

ANÁLISE QUANTITATIVA DAS CÉLULAS CALICIFORMES E COLÁGENO TIPO I E III NO ÍLEO DE RATOS EXPOSTOS A RESTRIÇÃO DE SONO

*João Victor Guedes Duda*¹, *Anne Caroline Santa Rosa*², *Glauca E. M De Lion Siervo*³, *Glaura Scantamburlo Alves Fernandes*⁴, *Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana*⁵, *Larissa Carla Lauer Schneider*⁶

¹Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, UEM. joao.v.duda@hotmail.com

²Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, UEM. Ex-Bolsista PIBIC/CNPq-UEM. santarosa.annecarol@gmail.com

³Doutoranda em Patologia Experimental, UEL. gemlsiervo@gmail.com

⁴Professora, Doutora, Departamento de Biologia Geral, UEL. glaura@uel.br

⁵Professora, Doutora, Departamento de Ciências Morfológicas, UEM. dmgsantana@gmail.com

⁶Professora, Doutora, Departamento de Ciências Morfológicas, UEM. lclschneider2@uem.br

RESUMO

O sono desempenha um papel fundamental para a preservação do organismo, a privação do mesmo pode acarretar em inúmeras consequências para o corpo, como estresse excessivo. Segundos estudos, o estresse pode afetar a permeabilidade do epitélio absorptivo do intestino por exemplo. A finalidade deste artigo é observar as consequências do estresse causado pela restrição de sono no intestino delgado, para isso foi feita a análise quantitativa das células caliciformes, que secretam glicoproteínas presentes na mucosa intestinal, bem como a análise quantitativa dos colágenos tipo I e III. Para isso foram utilizados 12 *Rattus norvegicus* machos Wistar pesando cerca de 125g e com 30 dias de idade, aleatoriamente distribuídos em dois grupos, Controle (CTL) (n=6) e Restrição de Sono (RS) (n=6). Os animais de RS foram expostos a privação de sono paradoxal pelo método da plataforma múltipla modificada, mantidos acordados diariamente por 18h consecutivas. Enquanto o grupo CTL esteve condicionado a um ciclo de 12h claro-escuro. Após 21 dias sob essas condições foi realizada a eutanásia dos ratos e, então, coletados 2cm de seus íleos, o material passou pelo processamento histológico e por fim foi corado com *Alcian Blue p.H. 1.0 e 2.5*, *Picrosirius* e *P.A.S* (Ácido Periódico de Schiff). A análise referente ao colágeno não demonstrou alterações significativas tanto no tipo I quanto no tipo III, bem como as células caliciformes produtoras de mucinas neutras, porém nas células caliciformes secretoras de mucinas ácidas houve uma divergência considerável em sua população quando comparamos o grupo RS com o grupo CTL.

PALAVRAS-CHAVE: Intestino delgado; Mucosa intestinal; Tecido conjuntivo.

1 INTRODUÇÃO

O ciclo biológico de um organismo é definido por meio do ritmo circadiano, uma vez que este é responsável por regular o período de sono-vigília por meio do controle hormonal. A liberação de melatonina por exemplo ocorre quando os níveis de luminosidade do ambiente caem, informando e preparando o corpo para o início período noturno, quanto mais escuro maiores os níveis deste hormônio no corpo causando uma redução nas atividades celulares até que se inicie as etapas do sono (SOUSA, N. J. A., CASTRO, B.F. 2008).

Dividido em 5 fases, o sono é caracterizado pela diminuição tanto da consciência quanto dos movimentos corporais e metabólicos, neste processo grupos de neurônios no cérebro param de produzir neurotransmissores e de certa forma desativam os sinais que mantem o organismo acordado, mantendo o corpo em estado de repouso (MAGALHÃES, F. & MATARUNA, J. 2007).

O sono é de extrema importância pois desempenha um papel fundamental na manutenção, preservação e restauração de um organismo, cada uma das suas etapas é classificada de acordo com a dinâmica que o corpo apresenta naquele momento. Do primeiro ao quarto estágio ocorre o período denominado de NREM (sem movimento rápido dos olhos). A quinta fase por sua vez é caracterizada pela presença dos movimentos rápidos dos olhos (REM), tais movimentos são ocasionados pela ocorrência dos sonhos. Outros estudos indicam que é durante o sono que as células realizam seus reparos, além de descansar o organismo e deixar o indivíduo disposto ao acordar, com facilidade para se concentrar, raciocinar e tomar decisões (MAGALHÃES, F. & MATARUNA, J. 2007). O

tempo necessário para que todos esses processos ocorram podem variar segundo uma série de fatores, como a idade (NEVES, G. S. M. L. et al. 2013).

Conseqüentemente a interrupção deste lapso de descanso pode ocasionar inúmeros empecilhos para o corpo como alterações cognitivas, fadiga e deficiências no sistema imunológico, visto que a produção de substâncias protetoras ocorrem durante este período, permanecer por muito tempo sem descanso ocasiona ainda estresse excessivo (MÜLLER, M.R. & GUIMARÃES, S. S. 2007). A privação do sono afeta diretamente na qualidade de vida das pessoas, profissionais na área de enfermagem por exemplo que atuam em períodos noturnos, necessitam se adaptar com as alterações no ciclo sono-vigília para conseguirem descansar devidamente em outro horário (RAVAGNANI, J. S. & CRIVELARO, P. M. S. C., 2010.)

Além das possíveis conseqüências citadas anteriormente, pressupõe-se que o estresse, como o propiciado pela restrição de sono, afeta também o trato gastrointestinal, influenciando negativamente na expressão de moléculas de junção das células, aumentando a permeabilidade intestinal (LAUFFER, A., 2015). Tal situação pode resultar em distúrbios gastrointestinais funcionais como a síndrome do intestino irritável que causa dores abdominais e diarreias (RIBEIRO, L. M., et al., 2011). Outra possível conseqüência do estresse é a deficiência no sistema imune do intestino, levando a uma maior probabilidade em adquirir doenças infecciosas, uma vez que pode ocorrer o desequilíbrio com a mucosa intestinal (PINHO, M., 2008).

As responsáveis por manter a mucosa intestinal são as células caliciformes, capazes de sintetizar e secretar glicoproteínas que compõem o muco que lubrifica tanto o lúmen intestinal, quanto o epitélio respiratório. Neste muco está presente a mucina que atua como uma barreira bacteriana, protegendo o intestino contra possíveis infecções, além de impedir que as paredes do tubo digestório fiquem aderidas umas às outras (ROCHA, P. M. C., et al., 2016). Portanto, nota-se que alterações na quantidade de células caliciformes refletem diretamente na integridade da barreira defensiva do epitélio intestinal (LOTHHAMMER, N., et al., 2009).

Considerando que possíveis infecções intestinais devido a deficiência na mucosa defensiva, o organismo inicia um processo inflamatório para tentar eliminar os agentes infecciosos. Como resposta ao agente infeccioso, o tecido conjuntivo, por ser vascularizado, inicia uma aglomeração de fluidos e células sanguíneas de modo a isolar o invasor, porém este processo causa inchaço, vermelhidão e dor no local (LIMA, R. R. et al., 2007). O processo inflamatório é a primeira etapa para a reparação do tecido danificado, com o fim da inflamação inicia-se o processo de proliferação, onde as células epiteliais se proliferam e migram para o local lesionado, seguidas dos fibroblastos que produzem colágeno para contrair a ferida, criando um tecido cicatricial (CAMPOS, A. C. L. et al., 2007).

A finalidade deste estudo é analisar a relação do estresse ocasionado pela falta de sono com possíveis alterações nas células epiteliais do íleo, especificamente, as células caliciformes e, também se ocorre mudanças no colágeno presente na lâmina própria e submucosa.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

De acordo com os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL), o experimento foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL (Parecer de Aprovação nº 3467.2014.86).

Foram utilizados 12 *Rattus norvegicus* machos Wistar pesando aproximadamente 125g e cada um com idade de 30 dias, distribuídos nos grupos Controle (CTL) (n=6) e Restrição de Sono (RS) (n=6), ambos mantidos em um ambiente com temperatura controlada em torno de 22 °C e com água e ração sempre à disposição.

Os animais do grupo CTL foram expostos a um ciclo de 12 horas no claro e 12 horas no escuro, enquanto, o grupo RS por sua vez foi submetido a terapia de privação de sono paradoxal, mantidos acordados por 18 horas diárias, por meio do método da plataforma múltipla modificada, os animais eram colocados dentro de um tanque com água sobre plataformas, estas ficaram 1cm acima do nível da água, os ratos conseguiam transitar livremente dentro do tanque pulando entre as plataformas. Quando se iniciava a fase paradoxal do sono eles caíam na água e despertavam. O experimento foi mantido por 21 dias.

Após o período experimental foi realizada a eutanásia dos ratos por meio da aplicação de uma dose letal de Tiopental Sódico® e então foram coletados cerca de 2 cm do íleo de cada rato. O material biológico foi lavado em uma solução de PBS 0,1M e fixados em paraformaldeído 4% posteriormente a amostra foi emblocada em parafina e cortada no micrótomo.

O material biológico foi corado com PAS- Ácido Periódico de Schiff, Alcian Blue 1.0. e 2.5 para o estudo das células caliciformes produtoras de mucinas neutras (PAS+), sulfomucinas (AB1.0+) e sialomucinas (AB2.5+), respectivamente e, *Picro Sirius red* para o estudo dos colágenos tipo I e III.

As imagens foram capturadas por meio de um microscópio óptico Olympus BX41 nas objetivas de 20X para colágeno e 40X para células caliciformes, e analisadas com o auxílio do programa Image-Pro Plus 4.5 ® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

Para quantificar as células caliciformes foram mensuradas todas as células no eixo vilo-cripta de 24 imagens por animal. Assim o número de células caliciformes foi expresso em milímetros quadrados (mm²).

Para quantificar os tipos de colágeno foram capturadas 21 imagens por animal, através da luz polarizada, as imagens foram digitalizadas através do software Q Capture Pro (version 5.1, Media Cybernetics, USA).

A coloração de picosirus baseia-se no alinhamento das moléculas de Sirius Red às de colágeno, promovendo assim um aumento da birrefringência das fibras. À medida que os pixels com tonalidade correspondente às fibras de colágeno do tipo I ou III são selecionados na imagem, as demais áreas com a mesma proporção de cor onde há coloração vermelho/laranja representa o colágeno tipo I e a coloração verde/amarelo o colágeno tipo III. Foi expresso em μm^2 a área de colágeno ocupada no tecido.

Os resultados obtidos foram submetidos às análises estatísticas pelo programa Graph Pad Prism 5.0, sendo expressos como média \pm erro padrão. Foi realizado o teste *t* de Student. O nível de significância utilizado foi de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No epitélio intestinal, além dos enterócitos, destacam-se os linfócitos que por estarem muito próximos da superfície mucosa sugere-se que exerçam um papel inicial na imunidade das mucosas contra patógenos e outros antígenos (ELIA; SOUZA, 2001). Outra célula presente no epitélio intestinal são as caliciformes, responsáveis pela produção e liberação de mucinas, que em contato com o lúmen formam um filme que lubrifica e protege o epitélio intestinal contra patógenos (MILLER, 1987; DEPLANCKE; GASKINS, 2001; FOONG; BORNSTEIN, 2009; GWYNNE et al., 2009).

As mucinas atuam na defesa da mucosa intestinal, sendo a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos como bactérias, esses invasores ligam-se a mucina ao invés de entrar em contato direto com o epitélio intestinal (KIM J. J., KHAN, W. I., 2013). Estas células e a composição das mucinas secretadas sofrem alterações em resposta à infecção

por micro-organismos e parasitos (DEPLANCKE; GASKINS, 2001; BANKS et al. 2005; MOAL; SERVIN, 2006; KIM; HO, 2010).

Na figura 1 A-B, observamos um aumento considerável na quantidade de células caliciformes produtoras de mucinas ácidas, as sulfomucinas. Porém, as demais células caliciformes, produtoras de mucinas neutras, não apresentaram alterações significativas comparando um grupo com o outro (Figura 1 C-D e G-H).

Há diferentes tipos de mucinas produzidas pelas células caliciformes, presentes no trato respiratório, na saliva e no trato gastrointestinal, suas estruturas se alteram de acordo com a região a qual pertencem. Mucinas gástricas por exemplo possuem um baixo teor de sulfato e ácido siálico, e são tipicamente separadas em mucinas ácidas (Figura 1 A-B) e neutras, possuem a capacidade de se associarem com lipídios para tornar o muco intestinal hidrofóbico, uma característica crucial para manter a camada mucosa íntegra (AMERONGEN, A. V. N. et al., 1988).

O aumento na quantidade de mucinas pode estar relacionado ao estresse ocasionado pela restrição do sono, ocorre o descontrole na produção do muco, gerado em excesso, que pode ocasionar uma diarreia, alterando o trânsito intestinal (DANTAS R. O., 2004). Com a passagem acelerada do bolo fecal no trato intestinal a absorção de nutrientes é comprometida, a longo prazo pode levar ao desgaste do organismo, bem como causar anemia e carência de vitaminas.

As células caliciformes também são afetadas por inflamações no intestino, a doença de Crohn por exemplo consiste em uma inflamação que eleva a quantidade de moléculas sinalizadoras de respostas imunes, ativando erroneamente o sistema imune mucoso (TORRES, J. A. P., et al., 2011).

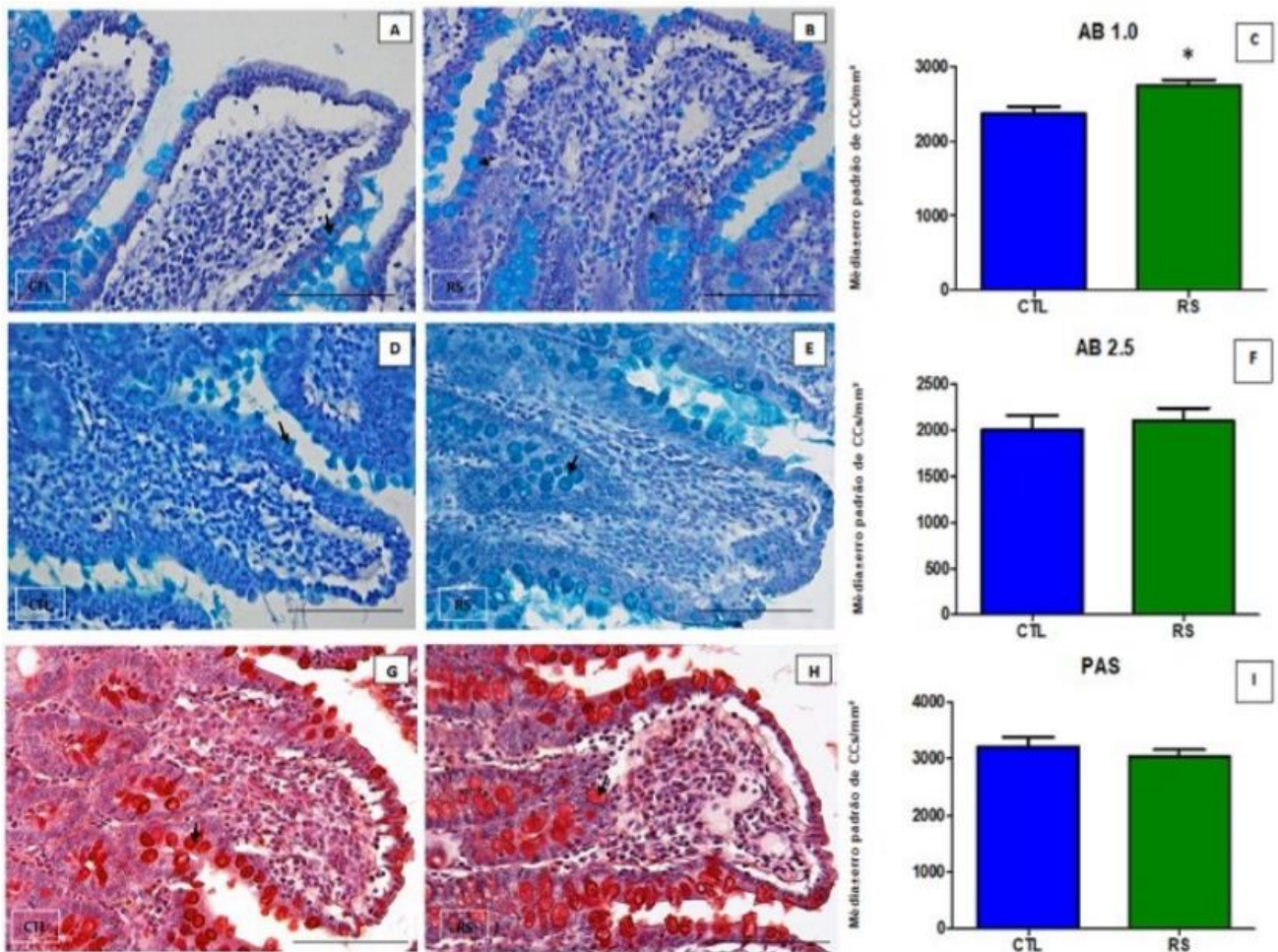


Figura 1: A, B- Densidade das sulfomucinas coradas com Alcian Blue (AB) pH 1.0. C – Gráfico da densidade de sulfomucinas. D, E - Densidade das sulfomucinas coradas com Alcian Blue (AB) pH 2.5. F – Gráfico comparativo da quantidade de sulfomucinas. G, H - Densidade das sialomucinas coradas com P.A.S (Ácido Periódico de Schiff). I – Gráfico contendo a quantificação de sialomucinas. Todos os resultados foram expressos em mm². CTL- Grupo controle; RS- Grupo com Restrição de Sono. As setas indicam a presença de células caliciformes. Barra: 100 µm.
Fonte: Dados experimentais.

Originado a partir dos fibroblastos e encontrado em tecidos conjuntivos, o colágeno é uma proteína fibrosa que mantém a integridade estrutural e fornece elasticidade aos tecidos (SILVA, T. F. & PENNA A. L. B., 2012). Apesar de serem expressos em tipos diferentes, os mais comuns são os tipos I, encontrado em ossos e tendões, e o tipo III presente principalmente em tecidos moles (CAMPOS, A. C. L. et al., 2007).

Agentes importantes no processo de regeneração de tecidos lesionados, as fibras de colágeno atuam no processo de cicatrização. Para que um tecido lesionado seja regenerado é necessário que antes haja um processo inflamatório sobre o local, isolando e eliminando possíveis invasores, como bactérias, posteriormente ocorre a formação de um tecido conjuntivo (CAMPOS, A. C. L. et al., 2007).

Na figura 2 foi observado que não ocorreram alterações na quantidade de colágeno, pode-se dizer então que o processo de restrição do sono não ocasionou no rompimento da barreira defensiva do intestino, o que facilitaria infecções. É possível deduzir isto pois a presença de uma quantidade anormal de colágeno em determinada região demonstra um processo de cicatrização, que ocorre para restaurar tecidos lesionados, como nos locais onde há inflamações.

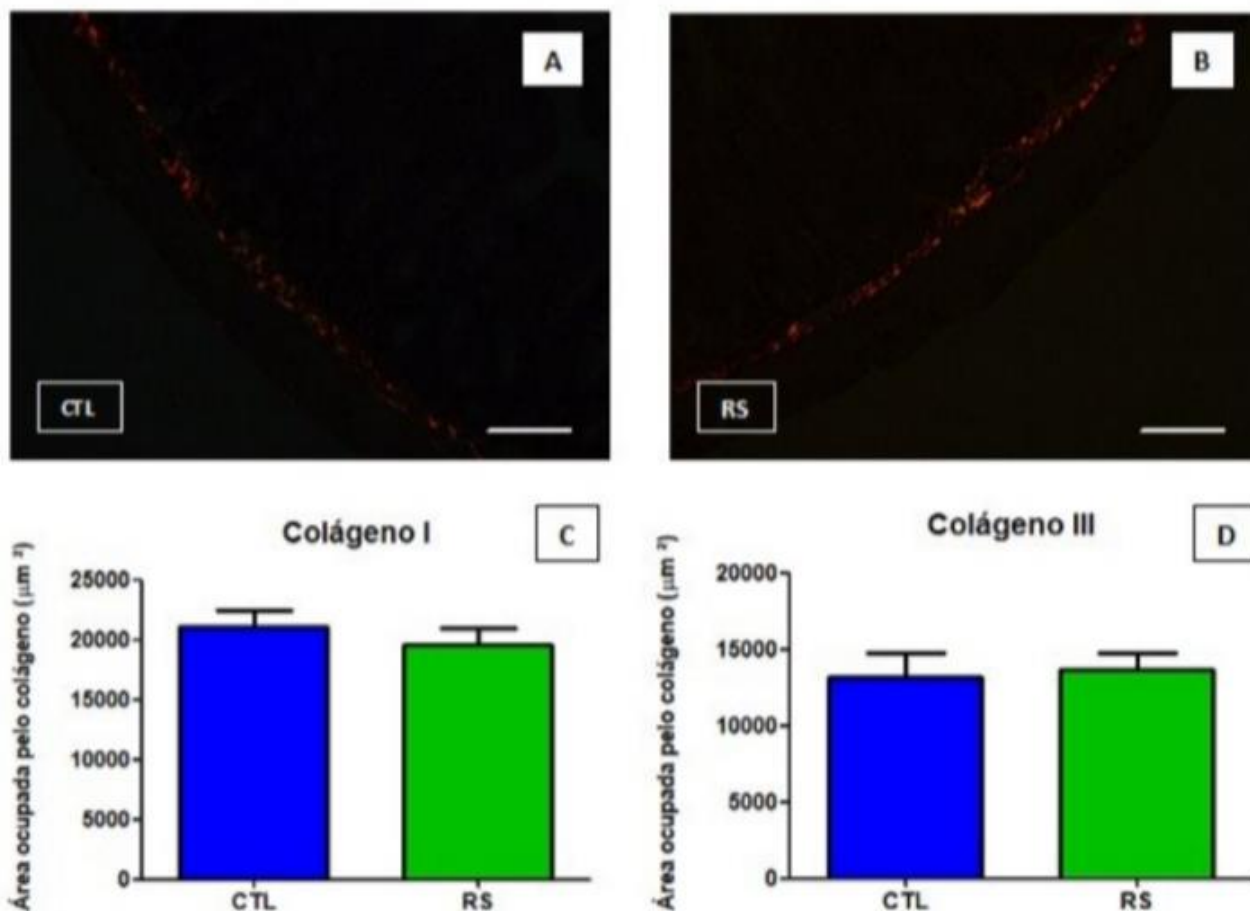


Figura 2: A, B – Fotomicrografia da polarização óptica de colágeno tipo I e III corado com picosirius, na túnica submucosa, a cor vermelha/laranja representa colágeno I e a cor verde/amarelo colágeno III. Os resultados foram expressos em μm^2 . **CTL**- Grupo controle; **RS**- Grupo com Restrição de Sono. Barra: 100 μm .

Fonte: Dados experimentais.

A barreira mecânica contra às agressões do meio externo e a penetração de microrganismo é o epitélio da mucosa intestinal, que além dos enterócitos e das células caliciformes, encontra-se também as células enteroendócrinas e as células de Paneth [6]. Esta barreira ocorre devido a presença de junções de oclusão [7] e do muco produzido pelas CCs [8]. Portanto é necessário estudar os outros tipos celulares presentes neste epitélio para entendermos melhor o efeito da restrição do sono na mucosa do íleo de ratos *Wistar*.

4 CONCLUSÃO

Houve um aumento significativo nas células caliciformes ácidas, especificamente nas sulfomucinas coradas com Alcian Blue (AB) pH 1.0. Enquanto as células produtoras de mucina neutras não apresentaram alterações significativas. Mostram-se necessários mais estudos sobre as consequências da restrição do sono sobre as células caliciformes.

A quantidade de colágeno tipo I e III não demonstrou diferença significativa entre os grupos. Porém, serão necessários mais estudos para compreender a relação do estresse ocasionado pela falta de sono sobre as fibras de colágeno.

REFERÊNCIAS

- AMERONGEN, A. V. N. et al., Sulfomucins in the Human Body, *Biol. Chem.*, Vol. 379,1988.
- BANKS, M.R. et al. Antisecretory actions of a novel vasoactive intestinal polypeptide (VIP) antagonist in human and rat small intestine. *Br. J. Pharmacol.* v. 144, p. 994-1001, 2005.
- CAMPOS, A. C. L. et al., Cicatrização de feridas, ABCD, arq. bras. cir. dig. vol.20 no.1 São Paulo. 2007.
- DANTAS R. O., Diarreia e constipação intestinal, Simpósio Semiologia, Ribeirão Preto, 2004.
- DEPLANCKE, B; GASKINS, H.R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am. J. Clin. Nutr* v.73: 1131S-1141S, 2001.
- ELIA, C.C.S.; SOUZA, H.S.P. *Imunologia da mucosa intestinal: Da bancada ao leito.*São Paulo: Atheneu, 2001.
- Goto Y, Ivanov II. Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk *Immunol Cell Biol.* 2013;91:204-214.
- GWYNNE, R.M. et al. Cholera toxin induces sustained hyperexcitability in submucosal secretomotor neurons in guinea pig jejunum. *Gastroenterology*, v.136, p.299-308, 2009.
- Johansson ME, Hansson GC. Mucus and the goblet cell *Dig Dis.* 2013;31:305-309.
- KIM J. J., KHAN, W. I., Goblet Cells and Mucins: Role in Innate Defense in Enteric Infections, *Pathogens* 2013, 2(1), 55-70.
- KIM, Y.S.; HO, S.B. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Curr Gastroenterol Rep* v.12, p. 319–330, 2010.
- LAUFFER, A., Efeito do estresse agudo, crônico e ambos combinados na permeabilidade intestinal de ratos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015).
- LIMA R. R. et al., Inflamação em doença neurodegenerativas, *Revista Paraense de Medicina* V21, 2007.
- LOTHHAMMER, N., et al., *Biologia Celular – Atlas Digital.* Porto Alegre: UFRGS/UFCSPA, 2009.
- MAGALHÃES, F. & MATARUNA, J., Parte I - Bases gerais, cronobiológicas e clínicas. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2007.
- MILLER, H. R. P. Gastrointestinal mucus, a medium for survival and for elimination of parasitic nematodes and protozoa. *Parasitology*,v .94, p. S77-S100, 1987.
- MOAL V.L.; SERVIN A. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides and microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 1, p. 9, 2006.

MONTANARI, T., Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. Tecido conjuntivo cap. 3, página 45.

MÜLLER, M.R. & GUIMARÃES, S.S., Impacto dos transtornos do sono sobre o funcionamento diário e a qualidade de vida, Estudos de Psicologia I Campinas I 24(4) I 519-528 I outubro - dezembro 2007.

NEVES, G.S.M.L. et al. Transtornos do sono: visão geral, Rev Bras Neurol. 49(2):57-71, 2013.

PATOLOGIA GERAL - DB-301, FOP/UNICAMP, Tecido conjuntivo e células de inflamação.

Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK et al. . The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system *Immunol Rev.* 2014;260:8-20.

PINHO, M., A Biologia molecular das doenças inflamatórias intestinais, Rev bras. coloproctol. vol.28 no.1 Rio de Janeiro Jan./Mar. 2008.

RAVAGNANI, J. S. & CRIVELARO, P. M. S. C., Qualidade de sono e percepção da qualidade de vida dos profissionais de enfermagem de uma unidade de terapia intensiva, Centro Universitário Católico Salesiano *Auxílium*, 2010.

RIBEIRO, L. M., et al., Influência da resposta individual ao estresse e das comorbidades psiquiátricas na síndrome do intestino irritável, Rev. psiquiatr. clín. vol.38 no.2 São Paulo 2011.

ROCHA, P. M. C., et al., Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no jejuno de frangos suplementados com probiótico *Bacillus subtilis* cepa C3102¹, Pesq. Vet. Bras. 36(4):312-316, abril 2016.

SILVA, T. F. & PENNA A. L. B., Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais, Rev Inst Adolfo Lutz. 2012.

SOUSA, N.J.A., CASTRO, B.F. Melatonina, ritmos biológicos e sono - uma revisão da literatura, Rev Bras Neurol, 44 (1): 5-11. 2008.

TORRES, J. A. P., et al., Doenças inflamatórias intestinais no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe: manifestações extraintestinais, Revista brasileira de coloproctologia, número 2, vol. 31, 2011.