



EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SOBRE A NEUROPATIA DIABÉTICA EM MODELO ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

Leonardo Beni Gomes (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Carlos Vinícius Dalto da Rosa (UEM), Jessica Men de Campos (UEM), Vilma A Ferreira de Godoi (UEM), Maria Raquel Marçal Natali (Orientador), e-mail: mrmnatali@uem.br

Departamento de Ciências Morfológicas/Universidade Estadual de Maringá-PR.

Área: 2.06.00.00-3 Morfologia, sub-área: 2.06.03.00-2 Histologia

Palavras-chave: hiperglicemia, restrição calórica, sistema nervoso entérico.

Resumo:

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) se caracteriza por elevada glicemia, polidipsia e poliúria, com alterações no estado oxidativo e repercussão sobre o trato gastrointestinal (TGI). A restrição alimentar (RA) ou restrição calórica promove benefícios ao organismo, comprovado no processo de envelhecimento e no combate às doenças relacionadas ao estresse oxidativo. No entanto poucos estudos relacionam os efeitos da RA com o diabetes. Este estudo teve como objetivo analisar os efeitos provocados pela DM2 e a restrição alimentar sobre a inervação intrínseca duodenal. Utilizou-se vinte ratos machos da linhagem *Wistar* divididos em 4 grupos: C (controle) e CR (controle + RA) mantidos individualmente em caixas, com água e ração padrão, D (diabéticos) e DR (diabéticos + RA) mantidos em condições semelhantes sendo administrado estreptozotocina e dieta estilo cafeteria para obter modelo experimental de DM2. Os ratos dos grupos CR e DR foram submetidos à RA (no 3º e 4º mês do tratamento). Foram avaliados os níveis de proteínas totais, triglicerídeos, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) plasmáticos, além de glicemia, peso, consumo alimentar e hídrico. Após eutanásia, amostras do duodeno foram imunomarcadas para avaliação quantitativa e morfométrica da população geral neuronal (HuC/D). O DM2 foi confirmado pelos parâmetros avaliados. O DM2 reduziu a população geral neuronal mioentérica, porém não foram observados efeitos da RA.





Introdução:

A restrição alimentar (RA), mantém níveis mínimos de nutrientes necessários a homeostase. A RA também reduz a apoptose, aumenta a sobrevivência de neurônios e ameniza o estresse oxidativo, reduzindo o nível de radicais livres (COWEN *et al.*, 2000). O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) gera hiperglicemia e alterações metabólicas, como o estresse oxidativo, que afeta o trato gastrointestinal e os neurônios do sistema nervoso entérico, podendo gerar disfunções. O objetivo deste trabalho é avaliar morfológicamente a inervação intrínseca duodenal e parâmetros sanguíneos sob os efeitos do DM2 e RA.

Materiais e métodos:

Vinte ratos *Wistar* machos foram inicialmente divididos em 2 grupos por 2 meses: controles, mantidos com água e ração padrão *ad libitum*; e diabéticos que receberam dieta estilo cafeteria (33% ração padrão; 33% leite condensado Nestlé; 7% açúcar; e água) e estreptozotocina (35 mg/Kg) para indução ao DM2. Em seguida, os controles foram divididos em 2 grupos (n=5): Controle (C) com dieta padrão e Controle+RA (CR) submetidos a RA. Os diabéticos formaram os grupos D e DR, que receberam dieta padrão *ad libitum*, e foram submetidos a RA, respectivamente, por 2 meses. Analisou-se a glicemia, peso, ingestão alimentar e hídrica durante o período experimental. Após eutanásia, coletou-se o soro sanguíneo para análise de proteínas totais, triglicerídeos e níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), com kits de determinações bioquímicas Analisa® (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Minas Gerais – Brasil). Amostras do duodeno fixadas em paraformaldeído 4%, foram dissecadas para obtenção de preparados totais da túnica muscular com anticorpos primários anti-HuC/HuD e anticorpos secundários (Alexa Flúor 488). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência, quantificando-se sob objetiva de 20x os neurônios de 40 campos por animal, além da morfometria da área de 100 corpos celulares com auxílio do programa Image Pró Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Inc). Os dados (média±EP) foram submetidos a Análise de Variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey (95%), quando paramétricos, e ao teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns quando não paramétricos (apenas consumo de ração e água).

Resultados e Discussão:





A indução por dieta hipercalórica e estreptozotocina foi eficiente no desenvolvimento de características morfofisiológicas do DM2, como diferença de peso, glicemia, ingestão de alimentar e hídrica (Tabela 1). A dieta hipercalórica e a RA mantiveram os níveis mínimos de nutrientes, como verificado pelas proteínas totais (Tabela 2). A RA não foi capaz de evitar as alterações geradas pelo DM2.

Tabela 1. Parâmetros avaliados em ratos dos grupos C (controle), CR (controle+restrição), D (diabéticos) e DR (diabéticos+restrição) (período de 0-2 meses alimentação *ad libitum*; e de 2-4 meses com restrição para CR e DR)

	C	CR	D	DR	
Peso final (g)	489,8±9,31#	372,0±9,70*	334,8±10,68*	200,4±8,11*#	P
Glicemia jejum final (mg/dL)	78,00±5,09#	81,60±4,97#	341,6±39,53*	293,6±64,98*	P
Consumo/ração 0-2 meses	31,80±0,36#	33,89±0,33*#	49,53±1,29*	47,81±1,05*	NP
Consumo/ração 2-4 meses	29,33±0,37#	15,00±0*#	47,59±1,12*	15,00±0*#	NP
Consumo/água 0-2 meses	58,44±4,99#	63,89±7,24	237,3±27,44*	276,9±32,19*	P
Consumo/água 2-4 meses	51,00±2,30#	50,13±3,54	196,4±15,11*	83,00±30,54	NP

*difere do grupo C #difere do grupo D

P=paramétrico>ANOVA Tukey; NP=não paramétrico>Kruskal-Wallis+Dunn's

Tabela 2. Análises bioquímicas do sangue de ratos dos grupos C (controle), CR (controle+restrição), D (diabéticos) e DR (diabéticos+restrição)

	C	CR	D	DR
Prot. Totais	5,32±0,19	4,96±0,21	5,5±0,30	5,58±0,59
Triglicerídeos	122,7±19,91	41,0±2,93*	112,7±20,72	26,0±3,29*#
AST	0,496±0,004	0,465±0,010	0,591±0,035*	0,477±0,007#
ALT	0,449±0,01	0,445±0,01	0,678±0,03*	0,493±0,01#

*difere do grupo C #difere do grupo D

Dados Paramétricos>ANOVA Tukey

Tabela 3. Parâmetros quantitativos e morfométricos (μm^2) dos neurônios mientéricos do duodeno de ratos dos grupos C (controle), CR (controle+restrição), D (diabéticos) e DR (diabéticos+restrição)

	C	CR	D	DR
--	---	----	---	----





Nº neurônios	20,41±4,887#	19,84±4,248#	14,37±3,994*	14,26±4,328*
Perfil celular	245,6±55,66#	223,9±49,40#	293,4±42,00*	277,2±48,58*

*difere do grupo C #difere do grupo D
Dados Paramétricos>ANOVA Tukey

O DM2 causou dano hepático como mostrado pelo aumento de AST e ALT. A RA promoveu redução tanto destas enzimas quanto dos níveis de triglicerídeos em relação aos seus controles. O DM2 causou ($p < 0,05$) redução do número e hipertrofia dos neurônios mientéricos do duodeno (Tabela 3). Alterações neuronais no DM2 também já foram observadas em outro modelo de DM2 (SPANGEUS; EL-SALHY, 2001). A RA não gerou nenhum efeito sobre estes parâmetros, apesar de já ter mostrado efeitos positivos no colo proximal (SCHOFFEN *et al.*, 2014).

Conclusões

O modelo de DM2 foi eficiente no desenvolvimento de alterações no duodeno, no entanto, a restrição alimentar não mostrou benefícios para a inervação intrínseca do duodeno.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo auxílio da bolsa PIBIC.

Referências

COWEN, T.; JOHNSON, R. J.; SOUBEYRE, V.; SANTER, R. M. Restricted diet rescues rat enteric motor neurones from age related cell death. *Gut*. 47(5):653-60, 2000.

SPÂNGÉUS. A.; EL-SALHY. M. Myenteric plexus of obese diabetic mice (an animal model of human type 2 diabetes). *Histol Histopathol*. 16(1):159-65, 2001.

SCHOFFEN, J. P.; VICENTINI, F. A.; MARCELINO, C. G.; ARAÚJO, E. J. A.; PEDROSA, M. M. D.; NATALI, M. R. M. Food restriction beginning at lactation interferes with the cellular dynamics of the mucosa and colonic myenteric innervation in adult rats. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 86(4): 1833-1847, 2014.

