

ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DOS COMPONENTES DO INTESTINO GROSSO DE RATOS GOTO-KAKIZAKI (GK)

Eduarda Pereira de Barros¹, Amanda Deliberall², Joice Naiara Bertaglia Pereira³, Rui Curi⁴, Aline Rosa Marosti⁵

¹Acadêmica do Curso de Medicina, Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. PIC-UniCesumar.

eduardapereiradebarros@hotmail.com

²Acadêmica do Curso de Medicina, Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR. adeliberalli@gmail.com

³Pró-reitora de Pós-graduação e Pesquisa, Universidade Cruzeiro do Sul, UNICSUL. joice_naiarabp@hotmail.com

⁴Professor Titular/ Diretor do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo – USP. ruicuri@icb.usp.br

⁵Professora/Orientadora, Doutora, Curso de Medicina, Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR.

aline.marosti@unicesumar.edu.br

RESUMO

A Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença crônica não transmissível que está relacionada com a deficiência das células β pancreáticas ou a resistência à insulina. Conseqüentemente, compromete o metabolismo da glicose, proporcionando uma falha em seu armazenamento nos músculos, tecido adiposo e fígado. Isso, a longo prazo, pode proporcionar neuropatias autonômicas que provocam alterações geniturinárias e gastrointestinais. Dessa forma, podendo afetar a morfologia do trato gastrointestinal (TGI) e do sistema nervoso entérico responsável por grande parte da motilidade intestinal. O animal utilizado será o rato Goto-Kakizaki (GK), espontâneo de diabetes mellitus tipo 2, muito estudado devido seu contraste com outros roedores, uma vez que não se torna obeso e não desenvolve hiperlipidemia. São escassos os trabalhos científicos que avaliam a morfologia do TGI relacionado à DM2 com os animais GK, principalmente, do intestino grosso. Resultados parciais indicaram uma diminuição da área da mucosa e da espessura das camadas musculares circular e longitudinal nos animais GK, quando comparados aos animais controle, que podem levar a alterações na absorção intestinal.

PALAVRAS-CHAVE: DM; GK; parede intestinal; resistência à insulina.

1 INTRODUÇÃO

A *Diabetes Mellitus* (DM) é umas das principais doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) da atualidade (MALTA et al., 2015). Esta doença ocorre em decorrência, tanto de fatores genéticos, quanto ambientais e é resultado de uma diminuição progressiva da população de células β pancreáticas ou distúrbios que proporcionam resistência periférica a insulina. Essa resistência se relacionada diretamente com o metabolismo da glicose nos diversos tecidos, podendo proporcionar a DM2.

Para se melhor compreender o papel de cada um dos elementos envolvidos na fisiopatologia da diabetes, vários estudos utilizam-se de modelos experimentais, que tentam elucidar o papel de cada um dos componentes da resistência à insulina e obesidade (CESARETTI; KOHLMANN-JUNIOR, 2006). Um dos modelos utilizados é rato GK, que é obtido através da reprodução seletiva de indivíduos com uma leve intolerância à glicose a partir de uma colônia de ratos Wistar não diabéticos. Esses animais desenvolvem hiperglicemia moderada e hiperinsulinemia entre 3 e 4 semanas de idade; deficiência na secreção e resistência à insulina (PICARET-BLANCHOT et al., 1996), metabolismo irregular de glicose (OSTENSON et al., 1993), bem como um desenvolvimento ontogênico diminuído das células das ilhotas pancreáticas (MOVASSAT et al., 1997). No entanto, esses os ratos GK não se tornam obesos como ocorre com outros roedores (GOTO; KAKIZAKI; MASAKI, 1975).

O trato digestório de pacientes diabéticos, como já era esperado, possui alterações morfológicas na parede intestinal que podem prejudicar as funções gastrintestinais, na digestão e absorção de nutrientes. Além disso, a DM2 aumenta a atividade de dissacaridases incluindo a sucrase-isomaltase, o que tem sido observado tanto em

humanos como em modelos animais. Estudos sugerem que esse aumento possa ser devido à hiperplasia intestinal (MATSUO et al., 1992), que aumenta a síntese de fatores de transcrição, promovendo a alteração na camada mucosa do intestino delgado.

A partir desse ponto, considerando todas as alterações relatadas no trato gastrointestinal, faz-se necessário caracterizar as possíveis modificações na morfologia do intestino grosso, quando acometido pela DM2, em animais GK. Mesmo que haja inúmeros estudos a respeito do tema, são raras as pesquisas científicas que têm por objetivo avaliar a morfologia do trato gastrointestinal, principalmente referente ao intestino grosso dos animais GK, portadores de DM2. Sendo assim, faz-se necessário caracterizar as possíveis modificações na morfologia do intestino grosso, quando acometido pela DM2, em animais GK, pois, a partir dos dados obtidos será possível discernir as principais alterações decorrentes da DM2 e, se possível, a partir delas planejar e alocar medidas e novas pesquisas de forma racional no tratamento dessa DCNT.

O presente projeto, possui como objetivo geral analisar a morfologia da parede do intestino grosso de ratos GK. As técnicas histológicas empregadas serão a microscopia de luz, aplicadas ao Cólon Proximal (CP) e Distal (CD). Utilizando as técnicas de histologia, de microscopia de luz, nos colos proximais e distais, avaliar, por exemplo, o número de células calciformes presentes na mucosa intestinal, o tamanho das criptas, a morfologia da mucosa intestinal, por meio da área da mucosa, além da espessura da camada muscular.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto é realizado em colaboração com Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). Os espécimes foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Rui Curi, professor titular do Departamento de fisiologia e biofísica, onde também passaram por processados para a histologia e emblocados. Depois foram cortados e corados no laboratório de histologia da Universidade Estadual de Maringá, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni.

Para a realização do trabalho, são utilizados 20 ratos machos Goto-Kakizaki e Wistar controle (W) (n=10) alocados no biotério do ICB-USP. O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) sob protocolo nº 109/2013). Aos dois meses de idade (8 semanas), os animais foram eutanasiados com o uso de câmara de CO₂, depois será realizada uma laparotomia mediana e o intestino grosso retirado e seu comprimento mensurado.

2.1 PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO

Fragmentos do intestino grosso dos animais de todos os grupos foram fixados em formol tamponado a 10%. Após a fixação, os segmentos foram lavados em álcool etílico a 70%, desidratados em série crescente de alcoóis até o absoluto e diafanizados em xilol. Posteriormente, incluídos em paraplast, submetidos a cortes transversais semi-seriados com 5µm de espessura e corados com as técnicas: Hematoxilina e Eosina (HE), para descrição da estratigrafia do tubo digestório, mensurações da espessura da túnica muscular (µm) e área da mucosa intestinal (µm²).

2.1.1 Análises Histológicas

Serão analisados, qualitativamente e quantitativamente, os seguintes parâmetros para o intestino grosso (colo proximal e colo distal): profundidade das criptas, quantidade de células calciformes, área da mucosa e espessura da túnica muscular. Para a profundidade da cripta, área da mucosa e espessura do músculo, 20 medidas por animal serão realizadas aleatoriamente em cada segmento. A quantificação das células

caliciformes será realizada conforme previamente descrito por GOIS et al., (2016). Em cada espécime, 2.500 enterócitos consecutivos serão contados, e a proporção de células caliciformes será determinada em relação a 100 células epiteliais. As análises serão realizadas utilizando imagens capturadas com uma câmera acoplada a um microscópio ótico no Centro Universitário Cesumar.

Para a análise estatística, todos os dados obtidos serão expressos como média \pm desvio padrão. Dados referentes à morfometria da parede intestinal serão submetidos à ANOVA, com pós-teste de Tukey, com nível de significância $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Resultados parciais da análise qualitativa indicam que os animais do grupo GK apresentam uma diminuição da mucosa no CP, que apresentava-se com superfície irregular e redução do número de células caliciformes quando comparadas ao animal controle (W). Além disso, a área das camadas musculares circular e longitudinal apresentam uma espessura menor em relação ao grupo controle (Figura 1). No CD, também foi possível observar redução na área da mucosa e na espessura das camadas musculares circular e longitudinal, com provável diminuição das células caliciformes.

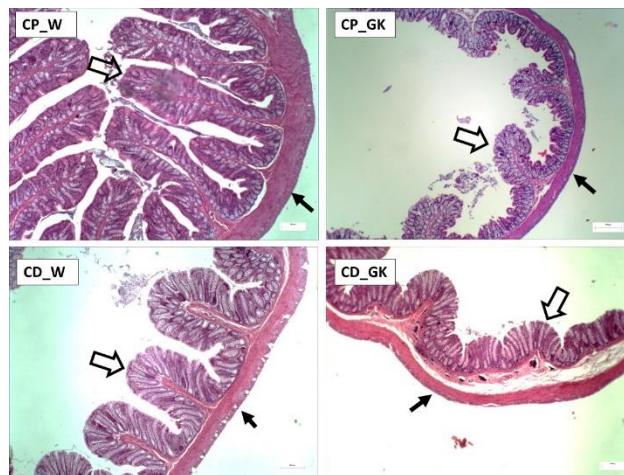


Figura 1: Fotomicrografia da parede intestinal dos colos proximal e distal de ratos wistar e GK. Seta indica a região das camadas musculares circular e longitudinal e setas vazadas indicam a região da mucosa. Barra calibração: 200 μ m.

Segundo Rodrigues et al., (2012), o trato digestório de pacientes diabéticos, possui alterações morfológicas, seja em tamanho de cripta, vilosidades e população celular. Dessa forma, há depleção das células intersticiais de Cajal (CIC) e diminuição das vilosidades, como o observado nos resultados preliminares do presente trabalho, que pode resultar em uma má absorção de nutrientes, prejudicando as funções gastrintestinais.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esses resultados são preliminares embora já indiquem alterações da parede intestinal. Espera-se que com a conclusão das análises morfométricas seja possível fornecer informações de maneira mais específica sobre essas modificações ocasionadas pelo DM, bem como os mecanismos envolvidos nas desordens intestinais nesses pacientes.

REFERÊNCIAS

CESARETTI, Mario Luís Ribeiro and KOHLMANN JUNIOR, Osvaldo. **Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas.** *Arq Bras Endocrinol Metab* [online]. 2006, vol.50, n.2, pp.190-197. ISSN 1677-9487. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302006000200005>.

ESPINDOLA, A. S. et al. **Avaliação morfológica do trato gastrointestinal de ratos diabéticos submetidos à atividade física**. 2013. 4 f. Pesquisa (Enfermagem)- Uniderp, São Paulo, 2013. único.

GOTO, Y., KAKIZAKI, M.; MASAKI, N. Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal wistar rats. **Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.** 51, 80–85, 1975.

MALTA, D.C. et al. Fatores de risco relacionados à carga global de doença do Brasil e Unidades Federadas, 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [S.l.], 20 maio 2017. SUPPL 1: 217-232, p. 217. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbepid/v20s1/1980-5497-rbepid-20-s1-00217.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2018.

MATSUO, T.; ODAKA, H.; IKEDA, H. Effect of an intestinal disaccharidase inhibitor (AO-128) on obesity and diabetes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [S.l.], 01 maio 2018. 55, p. 314-317. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/55/1/314S/4715348?redirectedFrom=fulltext>>. Acesso em: 04 abr. 2018.

MOVASSAT, J. et al. Impaired development of pancreatic beta-cell mass is a primary event during the progression to diabetes in the GK rat. **Diabetologia**, [s.l.], v. 40, n. 8, p.916-925, 21 jul. 1997. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s001250050768>.

OSTEONSON, C.G.; KHAN, A.; ABDEL-HALIM, S.M.; GUENIFI, A; & KI, Suzuki; GOTO, Y.; EFENDIC, S. (1993). Abnormal insulin secretion and glucose metabolism in pancreatic islet from the spontaneously diabetic GK rat. **Diabetologia**. 36. 3-8. 10.1007/BF00399086. PEREIRA, J. N. B. **Caracterização morfofisiológica dos componentes do intestino delgado de ratos Goto-Kakizaki (GK)**. 2016. 16 f. Pesquisa (Doutora em Ciências)- USP, São Paulo, 2016. único.

PICARET-BLANCHOT, F.; BERTHELIER, C.; BAIABI, D.; PORTHA, B. Impaired insulin secretion and excessive hepatic glucose production are both early events in the diabetic GK rat. **Am J Physiol** 34: E755–E762 26, 1996.

RODRIGUES, M.L. C.; MOTTA, M. E. F. A. Mecanismos e fatores associados aos sintomas gastrointestinais em pacientes com diabetes melito. **J Pediatr** (Rio J).88(1):17-24, 2012.