AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA SUBPOPULAÇÃO DE NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS NITRÉRGICOS DE RATOS DIABÉTICOS ADMINISTRADOS COM QUERCETINA MICROENCAPSULADA

Fabiana Galvão da Motta Lima (PIC/UEM)[1], Flávia Cristina Vieira Frez[2], Camila Caviquioli Sehaber[2], Jacqueline Nelisis Zanoni[3], Juliana Vanessa Colombo Martins Perles[3] (Orientadora), e-mail: jvcm@uem.br

[1]Acadêmica de Biomedicina – UEM. [2]Laboratório de Plasticidade Neural Entérica UEM / Maringá, PR. [3]Centro de Ciências Biológicas / UEM / Maringá, PR.

Morfologia - Histologia

Palavras-chave: Diabetes mellitus, Sistema Nervoso Entérico, nNOS, Quercetina

Resumo:

O objetivo desse trabalho foi avaliar a subpopulação de neurônios mioentéricos nitrérgicos de ratos diabéticos administrados com quercetina microencapsulada sobre o aspecto morfométrico. Foram utilizados 24 ratos machos Wistar divididos em 4 grupos: normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com quercetina (NQ), diabéticos (D) e diabéticos tratados com quercetina (DQ). Os animais dos grupos D e DQ sofreram indução do DM por injeção de Estreptozootocina por via endovenosa. Os grupos N e D foram submetidos à gavagem utilizando veículo, enquanto que os grupos NQ e DQ foram submetidos, diariamente, à gavagem com quercetina microencapsulada (100 mg/kg). Aos 150 dias de idade, os ratos foram mortos e o jejuno coletado para a realização das técnicas imunohistoquímicas. A análise morfométrica dos neurônios mioentéricos nitrérgicos foi feita com o programa *Image-Pro Plus*. Os resultados foram submetidos ao teste de *One-way Blocked Analysis of Variance* (ANOVA) com pós-teste de Fischer. O nível de significância foi de 5%. A análise morfométrica revelou aumento de aproximadamente 22% nas áreas celulares entre os grupos N e D, aumento de aproximadamente 26% entre os grupos N e NQ e de aproximadamente 16% entre os grupos D e DQ. Conclui-se que a administração da quercetina microencapsulada na dosagem de 100mg/kg de peso corporal é capaz de favorecer a expressão da enzima nNOS sintetase em ratos saudáveis e em ratos diabéticos.

Introdução

O DM pode resultar em disfunções neuronais relacionadas ao sistema nervoso entérico, com consequentes complicações gastrointestinais, como alterações de motilidade. Associa-se o desenvolvimento de neuropatia autonômica diabética com essa condição, afetando os neurônios intrínsecos, células intersticiais de Cajal (CIC) e o músculo liso do trato gastrintestinal (TGI). O movimento peristáltico do intestino delgado é controlado por neurônios secretores de neurotransmissores excitatórios e inibitórios, que em conjunto regulam a contração e o relaxamento do músculo liso da parede do TGI. (NEZAMI,

SRINIVASAN, 2010). A hiperglicemia crônica no DM estimula vias celulares que ocasionam o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) no organismo e a consequente depleção do sistema antioxidante endógeno, por meio da redução do oxigênio molecular. Em excesso, os EROs são prejudiciais, pois podem agredir as proteínas dos tecidos, enzimas, carboidratos e DNA, além de realizar peroxidação dos lipídios de membrana, estado chamado de estresse oxidativo. (LIMA, ABDALLA, 2001).

Um dos principais neurotransmissores inibitórios no TGI é o óxido nítrico (NO), o qual medeia o relaxamento do músculo liso de forma não-colinérgica e não-adrenérgica, inibindo as respostas a estimulações elétricas para contração. A expressão da enzima nNOS (Óxido Nítrico Sintetase), responsável pela conversão da L-arginina em óxido nítrico, pode ser avaliada e correlacionada com a produção do neurotransmissor no SNE, sendo utilizada em diversos estudos como marcador de neurônios produtores de NO. Diversos estudos têm demonstrado que a administração de antioxidantes pode apresentar benefícios no manejo das complicações do DM. Nesse contexto, os flavonoides ganham importância, por estarem presente na dieta humana e possuírem uma estrutura que facilita o sequestro de radicais livres. Dentre esses, destaca-se a quercetina, principal flavonóide da dieta humana e que possui a capacidade de inibir a peroxidação lipídica (BARREIROS, DAVID J M, DAVID J P, 2006). Dessa forma, objetiva-se com esse trabalho avaliar morfometricamente a subpopulação de neurônios mioentéricos nitrérgicos do jejuno de ratos diabéticos administrados com quercetina microencapsulada, na dosagem de 100 mg/kg de peso corporal.

Materiais e métodos

Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (número de protocolo: 073/2014) da UEM. Foram utilizados 24 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) inicialmente com 90 dias de idade, divididos em 4 grupos: animais normoglicêmicos (N), animais normoglicêmicos administrados com quercetina microencapsulada 100mg/kg (NQ), animais diabéticos induzidos pela estreptozootocina (D) e animais diabéticos administrados com quercetina microencapsulada 100mg/kg (DQ).

Os animais dos grupos D e DQ foram submetidos a jejum prévio de quatorze horas, antes de serem injetados com estreptozootocina por via endovenosa (veia peniana), na dose de 35 mg/kg de peso corporal. Foram considerados diabéticos quando os níveis de glicose estivessem acima de 200 mg/dl, valores fornecidos por meio de glicemia capilar. Após confirmação do estabelecimento do modelo experimental, os animais dos grupos D e DQ estavam aptos para a experimentação. Os grupos N e D foram submetidos à gavagem utilizando veículo, enquanto que os grupos NQ e DQ foram submetidos à gavagem com quercetina microencapsulada na dosagem de 100 mg/kg de peso corporal.

Ao final do período experimental, todos os animais foram pesados e mortos. Após celiotomia, o jejuno foi coletado, fixado e dissecado para obtenção

de preparados totais da túnica muscular. Posteriormente, foi realizado a imunohistoquímica para evidenciação dos neurônios mioentéricos imunorreativos à nNOS (nNOS-IR). As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência, com ampliação de 40X, para a realização da análise morfométrica.

Foram mensuradas as áreas (em micrômetros quadrados) de 100 corpos celulares de neurônios mioentéricos imunorreativos para nNOS, por animal, por meio do *software Image-Pro Plus*. Os dados morfométricos foram submetidos ao delineamento em blocos (ANOVA Blocked) seguido de Teste de Fisher (Programa *Statistic* 7.1). O nível de significância foi de 5%.

Resultados e Discussão

A tabela 1 demonstra os dados fisiológicos de cada grupo estudado. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão. Observa-se o estabelecimento do modelo experimental.

Tabela 1 – Dados fisiológicos dos grupos de estudo. (n=6)

Grupos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Glicemia final (mg/dl)
N	351,5 ± 7,7	438,5 ± 9,2	128,1 ± 3,2
NQ	334,8 ± 8,6*	403,0 ± 5,3*	114,0 ± 7,5
D	364,5 ± 8,4*	291,7 ± 8,7$^{\#}$	428,0 ± 10,8$^{\#}$
DQ	367,1 ± 4,0*	284,7 ± 8,0$^{\#}$	399,2 ± 16,0$^{\#}$

Os valores médios seguidos por símbolos diferentes na mesma linha são significativamente diferentes de acordo com teste de Fisher ($p < 0,001$), * quando comparado a N e $^{\#}$ quando comparado a D. Os resultados são expressos como média ± erro padrão.

A tabela 2 apresenta os valores médios encontrados para as áreas dos neurônios mioentéricos nNOS-IR dos grupos estudados. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão.

Tabela 2 – Média da área em µm^2 dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos nNOS-IR dos grupos estudados. (n=6)

	N	NQ	D	DQ
Área	318,8 ± 4,9	400,7 ± 4,8*	389,7 ± 4,9*	452,9 ± 6,4$^{\#}$

As médias seguidas de símbolos diferentes na mesma linha representam diferenças significativas pelo teste de Fisher, * quando $p<0.0001$ quando comparado a N e $^{\#}$ $p<0.001$ quando comparado a D.

Em relação aos grupos N e D, verificou-se aumento de aproximadamente 22% na área média dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos nNOS-IR, achado que está de acordo com observações prévias de outros estudos. Foi observado um aumento aproximado de 26% na área dos neurônios mioentéricos nNOS-IR, na comparação entre os grupos N e NQ, demonstrando que a quercetina possui a capacidade de *up-regulate* a expressão da enzima nNOS sintetase no plexo mioentérico em ratos saudáveis. No entanto, é importante ressaltar que maiores consequências em relação ao aumento da expressão de NO não foram avaliadas nesse estudo, considerando que o aumento da

expressão de um neurotransmissor pode ter significado de neuroproteção ou neurotoxicidade (DEMEDTS et al., 2013).

Também foi verificado um aumento de 16% da área média do corpo celular de neurônios mioentéricos nNOS-IR comparando-se o grupo D com o grupo DQ. Isso demonstra que a quercetina microencapsulada, na dosagem de 100mg/kg de peso corporal, foi capaz de prevenir a redução na expressão de NO ocasionada pelo DM, além de aumentar sua expressão para além já demonstrada no grupo N. Futuros estudos deverão ser realizados para esclarecer as consequências do aumento da área do corpo celular de neurônios mioentéricos nNOS-IR de ratos diabéticos administrados com quercetina na dosagem de 100mg/kg de peso corporal.

Conclusões

Conclui-se que a administração da quercetina microencapsulada na dosagem de 100mg/kg de peso corporal é capaz de favorecer a expressão da enzima nNOS sintetase em ratos saudáveis e em ratos diabéticos.

Agradecimentos

À Fundação Araucária por ter financiado esse estudo.

Referências

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. v.29, n.1, p. 113-123, 2006.

DEDETS, I. et al. Gastrointestinal Motility Changes and Myenteric Plexus Alterations in Spontaneously Diabetic Biobreeding Rats. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**. v.19, n.2, p.161-170, 2013.

LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v.37, n.3, p. 293-303, 2001

NEZAMI, B. H.; SRINIVASAN, S. Enteric Nervous System in the Small Intestine: Pathophysiology and Clinical Implications. **Current Gastroenterology Reports**. v.12, p. 358-365, 2010.