



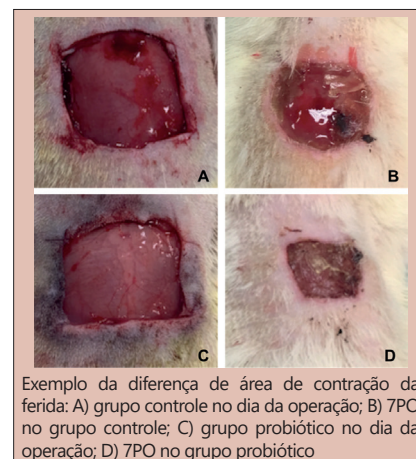
SUPLEMENTAÇÃO PERIOPERATÓRIA COM PROBIÓTICOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS DIABÉTICOS

Effects of probiotics supplementation on skin wound healing in diabetic rats

Letícia Fuganti CAMPOS¹, Eliane TAGLIARI¹, Thais Andrade Costa CASAGRANDE², Lúcia de NORONHA³, Antônio Carlos L. CAMPOS¹, Jorge Eduardo F MATIAS¹

RESUMO - Racional: Feridas crônicas em pacientes diabéticos muitas vezes se tornam incuráveis devido à produção prolongada e excessiva de citocinas inflamatórias. A utilização de probióticos modifica a microbiota intestinal e modula reações inflamatórias. **Objetivo:** Avaliar a influência da suplementação perioperatória com probióticos no processo de cicatrização cutânea em ratos diabéticos. **Método:** Quarenta e seis ratos foram divididos em quatro grupos (C3, P3, C10, P10) conforme tratamento (P=probiótico ou C=controle, via oral) e dia de eutanásia: 3º ou 10º dia de pós-operatório. Todos os ratos foram induzidos ao diabetes melito 72 h antes de iniciar o experimento com aloxana. A suplementação foi iniciada cinco dias antes da operação e mantida até a eutanásia. Foi realizada incisão com bisturi guiada por molde de 2x2 cm e a ferida foi deixada para cicatrizar por segunda intenção. As feridas foram medidas digitalmente. A densitometria de colágeno foi determinada com coloração picrosírius red. A histologia foi avaliada por coloração com H&E. **Resultados:** A contração da ferida foi maior no grupo P10, o que resultou em menor área cruenta (p=0,011). Houve aumento do colágeno tipo I do 3º para o 10º dia de pós-operatório no grupo P10 (p=0,016), o que não ocorreu no grupo controle (p=0,487). A análise histológica mostrou melhor grau de cicatrização no grupo P10 (p=0,005), com menos polimorfonucleares (p<0,001) e mais neovasos (p=0,001). **Conclusões:** A suplementação perioperatória de probióticos promove aceleração da cicatrização cutânea em ratos diabéticos, possivelmente por atenuar a resposta inflamatória e aumentar a neovascularização e a deposição de colágeno tipo I.

DESCRITORES - Probióticos. Diabetes melito. Cicatrização. Aloxano.



Exemplo da diferença de área de contração da ferida: A) grupo controle no dia da operação; B) 7PO no grupo controle; C) grupo probiótico no dia da operação; D) 7PO no grupo probiótico

Mensagem central

A suplementação perioperatória de probióticos em ratos diabéticos promove: aceleração da cicatrização cutânea, atenuação da resposta inflamatória, aumento da neovascularização da ferida, aumento da deposição de colágeno tipo I na ferida, prevenção da perda de peso, melhor controle glicêmico.

Perspectiva

Considerando os benefícios demonstrados neste estudo experimental, a suplementação perioperatória de probióticos poderia ser alvo de investigações clínicas futuras em pacientes diabéticos candidatos a cirurgias eletivas. Estes estudos clínicos deverão investigar a influência dos probióticos na cicatrização em pacientes diabéticos, definir as cepas indicadas, dose ideal e o tempo de suplementação perioperatória.

ABSTRACT - Background: Chronic wounds in patients with Diabetes Mellitus often become incurable due to prolonged and excessive production of inflammatory cytokines. The use of probiotics modifies the intestinal microbiota and modulates inflammatory reactions. **Aim:** To evaluate the influence of perioperative supplementation with probiotics in the cutaneous healing process in diabetic rats. **Methods:** Forty-six rats were divided into four groups (C3, P3, C10, P10) according to the treatment (P=probiotic or C=control, both orally administered) and day of euthanasia, 3rd or 10th postoperative days. All rats were induced to Diabetes Mellitus 72 h before starting the experiment with alloxan. Supplementation was initiated five days before the incision and maintained until euthanasia. Scalpel incision was guided by a 2x2 cm mold and the wounds were left to heal per second-intention. The wounds were digitally measured. Collagen densitometry was done with Picrosirius Red staining. Histological parameters were analyzed by staining by H&E. **Results:** The contraction of the wound was faster in the P10 group which resulted in a smaller scar area (p=0.011). There was an increase in type I collagen deposition from the 3rd to the 10th postoperative day in the probiotic groups (p=0.016), which did not occur in the control group (p=0.487). The histological analysis showed a better degree of healing in the P10 group (p=0.005), with fewer polymorphonuclear (p<0.001) and more neovessels (p=0.001). **Conclusions:** Perioperative supplementation of probiotics stimulates skin wound healing in diabetic rats, possibly due to attenuation of the inflammatory response and increased neovascularization and type I collagen deposition.

HEADINGS - Probiotics. Diabetes mellitus. Wound healing. Alloxan.



www.facebook.com/abcdrevista



www.instagram.com/abcdrevista



www.twitter.com/abcdrevista

Trabalho realizado no ¹Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba PR, Brasil; ²Mestrado Profissional em Biotecnologia Industrial, Universidade Positivo, Curitiba, PR, Brasil; ³Laboratório de Patologia Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Como citar este artigo: Campos LF, Tagliari E, Casagrande TAC, Noronha L, Campos ACL, Matias JEF. Suplementação perioperatória com probióticos na cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos. ABCD Arq Bras Cir Dig. 2020;33(1):e1498. DOI: /10.1590/0102-672020190001e1498

Correspondência:
Letícia Fuganti Campos
E-mail: le_campos@hotmail.com

Fonte de financiamento: O presente trabalho foi realizado com apoio parcial da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001e também parcial pela FQM-FARMA

Conflito de interesse: não há

Recebido para publicação: 15/10/2019

Aceito para publicação: 03/12/2019

INTRODUÇÃO

Aproximadamente 425 milhões de adultos são portadores de diabetes melito (DM) no mundo, doença responsável por quatro milhões de mortes em 2017 e um gasto de mais de 727 bilhões de dólares para o sistema de saúde nos Estados Unidos (12% do gasto total com adultos)¹⁰.

Pacientes diabéticos apresentam prejuízo na cicatrização pelo desequilíbrio da resposta inflamatória, com acúmulo prolongado de células inflamatórias e produção excessiva de citocinas inflamatórias, alteração na síntese de colágeno e redução da força tênsil^{6,7,14,19,22}. Estes fatores associados resultam em redução da resistência da ferida e deiscência que, somado ao grande risco de infecções neste grupo, resultam em aumento do tempo hospitalização e da taxa de mortalidade^{3,6,7,14,22}.

A combinação do prejuízo no processo cicatricial com a doença vascular periférica e a dificuldade de percepção de lesões nas extremidades pela neuropatia são fatores de risco para o desenvolvimento da doença do pé diabético. Úlcera em pé diabético é a principal causa de hospitalização de pacientes com DM em países desenvolvidos, e está entre as principais causas de morbimortalidade, com tempo médio de seis meses para cicatrização e necessidade de amputação em até um terço dos casos. Esta complicação ainda carece de estudos que envolvam a complexidade da sua gestão^{3,6,7,14}.

A lesão da barreira epitelial resulta em ruptura e estresse celular, com necessidade de reparo por meio de cicatrização. A cicatrização cutânea se caracteriza por processo dinâmico que envolve uma rede complexa de interações extracelulares, mediadores químicos e células locais e inflamatórias. Este processo tem como objetivos principais a restauração da integridade tecidual e a manutenção da homeostase. O processo de cicatrização envolve três fases, que podem ser subdivididas em quatro ou cinco, sequenciais, que se relacionam de maneira dinâmica e não individualizadas: inflamatória, proliferativa, formação do tecido conjuntivo, contração e final de remodelamento^{2,21,24}.

Feridas crônicas em pacientes com DM muitas vezes não seguem esta progressão ordenada, podendo persistir na fase inflamatória e não progredir para as próximas fases da cicatrização de feridas. A transição do estágio inflamatório para o proliferativo na cicatrização de feridas é tema de pesquisa atual intensiva, e a regulação sistêmica da inflamação desempenha papel importante nesta etapa^{4,7,11,14,19}.

A relação entre o processo de cicatrização e a interação com a microbiota da pele já está bem estabelecida. Foi demonstrado que a microbiota local pode fornecer estimulação tônica benéfica ao sistema imunológico do hospedeiro e previnem a invasão de outros micróbios patogênicos e, em caso de perda da diversidade microbiana, muitas vezes resulta em inflamação prolongada e atraso no processo de cicatrização de feridas^{25,28}. Estudos recentes sugerem que, além da interação com a microbiota local, alterações na microbiota intestinal também podem afetar positivamente ou negativamente o processo de cicatrização de feridas, pela produção de moléculas antimicrobianas e pela regulação da resposta imune e inflamatória^{1,11,12,26,28}. O eixo proposto por Arcket *al*¹ como "eixo cérebro-intestino-pele" propõe que a modulação da microbiota intestinal pode melhorar a resposta imune sistêmica e afetar respostas teciduais periféricas.

Neste sentido, modular a flora intestinal pode ser estratégia importante para a melhora do processo cicatricial da pele. As ferramentas para modulação da microbiota intestinal são os prebióticos, probióticos, simbióticos e o transplante de fezes, além de alterações dietéticas. Os probióticos comercializados contêm bactérias conhecidas e quantificadas, e as cepas com mais aplicabilidade em situações clínicas são os lactobacilos (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*) e as bifidobactérias (*Bifidobacterium lactis*)⁸. O principal elo entre o uso de probióticos e a cicatrização é na modulação da inflamação, que pode ter efeitos positivos na reparação de tecidos.

Objetivo deste estudo foi avaliar a influência da suplementação perioperatória com probióticos no processo de cicatrização cutânea em ratos diabéticos.

MÉTODO

Modelo experimental

Este estudo foi parte do Grupo de Pesquisa em Cicatrização do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. O projeto foi conduzido de acordo com as normas previstas na Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, normas previstas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) após aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Positivo, onde foi realizado o experimento. Foram utilizados 46 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia Mammalia), adultos, machos. Eles foram distribuídos em dois grupos: probiótico (P) que recebeu Probiatop® e controle (C), que recebeu maltodextrina, por via oral, com auxílio de uma espátula, na dose de 250 mg de probiótico ou maltodextrina por dia. Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos de acordo com o dia de eutanásia: 3º ou 10º pós-operatório (PO, subgrupos P3=12, C3=12, P10=11, C10=11). Durante o período experimental eles foram mantidos sob temperatura controlada (22±1° C) e 12 h escuro/claro de luz, com água e ração Presence® (Purina, São Paulo, Brasil) ad libitum. Os grupos receberam probiótico ou maltodextrina por cinco dias antes da realização da incisão e mantiveram este consumo diariamente até o dia da eutanásia. O probiótico ofertado foi o Probiatop®, composto pelas cepas (doses 1x10⁹ UFC/g) *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Bifidobacterium lactis* HN0019, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 e *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Estas doses estão dentro das recomendações baseadas em evidências em humanos¹⁸. Os ratos foram pesados antes da indução do DM, no dia da operação e nos dias 3, 7 e 10 de pós-operatório, com balança eletrônica (AM 5500® Marte, São Paulo, SP).

Indução ao diabetes melito

Os ratos foram induzidos em 72 h antes de iniciar suplementação pré-operatória com probiótico ou placebo (oito dias antes da operação). Após 16 h de jejum, os ratos foram submetidos à anestesia por inalação de isoflurano em campânula de vidro e depois mantidos em decúbito para receber injeção via veia caudal (*Sigma Chemical Co*, EUA). A aloxana foi diluída em água destilada e aplicada em dose única de 40 mg/kg¹⁶. Após 1h 30min a alimentação foi reintroduzida. O DM foi confirmado após 48 h da indução, sendo que glicemia de jejum >200 mg/dl foi padronizada para o diagnóstico. Os ratos que morreram logo após a indução do DM foram substituídos para evitar comprometimento do número final por grupo. Os níveis de glicose foram avaliados retirando uma gota de sangue mediante secção e ordenha da cauda, que foi colocada sobre fita reagente e avaliada pelo glicosímetro One Touch Select Simple® (Johnson&Johnson, Brasil). As glicemias foram avaliadas nos dias 0, 3, 7 e 10 de pós-operatório.

Procedimento cirúrgico

No dia da operação os ratos foram anestesiados por inalação de isoflurano em campânula de vidro e pré-medicados com morfina na dose 4 mg/kg IM. Foi realizada a tricotomia da região dorsal e antisepsia e em seguida foi realizada incisão com bisturi guiada por um molde quadrado de 2x2 cm, ressecando toda a espessura da pele e expondo a fáscia muscular dorsal. As feridas foram deixadas abertas para cicatrizar por segunda intenção. A analgesia foi realizada com uso de acetaminofeno líquido em dose diária de 100 mg/kg por via oral, diluído em água, até o 4º dia de pós-operatório.

Avaliação da contração da ferida

As feridas foram macroscopicamente avaliadas por fotografias digitais realizadas nos dias 1, 3, 7 e 10 para análise das taxas de

contração da ferida com software Image-Pro Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, EUA). As feridas foram fotografadas a uma distância padronizada de 15 cm.

Eutanásia

No 3º (grupos C3 e P3) e 10º dia (grupos C10 e P10) de pós-operatório os ratos foram submetidos à eutanásia em sistema fechado de câmara de vidro com isoflurano. Após a constatação do óbito, a ferida foi excisada com margem de 1 cm.

Densitometria do colágeno

Ela foi realizada para identificar e quantificar o colágeno tipo I e tipo III utilizando a coloração de Picrosirius Red F3BA (PSR), microscopia ótica sob luz polarizada e análise de imagens em software. As imagens foram registradas pelo Software AxioVision 4.9 (Zeiss, Alemanha) e analisadas pelo software Image-Pro Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, Maryland, EUA).

Estudo histológico por coloração H&E

As amostras foram cortadas em blocos em micrótomo rotativo, com cortes de cinco micrômetros de espessura, e submetidos à coloração com H&E. Em seguida, as peças foram submetidas aos processos de desidratação e diafanização em xilol, e coradas com H&E. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico Olympus BX40 (Tóquio, Japão), com magnificação de 20x. Na leitura, foram avaliados tipos e quantidade das células predominantes na reação inflamatória aguda (polimorfonucleares), presença de edema intersticial e congestão vascular e o grau de formação de fibroblastos, neovasos e monócitos. Estes dados foram classificados em acentuado (3), moderado (2) e discreto (1) e transformados em variáveis quantitativas por meio da atribuição de índice aos achados histológicos. A presença de polimorfonucleares, edema e a congestão foram indicativos de processo inflamatório agudo, pontuando negativamente, e a formação de fibroblastos, neovasos e monócitos foram indicativos de processo inflamatório crônico, pontuando positivamente. Após a atribuição dos índices, estes foram somados para totalizar escore final para posterior avaliação estatística entre os grupos estudados²⁷.

Análise estatística

Os resultados foram descritos por média e desvio-padrão (DP). Para a comparação entre os grupos foi usado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As comparações entre os dias de avaliação, dentro do mesmo grupo, foram feitas utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Para análise de correlação foi utilizado o Coeficiente de Spearman. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa IBM SPSS Statistics®, v.20.

RESULTADOS

Os grupos C3 e C10 apresentaram perda de peso ao longo do experimento ($p < 0,001$), enquanto os grupos P3 e P10 não apresentaram redução de peso no mesmo período ($P3=0,789$, $P10=0,433$).

Os ratos que receberam probióticos apresentaram glicemia mais baixa no momento da operação no grupo P10 quando comparado com o grupo C10 (321 ± 146 vs. $541,2 \pm 112$ mg/dl, $p=0,001$), assim como no 3º PO (281 ± 132 vs. 405 ± 147 mg/dl, $p=0,040$).

A glicemia do 3º PO do grupo C3 foi correlacionada negativamente com o peso do 3º PO neste grupo (coeficiente de correlação Spearman = $-0,68$, $p=0,016$), indicando que quanto mais alto os valores da glicemia, mais baixos foram os valores de peso (Figura 1). Não houve diferença significativa nos outros dias.

A contração da ferida foi maior no grupo P10 quando comparado com o grupo C10, o que resultou em menor área cruenta no 7º PO (847 ± 189 vs. 1054 ± 269 mm², $p=0,049$, Figuras 2 e 3).

Nos grupos controle houve correção positiva entre peso e área cruenta segundo o coeficiente de correlação de Spearman ($C3=0,69$, $p=0,014$; $C10=0,63$, $p=0,037$).

Houve aumento do colágeno tipo I do 3º para o 10º dia no grupo de recebeu probióticos ($p=0,016$), o que não ocorreu no grupo controle ($p=0,487$, Figura 4). Não houve diferença significativa para análise de colágeno tipo III.

A análise do escore histológico final por H&E mostrou melhor grau de cicatrização no grupo P10 quando comparado com C10 ($P10=3$ vs. $C10=0$, $p=0,005$, Figura 5), com menos polimorfonucleares ($p < 0,001$) e mais neovasos ($p=0,001$, Figura 6). Não houve diferença significativa para os demais parâmetros.

DISCUSSÃO

O presente estudo, em ratos diabéticos, demonstrou benefício na utilização de probióticos por via oral na cicatrização de feridas, deposição de colágeno maduro, estímulo da neovascularização e redução do processo inflamatório, além de reduzir a perda de peso e melhorar o controle glicêmico. Alguns estudos experimentais prévios também mostraram benefícios na utilização de prebiótico ou probióticos na cicatrização. Huseini et al⁹ mostraram que o uso de produtos com Kefir foi capaz de melhorar a cicatrização de queimaduras em ratos. Entretanto, nenhum destes estudos incluiu ratos diabéticos.

Além disso, as células de úlcera coletadas após o tratamento com *Lactobacillus plantarum* por 10 dias apresentaram menor carga bacteriana na ferida, além de indução de cicatrização de feridas²⁰.

No presente estudo a contração de ferida foi mais rápida no grupo probiótico quando comparado com o controle, o que resultou em menor área cruenta. Em estudo clínico¹⁸ recente resultados similares foram encontrados com suplementação com probióticos por 12 semanas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum* e *Bifidobacterium bifidum* (2×10^9 UFC/g cada) em pacientes diabéticos portadores de úlcera em pé diabético. Neste estudo, a suplementação com probióticos associou-se à redução do tamanho da úlcera e melhor controle glicêmico neste estudo. Os mecanismos anti-infecciosos dos probióticos em pacientes com úlcera em pé diabético sugeridos no estudo incluem a capacidade aprimorada de combater os microrganismos patogênicos ou por modular as respostas imunes do hospedeiro, a produção de substâncias antimicrobianas e as propriedades anti-inflamatórias¹⁸.

A fase de remodelamento da cicatrização é caracterizada pela deposição de colágeno de maneira organizada, com substituição do colágeno inicial (tipo III) e produção do colágeno maduro (tipo I), mais espesso e organizado, se aproximando da composição da derme saudável². Neste trabalho foi possível observar aumento da deposição de colágeno maduro (tipo I) no grupo que recebeu probiótico quando comparado com o controle.

Outro achado deste estudo foi a maior formação de neovasos no grupo probiótico (P10) quando comparado com o controle (C10). Estudo prévio mostrou que o número de neovasos se reduz após indução de DM em ratos¹⁹. A melhora da neovascularização via angiogênese é essencial para o processo de reepitelização adequada por garantir oferta adequada de nutrientes, células imunológicas e oxigênio. O crescimento capilar rápido e robusto cria um leito vascular com mais capilares que o tecido normal^{4,5,18,21,24}.

A redução de polimorfonucleares no grupo probióticos (P10), quando comparado com o controle (C10), sugere que a suplementação perioperatória com probióticos foi capaz de atenuar a expressão prolongada e excessiva de citocinas inflamatórias. Os neutrófilos se infiltram logo após a lesão na ferida para esterilização microbiana e remoção de compostos estranhos, e depois deve haver regressão até cessar a produção, quando a fase inflamatória é finalizada. Se os neutrófilos persistirem nos tecidos da lesão pode haver produção excessiva de citocinas inflamatórias, o que torna a cicatriz refratária. Análise de biópsia de pele em estudo prévio mostrou que pacientes diabéticos apresentaram maior

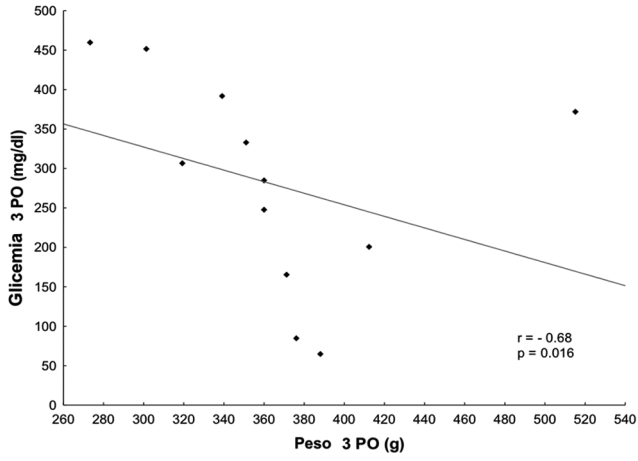


FIGURA 1 – Coeficiente de correlação de Spearman para glicemia e peso no 3º PO no grupo controle (C3)

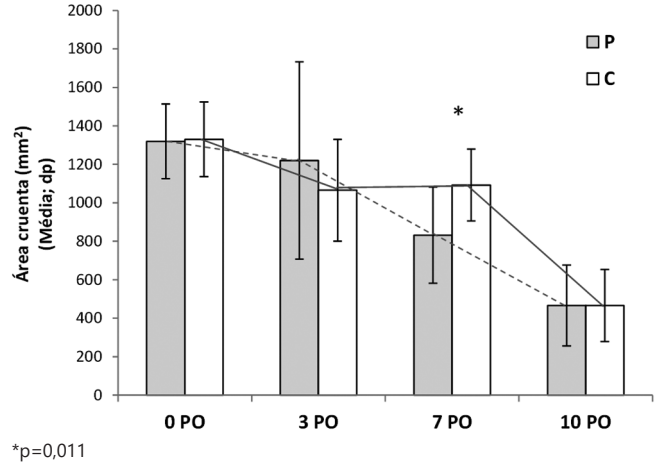


FIGURA 2 - Área cruenta nos grupos controle e probiótico. Observar que a suplementação com probiótico acelerou a cicatrização de ferida. A diferença foi significativa no 7º PO.

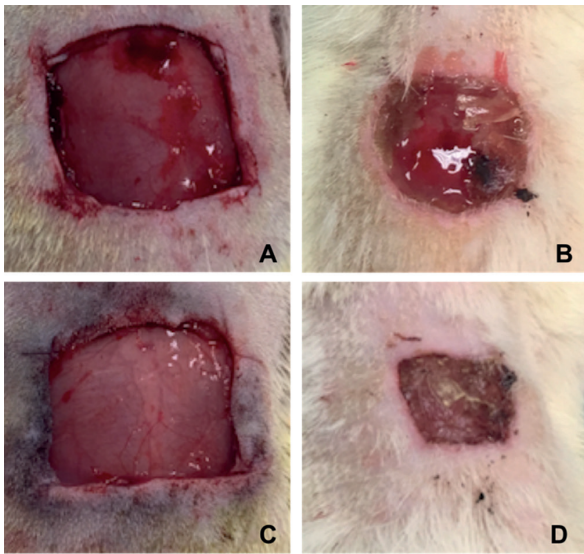


FIGURA 3 – Exemplo da diferença de área de contração da ferida: A) grupo controle no dia da operação; B) 7PO no grupo controle; C) grupo probiótico no dia da operação; D) 7PO no grupo probiótico

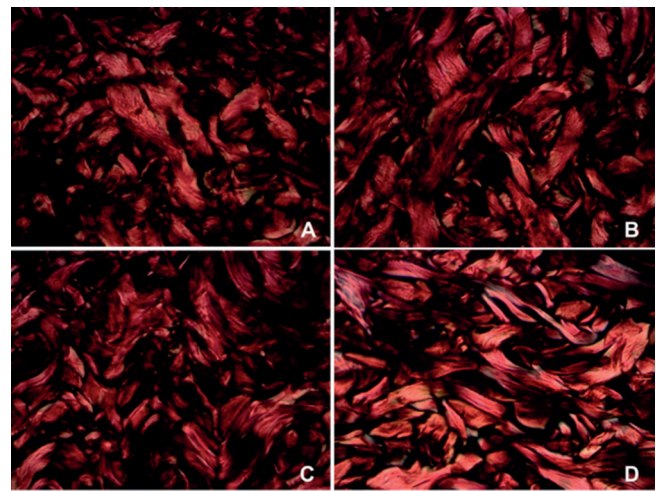


FIGURA 4 – Exemplo da deposição de colágeno tipo I: A) 3º PO no grupo controle; B) 10º PO no grupo controle; C) 3º PO no grupo probiótico; D) 10º PO no grupo probiótico

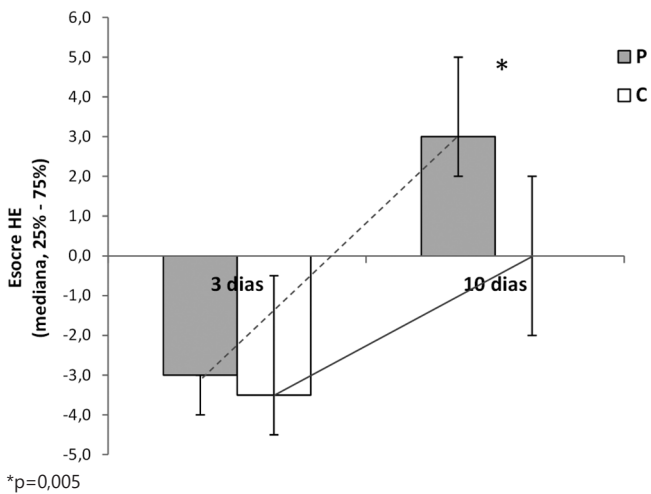


FIGURA 5 – Escore histológico por H&E para avaliar grau de cicatrização no grupo suplementado com probióticos (P) e controle (C)

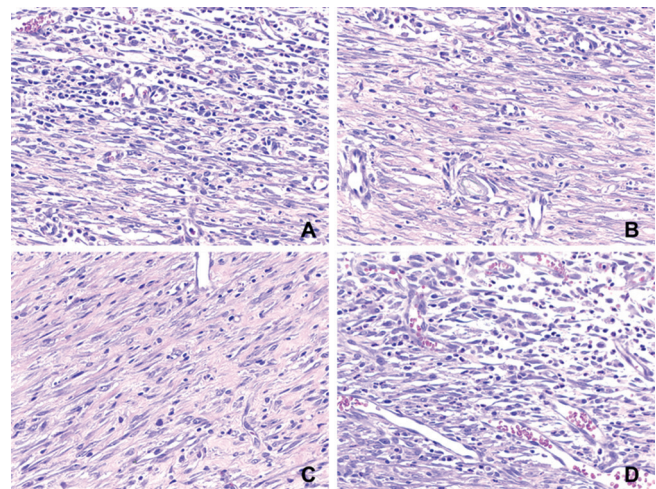


FIGURA 6 – Exemplo de micrografia demonstrando: A) presença acentuada de polimorfonucleares no grupo controle; B) presença discreta de polimorfonucleares no grupo probiótico; C) presença discreta de neovasos no grupo controle; D) presença acentuada de neovasos no grupo probiótico (20x)

infiltração de células imunes quando comparados com indivíduos saudáveis, e que este aumento da inflamação está associado à falha na cicatrização em pacientes com DM. A utilização de probiótico tóxico (*Lactobacillus plantarum*) em pacientes diabéticos e não diabéticos com úlcera infectada crônica em perna foi capaz de reduzir neutrófilos, além de reduzir carga bacteriana, e induzir a cicatrização²⁰.

A suplementação perioperatória com probióticos em ratos diabéticos evitou a perda de peso neste estudo, a qual ocorreu no grupo controle. A insulina é o hormônio anabólico mais conhecido e essencial para manutenção da homeostase da glicose e do crescimento e diferenciação celular, estímulo da lipogênese no fígado e nos adipócitos, da síntese proteica e da inibição da sua degradação. A incapacidade do organismo em utilizar a glicose pela falta de insulina pode levar ao catabolismo, com proteólise e lipólise como mecanismos para fornecer energia. Neste estudo, o coeficiente de correlação Spearman indicou que quanto mais alto o valor da glicemia, mais baixo foi o peso, o que sugere que a suplementação perioperatória com probióticos favoreceu o controle da glicemia e consequentemente evitou o catabolismo e a perda de peso. Revisão sistemática recente com pacientes com DM2 mostrou que o uso de probióticos foi capaz de reduzir glicemia de jejum (em 19 estudos), hemoglobina glicada (em 13 estudos), insulina (em 13 estudos) e HOMA-IR (em 10 estudos)¹³.

Os potenciais mecanismos de ação dos probióticos no controle glicêmico são: 1) os efeitos intraluminais e diretos na mucosa, com aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta, redução da permeabilidade intestinal, redução da absorção de lipopolissacarídeos e aumento da produção de GLP-1; 2) efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores com redução de citocinas pró-inflamatórias; 3) redução do estresse oxidativo com efeito protetor de células beta; 4) efeitos na expressão de genes envolvidos na homeostase da glicemia e na resistência à insulina, com aumento da sensibilidade via GLUT-4¹⁷.

O tratamento adequado do DM pode impedir que as feridas se mantenham no estágio inflamatório da cicatrização e, conseqüentemente, promover a cicatrização de feridas, pela redução de citocinas pró-inflamatórias, regulação dos fatores de crescimento, estímulo à angiogênese e do aumento da epitelização^{6,23}. A desnutrição, sobretudo proteica, também pode prejudicar a cicatrização de feridas por prolongar a fase inflamatória, diminuir a síntese e proliferação de fibroblastos, angiogênese e síntese de colágeno^{2,14}. Entretanto, é importante destacar, que neste estudo não houve correlação entre glicemia e área cruenta, e que, surpreendentemente, houve correlação positiva entre peso e área cruenta, o que indica que quanto maior o peso, maior a área cruenta. Assim, pode-se interpretar que o mecanismo de ação dos probióticos no aceleração da contração de ferida não foi relacionado ao melhor controle glicêmico ou prevenção da perda de peso, e sim com a redução da inflamação.

Não foi identificado até o momento estudo experimental similar a este. Em estudo clínico com pacientes portadores de pés diabéticos resultados similares foram encontrados, sem, no entanto, elucidar os mecanismos envolvidos¹⁸.

Contudo, o presente estudo apresenta algumas limitações: o modelo de diabetes utilizado mimetiza um quadro agudo da doença, devido ao efeito tóxico nas células beta por aloxana¹⁶, diferente do quadro crônico apresentado por pacientes com complicações de feridas crônicas. O DM crônico resulta em inúmeras complicações para o processo cicatricial, sobretudo a doença vascular periférica, que não foram extrapolados para os ratos deste estudo. Ainda, os animais deste estudo não estavam em tratamento para DM - pesquisas recentes vêm correlacionando o uso crônico de metformina com alterações na microbiota¹³ -, além de não estarem consumindo adoçantes artificiais, muito utilizados por pacientes diabéticos e conhecidos como prejudiciais para a microbiota intestinal¹⁵. Ainda assim, o efeito benéfico do probiótico na modulação da resposta inflamatória foi comprovado neste modelo. A microbiota do rato se difere da microbiota humana e, certamente, estudos clínicos que investiguem a influência dos

probióticos na cicatrização em pacientes diabéticos são necessários para definir o real benefício, bem como para definir a dose ideal, tempo de suplementação perioperatória e cepas mais indicadas.

CONCLUSÕES

A suplementação perioperatória de probióticos promove aceleração da cicatrização cutânea em ratos diabéticos, possivelmente por estar associada à atenuação da resposta inflamatória e estar também associada ao aumento a neovascularização e a deposição de colágeno tipo I. A suplementação com probióticos também evita perda de peso e promove melhor controle glicêmico quando comparado com ratos que não receberam probióticos.

REFERÊNCIAS

1. Arck, P.; Handjiski, B.; Hagen, E.; Pincus, M. et al. Is There a 'Gut-Brain-Skin Axis'? *Experimental Dermatology* 19(5):401-5, 2010. DOI.10.1111/j.1600-0625.2009.01060.x.
2. Campos, A. C. L.; Borges-Branco, A.; Groth, A. K. Cicatrização de Feridas. *ABCD Arq Bras Cir Dig (São Paulo)* 20 (1): 51-58, 2007. DOI.10.1590/S0102-67202007000100010.
3. Carro, G. V.; Saurral, R.; Sagüez, F. S.; Witman, E. L. Diabetic Foot among Hospitalized Patients in Latin America. *Medicina* 78 (4): 243-51, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30125251>>. Acesso em: Janeiro de 2018.
4. Dinh, T.; Tecilizich, F.; Kafanas, A.; Doupis, J., et al. Mechanisms Involved in the Development and Healing of Diabetic Foot Ulceration. *Diabetes* 61 (11): 2937-47, 2012. DOI.10.2337/db12-0227.
5. Di Pietro, L.A. Angiogenesis and Wound Repair: When Enough is Enough. *Journal of Leukocyte Biology* 100 (5): 979-84, 2016. DOI.10.1189/jlb.4MR0316-102R.
6. El-Bahy, A. A. Z.; Aboulmagd, Y. M.; Zaki, M. Diabetex: A Novel Approach for Diabetic Wound Healing. *Life Sci* 207: 332-39, 2018. DOI.10.1016/j.lfs.2018.06.020.
7. Falanga, V. Wound Healing and Its Impairment in the Diabetic Foot. *Lancet* 366(9498):1736-43, 2005. DOI. 10.1016/S0140-6736(05)67700-8.
8. Flesch, A. G. T.; Poziomyck, A. K.; Damin, D. D. C. O uso terapêutico dos simbióticos. *ABCD Arq Bras Cir Dig*, 27 (3): 206-9, 2014.
9. Huseini, H.F.; Rahimzadeh, G.; Fazeli, M. R.; Mehrazma, M.; Salehi, M. Evaluation of Wound Healing Activities of Kefir Products. *Burns : Journal of the International Society for Burn Injuries* 38 (5): 719-23, 2012. DOI.10.1016/j.burns.2011.12.005.
10. International Diabetes Federation. Disponível em: <<https://www.idf.org/Aboutdiabetes/What-Is-Diabetes/Facts-Figures.html>>. Acesso em: Setembro de 2019.
11. Johnson, T. R.; Gómez, B.I.; Mcintyre, M. K.; Dubick, M. A. et al. The Cutaneous Microbiome and Wounds: New Molecular Targets to Promote Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2018. DOI.10.3390/ijms19092699.
12. Kiritsi, D.; Nyström, A. The Role of TGFβ in Wound Healing Pathologies. *Mechanisms of Ageing and Development*, 172:51-58, 2018. DOI.10.1016/j.mad.2017.11.004.
13. Koutnikova, H.; Genser, B.; Monteiro-Sepulveda, M.; Faurie, J. C. et al. Impact of Bacterial Probiotics on Obesity, Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Related Variables: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *BMJ Open*, 9 (3): e017995, 2019. DOI.10.1136/bmjopen-2017-017995.
14. Lepäntö, M.; Apelqvist, J.; Setacci, C.; Ricco, J. B. et al. Chapter V: Diabetic Foot. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 42 (December): S60-74, 2011. DOI.10.1016/S1078-5884(11)60012-9.
15. Lobach, A. R.; Roberts, A.; Rowland, I. R. Assessing the in Vivo Data on Low/No-Calorie Sweeteners and the Gut Microbiota. *Food and Chemical Toxicology*, 124 (February): 385-99, 2019. DOI.10.1016/j.fct.2018.12.005.
16. Lucchesi, A. N.; Cassettari, L. L.; Spadella, C. T. Alloxan-Induced Diabetes Causes Morphological and Ultrastructural Changes in Rat Liver That Resemble the Natural History of Chronic Fatty Liver Disease in Humans. *Journal of Diabetes Research*, 2015: 494578, 2015. DOI.10.1155/2015/494578.
17. Miraghajani, M.; Dehsoukhteh, S. S.; Rafie, N.; Hamedani, S. G. Et Al. Potential Mechanisms Linking Probiotics to Diabetes: A Narrative Review of the Literature. *Sao Paulo Medical Journal*, 135 (2): 169-78, 2017. DOI.10.1590/1516-3180.2016.0311271216.
18. Mohseni, S.; Bayani, M.; Bahmani, F.; Tajabadi-Ebrahimi, M. Et Al. The Beneficial Effects of Probiotic Administration on Wound Healing and Metabolic Status in Patients with Diabetic Foot Ulcer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 34 (3), 2018. DOI.10.1002/dmrr.2970.

19. Oviedo-Socarrás, T.; Vasconcelos, A. C.; Barbosa, I. X.; Pereira, N. B. Et Al. Diabetes Alters Inflammation, Angiogenesis, and Fibrogenesis in Intraperitoneal Implants in Rats. *Microvascular Research*, 93 (May): 23–29, 2014. DOI.10.1016/j.mvr.2014.02.011.
20. Peral, M. C.; Rachid, M. M.; Gobbato, N. M.; Martinez, M. A. H.; Valdez, J. C. Interleukin-8 Production by Polymorphonuclear Leukocytes from Patients with Chronic Infected Leg Ulcers Treated with *Lactobacillus Plantarum*. *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (3): 281–86, 2010. DOI.10.1111/j.1469-0691.2009.02793.x.
21. Reinke, J. M.; Sorg, H. Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49 (1): 35–43, 2012. DOI.10.1159/000339613.
22. Rosado, P.; Hsu-Tang, C.; Chao-Min, W.; Fu-Chan, W. Influence of Diabetes Mellitus on Postoperative Complications and Failure in Head and Neck Free Flap Reconstruction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Head & Neck*, 37 (4): 615–18, 2015. DOI.10.1002/hed.23624.
23. Salazar, J. J.; William, J. E.; Timothy, J. K. Diabetes Medications: Impact on Inflammation and Wound Healing. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 30(4): 746–52, 2016. DOI.10.1016/j.jdiacomp.2015.12.017.
24. Salgado, F. L.; Artigiani-Neto, R.; Lopes-Filho, G. J. Growth factors and COX2 in Wound Healing: An Experimental Study with Ehrlich Tumors. *ABCD Arq Bras Cir Dig (São Paulo)* 29(4): 223–26, 2016. DOI.10.1590/0102-6720201600040003.
25. Sorg, H.; Tilkorn, D. J.; Hager, H.; Hauser, J.; Mirastschijski, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*, 58 (1–2): 81–94, 2017. DOI.10.1159/000454919.
26. Tsiouris, C. G.; Kelesi, M.; Vasilopoulos, G.; Kalemikerakis, I.; Papageorgiou, E. G. The Efficacy of Probiotics as Pharmacological Treatment of Cutaneous Wounds: Meta-Analysis of Animal Studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104 (June): 230–39, 2017. DOI.10.1016/j.ejps.2017.04.002.
27. Vizzotto Junior, A. O.; Noronha, L.; Scheffel, D. L. H.; Campos, A. C. L. Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. *J Bras Patol e Med Lab Jun*; 39(2): 143–9, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442003000200009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acessado em: Janeiro de 2018.
28. Wagner, N.R.F., Zapparoli, M.R., Crus, M.R.R., Schieferdecker, M.E.M., Campos, A.C.L. Postoperative changes in intestinal microbiota and use of probiotics in roux-en-y gastric bypass and sleeve vertical gastrectomy: an integrative review. *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 6;31(4), 2018.
29. Zheng, Y.; Ley, S. H.; Hu, F. B.. Global Aetiology and Epidemiology of Type 2 Diabetes Mellitus and Its Complications. *Nature Reviews Endocrinology*, 14 (2): 88–98, 2018. DOI.10.1038/nrendo.2017.151.