



RESVERATROL AMENIZA DANOS OCACIONADOS PELO DIABETES EXPERIMENTAL NO COLO DISTAL DE RATOS

Karina Keiko Kido (PIBIC/CNPq/Uem), Evandro José Beraldi, Nilza Cristina Buttow (Orientador), e-mail: Karina.kido@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / Maringá, PR.

Área: Ciências Biológicas e sub-área: Morfologia

Palavras-chave: estreptozotocina, diabetes, resveratrol.

Resumo:

Considerando os sintomas característicos do diabetes mellitus e que muitas de suas complicações são resultantes do estresse oxidativo, a suplementação com antioxidantes pode ter relevância no tratamento da doença. Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do tratamento com resveratrol sobre os neurônios do plexo mientérico do colo de ratos com diabetes induzida por estreptozocina, através de imunofluorescência para evidenciar a população neuronal total (HuC/D⁺) e subpopulação nitrérgica (nNOS⁺). Foram utilizados 4 grupos experimentais, normoglicêmico controle (C), normoglicêmico suplementado com resveratrol (CR), diabético (D) e diabético suplementado com resveratrol (DR), onde os animais tratados receberam doses diárias de resveratrol. O resveratrol não foi capaz de impedir a perda neuronal característica do modelo experimental, mas amenizou em partes os danos aos neurônios mientéricos no grupo DR. O tratamento com resveratrol ainda foi capaz de melhorar alguns parâmetros fisiológicos dos ratos diabéticos, como a perda de peso e consumo de água.

Introdução

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica de origem múltipla, caracterizada pela hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. Os danos ao sistema nervoso entérico (SNE) observados na neuropatia diabética são atribuídos à hiperglicemia, principal responsável pelo aumento do estresse oxidativo e redução na capacidade antioxidante (KUMAR et al., 2007). Compostos antioxidantes que atuem na redução do estresse oxidativo, como o resveratrol, podem ter um papel relevante no tratamento da doença. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos



do tratamento com resveratrol sobre o SNE do colo distal de ratos com DM experimental induzido por estreptozotocina.

Materiais e métodos

Delineamento experimental

Foram utilizados 24 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, que permaneceram em biotério setorial com temperatura e ciclo claro/escuro controlado. Com 90 dias de idade os ratos foram distribuídos em 4 grupos experimentais ($n = 6$): grupo normoglicêmico controle (C), grupo normoglicêmico suplementado com resveratrol (CR), grupo diabético (D) e grupo diabético suplementado com resveratrol (DR). Para a indução do diabetes os animais receberam uma dose endovenosa de streptozotocina (35 mg/kg de peso corporal), sendo considerados diabéticos os animais com glicemia acima de 250 mg/dL após 4 dias. Os grupos CR e DR receberam suplementação diária com resveratrol (10 mg/kg de peso corporal), via gavagem, até o final do experimento. O consumo de ração, água, excreção de urina e velocidade de trânsito gastrointestinal foram avaliados na última semana do período experimental.

Coleta e processamento do material de estudo

Após 120 dias de experimento, os ratos foram mortos com dose letal de anestésico e o sangue foi coletado por punção cardíaca para avaliação da glicemia sanguínea (glicose oxidase). O colo distal de cada animal foi coletado e fixado em paraformaldeído 4 %. Segmentos menores foram dissecados para obtenção de preparados totais da túnica muscular, utilizados para a marcação do plexo mientérico por imunofluorescência (SOUZA et al., 2015). Para a dupla marcação foram utilizados os anticorpos anti-HuC/D, marcador da população geral neuronal, e anti-nNOS, marcador da população neuronal nitrérgica.

Análises neuronais e estatística

A quantificação neuronal foi realizada por meio de imagens capturadas das lâminas montadas após imunofluorescência, com auxílio do programa Image Pro Plus 4.5. Para as análises quantitativas, todos os neurônios presentes em 30 imagens por animal foram quantificados. Para a morfometria, a área de corpos celulares neuronais HuC/D^+ , $nNOS^+$ e $nNOS^-$ foi mensurada num total de 100 células para cada subpopulação por animal. Os dados foram analisados nos programas Statistica 7.1 ou GraphPad Prism 5, através da análise de variância One-way ANOVA seguida de Tukey.

Resultados e Discussão



Os animais diabéticos (grupo D) apresentaram parâmetros fisiológicos característicos desse modelo experimental, como elevados níveis de glicemia final, aumento no consumo de água e ração, perda de massa corporal e aumento na velocidade do trânsito gastrointestinal, comparados ao grupo C (Tabela 1). O tratamento dos ratos diabéticos com resveratrol (grupo DR) amenizou algumas dessas alterações, como a perda de massa corporal e consumo de água. A Figura 1 mostra o plexo mientérico, com a imunofluorescência para marcação da população neuronal geral e subpopulação nitrérgica. O diabetes causou perda neuronal de 39 % na população geral mientérica do colo distal (Tabela 1), em relação ao grupo C; resultados similares foram observados nos neurônios nitrérgicos, onde ocorreu perda neuronal de 35 % no grupo D, comparado ao grupo C. O tratamento com resveratrol não foi capaz de prevenir a perda neuronal, quando comparados os grupos DR e D. Entretanto, também não houve diferença significativa entre os grupos C e DR, indicando que o resveratrol não previniu totalmente a perda neuronal, mas foi capaz de amenizar os danos causados aos neurônios. Embora a proporção de neurônios nitrérgicos não tenha sofrido alteração, a perda neuronal observada nos diabéticos pode ter afetado o equilíbrio entre neurônios excitatórios e inibitórios, comprometendo a motilidade (CHANDRASEKHARAN e SRINIVASAN, 2007). A morfometria do corpo celular neuronal mostrou que o diabetes alterou o perfil celular somente nos neurônios excitatórios, negativos para nNOS, reduzindo sua área quando comparados os grupos D e C. Curiosamente, o tratamento com resveratrol reduziu a área das três subpopulações (HuC/D^+ , $nNOS^+$ e $nNOS^-$) tanto no grupo CR quanto DR, comparados aos seus respectivos controles.

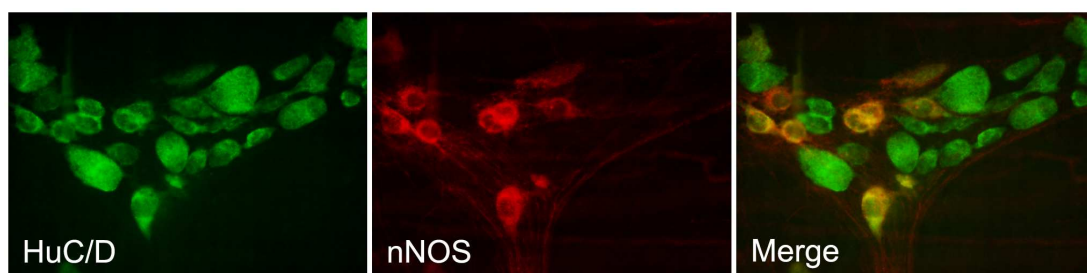
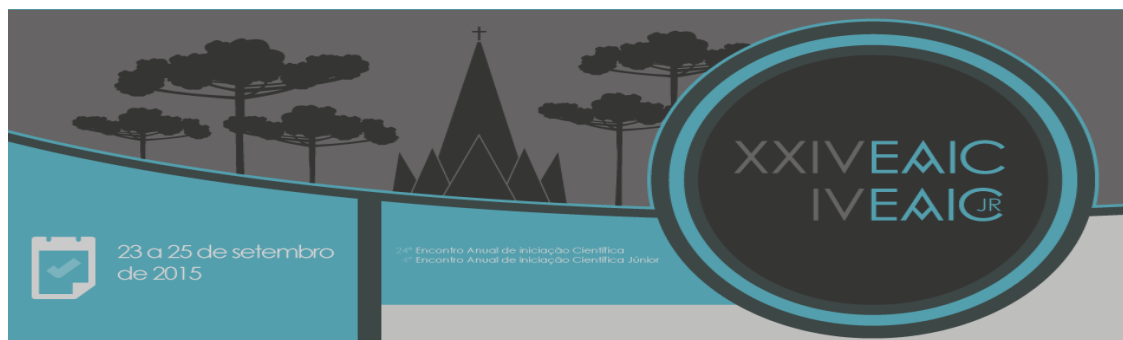


Figura 1. Gânglio no plexo mientérico do colo distal de um animal do grupo DR, visualizado por imunofluorescência em dupla marcação. HuC/D – população neuronal geral; nNOS – subpopulação nitrérgica; Merge – sobreposição das imagens

Tabela 1. Parâmetros fisiológicos e neuronais: glicemia final (mg/dL); peso final (g); consumo de água (mL/dia) e ração (g/dia); tempo de trânsito gastrointestinal (min); densidade neuronal geral (neurônios/cm²) e nitrérgica (neurônios/cm²); proporção de neurônios nitrérgicos (%); área do corpo celular de neurônios HuC/D^+ , $nNOS^+$ e $nNOS^-$ (μm^2).



Grupos	C	CR	D	DR
Glicemia	146 ± 5	160 ± 6	498 ± 22 ^a	412 ± 36
Peso	510 ± 19	486 ± 12	298 ± 13 ^a	409 ± 15 ^c
Água	30 ± 2,9	45 ± 0,2	164 ± 10,6 ^a	113 ± 11,4 ^c
Ração	26 ± 0,8	27 ± 0,2	41 ± 17 ^a	36 ± 2,5
Trânsito	565 ± 20	477 ± 33,2	449 ± 9,3 ^a	499 ± 36 ^a
Densidade geral	20350 ± 2474	20080 ± 2410	12289 ± 538 ^{ab}	16334 ± 1419
Densidade nitrérgica	5372 ± 482	5311 ± 602	3467 ± 219 ^{ab}	4354 ± 380
Proporção	27 ± 1.6	27 ± 0.9	28 ± 1.1	27 ± 2.0
Área HuC/D ⁺	363 ± 6	309 ± 6 ^a	345 ± 6 ^b	313 ± 5 ^{ac}
Área nNOS ⁺	349 ± 5	330 ± 5 ^a	336 ± 4	297 ± 4 ^{ac}
Área nNOS ⁻	365 ± 6	307 ± 6 ^a	337 ± 5 ^a	310 ± 5 ^{ac}

^ap < 0,05 versus C; ^bp < 0,05 versus CR; ^cp < 0,05 versus D. Resultados expressos como média ± erro padrão; n = 6 por grupo.

Conclusões

O tratamento com resveratrol em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina melhorou alguns parâmetros fisiológicos característicos da doença e, apesar de não ter prevenido totalmente a perda neuronal no plexo mientérico, o resveratrol foi capaz de amenizar os danos causados aos neurônios do colo distal.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo incentivo financeiro à pesquisa.

Referências

CHANDRASEKHARAN, B.; SRINIVASAN, S. Diabetes and the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*, v. 19, n. 12, p. 951-60, 2007.

KUMAR, A. et al. Effects of resveratrol on nerve functions, oxidative stress and DNA fragmentation in experimental diabetic neuropathy. *Life Sci*, v. 80, n. 13, p. 1236-44, 2007.

SOUZA, A. C. S., et al. Resveratrol Reduces Morphologic Changes in the Myenteric Plexus and Oxidative Stress in the Ileum in Rats with Ischemia/Reperfusion Injury. *Dig Dis Sci*, 2015. DOI: 10.1007/s10620-015-3742-5.