

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO JEJUNO DE RATOS DIABÉTICOS (DIABETES TIPO 2)

Gabriela Scomparin Goularte (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Carlos Vinícius Dalto da Rosa (UEM), Maria Raquel Marçal Natali (Orientadora), e-mail: mrmnatali@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas-Maringá, PR.

Ciências Biológicas - Morfologia - Histologia

Palavras-chave: diabetes mellitus, jejuno, morfofisiologia.

Resumo:

O Diabetes Mellitus (DM) gera alterações na morfologia intestinal. Neste trabalho foi realizada diabetização por estreptozotocina associada a dieta estilo cafeteria caracterizando o modelo de DM 2 e avaliar possível repercussão sobre o jejuno de ratos. Animais do grupo diabético receberam dieta estilo cafeteria nos 2 primeiros meses, seguida de ração padrão e do grupo controle receberam solução salina e ração padrão. Além da glicemia foi avaliado o consumo de ração e água. Após eutanásia, amostras do jejuno foram coradas em HE para análise morfométrica, e histoquímica PAS e Alcian Blue para quantificação de células calciformes produtoras de mucinas neutras e ácidas. As características morfológicas do jejuno foram mantidas, porém com redução significativa em algumas túnicas no grupo diabético, além da redução de células calciformes produtoras de mucinas neutras. O modelo de diabetização foi eficiente no desenvolvimento do DM 2 com repercussões sobre parâmetros morfométricos do jejuno de ratos.

Introdução

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica que, pode ser dividida em dois principais tipos: tipo 1 (insulino dependente) e tipo 2 (insulino independente). Diferentes estudos relatam alterações morfológicas na parede intestinal na presença do DM (ADACHI et al., 2003), sendo que muitas destas alterações são correlacionadas a hiperfagia que é causada pela doença. O presente estudo propõe-se a fazer uma análise quanto aos parâmetros fisiológicos do rato e histológicos e morfométricos da parede jejunal que são alterados na vigência do DM tipo 2, incluindo a quantificação de células produtoras de mucinas neutras e ácidas.

Materiais e métodos

Foram utilizados 10 ratos machos Wistar, distribuídos em dois grupos (n=5): grupo controle (C) e grupo diabético (D). O delineamento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/UEM (Parecer 7590050415/2015). Animais do grupo diabético tiveram suas glicemias mensuradas e submetidos ao protocolo de diabetização após jejum noturno (15 horas), sendo anestesiados com injeção intraperitoneal (ip) de ketamina/xilazina (100/10 mg/Kg), seguida de injeção via intravenosa de

estreptozotocina (35 mg/kg de massa corporal; Sigma), dissolvida em tampão citrato, pH 4,5. Estes animais também receberam dieta estilo cafeteria acrescida de água com açúcar (32%) durante 2 meses e, após, ração padrão até completar 4 meses. Os animais do grupo controle passaram pelo mesmo processo, porém receberam apenas solução salina via intravenosa e ração padrão para roedores *ad libitum* (NUVILAB-NUVITAL®).

Após quatro meses, os animais foram anestesiados intraperitonealmente e eutanasiados com Tiopental sódico (Thionembutal®) (120mg/kg). Realizou-se a laparotomia vertical, o intestino delgado foi coletado e mensurado, isolou-se amostras do jejuno que foram lavadas em tampão fosfato salinado e fixadas em paraformaldeído 4%. Posteriormente as amostras foram processadas histologicamente e coradas em Hematoxilina e Eosina (HE), e reação histoquímica PAS (Ácido Periódico de Schiff) e Azul de Alcian (AB). Analisou-se a parede total e morfometria das túnicas mucosa, submucosa, muscular externa, altura dos vilos e profundidade das criptas jejunais nos cortes em HE em 100 pontos/animal, bem como a quantificação das células caliciformes produtoras de mucinas neutras (PAS) e ácidas (AB), obtendo o índice de células caliciformes (ROSA et al., 2015). Os dados obtidos foram analisados com auxílio do programa estatístico GraphPadPrisma. Inicialmente foram submetidos ao teste Kolmogorov-Smirnov (K-S) para a verificação da normalidade. Para os dados paramétricos foi utilizado o teste T pareado. Os resultados foram expressos como média* ± erro padrão e nível de significância de (p<0,05).

Resultados e Discussão

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do DM tipo 2 sobre a morfofisiologia intestinal do jejuno de ratos *Wistar* com diabetização por estreptozotocina e dieta estilo cafeteria. Constatamos que este modelo foi eficiente no desenvolvimento de alterações características do DM2, tais como hiperglicemia, polifagia e polidipsia (Tabela 1).

Não houve influência do DM2 no comprimento do intestino delgado, bem como na morfologia do jejuno que manteve a organização histológica padrão. A análise morfométrica indica que houve redução significativa na altura das vilosidades, profundidade das criptas e na espessura da túnica submucosa e parede total (Tabela 2).

Tabela 1 - Mensuração da glicemia (mg/dL), massa corporal (g) durante os 4 meses de tratamento, consumo de ração (g) e consumo de água (mL) durante os períodos de 0-2 meses (dieta estilo cafeteria) e de 2-4 meses (ração padrão) de ratos dos grupos controle (C) e diabético (D). Resultados expressos como média* ± erro padrão (n=5/grupo).

| Variáveis | C | D |
|------------------------|--------------|---------------|
| Glicemia Final (mg/dL) | 78,00±5,09*a | 341,6±39,53*b |
| Massa corporal (g) | 489,8±9,31*a | 334,8±10,68*a |
| Consumo ração 0-2m(g) | 31,8±0,36*a | 49,5±1,29*b |
| Consumo ração 2-4m (g) | 29,3±0,37*a | 47,5±1,12*b |
| Consumo água 0-2m(mL) | 58,4±4,99*a | 237,3±27,44*b |
| Consumo água 2-4m (mL) | 51,0±2,30*a | 196,4±15,11*b |

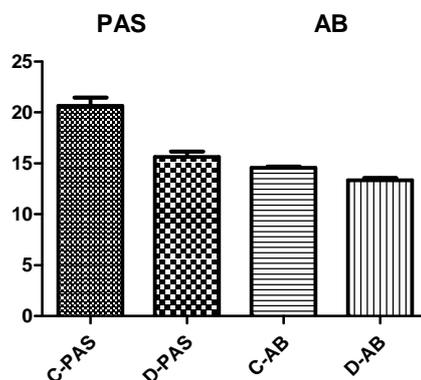
Tabela 2 - Comprimento total do intestino delgado (cm), espessura (μm) da parede total e tûnicas mucosa, submucosa, muscular externa e altura dos vilos e profundidade das criptas de jejuno de ratos dos grupos controle (C) e diabético (D) aos 120 dias. Resultados expressos como média \pm erro padrão (n=5/grupo).

| Variáveis | C | D |
|--|---------------------|---------------------|
| Intestino Delgado (cm) | 122,8 \pm 2,634*a | 144,4 \pm 3,234*a |
| Parede total (μm) | 652,1 \pm 5,251*a | 567,5 \pm 5,270*b |
| Mucosa (μm) | 531,4 \pm 4,903*a | 471,9 \pm 4,262*a |
| Submucosa (μm) | 40,76 \pm 0,711*a | 36,34 \pm 0,796*b |
| Muscular externa (μm) | 75,23 \pm 1,459*a | 67,36 \pm 1,580*a |
| Altura vilos (μm) | 377,7 \pm 4,315*a | 350,9 \pm 3,794*b |
| Profundidade criptas (μm) | 114,5 \pm 1,643*a | 101,6 \pm 0,919*b |

A redução obtida para alguns parâmetros morfométricos intestinais divergem dos obtidos por MCANUFF et al., 2003, que obtiveram aumento na espessura das tûnicas mucosa, submucosa e muscular externa, com destaque ao aumento da altura e volume das criptas e vilosidades em ratos diabéticos do tipo 1, tais eventos decorrem do aumento da área de absorção de nutrientes devido a hiperfagia típica do diabetes também induzida por estreptozotocina no entanto sem associação a dieta estilo cafeteria. Resultados frequentes na literatura (STENKAMP-STRAHM et al., 2013) indicam redução no número de neurônios entéricos decorrentes do DM, assim o envolvimento da inervação entérica no controle da proliferação celular da parede intestinal influenciando sua espessura deve ser considerada.

Houve redução significativa do índice de células caliciformes produtoras de mucinas neutras na mucosa jejunal de ratos diabéticos com relação aos controles (Figura 1). Esses dados estão de acordo com MANTLE et al., 1989, que constataram redução significativa na expressão de mucinas presentes nas células caliciformes em ratos diabéticos tipo 1 após 5 semanas de indução com estreptozotocina.

Figura 1 - Índice de células caliciformes produtoras de mucinas neutras e ácidas presentes no jejuno de ratos dos grupos controle (C) e diabético (D), em reação histoquímica PAS (mucinas neutras) e reação histoquímica AB (mucinas ácidas). C-PAS x D-PAS \neq (p<0,05). Resultados apresentados como média \pm EP (n=5/grupo)



Conclusões

A diabetização por estreptozotocina e dieta estilo cafeteria resultou em um modelo eficiente no desenvolvimento do DM tipo 2 com repercussões

sobre parâmetros morfométricos do jejuno de ratos mantidos diabéticos por 120 dias.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo auxílio da bolsa PIBIC, a orientação da professora Dr^a. Maria Raquel Marçal Natali e coorientação do doutorando Carlos Vinicius Dalto da Rosa.

Referências

ADACHI, T. et al. Morphological changes and increased sucrase and isomaltase activity in small intestines of insulin-deficient and type 2 diabetic rats. **Endocrine Journal**, Tokyo, v. 50, no. 3, p. 271-279, 2003.

MANTLE, M. et al. Effects of streptozotocin diabetes on rat intestinal mucin and goblet cells. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 97, no. 1, p. 68-75, 1989.

MCANUFF, M. A. et al. Alterations in intestinal morphology of streptozotocin-induced diabetic rats fed Jamaican bitter yam (*Dioscorea polygonoides*) steroidal saponin extract. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 23, no. 11, p. 1569-1577, 2003.

ROSA, C. V. D. et al. Supplementation with L-Glutamine and L-Alanyl-L-Glutamine changes biochemical parameters and jejunum morphophysiology in type 1 diabetic wistar rats. **PloS One**, San Francisco, v. 10, no. 12, e0143005, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4681705>>. Acesso em: 27 jul. 2017.

STENKAMP-STRAHM, C. M. et al. High-fat diet ingestion correlates with neuropathy in the duodenum myenteric plexus of obese mice with symptoms of type 2 diabetes. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 354, no. 2, p. 381-394, 2013.