

AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE BRILHO DAS CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL DO JEJUNO DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM QUERCETINA MICROENCAPSULADA

Lucas Brunati Gremaschi¹ (PIBIC/CNPq-FA-UEM), Flávia Cristina Vieira Frez², Camila Caviquioli Sehaber², Jacqueline Nelisis Zanoni², Marcílio Hubner de Miranda Neto³ (Orientador), e-mail: hubnermar@uem.br.

¹Universidade Estadual de Maringá / ²Laboratório de Plasticidade Neural Entérica UEM / Maringá, PR. ³Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas; Morfologia

Palavras-chave: diabetes mellitus, quercetina microencapsulada, células intersticiais de Cajal.

Resumo:

O objetivo do trabalho foi investigar os efeitos da administração de quercetina microencapsulada (100mg/Kg) sobre a imunoreatividade emitida pelas células intersticiais de Cajal (CIC) evidenciadas através da imunomarcagem da proteína TEMEM 16A no jejuno de ratos com diabetes mellitus. Foram utilizados 24 ratos machos Wistar com 90 dias de idade, distribuídos em 4 grupos: normoglicêmicos (N), normoglicêmicos administrados com quercetina microencapsulada (100mg/Kg -NQ), diabéticos (D) e diabéticos administrados com quercetina microencapsulada (100mg/Kg - DQ). Após 60 dias de período experimental foram avaliadas a imunoreatividade nas CIC da túnica muscular longitudinal e da muscular profunda através do programa ImageJ. A redução da intensidade de imunoreatividade das CIC -MY foi observada no grupo D (18%, $p < 0,001$) e no grupo NQ (15%, $p < 0,001$) em relação ao grupo N. A administração com quercetina não alterou a intensidade de imunoreatividade quando foi comparado o grupos DQ em relação a D ($p > 0,05$). Nas CIC-DMP no grupo D apresentou um aumento na imunoreatividade em 21,5% e 22,5% em relação a N e DQ, respectivamente ($p < 0,001$). A quercetina microencapsulada na concentração utilizada (100mg/kg) não foi capaz de reverter os danos do diabetes mellitus às CIC do jejuno de ratos diabéticos.

Introdução

O diabetes mellitus (DM) está relacionado com morbidade considerável, incapacitações e encurtamento da vida útil. Os principais eventos envolvidos na patogênese da diabetes estão relacionados a alterações vasculares, metabólicas, autoimunes, além da neuropatia diabética (American Diabetes Association, 2012)

Essas alterações neurais são atribuídas à hiperglicemia, considerada a principal desencadeadora do estresse oxidativo no diabetes, este desequilíbrio entre os antioxidantes celulares e as espécies reativas de oxigênio leva a danos às células por afetar proteínas e membranas das células e causar lesões oxidativas (Potenza, 2009).

Tais comprometimentos podem afetar todo o sistema nervoso, inclusive o Sistema Nervoso Entérico, responsável também pela motilidade do trato gastrointestinal. A motilidade gastrointestinal, além da inervação entérica, também é regulada por células marca-passo específicas, conhecidas como células intersticiais de Cajal (CIC), que tem por função a geração e propagação de ondas elétricas lentas (Wedel et al., 2006).

As CIC estão localizadas ao longo de todo o trato digestório, distribuídas nas camadas do tubo digestório. Porém, as CIC se concentram principalmente nas camadas longitudinal externa (CIC-MY) e muscular circular interna (CIC-DMP) (Wedel et al., 2006). O marcador imuno-histoquímico específico das CIC é a TEMEM16A, também conhecida como Ano1, uma proteína transmembrana que atua na regulação dos canais de Ca^{2+} e Cl^{-} (Ferreira et al., 2009). O diabetes mellitus compromete as redes de CIC, estudos vêm relacionando o uso de antioxidantes, como a quercetina, com melhora na expressão destas células (Frez et al., 2017). A proposta desta pesquisa é realizar a avaliação da imunoreatividade emitida das CIC MY e DMP na túnica muscular longitudinal e a circular profunda, respectivamente, em ratos diabéticos após administração com quercetina microencapsulada.

Materiais e métodos

O tratamento dos animais ocorreu após a aprovação do comitê de ética experimental da UEM, sob n.073/2014. Ratos adultos machos da linhagem Wistar com 90 dias de idade, foram separados em 4 grupos experimentais com 6 animais, grupo (N) corresponde a animais normoglicêmicos, o grupo NQ animais normoglicêmicos administrados com quercetina microencapsulada (100 mg/kg), o grupo D animais diabéticos e, por fim, o grupo DQ animais diabéticos administrados com quercetina microencapsulada (100 mg/kg). Os animais foram diabetizados com o uso de estreptozotocina via peniana dose de 35 mg/Kg de animal.

Após 60 dias de tratamento por gavagem, os animais foram eutanaziados, o sangue coletado por punção cardíaca para avaliação da glicemia para a confirmação do estado diabético. Após o intestino delgado foi coletado e processado para as técnicas de avaliação imunohistoquímica para evidenciação das CIC no jejuno. Para tanto, foram utilizados dois preparados totais da túnica muscular, para obtenção da muscular longitudinal externa (CIC-MY) e muscular circular profunda (CIC-DMP), para evidenciação da proteína Ano1.

As imagens foram capturadas por câmera de alta resolução AxioCam (Zeiss, Jena, Alemanha), acoplada ao microscópio de fluorescência Axioskop Plus (Zeiss), transferidas para microcomputador por meio do programa AxioVision 4 versão 4.1 e gravadas. O software de análise de imagens ImageJA® versão 1.43o (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, EUA) foi utilizado para a quantificação da intensidade imunoratividade em RGB (Red-Green-Blue) emitido nas imunomarcações. A análise estatística utilizada o delineamento em blocos (ANOVA Blocked) seguido de Teste de Fisher (Programa Statistic 7.1). O nível de significância foi inferior a 5%.

Resultados e Discussão

Observamos uma diminuição na intensidade de brilho emitida pelas CIC MY nos grupos NQ e D em uma proporção de 15% e 18%, respectivamente quando comparados a N ($p < 0,0001$), não houve diferença significativa do grupo DQ em comparação ao grupo D ($p > 0,05$). Nas células DMP localizadas mais internamente na musculatura intestinal os resultados evidenciaram que houve um aumento na expressão destas células nos animais do grupo D quando comparado com o grupo N e DQ, na proporção de 21% e 22,5% respectivamente ($p < 0,0001$), Tabela 1.

Tabela 1: Intensidade de brilho em RGB dos grupos experimentais N, NQ, D e DQ, expressos em média \pm erro padrão, $n=6$.

	MY	DMP
N	31.597 \pm 442,9	21.109 \pm 440,4
NQ	26.331 \pm 932,7*	17.384 \pm 250,7 *
D	25.907 \pm 296,3 *	25.611 \pm 290,3 *
DQ	25.605 \pm 304,1	19.672 \pm 382,5 #

Os valores médios seguidos por símbolos diferentes na mesma linha são significativamente diferentes de acordo com teste de fisher * ($p < 0,0001$) quando comparado com N, # ($p < 0,0001$) quando comparado com D. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão.

A diminuição da expressão de proteínas imunorreativas a Ano1 das CIC MY nos animais diabéticos são compatíveis com a literatura, já que estudos demonstram que a diabetes melitos é capaz de levar à morte dessas células através do estresse oxidativo (Frez et al, 2017). Contudo, ao contrário do que se esperava, os grupos experimentais tratados com quercetina microencapsulada na concentração de 100mg/kg não só não apresentou benefícios aparentes em relação à preservação da intensidade de brilho das CIC, como também, apresentaram uma piora desse parâmetro em relação as CIC DMP. Estes achados sugerem que a relação concentração-dependente pode ter gerado um efeito pró-oxidante nesta concentração, causando uma diminuição significativa da expressão desta proteína e conseqüentemente desencadeando prováveis alterações na geração e propagação de impulsos eletroquímicos sobre a musculatura lisa do jejuno o que altera a motilidade do trato gastrointestinal. Estudos mostram que os efeitos pro-oxidantes da quercetina são diretamente proporcionais a concentração da droga, de radicais livres e o número de hidroxilas na molécula, e da conversão da mesma em o-quinona, levando a formação de superóxidos e peróxido de hidrogênio e aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial levando a sua disfunção, além de causar a inibição da cadeia respiratória, reduzindo o níveis de ATP induzindo necrose. Seguindo esse raciocínio, a redução das CIC nos ratos diabéticos administrados com quercetina pode ser resultado desses mesmos mecanismos. Convém avaliar doses menores para que seja detectada a atividade antioxidante efetiva no mesmo modelo utilizado neste estudo.

Conclusões

O Diabetes por um período experimental de 60 dias reduziu e intensidade de brilho das CIC MY e DMP sendo assim, é possível concluir que o tratamento com quercetina microencapsulada (100mg/kg) não foi capaz de prevenir os danos causados naturalmente pela doença, além disso, é necessário maiores investigações sobre um possível efeito pró-oxidante da quercetina microencapsulada na concentração de 100mg/kg sobre estas células.

Agradecimentos

À Fundação Araucária por ter financiado esse estudo.

Referências

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Diagnosis and classification of diabetes mellitus**. Diabetes Care, v. 35: S64–S71 p. 2012.

FERRERA, LORETTA et al. **Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing**. Journal of Biological Chemistry, v. 284, n. 48, p. 33360-33368, 2009.

FREZ, FCV; PERLES, JVMC; LINDEN, D. **Restoration of density of interstitial cells of Cajal in the jejunum of diabetic rats after quercetin supplementation**. Revista Espanhola de Enfermidades Digestivas, v. 109, n 3, p 190-195, 2017.

POTENZA, M.A.; GAGLIARI, S.; NACCI, C, et al., **Endothelial dysfunction in Diabetes: From mechanisms to therapeutic targets**. Current Medicinal Chemistry, v.16, n 1, p 94-112, 2009.

WEDEL T.; SPIEGLER J.; SOELLER S.; ROBLICK UJ.; SCHIEDECK THK.; BRUCH HP.;KRAMMER HJ.: **Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow transit constipation and megacolon**. Gastroenterology, v. 123, p.1459-67, 2006.