidos aos procedimentos cirúrgicos não emergenciais¹¹, inclusive após a cirurgia, o risco de sepsis é maior^{8,5}.

A esplenectomia ocasiona a redução das células mononucleares e das IgM, o que pode desencadear a translocação bacteriana via trato digestório e, consequentemente, sepsis pós-esplênica¹². Leone e Pizzigallo¹³ relatam que a esplenectomia, independentemente da sua causa, induz um aumento precoce e tardio da incidência de tromboembolismo venoso e infecções. As infecções continuam a ser a complicação mais perigosa da esplenectomia. Após a esplenectomia, os níveis de anticorpos são preservados, mas há perda de células B de memória contra o pneumococo e o tétano, e a perda de monócitos da zona marginal esplênica para defesa imunológica de bactérias encapsuladas.

Estudos realizados por Spaeth *et al.*¹⁴ mostraram, porém que a esplenectomia parece não promover translocação bacteriana no intestino de camundongos. Outros estudos também descreveram que a retirada do baço aumenta resistência a translocação bacteriana induzida por inoculação intraperitoneal de endotoxinas de *Escherichia coli*. Neste caso, a sepsis pós-esplenectomia poderia ser causada por inoculação intranasal ou intravenosa e não por componentes da microbiota intestinal do hospedeiro^{15,16}. Torna-se, importante, então, averiguar quais as consequências da esplenectomia total na microbiota intestinal e se a esplenectomia total influencia, positivamente ou negativamente, a translocação bacteriana.

Assim, considerando a importância da remoção do baço para a terapia de algumas doenças, objetivou-se investigar a presença da translocação bacteriana na pós-esplenectomia experimental. Para tal finalidade, foram analisados fatores como peso, sexo, microbiota intestinal e morfometria duodenal dos grupos analisados.

2 Material e Métodos

2.1 Animais e formação dos grupos experimentais

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (Brasil) com o número 23076.023860.2008-07. Foram utilizados 40 camundongos Swiss Webster com 125 dias de idade: 20 machos e 20 fêmeas. Os animais foram obtidos e mantidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE). Os camundongos foram divididos em quatro grupos: Esplenectomizados Machos (EM=10); Esplenectomizados Fêmeas (EF = 10); Controles Machos (CM=10) e Controles Fêmeas (CF=10).

2.2 Esplenectomia

Com 125 dias de nascidos, os grupos EM e EF foram submetidos à esplenectomia total convencional. Após jejum de 12 h que antecedeu o experimento, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico, realizado sob condições de limpeza. Os camundongos foram anestesiados com solução de cloridrato de xilazina 2% (10 mg/Kg) e cloridrato de cetamina 10% (115 mg/Kg). Posteriormente, foram pesados e imobilizados em decúbito dorsal horizontal com ligas elásticas, sendo realizada a tricotomia na região ventral do abdômen e a antisepsia feita com solução tinteira de polivinilpirrolidona-iodo (Povidine tinteira[®]).

Durante o procedimento cirúrgico, inicialmente, foi realizada uma incisão mediana de aproximadamente 3cm de extensão, foi realizado o inventário da cavidade abdominal para verificar a presença de baços acessórios e foi realizada a exposição do hipocôndrio esquerdo com rebatimento do estômago e baço, luxação parcial desde a cavidade abdominal e proteção com gazes umedecidas com solução de cloreto de sódio a 0,9%. Realizou-se, então, a esplenectomia total, após isolamento, pinçamento e ligadura de parte do pedículo esplênico com fio de algodão 4.0¹⁷.

2.3 Avaliação da evolução ponderal

O peso corporal dos animais foi registrado a partir do 125º dia (antes da esplenectomia) até o 132º dia (antes da eutanásia). O peso foi medido em balança eletrônica (Marte, Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil, Mod. 1001, com capacidade para 1610 g e sensibilidade até 0,1 g). O registro dos pesos de cada animal foi realizado em protocolo individual.

2.4 Coleta de amostras biológicas e avaliação da translocação bacteriana

Sete dias pós-esplenectomia, todos os camundongos, inclusive os não esplenectomizados, foram submetidos à eutanásia por *overdose* de solução de cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de cetamina 10%. A coleta do sangue periférico (0,5 mL) foi realizada por punção caudal após rigorosa assepsia da cauda e de todo o corpo do animal com iodopovidona 1% para evitar contaminação das amostras e/ou tubo com a microbiota residente e transitória externa do camundongo.

Posteriormente, foi realizada tricotomia da região, seguindo-se da antisepsia e incisão mediana xifo-púbica. Coletaram-se na seguinte ordem, fragmentos do fígado, sangue do sistema portal, linfonodos mesentéricos na região média do intestino delgado, fragmentos da porção distal do intestino delgado e material fecal desta região. Para a aspiração do sangue da veia porta (0,5 mL) utilizou-se agulha 13 x 4,5 acoplada à seringa descartável de 1 mL.

Todo material coletado foi submetido à pesquisa de bactérias. Fragmentos do fígado e linfonodos mesentéricos foram macerados e homogeneizados, separadamente, em placas

de Petri estéreis. As amostras foram adicionadas a caldo cérebro coração – BHI, (*BioMérieux*, Marcy l'Etoile, França) na proporção de 1:5 e incubados em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, alçadas de caldo foram semeadas em placas de Petri com ágar Columbia + 5% sangue carneiro, ágar Mac Conkey, Chrom ID CPS e ágar Chocolate PolyviteX, (todos produzidos pela *BioMérieux*, Marcy l'Etoile, França). As placas foram incubadas por 24-72 h a 37°C. As espécies bacterianas isoladas foram identificadas por testes bioquímicos convencionais e confirmadas em equipamento automatizado (VITEK 2 System® *BioMérieux*, Marcy l'Etoile, França).

2.5 Avaliação da microbiota intestinal

Amostra de material entérico foi coletada diretamente da região medial do intestino delgado de cada animal. Para a determinação do número de unidades de colônias por grama de fezes (UFC/g) utilizou-se método adotado por Naaber *et al.*¹⁸ e Bisso¹⁹. Nos tubos contendo amostras fecais foi acrescentado solução salina estéril/NaCl 0,9% (1:10). Após homogeneização mecânica, obteve-se diluição inicial 10:1, seguida de diluições seriadas, até diluição de 10:6. A partir das cinco diluições preparadas, foram inoculados 0,1 mL de cada amostra na superfície de placas contendo meios cromogênicos (Agar CPS ID®, *BioMérieux*, Marcy l'Etoile, France). Espalhou-se o inóculo com auxílio da alça de repicagem comum. As placas foram incubadas invertidas a 37 °C durante 24-48 horas. As bactérias foram identificadas de acordo com a morfologia colonial, microscópica e características bioquímicas. O cálculo do UFC foi dado pelo número de colônias detectado no meio de cultura x fator decimal de diluição das fezes x 10 (fator para expressar o resultado por grama de fezes, visto que o volume semeado em cada meio foi 0,1 mL). As bactérias foram identificadas de acordo com Koneman²⁰.

2.6 Análise morfométrica da mucosa duodenal

Foi realizada a análise morfológica da mucosa intestinal a partir de lâminas de cortes sagitais coradas com hematoxilina-eosina (HE). As variáveis consideradas no estudo histológico foram: medidas da altura e área das vilosidades, bem como superfície total da mucosa (perímetro). As análises morfométricas foram realizadas em microscópio óptico acoplado a vídeo-câmera. O observador desconhecia qualquer dado sobre os grupos dos animais. As imagens capturadas foram analisadas pelo software *Image*²¹. As medições foram feitas em pixels (unidade de resolução de imagem) da altura e área das vilosidades, bem como superfície total da área da mucosa (perímetro).

2.7 Apresentação e análise dos dados

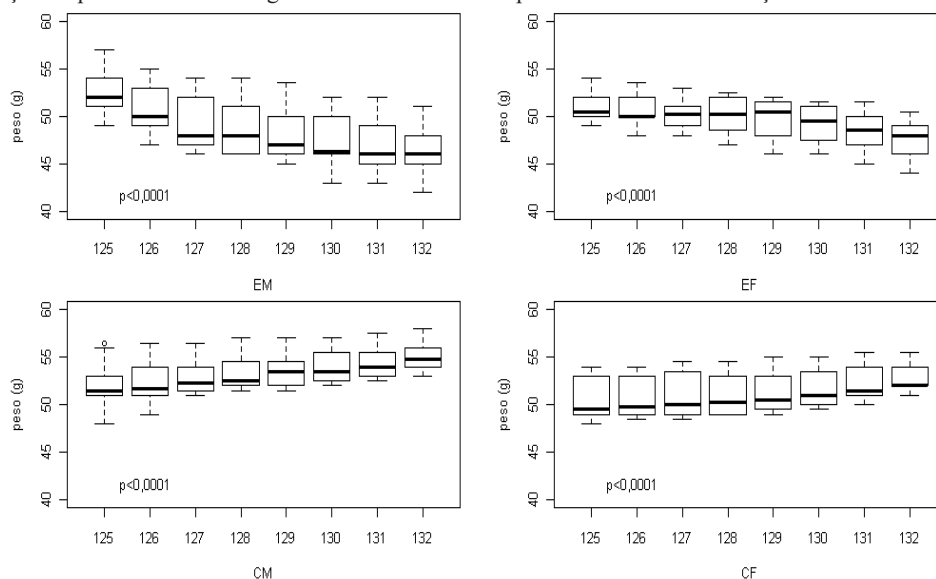
Os resultados das variáveis quantitativas foram expressos por média e desvio padrão e os resultados das variáveis qualitativas, por frequências absolutas e relativas. Foi utilizado teste de Friedman para verificar diferenças do peso dos camundongos, em relação ao tempo de aferição. Utilizou-se teste de Mann-Whitney para verificar diferenças na média do peso dos camundongos, da área total, altura da vilosidade e área da vilosidade. Realizou-se o teste exato de Fisher para verificar possível diferença entre frequências. Foi adotado nível de significância de 5%.

3 Resultados e Discussão

3.1 Análise do peso ponderal

De acordo com os dados apresentados na Figura 1, os camundongos EM e EF demonstraram redução da evolução do peso do 125º ao 132º dia de nascidos ($p < 0,0001$). Houve diferenças estatísticas em comparação aos pesos dos controles nos grupos EM e EF.

Figura 1: Evolução do peso dos camundongos entre 125 e 132 dias após o nascimento em relação aos dias de aferição e aos grupos



EM – Esplenectomizados machos, EF – Esplenectomizados fêmeas, CM – Controles machos, CF – Controles fêmeas.

Fonte: Dados da pesquisa.

3.2 Estudo da microbiota entérica

Conforme representado no Quadro 1, não houve diferença significativa entre os grupos analisados na biodiversidade bacteriana e na quantidade de UFC/g fezes. Os camundongos esplenectomizados apresentaram maior variação nas coproculturas em relação à densidade bacteriana por espécies e ao número de UFC/g.

Quadro 1: Prevalência (%) e quantidade (log₁₀ UFC/g de fezes) das espécies bacterianas isoladas de amostras entéricas de camundongos esplenectomizados e controle

Isolados bacterianos	Grupos experimentais			
	Esplenectomizados		Controle	
	%	UFC (log ₁₀)/g	%	UFC (log ₁₀)/g
<i>Proteus mirabilis</i>	40	5	25	4
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	25	5	10	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25	6	20	4
<i>Enterococcus faecalis</i>	100	8	90	7
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	6	30	4
<i>Escherichia coli</i>	40	7	20	5

Fonte: Dados da pesquisa.

3.3 Análise histomorfométrica do duodeno

Os grupos controle não apresentaram alterações anatômicas e histológicas. O sexo também não influenciou nos achados histopatológicos do duodeno, na altura das vilosidades, na área das vilosidades e na área total, (p=0,5452, p=0,3634 e p=0,9118, respectivamente). Para estes parâmetros, também não foram observadas diferenças significativas entre machos e fêmeas esplenectomizados (p=0,1655, p=0,6120 e p=0,1230, respectivamente) (Quadro 2).

Quadro 2: Comparação das médias das alturas das vilosidades, das áreas das vilosidades e das áreas totais (µM) dos grupos esplenectomizados e controle, machos e fêmeas.

Grupos (Média ± DP)			
Medidas	EM	EF	I.C. 95% (p-valor)
ALV	109,2 ± 2,0	112,4 ± 5,3	[-5,82; 0,58] (0,1655)
AV	2,9 ± 0,2	3,0 ± 0,1	[-0,2; 0,03] (0,6120)
AT	459,2 ± 65,6	509,3 ± 79,4	[-97,7; 2,52] (0,1230)
Grupos (Média ± DP)			
Medidas	CF	CM	I.C. 95% (p-valor)
ALV	123,3 ± 12,2	118,5 ± 6,7	[-1,63; 11,23] (0,5452)
AV	3,4 ± 0,1	3,7 ± 0,5	[-0,53; 0,06] (0,3634)
AT	532,0 ± 102,9	519,5 ± 97,9	[-53,1; 78,1] (0,9118)

ALV- altura da vilosidade; AV- área da vilosidade; AT- área total; EM- machos esplenectomizados; CM- machos controle; EF- fêmeas esplenectomizadas; CF- fêmeas controle; *- estatisticamente significativo; I.C. intervalo de confiança.

Fonte: Dados da pesquisa.

A análise morfométrica revelou redução significativa na altura das vilosidades dos grupos esplenectomizados, quando

comparado aos respectivos controles (p<0,0001 e p=0,0185, respectivamente). Da mesma forma, foi observado redução da área das vilosidades dos animais esplenectomizados em comparação com os controles (p<0,0001). Entretanto, não foi observada diferença significativa na área total dos animais esplenectomizados, quando comparado aos respectivos controles (p=0,1051 e p=0,6305) (Quadro 3).

Quadro 3: Comparação das médias das alturas das vilosidades, das áreas das vilosidades e das áreas totais (µM) nos grupos esplenectomizados e controles, machos e fêmeas

Grupos (Média ± DP)			
Medidas	EM	CM	I.C. 95% (p-valor)
ALV	109,2 ± 2,0	118,5 ± 6,7	[-12,53; -6,06] (<0,0001*)
AV	2,9 ± 0,2	3,7 ± 0,5	[-1,05; -0,55] (<0,0001*)
AT	459,2 ± 65,6	519,5 ± 97,9	[-114,74; 5,85] (0,1051)
Grupos (Média ± DP)			
Medidas	EF	CF	I.C. 95% (p-valor)
ALV	112,4 ± 5,3	123,3 ± 12,2	[-17,05; -4,76] (0,0185*)
AV	3,0 ± 0,1	3,4 ± 0,1	[-0,46; -0,33] (<0,0001*)
AT	509,3 ± 79,4	532,0 ± 102,9	[-82,74; 37,34] (0,6305)

ALV- altura da vilosidade; AV- área da vilosidade; AT- área total; EM- machos esplenectomizados; CM- machos controle; EF- fêmeas esplenectomizadas; CF- fêmeas controle; *-estatisticamente significativo; I.C. intervalo de confiança.

Fonte: Dados da pesquisa.

3.4 Estudo da translocação bacteriana

Nos animais controles e esplenectomizados houve translocação bacteriana para linfonodos mesentéricos. A prevalência da translocação foi maior nos camundongos esplenectomizados (Quadro 4). Apenas os animais esplenectomizados apresentaram translocação para o sangue do sistema porta, fígado e sangue periférico.

Quadro 4: Prevalência e locais da translocação bacteriana dos grupos esplenectomizados e controle, machos e fêmeas

Grupos	Linfonodos Mesentéricos	Sangue do Sistema Porta	Fígado	Sangue Periférico
EM (I)	10/10 (100,0%)	10/10 (100,0%)	10/10 (100,0%)	8/10 (80,0%)
EF (II)	10/10 (100,0%)	7/10 (70,0%)	5/10 (50,0%)	3/10 (30,0%)
CM (III)	1/10 (10,0%)	0/10 (0,0%)	0/10 (0,0%)	0/10 (0,0%)
CF (IV)	2/10 (20,0%)	0/10 (0,0%)	0/10 (0,0%)	0/10 (0,0%)
Valor de p				
EM com EF	1,0000	0,2104	0,0389*	0,0722
EM com CM	0,0003*	<0,0001*	<0,0001*	0,0014*
EF com CF	0,0014*	0,0049*	0,0389*	0,2104
CM com CF	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

EM- machos esplenectomizados; CM- machos controle; EF- fêmeas esplenectomizadas; CF- fêmeas controle; *- estatisticamente significativo (p<0,005).

Fonte: Dados da pesquisa.

A translocação bacteriana foi mais frequente em machos esplenectomizados (Quadro 5). Não houve crescimento nos meios para micro-organismos anaeróbios e fungos. As espécies bacterianas detectadas nas culturas dos tecidos foram as mesmas espécies observadas nos meios, que continham diluições da microbiota intestinal. Para os grupos macho controle e fêmea controle houve distribuição da espécie *Escherichia coli* nos linfonodos mesentéricos nos valores de 10% e 20% respectivamente (dados não mostrados na

tabela). Serão realizadas futuramente análises de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) para definir a relação genética entre as cepas detectadas no intestino e cepas extra-intestinais. Em alguns casos, em camundongos esplenectomizados, as espécies bacterianas observadas com maior frequência nas placas com semeio da amostra fecal foram responsáveis pela translocação bacteriana para linfonodos mesentéricos, para o sangue do sistema portal, para o fígado e para o sangue periférico.

Quadro 5: Distribuição da frequência de espécies e de associações de espécies responsáveis por translocação bacteriana nos grupos machos e fêmeas esplenectomizados.

Isolados bacterianos	Grupos experimentais e locais de translocação bacteriana							
	EM				EF			
	LM	SP	FI	Sp	LM	SP	FI	Sp
<i>Enterococcus faecalis</i>	10%	30%	30%	10%	10%	10%	10%	10%
<i>Enterococcus faecalis</i> / <i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	50%	20%	10%	0%	10%	0%	0%	0%
<i>Escherichia coli</i>	0%	10%	10%	10%	30%	20%	20%	0%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0%	0%	0%	0%	10%	0%	0%	0%
<i>Proteus mirabilis</i>	10%	10%	10%	10%	20%	20%	0%	0%
<i>Escherichia coli</i> / <i>Enterococcus faecalis</i>	10%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0%	10%	10%	10%	0%	0%	0%	0%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>Enterococcus faecalis</i>	10%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<i>Staphylococcus aureus</i>	0%	0%	10%	10%	10%	20%	20%	10%
<i>Staphylococcus aureus</i> / <i>Enterococcus faecalis</i>	10%	10%	0%	0%	10%	0%	0%	0%
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	0%	10%	20%	30%	0%	0%	0%	0%

EM- machos esplenectomizados; CM- machos controle; EF- fêmeas esplenectomizadas; CF- fêmeas controle; LM- linfonodos mesentéricos; SP- sangue do sistema porta; FI- fragmentos do fígado; Sp- sangue periférico.

Fonte: Dados da pesquisa.

3.5 Asplênia

Mesmo sabendo que ausência do baço é compatível com a vida, este órgão desempenha funções imunológicas relevantes, tais como: depuração de bactérias da corrente sanguínea e produção precoce de anticorpos contra várias partículas antigênicas. A asplênia aumenta a suscetibilidade às doenças de origem séptica²². O efeito imunoprotetor do baço tem sido testado em diversas pesquisas experimentais com as bactérias, entretanto, há poucos relatos na literatura atual sobre infecções bacterianas devido à translocação via trato digestório em animais asplênicos²³.

3.6 Perda ponderal

De acordo com os dados obtidos neste estudo, camundongos esplenectomizados apresentaram redução da evolução ponderal em relação aos controles durante sete dias, após cirurgia. Esta redução pode estar relacionada à reação fisiológica do animal no pós-operatório, caracterizada pela dificuldade em se alimentar ou à alteração do apetite em razão da cirurgia. Este fator prejudicou o estado nutricional do animal, consequentemente, o estado imunológico, favorecendo a presença de infecções.

Em estudo com ratos submetidos à esplenectomia total,

foi observado aumento de peso corporal e, consequentemente, aumento significativo do colesterol total, das frações LDL e VLDL e dos triglicérides²⁴ após 90 dias. Outro estudo demonstrou redução da evolução ponderal em camundongos esplenectomizados infectados com *S. mansoni* atribuindo tal redução a fatores relacionados ao imunocomprometimento devido à infecção, ausência do baço e à infecção pelo *S. mansoni*²³. É importante considerar que no presente estudo não se utilizou um grupo apenas com o trauma cirúrgico (laparotomia branca) sendo assim, um fator limitante da pesquisa. Da mesma forma, não foi utilizada gaiola metabólica para avaliar o peso da ração dos animais esplenectomizados em comparação com o peso residual da ração dos animais do grupo controle.

3.7 Microbiota intestinal e translocação bacteriana

Uma das causas envolvidas na translocação bacteriana é a alteração da microbiota intestinal, resultando em excessivo crescimento bacteriano²⁵. De acordo com os dados obtidos neste estudo, os camundongos esplenectomizados apresentaram maior variância nas coproculturas tanto com relação à densidade bacteriana por espécies, quanto ao número de UFC. Segundo estudos de Balzan *et al.*²⁶,

as bactérias mais comumente observadas no estômago e na região distal do intestino delgado são gram-positivas e aeróbias. Já a partir do íleo distal, as bactérias gram-negativas são as mais frequentes. No presente estudo houve predomínio de bactérias gram-positivas na porção medial do intestino delgado, e estas bactérias aumentaram em ambos os grupos esplenectomizados. Tanto a microbiota da região distal e proximal do intestino delgado são importantes e trazem benefícios para o hospedeiro, contribuindo na defesa contra agentes estranhos, pois apresentam efeitos de trofismo similares ao da mucosa intestinal, que desempenha também papel relevante no desenvolvimento e competência do sistema imunológico^{27,28}. Em termos gerais, em condições fisiológicas os micro-organismos residentes do sistema digestivo são inócuos ou benéficos ao hospedeiro nas suas localizações normais. As bactérias residentes são, geralmente, limitadas ao lúmen do trato intestinal, mas no caso de atingirem outros sistemas (como exemplo, sangue ou outros tecidos), podem causar doenças²⁹. Assim, a integridade das vilosidades e microvilosidades do intestino delgado permite prevenir a passagem de micro-organismos e moléculas tóxicas³⁰ que podem causar doenças, bem como de fatores pró-inflamatórios do lúmen para a circulação³¹. Danos às junções intercelulares epiteliais permitem que micro-organismos utilizem essas áreas afetadas como via de acesso à circulação sanguínea por meio da mucosa intestinal³².

Condições clínicas críticas como queimaduras, infecções bacterianas, desnutrição, redução do fluxo sanguíneo esplâncnico e obstrução intestinal associam-se também ao aumento da permeabilidade da mucosa intestinal¹¹. No presente estudo, a análise morfológica duodenal revelou redução na altura e área das vilosidades dos grupos esplenectomizados machos e fêmeas, o que pode afetar a integridade das vilosidades e facilitar a translocação bacteriana, que se relaciona com diminuição da função do sistema imunitário intestinal, tanto celular quanto humoral. Estudos com pacientes sépticos demonstraram diminuição de IgA e IgM na lâmina própria e redução das imunoglobulinas na superfície mucosa do intestino delgado. O estresse induzido pela septicemia pode ter reduzido as imunoglobulinas, afetando a competência imunológica e facilitando a aderência de bactérias à superfície de enterócitos, etapa inicial do processo de translocação bacteriana^{11,33}.

Na análise presente, foi observada translocação bacteriana para linfonodos mesentéricos, tanto em animais esplenectomizados como nos controles, apesar de ter sido mais evidente em animais esplenectomizados. A translocação bacteriana ocorre em indivíduos saudáveis como evento fisiológico e necessário para geração de células imunocompetentes pelo tecido linfóide associado à mucosa digestória (GALT)^{10,11,34}.

Além disso, pacientes imunodeprimidos, desnutridos ou em uso prolongado de nutrição parenteral e com cirrose hepática/insuficiência hepática aguda apresentam maior risco de translocação bacteriana³⁵⁻³⁷. Estudos mostram, também, a

relação da infecção por *Streptococcus pneumoniae* mesmo após vacinação, em estudo de caso, com paciente pós-esplenectomizado³⁸; pacientes com trombocitopenia imune, que foram submetidos à esplenectomia com risco aumentado de sepsis³⁹; associação da esplenectomia à pancreatite aguda relatando a necessidade de mais estudos para que se pesquise os mecanismos patogênicos relacionados à associação⁴⁰ e maior risco de evolução para sepsis pós-cirúrgica em crianças menores que 15 anos esplenectomizadas, além do fato de pacientes asplênicos com infecções desencadeadas por organismos encapsulados apresentarem um risco aumentado de 50-70% de desenvolver septicemia nos primeiros três anos após o procedimento cirúrgico de asplênia⁴¹. Da mesma forma, no presente estudo foi observado que a esplenectomia experimental pode favorecer translocação e, conseqüentemente, sepsis.

A translocação de bactérias gram-positivas e gram-negativas pós-esplenectomia é bem relatada na literatura. Vários autores descrevem⁴²⁻⁴⁴ espécies gram-negativas intestinais associadas a esse evento, podendo causar infecção extra-intestinal: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Estas bactérias intestinais, potencialmente patogênicas, podem iniciar ou perpetuar estado de septicemia em pacientes, que não apresentam focos de infecção, propiciando desenvolvimento de falência múltipla orgânica^{5, 42}.

No presente estudo foi observada a translocação bacteriana nos grupos esplenectomizados, após sete dias da cirurgia. Este evento pode ter sido favorecido pela diminuição da evolução do peso corporal, alteração da microbiota intestinal e alterações da mucosa duodenal; e todos estes fatores podem ter sido influenciados pelo estresse do pós-operatório. O tempo de análise superior a sete dias não foi utilizado para diminuir a interferência cirúrgica devido à debilidade dos animais asplênicos. Em estudo piloto, realizado anteriormente, pelos mesmos pesquisadores, foi demonstrada a morte súbita dos animais após este período. Desta forma, outros estudos deverão ser realizados, a fim de esclarecer a interferência da esplenectomia na translocação bacteriana, diminuindo assim, a influência do trauma pós-cirúrgico. Os animais machos esplenectomizados foram mais acometidos pela sepsis, o que poder ser explicado pelo grau de eficiência do sistema imunológico destes animais. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliação deste mecanismo em relação ao sexo.

4 Conclusão

Na primeira semana pós-esplenectomia foi observada translocação de bactérias intestinais nos animais esplenectomizados para linfonodos mesentéricos, fígado, sangue portal e sangue periférico. Assim, sugere-se que infecções pós-esplenectomias possam ser causadas pelos próprios componentes da microbiota intestinal, em razão da translocação bacteriana.

Referências

1. Phillips GS, Radosevich MD, Lipsett PA. Splenic abscess. *Arch Surg* 1997;132(12):1331-5.
2. Ferraz AP. Complicações cirúrgicas das esplenectomias. In: Petroianu A. O baço. São Paulo: CLR Balieiro; 2003.
3. Petroianu A. Cirurgia do baço. In: Petroianu A. Clínica cirúrgica. Rio de Janeiro: Revinter; 2001. p.429-42.
4. Cole JT, Flaum MA. Postsplenectomy infections. *South Med J* 1992; 85(12):1220-6.
5. Shiomi H, Shimizu T, Endo Y, Murata S, Kurumi Y, Uji Y, et al. Relations among circulating monocytes, dendritic cells, and bacterial translocation in patients with intestinal obstruction. *World J Surg* 2007;31(9):1806-12.
6. Tennenberg AM, Sepkowitz KA. Postsplenectomy infections in oncologic patients. *Infect Med* 1996;13 (1):15-21.
7. Petroianu A. Pós-operatório em cirurgias do baço. In: Petroianu A. O baço. São Paulo: CLR Balieiro; 2003. p.281-98.
8. Katouli M, Ramos NL, Nettelbladt CG, Ljungdahl M, Robinson W, Ison HM, et al. Host species-specific translocation of *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28(9):1095-103.
9. Reddy BS, Gatt M, Sowdi F, Macfie J. Surgical manipulation of the large intestine increases bacterial translocation in patients undergoing elective colorectal surgery. *Colorec Dis* 2006;8:596-600.
10. Zaroni FL, Benabou S, Greco KV, Moreno ACR, Cruz JWMC, Filgueira FP, et al. Mesenteric microcirculatory dysfunctions and translocation of indigenous bacteria in a rat model of strangulated small bowel obstruction. *Clinics* 2009;64(9):911-9.
11. MacFie J. Enteral versus parenteral nutrition: the significance of bacterial translocation and gut-barrier function. *Nutrition* 2000;16:606-11.
12. Times W, Leemans R. Splenic autotransplantation and the immune system. *Ann Surg* 1991; 215:256-60.
13. Leone G, Pizzigallo E. Bacterial Infections Following Splenectomy for Malignant and Nonmalignant Hematologic Diseases. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2015;7(1):1-21.
14. Spaeth G, Specian RD, Berg RD, Deitch EA. Splenectomy influences endotoxin-induced bacterial translocation. *J Trauma* 1990;30:1267-72.
15. Leemans R, Harms G, Rijkers GT, Timens W. Spleen autotransplantation provides restoration of functional splenic lymphoid compartments and improves the humoral immune response to pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clin Exp Immunol* 1999;117:596-604.
16. Schwartz PE, Sterioff S, Much P, Melton III LJ, Offord KP. Postsplenectomy sepsis and mortality in adults. *JAMA* 1982;248:2279-83.
17. Siqueira LT, Ferraz AAB, Campos JM, De Lima Filho JL, Albuquerque MCPA, De Lima Aires A, et al. Analysis of plasma citrulline and intestinal morphometry in mice with hepatosplenic schistosomiasis. *Surg Infect* 2010;11:419-26.
18. Naaber P, Mikelsaar RH, Salminent S, Mikelsaar M. Bacterial translocation, intestinal microflora and morphological changes of intestinal mucosa in experimental models of *Clostridium difficile* infection. *J Med Microbiol* 1998;47:591-8.
19. Bisso LML. Modelo murino de inflamação intestinal crônica: Avaliação quantitativa da dinâmica da microbiota intestinal. Rio de Janeiro: UFF; 2008.
20. Koneman EW. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. São Paulo: Medsi; 2008.
21. Rasband WS. Image J. Bethesda, Maryland, USA: National Institutes of Health. 2004. [accessed 15 Dez 2016]. Available from <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
22. Balagué C, Targarona EM, Vela S, Chierichetti C, Kobus C, Alonso V, et al. Esplenectomía laparoscópica: resultados a largo plazo de una serie prospectiva de 257 pacientes en función del diagnóstico hematológico. *Cir Esp* 2004;75:29-34.
23. De Magalhães Lima K, Negro-Dellacqua M, Emmanuell Fernandes M, dos Santos A, Machado Barbosa de Castro CM. Post-splenectomy infections in chronic schistosomiasis as a consequence of bacterial translocation. *Rev Soc Bras Med Trop* 2015;48(3):314-20.
24. Paulo ICAL, Paulo DNS, Silva AL, Foletto RM, Colnago GL, Vargas PME. Plasmatic lipids levels in rats after total splenectomy, simultaneous ligation of the splenic vessels and subtotal splenectomy with inferior pole preservation. *Rev Col Bras Cir* 2005;32(5):229-36.
25. Wiest R, Rath HC. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:397-425.
26. Balzan S, Almeida Quadros C, Cleva R, Zilberstein B, Ceconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22(4):464-71.
27. Guarner F. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutr Hosp* 2007;22:14-19.
28. Jia W, Li H, Zhao L, Nicholson JK. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(2):123-9.
29. Barbosa FHF, Martins FS, Barbosa LPJL, Nicoli JR. Microbiota indígena do trato digestório. *Rev Biol Ciênc Terra* 2010;10:78-9.
30. Pirlich M, Norman K, Lochs H, Bauditz J. Role of intestinal function in cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9(5):603-6.
31. Farhadi A, Banan A, Fields J, Keshavarzian A. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18(5):479-97.
32. Acheson DW, Luccioli S. Microbial-gut interactions in health and disease. Mucosal immune responses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18(2):387-404.
33. Woodcock NP, Robertson J, Morgan DR, Gregg KL, Mitchell CJ, MacFie J. Bacterial translocation and immunohistochemical measurement of gut immune function. *J Clin Pathol* 2001;54(8):619-23.
34. Lichtman SM. Bacterial translocation in Humans, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33(1):1-10.
35. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 1999;473:11-30.
36. De Souza DA, Greene LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine. *Crit Care Med* 2005;33(5):1125-35.
37. Gatt M, Reddy BS, MacFie J. Bacterial translocation in the critically ill-evidence and methods of prevention. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25(7):741-57.

38. Hirose K, Okabe H, Toshizumi T, Uchiyama H, Ikegami T, Harimoto N, *et al.* A case report of bacteremia manifesting as an overwhelming postsplenectomy infection due to *Streptococcus pneumoniae* post vaccination. *Surgical Case Reports* 2016;2:(48):1-3.
39. Boyle S, White RH, Brunson A, Wun T. Splenectomy and the incidence of venous thromboembolism and sepsis in patients with immune thrombocytopenia. *Blood* 2013;121(23):4782-90.
40. Lai S-W, Lin C-L, Liao K-F. Splenectomy correlates with increased risk of acute pancreatitis: a case-control study in Taiwan. *J Epidemiol* 2016;26(9):488-92.
41. Price V, Salvadori MI. Preventing and treating infections in children with asplenia or hyposplenia. *Paediatr Child Health* 2014;18(5):271-4.
42. Seehofer D, Rayes N, Schiller R, Stockmann M, Muller AR, Schirmeier A, *et al.* Probiotics partly reverse increased bacterial translocation after simultaneous liver resection and colonic anastomosis in rats. *J Surg Res* 2004;117(2):262-71.
43. Silva RM, Buzzutti FI, Siliano PR, Menchaca-Diaz JL, Siqueira AF, Koh HJ. Bacterial translocation is dependent on bacterial plasmid-borne genetic determinants. *Transplant Proc* 2002;34(3):999-1000.
44. Stallion A, Kou TD, Latifi SQ, Miller KA, Dahms BB, Dudgeon DL, *et al.* Ischemia/reperfusion: a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. *J Pediatr Surg* 2005;40(3):470-7.