



EFEITOS DA QUERCETINA NOS PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS DOS NEURÔNIOS NADH-DIAPHORASE POSITIVOS DO PLEXO MIOENTÉRICO DO COLO DE RATOS DIABÉTICOS

Paulo Da Silva Watanabe¹; Jéssica Mayumi Melo Abiko¹; Mayara Christina Da Silva¹; Valéria Ferreira Garcez²; Paulo Alexandre Galvanini³

RESUMO: O diabetes mellitus (DM) é o resultado da deficiência crônica da ação insulínica no organismo, por alguma insuficiência relativa ou absoluta do hormônio insulina. Como consequência há um estresse oxidativo, esse processo irá provocar alteração nos padrões das enzimas antioxidantes em virtude do aumento da glicação não-enzimática, havendo assim um desequilíbrio entre a produção de substâncias oxidantes e o sistema de defesa. Estes irão causar danos aos ácidos nucleicos, lipídeos, proteínas resultando assim em morte celular. Conseqüentemente os neurônios mioentéricos serão lesionados perdendo suas funções, comprometendo assim todo o trato gastrointestinal. O objetivo da pesquisa foi avaliar os efeitos de uma droga antioxidante (quercetina) sobre os neurônios mioenterios. Foi possível concluir que a suplementação com quercetina causou a prevenção do aumento da área do corpo neuronais nos ratos do grupo diabético tratado com quercetina em relação ao grupo diabético ($p < 0,05$), deixando o tamanho próximo ao tamanho da área do corpo neuronal dos ratos do grupo controle. Por tanto os resultados são sugestivos de que a quercetina auxilia restaurando os processos oxidativos reduzindo por tanto a produção de radicais livres, protegendo assim os neurônios NADH-dp.

PALAVRAS-CHAVE: Diabetes; Quercetina; Plexo Mioentérico.

1 INTRODUÇÃO

O DM tem sido reconhecido mundialmente como um problema de saúde pública. São alarmantes os índices de óbitos relacionados à doença, sendo também de alto custo financeiro para a sociedade (ALMEIDA et al., 1997;). Estima-se que em 2007 existiam aproximadamente 246 milhões de diabéticos em todo mundo, representando quase 6 % da população mundial, podendo chegar até em 380 milhões em menos de 20 anos. (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2008). No Brasil alguns dados relatam que até 2025, o país deverá ter 17,6 milhões de diabéticos, duas vezes mais do que os dados atuais que apontam uma população de oito milhões de portadores (BAZOTTE, 2010).

¹ Acadêmicos do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá (CESUMAR), Maringá – Paraná. Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). pswatanabe@gmail.com; mayumi_j2ma@hotmail.com; maya_cuties@hotmail.com

² Co-orientador, Professora Doutora do Centro Universitário de Maringá (CESUMAR). valeria.garcez@cesumar.br

³ Orientador, Professor Mestre do Centro Universitário de Maringá (CESUMAR). paulo.galvanini@cesumar.br



Esta doença é o resultado da deficiência crônica da ação insulínica no organismo, por alguma insuficiência relativa ou absoluta do hormônio insulina (WOLFF, 1970). O DM é pertencente a um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por apresentar um estado crônico de hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção e/ou ação do hormônio, ocorrendo uma alteração no metabolismo, em especial o do controle dos níveis de açúcar do organismo (OPPENHEIM, 1996; BAZOTTE, 2010).

São vários fatores que podem provocar o DM, fatores genéticos ou ambientais. Atualmente acredita-se que quando provocadas por fatores genéticos seja por herança do tipo multifatorial. Esses problemas genéticos atuam diretamente ao diminuir a capacidade do pâncreas em secretar a insulina e/ou indiretamente, através do desencadeamento de uma reação imunitária anormal que poderá destruir as células betas do pâncreas, sendo estas as principais células produtoras de insulina. Existem dois tipos principais de DM, as mais comumente encontradas, DM tipo 1, também conhecida como diabetes juvenil que acomete de 10 a 20 por cento dos casos, e DM tipo 2 ou diabetes tardio responsável por 80 a 90 por cento dos casos. Estas são classificadas com base nas necessidades de insulina. (MANUAL DE DIABETES DO MINISTÉRIO DA SAÚDE 1993; WOLFF, 1993; BRASILEIRO FILHO, 2000; KAHN et al., 2009). Algumas pesquisas relatam que as complicações são conseqüências dos distúrbios metabólicos, sendo uns destes distúrbios a hiperglicemia e a hipoglicemia (GIANNINI, 1996; KAHN, 2009).

A neuropatia diabética é uma das complicações mais freqüente, em longo prazo e pode assumir duas formas, simétrica ou polineuropatia e assimétrica ou mononeuropatia sendo distinguidas fisiopatologicamente. Ainda não se sabe ao certo quais os mecanismos que estão envolvidos na patogênese da neuropatia, porém estima-se que são provavelmente devido a uma combinação de doenças microvascular, lesão por compressão e mecanismos imunologicamente mediados. Um dos mecanismos descritos para a formação da neuropatia é o estresse oxidativo, em que esse processo irá provocar a peroxidação lipídica aumentada e alteração nos padrões da glutathione e das enzimas antioxidantes, havendo assim um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e do sistema de defesa, resultando em um aumento de moléculas oxidativas altamente reativas, também chamadas de radicais livres, esses radicais livres acabam causando danos aos ácidos nucléicos, lipídeos, proteínas resultando assim em morte celular. (WOLFF, 1970; ALMEIDA et al., 1997; KAHN, 2009).



A hiperglicemia, por um processo de auto-oxidação em presença de traços de metais transicionais redox-ativos descompartimentalizados, pode gerar oxidantes altamente reativos e resultar em peroxidação lipídica. Tais comprometimentos podem afetar diretamente os componentes neurais simpáticos, parassimpáticos e entéricos induzindo o paciente a uma perda funcional de vários sistemas, dentre eles o trato gastrointestinal (HERNANDES et al., 2000; KAHN 2009).

Dentre as neuropatias que se manifestam no DM, a neuropatia autonômica, que em longo prazo compromete o trato gastrointestinal, isso porque as espécies reativas (antioxidantes) atuam diretamente afetando os neurônios entéricos (KAHN 2009). Clinicamente as principais manifestações que refletem o envolvimento do sistema nervoso são: disfunção motora, retenção gástrica, diarreia (JABLONKA et al., 1980), mal-absorção intestinal, constipação (WOLFF, 1970), alterações cardíacas, distúrbios de sudorese, impotência sexual (ALMEIDA, 1997). Alguns desses sintomas podem ser explicados pelo fato de haver uma ausência ou diminuição das ondas peristálticas primárias. Em 16% dos diabéticos com neuropatia autonômica foi-se registrado também um aumento da vesícula biliar (ARDUINO, 1980). Aproximadamente 75% dos diabéticos possuem problemas digestivos, causado devido os danos aos neurônios do plexo mioentérico, situado no trato gastro intestinal (GOWER, 2007).

O sistema nervoso entérico (SNE) é constituído por redes neurais encontradas entre as camadas de células que constituem a parede do tubo digestório. O plexo mioentérico, está distribuído desde o esôfago até o canal anal, podendo localizar-se entre os estratos longitudinais e circula da túnica muscular. O SNE é formado por neurônios motores, neurônios sensitivos e interneurônios. Os neurônios sensitivos possuem seus corpos distribuídos no plexo submucoso e no plexo mioentérico: são sensíveis às alterações nas tensões na parede dos intestinos e às alterações químicas na luz intestinal. De moto geral pode-se afirmar que o SNE é de fundamental importância para o controle da motilidade do intestino e da tonicidade dos vasos sanguíneos intestinais. (MIRANDA NETO, 2008).

Os neurônios mioentéricos, liberam óxido nítrico em suas terminações nervosas compõem uma subpopulação importante no sistema nervoso entérico. Estes possuem uma função inibitória importante no controle da motilidade do trato gastrointestinal (BULT et al., 1990). O óxido nítrico é produzido quando a L-arginina é reduzida para L-citrulina pela



ação da enzima óxido nítrico sintase (OLSSON e HOLMGREN, 2001) Já que o óxido nítrico é o maior neurotransmissor inibitório não adrenérgico e não colinérgico do trato gastrointestinal, sua alteração, causada em condições patológicas como no diabetes, pode está relacionada a sinais e sintomas encontrados no trato digestório.

Muitas estratégias terapêuticas vêm sendo aplicadas na tentativa combater o excesso de radicais livres, esses tratamentos com antioxidantes tem por objetivo a prevenção a formação e/ou a neutralização dos radicais livres geradas no estresse oxidativo, objetivando minimizar ou evitar as complicações neurológicas do DM (CAMERON et al., 1993; SHIRPOOR et al., 2007). As drogas antioxidantes podem ser relevantes para o tratamento das complicações neurológicas do diabetes.

Os flavonóides pertencem a uma classe de composto fenólicos que possuem ações antioxidantes. Entre eles destaque-se a quercetina (3,5,7,3'-4' – pentahidroxi flavona) por ser o principal flavonóide presente na dieta humana. A quercetina é um flavonóide natural possuindo um grupo hidroxila no anel-B, encontrado em grande quantidade em alimentos, tais como: maçã, chá verde, romã, brócolis, frutas vermelhas, acelga entre outros. Em plantas a quercetina exerce funções de proteger as plantas contra os raios ultravioletas e ainda na prevenção de vírus e bactérias. Luna et al. (1996) afirma que os compostos fenólicos possuem atividade antiviral contra o vírus da imunodeficiência em humanos e ainda aponta que o flavonóide foi responsável por induzirem as células a um aumento do crescimento celular. Já Mascolo et al. (1998) demonstra que em suas pesquisas o flavonóide quercetina apresentaram atividades antiinflamatória, agindo como inibidores de algumas enzimas lisossômicas.

De acordo com a revista de Nutrição de Campinas (2003), estima-se que os humanos consomem apenas 100mg/dia dos flavonóides em suas dietas, afirmando ainda que a quercetina glicosilada, pode ser absorvida em maior escala que a quercetina aglicona. A hidrólise da quercetina no intestino é efetuada por microorganismos, sendo por tanto enzimática.

Dentre as técnicas de histoquímicas que existem para a evidenciação de neurônios do plexo mioentérico, uma das mais utilizadas é a de marcação da enzima NADH. Essa técnica é usada para marca neurônios metabolicamente funcional. O Dinucleótido de nicotinamida e adenina ou NADH (do inglês Nicotinamide adenine dinucleotide) é uma coenzima NAD^+ que quando está em sua forma reduzida se torna NADH, é um composto



orgânico encontrado em todos os seres vivos, já que a mesma é responsável por “transporta elétrons” apresentando um fundamental papel na produção de energia para as células, de acordo com George D. Birkmayer (2011). Para ocorrer esta reação é fornecido, como substrato o NADH e o aceptor artificial de elétrons o Nitro Blue Tetrazolium (NBT). Ao ganhar os elétrons, o NBT precipita-se formando grânulos de formazana de cor azul e insolúvel, deixando evidente assim o corpo celular de neurônios com maior atividade da enzima NADH-dp, que representam aqueles com maior atividade daquela enzima. (SEYFERT, 2009)

Apesar de existir diversas literaturas que comprovam o uso da quercetina como antioxidante uma abordagem que ainda merece investigação são os possíveis efeitos neuroprotetores e/ou neurotróficos da quercetina sobre os neurônios do SNE, já que o mesmo é danificado em pacientes diabéticos, causando distúrbios neurais. O objetivo deste projeto foi realizar essa investigação no plexo mioentérico do colo de ratos diabéticos evidenciados pela técnica da NADH-dp, sendo a quercetina um agente antioxidante, participando da suplementação alimentar dos animais.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAIS E MÉTODO

Para a obtenção dos grupos de estudos foram utilizado neste estudo o colo de ratos adultos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), variedade *albinus*, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá.

Aos 86 dias de idade, os animais foram transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfofisiológicas, onde permaneceram alojados em caixas de polipropileno com dimensões 40x33x17 cm (comprimento, largura e altura) providas de bebedouro e comedouro, e mantidos em condições ambientais controladas de temperatura (22°C) e iluminação (ciclo 12 horas claro/12 horas escuro).

Após um período de adaptação ao novo ambiente, os ratos então com 90 dias de idade, foram disponibilizados para o período experimental que tem duração de 120 dias. Portanto, foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, contendo 6 animais cada,



segundo os tratamentos a que foram submetidos (tabela 1):

Tabela 1. Divisão dos grupos de animais

Grupos	Animais
C	Animais normoglicêmicos (Controle)
Q	Animais normoglicêmicos suplementados com quercetina
D	Animais diabéticos induzidos pela estreptozotocina
DQ	Animais diabéticos induzidos pela estreptozotocina, suplementados com quercetina

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.

A partir do primeiro dia do experimento, após a injeção de estreptozotocina, os animais dos grupos Q e DQ estão recebendo diariamente água suplementada com quercetina na dosagem de 200 mg/Kg de peso corporal. Os animais dos grupos C e D recebem água sem suplementação.

Para o cálculo da quercetina (200mg/Kg) foi realizada uma avaliação prévia da ingestão de água pelos animais dos grupos Q e DQ por três dias consecutivos a fim de obtermos a média da quantidade de água consumida por cada animal e ainda, os animais foram pesados periodicamente e a média do grupo está sendo usada para a manutenção da quantidade de quercetina (200mg/kg) a ser administrada no experimento.

Aos 210 dias de idade o colo proximal dos animais serão coletados e processados para a seguinte técnica:

- Elaboração de preparados totais da túnica muscular para a análise quantitativa e morfométrica dos neurônios mioentéricos reativos ao NADH.
Obs. Para todas as técnicas será utilizado um n= 6 animais por grupo.

No dia do sacrifício, os animais serão pesados e anestesiados com tiopental (40 mg/kg).



2.1.1 Técnica da NADH-diaphorase

Os segmentos intestinais serão lavados e distendidos em solução de Krebs pH 7,3 contendo: 1,3 g de NaHCO_3 , 0,24 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,44 g de KCl, 0,165 g de NaH_2PO_2 , 7,05 g de NaCl e 0,27 g de CaCl_2 em 1 litro de água destilada e, imediatamente, submetidos aos procedimentos para evidênciação neuronal. Estes constam de duas lavagens de 10 minutos em solução de Krebs pH 7,3; permeabilização em Krebs contendo Triton X-100[®](Sigma) a 0,3% por cinco minutos; mais duas lavagens de 10 minutos em Krebs; e incubação por 45 minutos em meio de reação consistindo de: 25 ml de solução estoque de NBT^(Sigma) (NBT, solução estoque na concentração de 0,5 mg/ml), 25 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M, 50 ml de água destilada e 0,05 g de β -NADH^(Sigma). Em seguida, serão fixados em formol a 10% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 para interromper a reação e, submetidos à elaboração de preparados de membrana e montados entre lâmina e lamínula.

Para a realização dos preparados de membranas, o colo será seccionado, as camadas mucosa e submucosa serão removidas com auxílio de instrumental cirúrgico sob microscópio estereoscópio com transiluminação; a seguir, os preparados totais de membrana serão montados com glicerina tamponada entre lâmina e lamínula e foram fotografados em fotomicroscópio binocular.

2.1.2 Análise Morfométrica

Para a análise do tamanho da área do corpo celular serão mensurados 100 neurônios de cada colo de todos os animais, utilizando-se para tanto, um software analisador de imagens, Image-Pro Plus 4.5.

2.1.3 Tratamento Estatístico

Os dados referentes à morfometria serão submetidos ao programa statistics, ao Teste estatístico Tukey.



Para o processamento das imagens foi utilizado um micro computador com processador AMD athon 64X2 dual core 5000+, 2,60 GHz, 1,87 GB de Ram, HD 200 GB, Sistema operacional windows XP, Monitor AOC 20". Para capturar as imagens foi utilizado um software específico, axiovision rel. 4,8, utilizando também um aparelho de microscópio Axioskop 2 plus (Zeiss).

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da mensuração de 100 neurônios por grupo, e obtido a média e desvio padrão do tamanho dos corpos neuronais. Observa-se que o grupo Diabético houve um aumento do tamanho neuronal de 21% em relação aos ratos do grupo controle. E o grupo diabético suplementado com a quercetina pode-se constatar uma redução no corpo neuronal dos neurônios NADH-dp de 8,9% se comparado com o grupo diabético. A tabela 2 demonstra estes resultados.

Tabela 2 – Média±Desvio Padrão do tamanho dos corpos neuronais dos neurônios NADH-dp, unidade de medida em μm^2 . Em que C – Grupo controle, Q - Grupo normoglicêmico suplementado com Quercetina, D - Grupo Diabético, DQ – Grupo Diabético suplementado com Quercetina.

Grupo	Média±DP
C	104.8±49,17
Q	100.3±50,81
D	126.5±103,8
DQ	115.2±54,22

Na figura 1 apresentamos um gráfico disposto da média do tamanho dos corpos neuronais comparando os grupo. Na qual fica evidente os resultados obtidos.

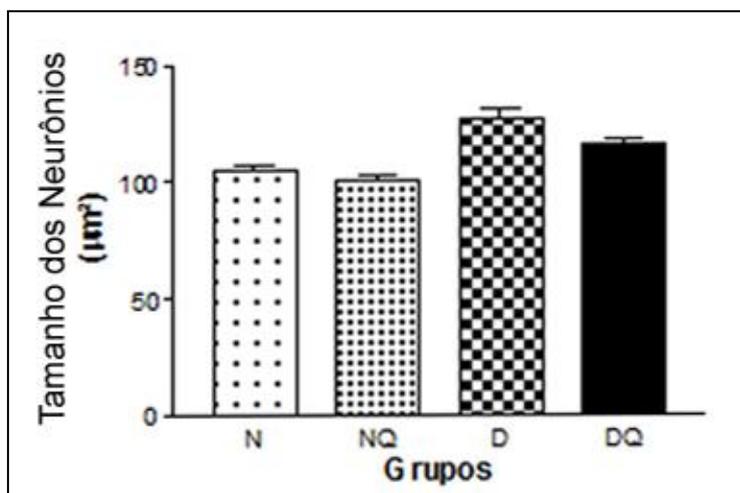


Figura 1 - Área média (μm^2) dos corpos celulares de neurônios NADH-diaforase positivos do plexo mioentérico do íleo de ratos pertencentes aos grupos: controle (N), diabético (D) e diabético suplementado com quercetina (DQ). Dados expressos como média \pm DP

O grupo normoglicêmico suplementado com quercetina não apresentou diferença significativa no tamanho neuronal, evidenciando que este suplemento não causa perdas, quando analisado a área do neurônio.

Os resultados obtidos vão de encontro aos dados apresentados por Zanoni et al., (2002) em que afirma que os neurônios NADH-dp positivos sofrem um edema aumentando de tamanho, isto devido ao estresse oxidativo provocado pelo aumento de glicose sélica, o que ocorre em quadros de DM (figura 2). Uma possível hipótese para a causa do tamanho aumentado em DM e que seja provocado por aumento do sorbitol intracelular um poliálcool que é oriundo da glicose e esse excesso de sorbitol dentro da célula causada pelo DM causa um aumento da pressão osmótica (dano a bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$), tornando o neurônio hiperosmótico em relação ao meio, como consequência, há influxo de água, tornando-o maior (PERUZZO e CANTO, 2010).

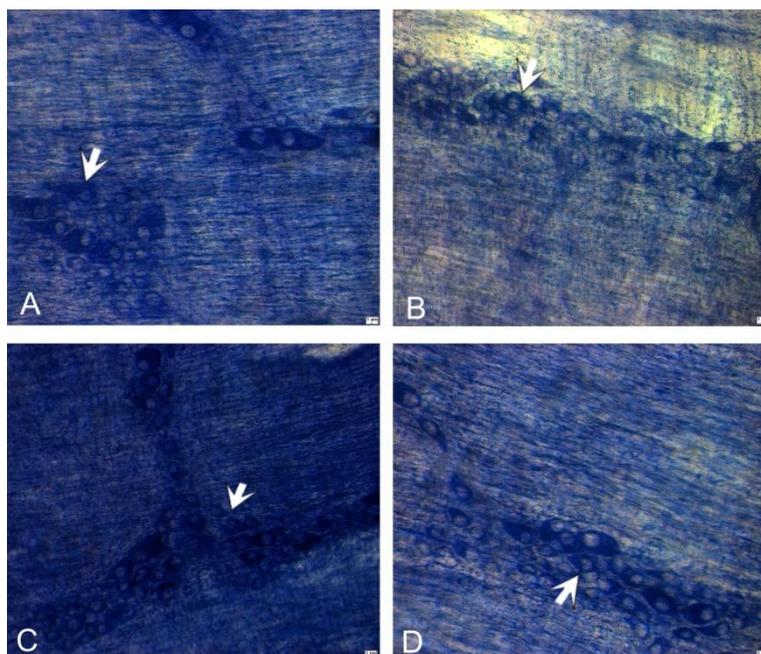


Figura 2 - Neurônios NADH-dp em que, A- Rato Controle, B- Rato Diabético, C- Rato Normoglicêmico suplementado com quercetina, D- Rato Diabético suplementado com quercetina. Setas- Indicam neurônios NADH-dp, em que percebemos que na imagem B há uma prevalência maior de corpos neuronais grandes ao passo que o animal com DM, porém suplementado com quercetina há também corpos neuronais pequenos. –imagens obtidas no aumento de 40x.

3 CONCLUSÃO

Concluimos com este estudo que a quercetina preveniu o aumento (edema) dos neurônios NADH-dp positivos do colo proximal de ratos com DM induzidos pela estreptozotocina, possivelmente, por diminuir os danos causados no estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Henriqueta. et al. **Diabetes mellitus, uma abordagem simplificada para profissionais de saúde**. São Paulo: Atheneu. 1997.
- ARDUINO, Fransisco. **Diabetes mellitus**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980.
- BAZOTTE, Roberto. **Paciente diabético: Cuidados Farmacêuticos**. Rio de Janeiro: MedBook, 2010.



BIRKMAYER, George. **Tudo sobre NADH**. Disponível em: <
<http://www.ergivit.pt/index.php> >. Acesso em 10 Mar. 2011, 23:05:12.

BRASÍLIA. **Ministério da saúde, secretaria de assistência a saúde. Manual de diabetes**, 1993

BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo Patologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BULT, H et al. **Nitric oxide as na inhibitory non-adrenergic, no-cholinergic neurotransmitter**. *Nature*, 1990.

CAMERON, N.E. et al. **Anti-oxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats**. *Diabetologia*, 1993.

GOWER Timoty. Diabetes e problemas digestivos. Disponível em <
<http://saude.hsw.uol.com.br/diabetes-problemas-digestivos.htm> > Acesso em 12 Mar. 2011, 18:34:45

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. BARNETT ET AL. **Diabetes impact survey report. MSD Diabetes, 2008**. Disponível em: <
www.merckfrosst.ca/assets/en/pdf/press/r_d_news/diabetes/press_releases/pr_20081112.pdf.> Acesso em 22 de Mar. 2011, 14:50:23.

JABLONKA, Sylvio. et al. **Diabetes mellitus**. São Paulo: Fundo editorial BYK-Prociex, 1980.

KAHN, C.Ronald, et al. **Joslin: Diabetes Melito**. 14.ed. São Paulo: Artmed, 2009.

LIMA, Leonardo et al. **Efeitos do Flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos**. *Revista de Nutrição*. Campinas, Jul/Set. 2003

LUNA D. et al. **Actividad biológica de flavonóides**. Anais do 4^o Simpósio Internacional de Química de Productos Naturales y SUS aplicaciones 1996. P. 134-135.

MASCOLO N. et al. **Natural Products and cardiovascular disturbances. Phytother Res** 1998. p. 121-123.

MIRANDA NETO, Marcílio. **Anatomia Humana: Aprendizagem dinâmica**. 3.ed. Paraná: Clhetec, 2008.

OLIVEIRA, Tania et al. **Efeito de diferentes doses de flavonóides em ratos hiperlipidêmicos**. *Revista de Nutrição*. Campinas, Jan/Abr. 2002

OLSSON C, HOLMGREN S. **The control of gut motility. Comparative Biochemistry and Physiology Part-A**, 2001.

OPPENHEIM, Renato. **Fiquei diabético, e agora?**. 2. Ed. São Paulo: Saraiva, 1996.



SANTORO, Mariana. **Já ouviu falar em quercetina?**. Disponível em <
http://saude.abril.com.br/edicoes/0311/nutricao/conteudo_473623.shtml > Revista Abril.
Acesso em 09 Mar. 2011, 10:09:23

SEYFERT C.E. **Repercussões morfológicas da lesão térmica corporal nos componentes do plexo mioentérico do jejuno de ratos adultos. 2009.** Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

SHIRPOOR, A. et al. **Effect vitamin E on oxidative stress status in small intestine of diabetic rat. World J Gastroenterol, 2007.**

PERUZZO, Tito, et al. **O que é sorbitol? Que risco causa aos diabéticos?: Sorbitol endógeno está ligado a problemas como catarata, retinopatia e neuropatia.** Editora Moderna, 2010. Obtido via internet <
<http://www.moderna.com.br/lumis/portal/file/fileDownload.jsp?fileId=8A7A83CB30D6852A0130DCBC3E8077EA>> acesso em 30 ago. 2012. 19:11:40

VINCENT, A.M. et al. **Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. Endocrine Reviews Ann Arbor, 2004.**

WOLFF, Henry. **Diabete méliko.** São Paulo: Fundo editorial Prociencx, 1970.

ZANONI, J. N. et al. **Neuropatias periféricas associadas ao Diabetes: contribuições da vitamina E para o seu tratamento e prevenção.** Arq. De Ciên. Saúde Unipar, 2002. Disponível em < <http://revistas.unipar.br/saude/article/viewFile/1191/1052>> acesso em 21 ago. 2012. 23:11:56