



## **ANÁLISE DA INERVAÇÃO NITRÉRGICA DOS NEURÔNIOS DO JEJUNO DE RATOS DIABÉTICOS SOB SUPLEMENTAÇÃO COM *Trichilia catigua*.**

Bianca Silva Cardoso (PIBIC/CNPq-UEM), Jacqueline Nelisis Zanoni (Orientadora), e-mail: jnzanoni@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Ciências Morfológicas

**Área e subárea:** Ciências Biológicas- Morfologia-Histologia

**Palavras-chave:** diabetes mellitus, estrepto-zotocina, *Trichilia catigua*.

### **Resumo:**

Complicações crônicas do diabetes mellitus (DM), devido a um longo período com níveis elevados de glicemia, podem levar à comprometimentos vasculares e nervosos que alteram a motilidade gastrointestinal e sua inervação entérica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o tamanho e a densidade dos neurônios nitrérgicos do plexo mioentérico de ratos diabéticos administrados com extrato líquido de *Trichilia catigua* (*T. catigua*) (200 mg/Kg). Foram utilizados ratos machos Wistar com 90 dias de idade, distribuídos em 4 grupos: N- normoglicêmicos; NC- normoglicêmicos administrados com extrato líquido *T. catigua*; D- diabéticos induzidos pela estrepto-zotocina; DC- diabéticos induzidos pela estrepto-zotocina, administrados com extrato líquido *T. catigua*. Após 60 dias de período experimental o jejuno foi coletado e submetido a técnica imunohistoquímica para nNOS (óxido nítrico sintase neuronal). Foi verificada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na área do corpo celular dos neurônios nitrérgicos entre todos os grupos estudados. Em relação à densidade dos neurônios mioentéricos nNOS imunoreativos foi observada um aumento quando foram comparados os grupos D e NC em relação ao grupo N ( $p < 0,05$ ). A suplementação com *T. catigua* promoveu uma redução da área dos neurônios nitrérgicos no grupo DC ( $p < 0,05$ ), o que pode estar relacionado a alteração na síntese de NO e/ou inativação pela propriedade antioxidante da *T. catigua*.

### **Introdução**





O Diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico crônico decorrente da falta de insulina e/ou resistência na ação deste hormônio sobre os tecidos alvos, levando à hiperglicemia. Entre as neuropatias que se manifestam no DM, está a autonômica que compromete o trato gastrointestinal, afetando diferentes tipos de neurônios entéricos, levando a modificações das atividades motora, secretora/absortiva e vascular. De acordo com Chandrasekharan e Srinivasan (2007) o neurotransmissor inibitório NO (óxido nítrico) parece estar diminuído no início do diabetes com um aumento nos estados avançados de diabetes, possivelmente secundários à regeneração. O aumento de moléculas oxidativas altamente reativas (radicais livres) dentro das células leva a danos às proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, culminando em morte celular por necrose ou apoptose (VINCENT et al., 2004). Estudos feitos por Tang et al., (2007) conseguiram verificar uma forte atividade antioxidante da *T. catiguá* e por essa razão se faz promissor na prevenção do desenvolvimento da neuropatia entérica de ratos diabéticos. O objetivo do trabalho foi avaliar o tamanho e a densidade dos neurônios nitrérgicos do plexo mioentérico de ratos diabéticos administrados com extrato líquido *T. catigua* (200 mg/Kg).

## Materiais e métodos

Foi utilizado neste estudo 24 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade; *albinus*) adultos machos, distribuídos em quatro grupos experimentais, com 6 animais em cada grupo: normoglicêmicos (N), normoglicêmicos administrados com extrato líquido *T. catigua* (200mg/Kg) por gavagem (NC), diabéticos induzidos pela estreptozotocina 35 mg/Kg (D), diabéticos administrados com extrato líquido *T. catiguá* (200mg/Kg) por gavagem (DC). Após de 60 dias os animais foram submetidos à eutanásia e os segmentos de jejuno foram coletados e fixados por 18 horas em solução fixadora de Zamboni. Após fixação, os segmentos foram abertos ao longo da borda mesentérica e sucessivamente lavados em álcool 80% até remoção completa do fixador. Na sequência foi realizada a desidratação em série ascendente de álcoois (95% e 100%), diafanização em xilol e reidratação em série descendente de álcoois (100%, 90%, 80%, 50%) e PBS. Os jejunos foram dissecados sob estereomicroscópio para obtenção de preparados totais da túnica muscular, através da remoção da túnica mucosa e tela submucosa. Os preparados totais com cerca de 1 cm foram processados imunohistoquimicamente para a proteína nNOS. Foram capturadas trinta imagens por lâmina em cada segmento intestinal (por animal), em objetiva





de 40X com câmera de alta resolução AxioCam (Zeiss, Jena, Germany) acoplada microscópio de luz com filtros para Axioskop Plus (Zeiss). As imagens foram digitalizadas em microcomputador com o programa AxioVision version 4.1 A análise quantitativa foi realizada, por amostragem aleatória, na região intermediária da circunferência do jejuno. Para avaliação da densidade neuronal no plexo mioentérico, todos os neurônios de cada imagem foram contados. A análise quantitativa e a determinação da área da imagem foram realizadas através de programa de análise de imagens Image ProPlus 4.5 (Media Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD, EUA.). A densidade da subpopulação nitrérgica foram expressas em número total de neurônios por unidade de área ( $\text{cm}^2$ ). Foram realizadas análises morfométricas da subpopulação de neurônios mioentéricos nitrérgicos, onde as áreas em  $\mu\text{m}^2$  de 100 corpos celulares de neurônios por animal foram mensuradas através do programa Image-Pro Plus. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Fisher, nível significância usado foi de 5%.

## Resultados e Discussão

Foram observadas características clínicas da doença ao longo de todo o experimento: poliúria, polidipsia e polifagia e perda de peso. Os resultados mostraram que a *T. catigua* não impediu a perda de peso nos animais do grupo DC quando comparados aos animais do grupo D e também não interferiu com os valores da glicemia final. A técnica imunohistoquímica para nNOS foi utilizada neste trabalho para evidenciação dos neurônios mioentéricos que expressam para o neurotransmissor inibitório NO. Foi observado nos animais do grupo D e NC um aumento da densidade dos neurônios mioentéricos nNOS-IR (nNOS-imunoreativos) quando comparado a N ( $p < 0,05$ ). Não foram verificadas alterações significativas entre o grupo D e o grupo DC ( $p > 0,05$ ). Foi observado um aumento do tamanho do corpo neuronal nos animais diabéticos ( $p < 0,05$ ) e a administração da *T. catigua* (grupo DC) reverteu este aumento ( $p < 0,05$ ). Assim como evidenciado por Zanoni et al. (2003), foi observado um aumento da área do corpo celular de neurônios nitrérgicos dos ratos diabéticos provavelmente pelos danos sofridos pelo estresse oxidativo. Esta alteração no tamanho do corpo neuronal pode estar relacionada com a propriedade antioxidante da *T. catigua* (TANG, 2007). A qual pode ser benéfica visto que o NO em elevada quantidade pode ser considerado citotóxico levando a morte celular e contribuindo para a neuropatia diabética.





## Conclusões

A suplementação com *T.catigua* promoveu uma redução na área do corpo celular dos neurônios nitrérgicos, o que poderia estar associado a um possível efeito antioxidante, apesar desses valores não terem sido próximos aos valores de normalidade do grupo normoglicêmico. Outros estudos deverão ser realizados com o intuito de avaliar os possíveis efeitos produzidos pela *T. catigua* com períodos maiores de tratamento e em outras subpopulações neuronais prejudicadas no *diabetes mellitus*.

## Agradecimentos

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de iniciação científica.

## Referências

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. Robbins: **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2000.

CHANDRASEKHARAN, B.; SRINIVASAN, S. Diabetes and the enteric nervous system. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 19, p. 951-960, 2007.

TANG, W. et al. Antioxidant Phenylpropanoid-Substituted Epicatechins from *Trichilia catigua*. **Journal of Nature Products**, v. 70, p. 2010–2013, 2007.

VINCENT, A.M.; RUSSELL, J.W.; LOW, P. et al. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. **Endocrine Reviews Ann Arbor**; v. 25, n. 4, p. 612-628, 2004.

ZANONI, J. N; BUTTOW, N.C; BAZOTTE, R.B; MIRANDA-NETO, M.H. Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 104, p. 32– 38, 2003.

