

MORFOLOGIA E POPULAÇÃO MIOENTÉRICA DO JEJUNO DE RATOS DIABÉTICOS INSULINO INDEPENDENTES (DM2).

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, intestino delgado, restrição alimentar

Resumo:

O diabetes mellitus (DM) gera alterações na morfologia e inervação intrínseca intestinal. Neste trabalho realizou-se a diabetização com nicotinamida e estreptozotocina, levando ao quadro de DM tipo 2 em ratos. Animais do grupo diabético e controle receberam dieta padrão nos 2 primeiros meses e, após, metade dos animais de cada grupo passaram por restrição alimentar (RA) de 50% por mais 2 meses. Além da glicemia foi avaliado o consumo de ração, água e peso corporal. Após eutanásia, amostras do jejuno foram coradas em HE para análise morfométrica, e histoquímica PAS para quantificação de células caliciformes. Amostras do jejuno também foram destinadas ao método de Giemsa para a evidência da população geral dos neurônios do plexo mioentérico. As características morfológicas do jejuno foram mantidas, porém com aumento significativo da espessura da parede total, túnica mucosa e altura dos vilos e redução da profundidade das criptas no grupo diabético e diabético+RA, além de redução do número de células caliciformes e redução da população neuronal mioentérica geral nos grupos diabéticos.

Introdução

O Diabetes mellitus é uma doença crônica que pode promover alterações morfológicas na parede intestinal (ADACHI et al., 2003) e variações morfoquantitativas em populações neuronais dos plexos mioentérico e submucoso (CHANDRASEKHARAN; SRINIVASAN, 2007). O presente estudo propõe-se a analisar parâmetros fisiológicos e morfométricos da parede jejunal de ratos na vigência do DM tipo 2, bem como a quantificação da população neuronal mioentérica.

Materiais e métodos

Foram utilizados 20 ratos machos Wistar, distribuídos e mantidos em caixas de polipropileno no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas com iluminação de claro e escuro de 12 h e temperatura de 22 ± 2 °C. Os animais foram distribuídos em 4 grupos: (C) Controle, (CR) Controle + RA, (D) Diabético e (DR) Diabético + RA. O delineamento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/UEM. Animais dos grupos D e DR foram submetidos ao protocolo de diabetização após jejum noturno de 15 h, anestesiados com injeção intraperitoneal (ip) de ketamina/xilazina (100/10 mg/Kg), seguida de injeção via ip de nicotinamida (100 mg/kg, Sigma, St. Louis, MO, EUA), e 15 min após depois injeção iv inicial de estreptozotocina (STZ) (60 mg/Kg), e após quinze minutos injeção intraperitoneal de nicotinamida (NIC) (80 mg/Kg). Após sete dias receberam nova dose de STZ (30 mg/Kg), e após quinze minutos, 40 mg/Kg de NIC. Os animais controle receberam apenas solução salina via intravenosa, simulando o processo de diabetização.

Animais de todos os grupos receberam ração padrão para roedores (NUVILAB-NUVITAL[®]) *ad libitum* durante 60 dias. Porém, os grupos CR e DR passaram a receber apenas 50% da ingestão média diária dos animais do grupo controle. Durante o período experimental, o peso corporal, consumo de água, as glicemias pós-prandial e de jejum e o consumo de ração foram avaliados.

Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados com Tiopental sódico (40mg/kg do peso corporal), foi realizada laparotomia vertical e o intestino delgado foi coletado e mensurado. Amostras do jejuno foram fixadas em paraformaldeído, incluídas em parafina e submetidas a microtomia. Os cortes foram corados com HE para análise da morfometria das túnicas intestinais, sendo realizada em 100 pontos/animal. Parte das amostras foram submetidas a histoquímica com PAS, para a quantificação das células calciformes produtoras de mucinas neutras, a qual foi realizada em microscópio de luz (objetiva de 40X), sendo quantificadas 2500 células epiteliais por animal para obtenção do índice de células marcadas, sendo este calculado pelo número de células marcadas*100/ total de células contadas.

Para a evidenciação neuronal, utilizou-se o método de Giemsa (modificado por BARBOSA, 1978). Amostras do jejuno foram lavadas e submersos em solução fixadora de Giemsa por 48 horas. Em seguida, para a obtenção dos preparados de membrana da túnica muscular, os segmentos foram microdissecados sob esteromicroscópio. Os preparados foram corados com solução corante de Giemsa, à base de azul de metileno, durante 24 horas.

A análise quantitativa dos neurônios foi realizada em 60 campos/animal nas regiões intermediária e antimesentérica, em microscópio de luz sob objetiva de 40X. Cada campo microscópio correspondeu a área de $0,221 \text{ mm}^2$, perfazendo um total de $13,26 \text{ mm}^2$. A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa estatístico GraphPadPrism (GraphPad Software, versão 5.0, São Diego, CA, USA). Após o teste Kolmogorov-Smirnov (K-S) de normalidade, dados não paramétricos foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's e os dados paramétricos submetidos à Análise de Variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey prefixando-se o

nível de significância em 95% ($p < 0,05$). Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão.

Resultados e Discussão

Constatou-se que o modelo de diabetização foi eficiente no desenvolvimento de alterações características do DM2, tais como hiperglicemia, polifagia e polidipsia (BLAGOSKLONNY, 2013). A RA promoveu redução significativa ($p < 0,05$) da glicemia e massa corporal nos grupos controle (CR) e diabéticos (DR), além de redução do consumo de água no grupo DR (Tabela 1).

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 (pré RA) e de 2-4 meses (durante RA) de ratos dos grupos controle (C), controle + restrição (CR), diabético (D) e diabético + restrição (DR). Resultados expressos como média* \pm EP (n=5/grupo).

| Variáveis | C | CR | D | DR |
|-------------------------------------|------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Glicemia final pós-prandial (mg/dL) | 66.80 \pm 6.02 | 60.20 \pm 3.81 | 428.8 \pm 26.51 ^a | 138.4 \pm 16.68 ^{ab} |
| Glicemia final jejum (mg/dL) | 78.0 \pm 5.09 | 81.6 \pm 4.98 | 267.8 \pm 54.44 ^a | 109.8.8 \pm 3.34 ^{ab} |
| Massa corporal (g) | 489.8 \pm 9.31 | 372.0 \pm 9.71 ^a | 351.6 \pm 14.18 ^a | 296.8 \pm 12.68 ^{ab} |
| Consumo ração 0-2 m (g) | 31.9 \pm 1.46 | | 40.50 \pm 1.97 | |
| Consumo água 0-2 m (mL) | 69.0 \pm 4.64 | | 156.0 \pm 11.49 | |
| Consumo ração 2-4 m (g) | 27.60 \pm 1.63 | 16.0 \pm 0.00 ^b | 43.40 \pm 2.44 ^a | 16.00 \pm 0.00 ^{ab} |
| Consumo água 2-4 m (mL) | 41.00 \pm 5.57 | 34.00 \pm 7.48 | 172.00 \pm 16.55 ^a | 48.00 \pm 2.00 ^{ab} |

^a $p < 0,05$ vs C

^b $p < 0,05$ vs D

Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, $p < 0,05$

Não houve influência do DM2 ou RA sobre o comprimento do intestino delgado e organização histológica padrão do jejum. A análise morfométrica indica aumento significativo na espessura da parede total, túnica mucosa e altura dos vilos, convergindo aos resultados de ADACHI et al. (2003), e redução significativa da profundidade das criptas (Tabela 2). A RA não alterou a parede do jejuno dos animais CR, porém promoveu redução geral no grupo DR em relação ao grupo D. Houve redução significativa no número de células calciformes nos grupos diabético e com RA, em relação ao controle. Esta redução também já foi observada no colo distal sob RA, podendo ser uma resposta adaptativa a disponibilidade limitada de nutrientes.

Tabela 2: Comprimento total do intestino delgado (cm) e espessura da parede total, túnicas mucosa, submucosa, muscular externa, altura dos vilos, profundidade das criptas (μ m) e índice de células calciformes produtoras de mucinas neutras em reação histoquímica PAS. Resultados expressos como média* \pm EP (n=5/grupo).

| Variáveis | C | CR | D | DR |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Intestino delgado (cm) | 105.4 \pm 2.34 | 92.10 \pm 2.36 | 97.80 \pm 3.948 | 95.40 \pm 4.03 |
| Parede total (μ m) | 653.80 \pm 6.83 | 638.60 \pm 6.33 | 753.90 \pm 8.04 ^a | 600.50 \pm 8.73 ^{ab} |
| Mucosa (μ m) | 533.40 \pm 5.47 | 522.70 \pm 6.09 | 652.90 \pm 6.67 ^a | 514.70 \pm 6.71 ^b |
| Submucosa (μ m) | 40.58 \pm 0.74 | 39.93 \pm 0.73 | 28.26 \pm 0.53 | 28.81 \pm 0.73 |
| Muscular externa (μ m) | 75.72 \pm 1.63 | 75.23 \pm 1.39 | 73.06 \pm 1.76 | 56.21 \pm 2.00 ^b |
| Altura dos vilos (μ m) | 377.00 \pm 4.65 | 382.50 \pm 6.30 | 553.7 \pm 5.89 ^a | 424.40 \pm 5.90 ^a |
| Profundidade das criptas (μ m) | 114.00 \pm 1.75 | 91.01 \pm 1.26 | 88.12 \pm 1.09 ^a | 81.90 \pm 1.09 ^a |
| Índice de células calciformes (%) | 20.66 \pm 0.79 | 13.40 \pm 0.54 | 11.42 \pm 0.25 ^a | 12.46 \pm 0.43 |

^a $p < 0,05$ vs C

^b $p < 0,05$ vs D

Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, $p < 0,05$

Análise de Variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey, $p < 0,05$ para índice de células calciformes

Por meio da técnica de Giemsa (Tab.3) constatou-se redução no número de neurônios mioentéricos nos animais diabéticos do grupo D, e reestabelecimento no grupo DR indicando efeito positivo da restrição alimentar sobre a população geral neuronal. Este efeito é justificado pela redução do estresse oxidativo em decorrência da RA (ROSA et al., 2018).

Tabela 3: Número médio e densidade neuronal mioentérica no jejuno de ratos (área: 13,26mm²). Método de Giemsa (n=5/grupo). Resultados expressos como média* ± EP (n=5/grupo).

| GIEMSA | | |
|--------|----------------------------------------------------|------------------------------------------|
| | Média n° de neurônios (0,1326 cm ²) | Densidade neuronal (cm ²) |
| C | 1030±46.99 | 129.487 |
| CR | 950.2 ±25.00 | 119.457 |
| D | 886.8±37.31 ^a | 111.463 |
| DR | 1006±21.30 | 123.529 |

^a p<0,05 vs C

Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, p<0,05

Conclusões

O modelo de diabetização por associação de estreptozotocina e nicotinamida foi eficiente em produzir o DM tipo 2 com efeito sobre parâmetros morfométricos de elementos da parede e número de neurônios mioentéricos. O modelo de RA imposto promoveu respostas adaptativas na parede intestinal e preservou a população neuronal mioentérica geral neuronal.

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.
- BARBOSA, A. J. A. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, São Paulo, v. 11, p. 95-97, 1978.
- BLAGOSKLONNY, M. V. TOR-centric view on insulin resistance and diabetic complications: perspective for endocrinologists and gerontologists. **Cell Death & Disease**, New York, v. 4, no. 12, p. e964, 2013.
- CHANDRASEKHARAN, B.; SRINIVASAN, S. Diabetes and the enteric nervous system. **Neurogastroenterology & Motility**, Oxford, v. 19, no. 12, p. 951-960, 2007.
- ROSA, C. V. D. da et al. Food restriction promotes damage reduction in rat models of type 2 diabetes mellitus. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, no. 6, p. e0199479, 2018.