

ALTERAÇÕES MORFOQUANTITATIVAS DUODENAIIS CAUSADAS PELO DIABETES MELLITUS TIPO I

Valéria Milena Dantas de Castro ¹
Fernando Vagner Lobo Ladd ²
Karina Carla de Paula Medeiros ³
Licyanne Ingrid Carvalho de Lemos ⁴
Naisandra Bezerra da Silva Farias ⁵

RESUMO

O Diabetes Mellitus é uma desordem metabólica causada pela destruição imunomediada das células beta pancreáticas com um consequente déficit na produção de insulina. Segundo as estimativas mundiais de acometimento dessa doença a mesma tende a aumentar nos próximos anos afetando milhões de pessoas em todo o mundo. A hiperglicemia gerada por essa doença pode levar ao desenvolvimento de diversos danos e complicações em tecidos e órgãos. No trato intestinal algumas alterações já foram descritas como peristaltismo anormal, mudanças de microbiota e inflamação. Sendo assim, o presente estudo visa analisar as alterações morfoquantitativas que ocorrem na porção duodenal do intestino delgado de ratos com diabetes induzidos por estreptozotocina. Para isto se utilizou 16 animais machos da linhagem Wistar, onde a amostra foi dividida em dois grupos: 1- grupo controle: animais normoglicêmicos, 2- grupo diabético: animais hiperglicêmicos. Os animais permaneceram alojados em caixas de polipropileno e receberam ração e água *ad libitum*. No decorrer do período experimental se quantificou dados pré-clínicos e finalizado o período de 30 dias, foi realizado a eutanásia para remoção das amostras duodenais. Posteriormente as amostras passaram pelo processamento histológico de rotina, coradas em HE, fotografadas e analisadas por métodos morfoquantitativos. Durante o experimento observou-se a hiperglicemia, bem como polidipsia e polifagia, sinais típicos da doença. Além disso quanto aos dados de quantificação e morfologia do duodeno, ocorreu um aumento no volume total do duodeno proveniente do espessamento da camada de mucosa.

Palavras-chave: Estreptozotocina, Polifagia, Estereologia, Intestino delgado.

INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) se trata de um distúrbio metabólico caracterizado pela hiperglicemia, proveniente da deficiência na secreção ou da ação da insulina (SAMI et al.,

¹ Doutoranda pelo programa de pós-graduação em Biocência Animal - UFRPE, castromilenabio@gmail.com;

² Professor adjunto de anatomia do Departamento de Morfologia na Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN fernandoladd@gmail.com;

³ Professora adjunta de histologia do departamento de morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, karinapm@yhoo.com;

⁴ Mestre em Nutrição pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Licyannelemos@outlook.com;

⁵ Professor orientador: Dra: Naisandra Bezerra da Silva Farias, Departamento de Morfologia - UFRN, naisandra@hotmail.com.

Resultados de projeto de pesquisa de pós-graduação a nível de mestrado.

2017). Esta desordem pode ocorrer de diversas formas como o Diabetes Mellitus Tipo I (DM1), Diabetes Mellitus Tipo II (DM2) e Diabetes Mellitus Gestacional (SBD -2019).

A longo prazo tal patologia leva ao desenvolvimento de diversas complicações associadas. Danos como retinopatia, neuropatia, problemas cardíacos já foram evidenciados em estudos anteriores (MACHADO et al., 2017). No sistema gastrointestinal podem ocorrer alterações desde a cavidade oral até a região anorretal levando ao surgimento de sintomas como - gastroparesia, diarreia, peristaltismo anormal, dores abdominais e vomito (WOLOSIN et al., 2000; SHAKIL et al., 2008; KRISHNAN et al., 2013).

Além desses sintomas, alguns estudos já vêm mostrando as alterações que ocorrem a nível morfológico tecidual que compõem esse sistema. Tais anormalidades tem sido observadas tanto em roedores quanto em humanos (PELLEGRINI et al., 2017). Mudanças de microbiota, presença de infiltrados inflamatórios e alterações de volume do jejuno e íleo já foram observadas em estudos anteriores (DA ROSA et al., 2015; WEN; DUFFY, 2017).

A partir disso, levando em consideração a gravidade desta doença, o presente estudo visa elucidar por parâmetros de quantificação estereológica as possíveis alterações morfológicas e volumétricas causadas pelo diabetes na porção duodenal do intestino delgado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização deste estudo foi utilizado como modelo animal o *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar. Os animais foram provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, após aprovação prévia pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UFRN, sob o protocolo 018/2017. O experimento foi realizado no biotério experimental do Departamento de Morfologia/UFRN com a utilização de um total de 16 ratos machos com 90 dias de idade e pesando cerca de 250-300 g.

Os animais permaneceram alojados em caixas de polipropileno providas de bebedouro e comedouro durante o período de ambientação de uma semana. Foram alocados 4 animais por caixa, mantidas em condições controladas de temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$), iluminação (ciclo de 12 horas claro/ 12 horas escuro) e receberam ração e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos em 2 grupos, sendo um grupo controle composto por animais saudáveis e outro grupo composto por animais diabéticos induzidos por estreptozotocina.

Resultados de projeto de pesquisa de pós-graduação a nível de mestrado.

Os animais passaram por um processo de indução de DM1 por via intraperitoneal, com a utilização da estreptozotocina (STZ, 50mg/kg) dissolvida a 10 mmol/L solução citrato de sódio (pH 4,5). O resultado da ação dessa substância é que os animais se tornam acometidos pela deficiência de insulina, hiperglicemia, polidipsia e poliúria, todos esses sinais característicos do DM1 humano. Após 5 dias da indução do diabetes, a glicemia de todos os animais experimentais foi mensurada por meio de um glicosímetro portátil e os animais que exibiram glicemia ≥ 250 mg/dl foram considerados diabéticos. Posteriormente a confirmação os animais foram mantidos nas mesmas condições e permaneceram por um período de 30 dias, sendo avaliados parâmetros pré-clínicos de glicemia, consumo de água e ração.

Terminado o período experimental foi realizada a eutanásia com uma dose letal de isoflurano para retirada das amostras duodenais. As amostras foram lavadas com soro fisiológico, fixadas em paraformaldeído a 4% e posteriormente seguiram o processamento de rotina e coloração em Hematoxilina-Eosina -HE.

Com as lâminas histológicas confeccionadas foram feitas captura de imagens em microscópio ótico e com câmera acoplada. Foram utilizadas objetivas em aumentos de 2x para analisar Volume de Referência-Vref (parede, lúmen e volume total) e em aumento de 4x para mensurar em percentagem a Densidade de volume-Vv que fornece a proporção ocupada por cada subcamada (mucosa, submucosa e muscular) em relação ao total da parede. Em seguida foi feita a aplicação de sistemas testes quadráticos para contagem de pontos que tocassem regiões de interesse e aplicação dessa contagem em formulas específicas para cada parâmetro avaliado.

Para análise de Vref segundo o princípio de Cavalieri foi utilizada a seguinte formula:

$$V_{ref} = \sum p \times (a/p) \times t \times f^{-1} \times f^{-1}$$

Onde $\sum p$ é o somatório de pontos que tocam a região de interesse (Parede ou Lúmen), a/p é a área por ponto do sistema teste quadrático que foi aplicado nas imagens de microscópio ótico, t é a espessura da secção em μ^2 , f^{-1} é o inverso da fração que foi utilizada para amostragem do órgão na clivagem e na microtomia respectivamente (GUNDERSEN et al., 2013).

Após isso, a partir da soma do Vref de parede e Vref de lúmen se obteve o volume total **Vtot** como demonstrado na formula a seguir:

$$V_{tot} = V_{ref} \text{ parede} + V_{ref} \text{ de lúmen}$$

Resultados de projeto de pesquisa de pós-graduação a nível de mestrado.

Seguindo o princípio de Delesse foi estimado a Densidade de Volume (Vv) por subcamadas. Foi feito para mucosa, submucosa e musculares tendo em vista que a serosa não era perceptível em algumas das secções histológicas. Para isto se utilizou a formula a seguir:

$$Vv = \frac{\sum p \text{ subcamada}}{\sum p \text{ parede}}$$

onde Σp é o somatório de pontos que tocam a região de interesse e a subcamada neste caso pode ser mucosa ou muscular (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Essa fração foi feita para estimar a proporção que cada camada ocupa em relação ao total que é a parede composta por mucosa, submucosa, musculares e serosa.

A análise dos dados foi realizada com auxílio do Software Minitab 2018, onde se aplicou inicialmente um teste de normalidade para verificar a distribuição dos dados e em seguida foi realizado o teste T para verificar a diferença estatística entre os grupos.

DESENVOLVIMENTO

O Diabetes Mellitus ainda é um problema de saúde pública tendo em vista a forma como a qual afeta a vida dos pacientes bem como a necessidade de altos investimentos destinados todos os anos para tratamento da mesma. Estimativas mundiais mostram que o número de pessoas com essa doença tende a aumentar nos próximos anos onde até 2045 o número de pessoas acometidas pelo diabetes pode chegar a 629 milhões com um aumento de 48% de casos (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES - 2019).

É uma doença sistêmica que afeta a saúde do indivíduo em diversos aspectos, desde o nível de organização celular até o nível sistêmico. O quadro patológico do DM acarreta em diversos prejuízos a qualidade de vida do indivíduo incluindo o bem estar físico, emocional e social (NANSEL et al., 2008). Além disso alterações hormonais, imaturidade e resistência na aceitação da doença são fatores comuns aos adolescentes com DM1 o que dificulta o controle da glicose sanguínea, maximizando os danos que o DM1 traz para os pacientes (COSTA; VIEIRA, 2015).

As alterações metabólicas decorrentes do DM podem levar a uma variedade de complicações em órgãos e tecidos (MACHADO et al., 2017; SBD - SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES-[s.d.]). No trato gastrointestinal, alguns estudos mostram

Resultados de projeto de pesquisa de pós-graduação a nível de mestrado.

anormalidades na absorção de nutrientes, mudanças de microbiota e inflamação (KNIP; SILJANDER, 2016; LEE et al., 2017; VELLA; CAMILLERI, 2017; WEN; DUFFY, 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados pré-clínicos avaliados demonstraram os sinais típicos da síndrome metabólica como o aumento da glicose sanguínea, consumo de água e ração. Esses resultados indicam polidipsia e polifágia assim como demonstrado na literatura em estudos com o uso de estreptozocina (DAVIDSON et al., 2011; DE OLIVEIRA et al., 2019).

Tabela 1. Dados pré-clínicos. Grupo controle (C), grupo diabético (D).

	C	D
Glicemia (d/mg)	120,63	700,4*
Água i (ml)	37,88	136*
Água f (ml)	31,8	220,5*
Ração i (g)	25,8	30,5
Ração f (g)	19,3	42,8*

Fonte: arquivo pessoal. * diferença estatística significativa versus o grupo controle.

Quanto aos dados de quantificação de volume do duodeno foram observadas de modo geral um aumento no volume duodenal. Observando separadamente os dados para parede, lúmen e volume total observou-se que houve um espessamento significativo da parede e do volume total no grupo diabético em relação ao grupo controle, enquanto que o volume de lúmen não houve diferença significativa entre os grupos (Gráfico 1). Ao comparar os dados percebe-se que o aumento total foi em decorrência do aumento de volume de parede. Tal alteração corrobora com o encontrado com Rosa et al. (2015) em que avaliou o volume de jejuno e ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

Resultados de projeto de pesquisa de pós-graduação a nível de mestrado.

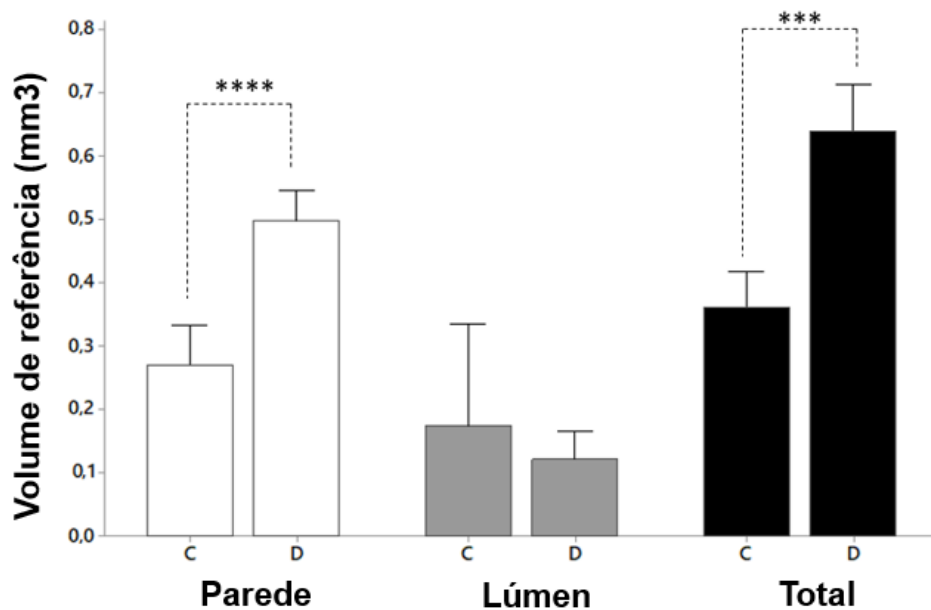


Gráfico 1- Volume de referência do duodeno. Grupo controle (C), grupo diabético (D). *** P= 0,001, **** P= 0,000.

Quando avaliado separadamente as subcamadas da parede duodenal visualmente nas secções transversais coradas em Hematoxilina e Eosina -HE em aumento de 4x é perceptível que há um aumento da mucosa selecionada pelo colchete. Já nas secções em aumento de 40x se destaca pela estrela a submucosa e pelo traço a muscular onde ambas reduzem de tamanho no grupo diabético versus o grupo controle (Figura 1A). Esses dados se confirmam na análise quantitativa estereológica de densidade de volume onde se observa que a um aumento da proporção ocupada pela mucosa em relação ao valor total da parede enquanto a submucosa e muscular reduzem sua proporção (Figura 1B).

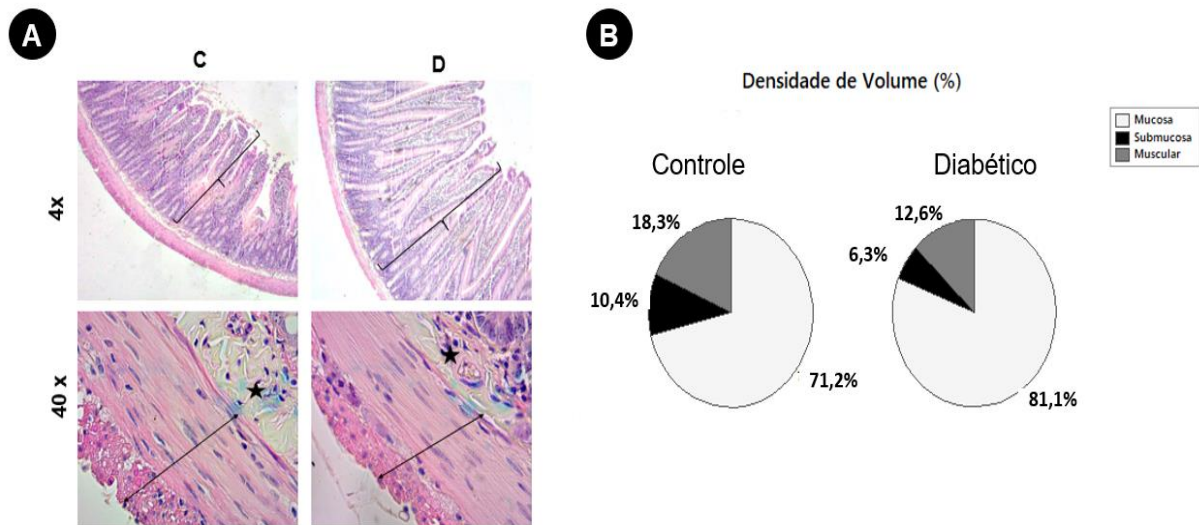


Figura 1- Densidade de volume do duodeno. Secções transversais coradas em HE em aumentos de 4X e 40X (A), gráfico de setores mostrando a proporção em (%) ocupada pelas subcamadas da parede intestinal (B).

Algumas hipóteses vêm sendo formuladas para essa alteração morfológica de volume, uma delas é que por haver uma dificuldade na captação de glicose pelos tecidos mediante a ausência de insulina o intestino atue de forma compensatória aumento sua área de superfície para obter uma maior quantidade de nutrientes (MAYHEW; CARSON, 1989). Quanto a diminuição da submucosa vista nesse estudo nos animais diabéticos corrobora com os dados encontrados por Rosa et al. 2015 em que atribui esse dano a glicação proteica que ocorre de modo acelerado mediante o estado hiperglicêmico. Esse processo de glicação está ligado a hiperglicemia, onde no tecido conjuntivo pode ocorrer principalmente com as proteínas de colágeno (SADOWSKA-BARTOSZ; BARTOSZ, 2015). Tendo em vista que a submucosa é constituída de tecido conjuntivo principalmente, pode se atribuir o mecanismo de glicação avançada como preditor da diminuição dessa camada.

Outro fator que pode contribuir para esse aumento de volume da mucosa intestinal é a polifagia gerada pelo DM1 que leva ao desenvolvimento hiperplásico da mucosa intestinal. Somado a isso tem-se que a inervação intestinal que participa na cinética de regulação da proliferação celular e apoptose, mantém a homeostase entre esses processos. No entanto com a neuropatia diabética há prejuízos nessa regulação o que contribui ainda mais para o aumento do volume da mucosa (ZANONI; FERNANDES PEREIRA, 2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Resultados de projeto de pesquisa de pós-graduação a nível de mestrado.

A partir dos dados obtidos observou-se que a estreptozotocina atuou de forma efetiva na produção do modelo experimental de DM1 levando ao surgimento dos sinais clínicos do diabetes humano como hiperglicemia, polidipsia e polifagia.

A hiperglicemia gerada pela destruição das células beta pancreáticas foi capaz de induzir alterações morfológicas no duodeno.

O aumento de volume total do duodeno foi propiciado pelo aumento de mucosa.

O aumento da mucosa intestinal pode estar relacionado a polifagia gerada pelo DM1 que requer uma maior absorção tendo em vista a maior demanda de nutrientes consumidos.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional e ao Departamento de Morfologia -DEMOR da Universidade Federal do Rio Grande do Norte- UFRN por fornecer toda estrutura necessária aos experimentos e análises necessárias para conclusão desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

COSTA, LM; VIEIRA, SE. Quality of life of adolescents with type 1 diabetes. **Clinics**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 173–179, 2015.

DA ROSA, C. V. D. AZEVEDO, S, C. F. S; BAZOTTE, R. B et al. Supplementation with L-glutamine and l-alanyl- l-glutamine changes biochemical parameters and jejunal morphophysiology in type 1 diabetic wistar rats. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1–16, 2015.

DAVIDSON, E. P. COPPEY, L; DAKE , B Et al. Treatment of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats with Alogliptin: Effect on Vascular and Neural Complications. **Experimental Diabetes Research**, [s. l.], v. 2011, p. 1–7, 2011.

DE OLIVEIRA, A. R. SILVA, F. S; BORTOLIN, R. H et al. Effect of photobiomodulation and exercise on early remodeling of the Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. e0211643, 2019.

Federação Internacional de Diabetes - Home. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.idf.org/>>. Acesso em: 27 maio. 2019.

GUNDERSEN, H. J. G. MIRABILE, R; BROWN, D et al. **Stereological Principles and Sampling Procedures for Toxicologic Pathologists**. Third Edit ed. [s.l.] : Elsevier, 2013.

KNIP, M; SILJANDER, H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 154–167, 2016.

Resultados de projeto de pesquisa de pós-graduação a nível de mestrado.

KRISHNAN, B., BABU, S., WALKER, J., WALKER, AB, E PAPPACHAN, JM. Gastrointestinal complications of diabetes mellitus. **Gastrointestinal complications of diabetes**, [s. l.], v. 4, 2013.

LEE, S. H; RHEE, M; KIM, J et al. Generation of insulin-expressing cells in mouse small intestine by Pdx1, MafA, and BETA2/NeuroD. **Diabetes and Metabolism Journal**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 405–416, 2017.

MACHADO, D; COELHO, A; PAULA, A et al. Prevalência de Lesões de Cárie de Doentes com Diabetes Mellitus Tipo 1 Tratados com Múltiplas Administrações de Insulina e de Indivíduos sem Diabetes. **Acta Médica Portuguesa**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 402, 2017.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 75, n. 4, p. 469–486, 2003.

MAYHEW, T. M.; CARSON, F. L. Mechanisms of adaptation in rat small intestine: regional differences in quantitative morphology during normal growth and experimental hypertrophy. **Journal of anatomy**, [s. l.], v. 164, p. 189–200, 1989.

NANSEL, T. R. WEISBERG-BENCHELL, J; WYSOCKI, T et al. Quality of Life in Children with Type 1 Diabetes: A Comparison of General and Diabetes-Specific Measures, and Support for a Unitary Diabetes Quality of Life Construct. **Diabetic Medicine**, [s. l.], 2008.

PELLEGRINI, S; SORDI, V; BOLLA, A. M et al. Duodenal mucosa of patients with type 1 diabetes shows distinctive inflammatory profile and microbiota. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 102, n. 5, p. 1468–1477, 2017.

SADOWSKA-BARTOSZ, I; BARTOSZ, G. Prevention of protein glycation by natural compounds. **Molecules**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 3309–3334, 2015.

SAMI, W; ANSARI, T; BUTT, N. S et al. Effect of diet on type 2 diabetes mellitus: A review. **International journal of health sciences**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 65–71, 2017.

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes - Notícias e Tratamentos para Diabetes. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/publico/>>. Acesso em: 16 maio. 2019.

SHAKIL, A; IGREJA, R. J, & RAO, SS. Gastrointestinal Complications of Diabetes. **Médico de família americano**, [s. l.], v. 77, 2008.

VELLA, A; CAMILLERI, M. The Gastrointestinal Tract as an Integrator of Mechanical and Hormonal Response to Nutrient Ingestion. **Diabetes**, [s. l.], v. 66, n. 11, p. 2729–2737, 2017.

WEN, L; DUFFY, A. Factors Influencing the Gut Microbiota, Inflammation, and Type 2 Diabetes. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 147, n. 7, p. 1468S–1475S, 2017.

WOLOSIN, J. D; FACP M. D; EDELMAN, S. V. Diabetes e Tracto gastrointestinal. **Diabetes clinicas**, [s. l.], v. 18, 2000.

Resultados de projeto de pesquisa de pós-graduação a nível de mestrado.

ZANONI, J. N; FERNANDES, F. R.V. Cell proliferation of the ileum intestinal mucosa of diabetic rats treated with ascorbic acid. **Biocell**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 163–168, 2008.