

ESTUDO DA DENSIDADE DAS CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL EM RATOS DIABÉTICOS ADMINISTRADOS COM QUERCETINA MICROENCAPSULADA

Rafael Campos do Nascimento¹ (PIC/CNPq/FA/Uem), Flávia Cristina Vieira Frez², Camila Caviquioli Sehaber², Juliana Vanessa Colombo Martins Perles³ Jacqueline Nelisis Zanon³ (Orientador), e-mail: zanonijn@gmail.com

¹Universidade Estadual de Maringá /²Laboratório de Plasticidade Neural Entérica UEM / Maringá, PR. ³ Departamento de Ciências Morfológicas.

Morfologia e Histologia.

Palavras-chave: células intersticiais de Cajal, diabetes, Quercetina microencapsulada

Resumo:

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da quercetina microencapsulada (QM), 10mg/Kg sobre as células intersticiais de Cajal (CIC) do jejuno de ratos diabetizados com estreptozotocina (35mg/k). Ratos machos Wistar foram distribuídos em 4 grupos (n=6): Normoglicêmicos (N); normoglicêmicos administrados com quercetina (NQM); Diabéticos (D) e diabéticos administrados com quercetina (DQM) por gavagem. Após 60 dias de protocolo experimental os ratos aos 150 dias de idade foram mortos e o jejuno coletado e processado para a realização da técnica imunohistoquímica para CIC (marcador Ano1-TMEM16A) na túnica muscular longitudinal e na muscular circular profunda. A quantificação foi realizada em 32 campos microscópicos aleatórios. Foi observada uma redução da densidade das CIC MY e DMP nos animais diabéticos em relação aos normoglicêmicos (grupo N) ($p < 0,0001$). A administração com quercetina microencapsula (Grupo DQ) restaurou a densidade em 49 % e 18 % para as CIC -MY e DMP, respectivamente ($p < 0,0001$). No grupo NQ houve um aumento da densidade da CIC-MY e DMP em relação ao grupo N ($p < 0,0001$). O Diabetes reduziu a densidade das CIC-DMP e MY imunorreativas a proteína Ano1 no jejuno de ratos e a administração com quercetina (10mg/Kg) foi capaz de prevenir essa alteração apresentando um possível efeito proliferativo nas células de Cajal, o que poderia estar atuando positivamente no controle da motilidade do trato gastrointestinal.

Introdução

O diabetes mellitus, em consequência de uma hiperglicemia crônica, leva a um estresse oxidativo reduzindo da atividade de enzimas antioxidantes e elevando a produção de radicais livres que podendo induzir a apoptose das células intersticiais de Cajal (CIC). Estas células são responsáveis pela contração coordenada das células musculares lisas do intestino por atuarem como marca-passo na conexão entre as células musculares e os neurônios

entéricos (Kostitska et al, 2015). Dessa maneira, a utilização de uma terapia antioxidante poderia ter um efeito positivo, reduzindo os efeitos da produção descontrolada de radicais livres em pacientes com diabetes crônico. A quercetina têm sido estudada para esse fim como tendo relevante potencial antioxidante, e em nanopartículas de polímero, a quercetina apresentou melhora na inibição da produção de radicais livres (Pool et al, 2012). Sendo assim o objetivo desse trabalho foi analisar os efeitos da quercetina microencapsulada (10mg/Kg) sobre a densidade das CIC do jejuno de ratos diabéticos.

Materiais e métodos

Foram utilizados 24 ratos machos Wistar que iniciaram o experimento com 90 dias de idade (protocolo n.073/2014). Os animais foram distribuídos em 4 grupos com 6 animais cada: normoglicêmicos (N); normoglicêmicos tratados com quercetina microencapsulada (10mg/Kg - CQM); Diabéticos (D) e diabéticos administrados com quercetina microencapsulada (10mg/Kg - DQM). O diabetes foi induzido por estreptozotocina (35mg/ Kg endovenoso) e após 4 dias iniciou-se o período experimental de tratamento que durou 60 dias onde administrou-se o flavonóide por gavagem diariamente. Após os ratos foram anestesiados com tiopental (40mg/Kg) e mortos, o jejuno foi coletado sendo fixados e dissecados para obtenção de preparado total da camada muscular longitudinal (CIC-MY) e muscular circular profunda (DMP), processados para a realização de técnicas de imunohistoquímica para evidenciação das CIC (marcador Ano1-TEMEM16A). Na sequência foi feita a captura de 32 imagens aleatórias em objetiva de 40x, seguida de quantificação no programa Image Pro Plus4. Todos os resultados foram submetidos à ANOVA seguida do teste de Fisher pelo programa Statistic 7.1. O nível de significância foi de 5%.

Resultados e Discussão

Foi observada uma redução da densidade das CIC MY e DMP nos animais diabéticos em relação aos normoglicêmicos (grupo N) ($p < 0,0001$). A administração com quercetina microencapsulada (Grupo DQ) restaurou a densidade em 49 % e 18 % para as CIC -MY e DMP, respectivamente ($p < 0,0001$, Tabela1). No grupo NQ houve redução da densidade da CIC-DMP em relação ao grupo N ($p < 0,0001$, Tabela1).

A redução no número de CIC imunorreativas a Ano1 nas células do tipo MY e DMP nos animais diabéticos é um fenômeno esperado, uma vez que a literatura demonstra que diabetes mellitus aumenta o estresse oxidativo levando a apoptose dessas células (Kostitska et al, 2015). O uso da quercetina microencapsulada conseguiu reverter este quadro nos animais diabéticos tratados, como também, estimulou a proliferação destas células nos grupos normoglicêmicos tratados, esta evidência foi observada nos dois tipos celulares estudados. Esse aumento se deve provavelmente a uma plasticidade celular induzida pela quercetina, que aumenta a expressão de proteínas mitocondriais em neurônios e células musculares facilitando a divisão celular (Diaz; Moraes, 2008). Esse aumento da

maquinaria celular foi observado em outros tipos celulares de origem mesenquimal, como células musculares e em neurônios em estudos feitos com esse flavonóide, por estimulação da expressão de RNA mitocondrial e citocromo c (Davis et al, 2009).

Tabela 1- Resultados de quantificação de CIC/cm² nos preparados totais das CICs MY e DMP dos grupos: N (normoglicêmicos), D (diabéticos), NQM (normoglicêmicos tratados com quercetina) e DQM (diabéticos tratados com quercetina) 10 mg/kg. Resultados expressos em média ± erro padrão (n = 6).

GRUPOS	N	NQM	D	DQM
MY	18.155±350	18.501± 320*	13.116 ±300*	19.572 ±330**
DMP	13.694±260	14.854±240*	12.912±240*	15.874 ±250**

Médias seguidas por símbolos diferentes na mesma linha são significativamente diferentes, *onde p<0,001 quando comparado a N e ** p<0,0001 quando comparado a D.

Ao contrastar a densidade de células nos grupos D e DQM, é possível observar um aumento significativo no número dessas no grupo tratado, esse fato se deve provavelmente, ao efeito antioxidante da quercetina reduzindo a apoptose celular induzida por dano oxidativo—parece estimular cascatas de sobrevivência em neurônios, como outros flavonóides, quando em baixas concentrações plasmáticas, bloqueando a fosforilação das proteínas JNK e p38 MAPK, que participam das vias pró-apoptóticas (Spencer, 2013). Além da possível plasticidade induzida por proliferação mitocondrial já descrito por acima por Davis et al (2009).

Conclusões

O diabetes melittus por um período experimental de 60 dias, reduziu a densidade das CIC- MY e DMP imunorreativas a proteína Ano1, em contra partida, o tratamento com a quercetina microencapsulada reverteu este quadro atuando no aumento destas células e uma provável melhora nos quadros de dismotilidade intestinal causado pela doença.

Agradecimentos

Agradecimentos a Fundação Araucária e a CAPES pelo auxílio financeiro, ao Prof. Dr. Waldiceir A. Verri Jr do Departamento de Ciências da UEL por fornecer a quercetina microencapsulada utilizada no experimento.

Referências

DAVIS, J. Mark et al. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 4, p. R1071-R1077, 2009.

DIAZ, Francisca; MORAES, Carlos T. Mitochondrial biogenesis and turnover. **Cell calcium**, v. 44, n. 1, p. 24-35, 2008

-KOSTITSKA, I. O. et al. Morphological Aspects of Diabetic Gastroparesis. **Galician Medical Journal**, v. 22, n. 4, p. 8-12, 2015

POOL, Hector et al. Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 86, 2012.

-SPENCER, Jeremy PE; RICE-EVANS, Catherine; WILLIAMS, Robert J. Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 37, p. 34783-34793, 2013.