

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA POPULAÇÃO NEURONAL ENTÉRICA IMUNORREATIVOS À PROTEÍNA HUC/D DE RATOS DIABÉTICOS SUPLEMENTADOS COM QUERCETINA MICROENCAPSULADA.

José Augusto de Oliveira Dias (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Camila Caviquioli Sehaber (CCS/PCF), Flávia Cristina Vieira Frez (CCS/PCF), Juliana Vanessa Colombo Martins Perles (CCB/DCM), Jacqueline Nelisis Zanoni (Orientadora), e-mail: zanonijn@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Morfologia/ Histologia

Palavras-chave: Diabetes mellitus, Sistema nervoso entérico, Quercetina.

Resumo:

O objetivo desse projeto foi avaliar o efeito antioxidante da administração com quercetina microencapsulada sobre a inervação entérica sob o aspecto quantitativo da população geral de neurônios mioentéricos em modelo experimental de diabetes *mellitus*. Foram utilizados neste estudo ratos adultos machos com 90 dias de idade, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) distribuídos em quatro grupos com 6 animais cada: normoglicêmico (C), normoglicêmico quercetina (Q), diabético (D), diabético quercetina (DQ). O diabetes foi induzido experimentalmente por estreptozotocina endovenosa na dosagem de 35 mg/Kg nos grupos D e DQ. Os animais dos grupos quercetina (Q e DQ) foram administrados com quercetina microencapsulada por meio de gavagem na concentração de 100 mg/Kg. Ao final de 60 dias do período experimental, os animais foram eutanaziados e o íleo foi coletado para ser submetido à técnica de imunohistoquímica para proteína HuC/D. Foi avaliada a densidade dos neurônios mioentéricos em 32 campos microscópicos aleatórios. O diabetes reduziu o número de neurônios HuC/D-IR mioentérico em 29,82% no grupo D em comparação com o grupo C. No grupo diabético suplementado com quercetina (DQ) não houve diferença significativa na densidade neuronal em comparação com animais diabéticos (D). Animais normoglicêmicos suplementado com quercetina (grupo Q) apresentaram 19,84% menos neurônios do que o C grupo. Podemos concluir que em animais saudáveis a suplementação com quercetina microencapsulada na concentração de 100 mg/Kg atuou como pró-oxidante, em decorrência da diminuição neuronal expressada no grupo Q. Ao avaliarmos os animais doentes, a suplementação não apresentou proteção neuronal.

Introdução

A disfunção do Sistema Nervoso Entérico no diabetes está diretamente relacionada aos efeitos dos radicais livres que estão aumentados por meio de diversas vias, entre elas a via dos polióis, via do sorbitol, produtos finais de glicação avançada. Os danos se originam através da peroxidação lipídica das membranas do axônio e das células de Schwann, levando a uma diminuição da função das células nervosas como também da diminuição das defesas antioxidantes (CAMERON et al., 1993). Os antioxidantes são substâncias capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, sequestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos. Eles protegem organismos aeróbicos do estresse oxidativo, definido como elevação na formação de espécies reativas de oxigênio (RODRIGUES et al., 2003). A quercetina é a principal representante da subclasse flavonol da família dos flavonoides, distribuída universalmente em várias plantas comestíveis e um dos mais potentes antioxidantes de origem vegetal (JAIN et al., 2014). Dessa forma o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito antioxidante da administração com quercetina microencapsulada sobre a inervação entérica sob o aspecto quantitativo de sua população neuronal.

Materiais e métodos

Foi utilizado neste estudo o íleo de ratos adultos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), variedade *albinus*, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. (PARECER DO COMITE DE ÉTICA: 073/2014). Os animais foram tratados e sacrificados seguindo esses procedimentos: Aos 86 dias de idade, os animais foram transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas em caixas providas de bebedouro e comedouro, e mantidos em condições ambientais controladas de temperatura (22°C) e iluminação (ciclo 12 horas claro/12 horas escuro). Os animais dos grupos D e DQ foram submetidos a jejum prévio de quatorze horas, antes de serem injetados com estreptozotocina por via endovenosa (veia peniana), na dose de 35 mg/kg de peso corporal para a indução do diabetes. Após um período de adaptação ao novo ambiente, os ratos estavam com 90 dias de idade, foram disponibilizados para o período experimental que teve duração de 60 dias. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, contendo 6 animais cada. Os animais dos grupos Q e DQ passaram a receber diariamente quercetina microencapsulada na dosagem de 100 mg/Kg de peso corporal via gavagem. Os animais dos grupos C e D não receberam a suplementação sendo os respectivos controles. Aos 150 dias de idade foi realizado a eutanásia dos animais e o íleo foi coletado e processado para evidencição de neurônios mioentéricos imunorreativos a proteína HuC/D em preparados totais da túnica muscular. A quantificação dos neurônios HuC/D- IR foi realizada em 32 campos microscópicos aleatórios, convertidos posteriormente para neurônios/cm². Os resultados foram submetidos a análise estatística e o nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados e Discussão

O diabetes reduziu o número de neurônios HuC/D-IR mioentéricos em 29,82% no grupo D em comparação com o grupo C ($p < 0,05$). A administração com quercetina nos animais diabéticos (DQ) não impediu a redução da densidade neuronal em comparação com animais diabéticos (D) ($p > 0,05$). Os animais normoglicêmicos administrados com quercetina (grupo Q) apresentaram diminuição de 19,84% neuronal que o Grupo C, esses dados estão demonstrados na Tabela 1. Fotomicrografias representativas são mostradas na Figura 1.

Tabela 1. Densidade neuronal no íleo em neurônios mioentéricos imunomarcados por HUC/D (neurônios / cm^2). Grupos experimentais: normoglicêmico (C); normoglicêmico suplementado com quercetina microencapsulada 100 mg/Kg (Q); diabético (D) e diabético suplementado com quercetina microencapsulada 100 mg/Kg (DQ), $n=6$ animais por grupo.

Densidade	Grupos experimentais			
	C	Q	D	DQ
Neurônios mioentéricos HuC/D-IR	45432±1059 ^a	36408±1336 ^b	31857±1029 ^c	31725±1006 ^c

Os resultados foram submetidos ao teste de *One-way blocked analysis of variance* (ANOVA Blocked) com pós-teste de *Fisher*. Em uma mesma linha letras iguais significam $p > 0,05$, letras diferentes significam $p < 0,05$.

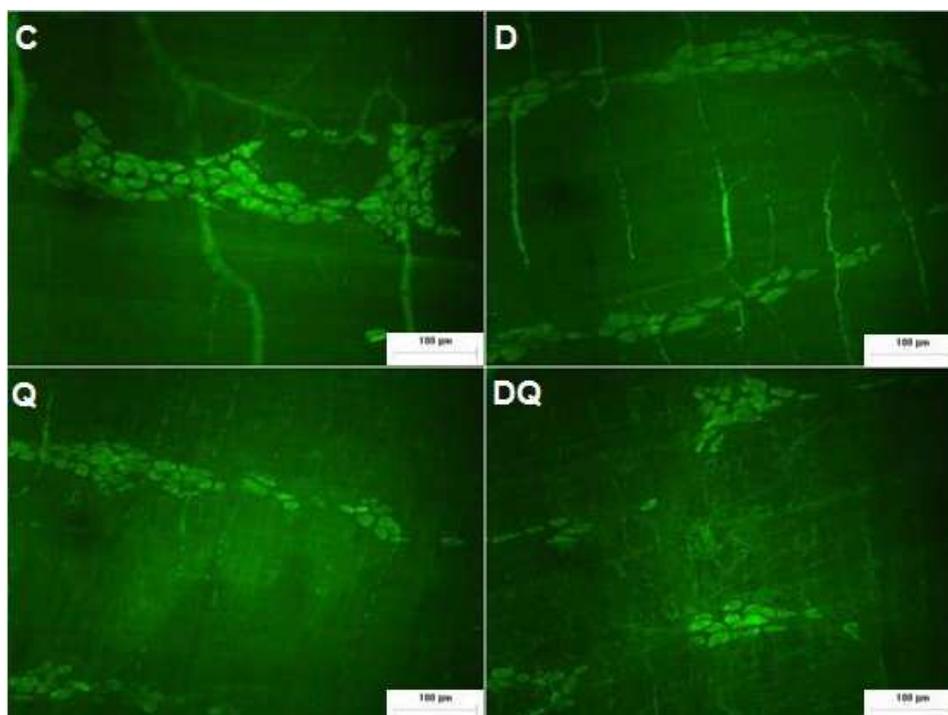


Figura 1 - Fotomicrografia mostrando células imunoreativas a proteína HuC/D do íleo de ratos normoglicêmico (C), normoglicêmico quercetina (Q), diabético (D), diabético quercetina (DQ). Os animais dos grupos quercetina (Q e DQ) foram suplementados com quercetina

microencapsulada por meio de gavagem na concentração de 100 mg/Kg. Barra de calibração= 100 µm.

O modelo experimental de neuropatia entérica diabética foi comprovado efetivamente pela morte neuronal significativa do grupo D. A morte neuronal está relacionada ao estresse oxidativo, decorrente das alterações de vias metabólicas que culminam no aumento de espécies reativas, sendo o principal fator responsável por dano causado pelo diabetes ao Sistema Nervoso Entérico. Em diabéticos a hiperglicemia gera estresse oxidativo, levando a morte do neuronal pela apoptose e consequentes mudanças na motilidade do trato gastrointestinal, incluindo casos de constipação e diarreia. Os tecidos intestinais tornam-se ainda mais suscetíveis ao estresse oxidativo em vista das deficiências de antioxidantes associados à diabetes (PEREIRA et al., 2016). A administração com quercetina nos animais diabéticos não reverteu a neuropatia instalada. Por outro lado, doses elevadas de antioxidantes podem atuar como potenciais pró-oxidantes que acarretam um aumento no quadro de estresse oxidativo (JAIN et al, 2014), essa característica foi demonstrada no grupo Q, o qual apresentou diminuição na densidade neuronal em animais saudáveis.

Conclusões

Podemos concluir que em animais saudáveis a suplementação com quercetina microencapsulada na concentração de 100 mg/Kg atuou como pró-oxidante, em decorrência da diminuição neuronal expressada no grupo Q. Ao avaliarmos os animais doentes, a suplementação não apresentou proteção neuronal.

Agradecimentos

Ao programa CNPq/PIBIC UEM.

Referências

CAMERON, N. E.; COTTER, M. A.; MAXFIELD, E. K. Anti-oxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia**, Heidelberg, v. 36, no. 4, p. 299-304, 1993.

JAIN, Amit K.; THANKI, Kaushik; JAIN, Sanyog. Novel self-nanoemulsifying formulation of quercetin: Implications of pro-oxidant activity on the anticancer efficacy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 5, p. e959-e969, 2014.

PEREIRA, RENATA VF et al. Differential effects in CGRPergic, nitroergic, and VIPergic myenteric innervation in diabetic rats supplemented with 2% L-glutamine. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, p. 609-622, 2016.

RODRIGUES et al. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, v. 16, p. 315-320, 2003. ISSN 1415-5273.