

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – PBC

JÉSSICA MEN DE CAMPOS

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR EM RATOS DIABÉTICOS:  
PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS DO  
INTESTINO GROSSO**

Maringá  
2017

JÉSSICA MEN DE CAMPOS

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR EM RATOS DIABÉTICOS:  
PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS DO  
INTESTINO GROSSO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Maria Raquel Marçal Natali

Maringá  
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

C198e Campos, Jéssica Men de  
Efeitos da restrição alimentar em ratos diabéticos: parâmetros fisiológicos, bioquímicos e morfológicos do intestino grosso / Jéssica Men de Campos. -- Maringá, 2017.  
69 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Raquel Marçal Natali.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Morfológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2017.

1. Diabetes mellitus (DM) - *Rattus norvegicus* - Restrição alimentar. 2. Intestino grosso - Neurônios mientéricos. 3. Dieta hipercalórica - Estilo cafeteria. 4. Análises bioquímicas. 5. Análises fisiológicas. 6. Trânsito intestinal. I. Natali, Maria Raquel Marçal, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Morfológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDD 23.ed. 616.462

MN-004047

## **BIOGRAFIA**

Jéssica Men de Campos nasceu em Cianorte, Paraná, em 25 de junho de 1991. Mudou-se para a cidade de Maringá, Paraná em 2009 e ingressou no curso de graduação em 2011. Obteve o certificado de Bacharel em Biomedicina (2014), pela Universidade Estadual de Maringá desenvolvendo trabalhos de iniciação científica em diferentes áreas do conhecimento, entre elas: imunogenética, microbiologia de alimentos e histologia. Na mesma instituição participou também da fundação da empresa júnior de biomedicina (Salus Consultoria) e trabalhos voluntários, projetos os quais foram muito importantes para o crescimento profissional, exercitando a empatia e trabalho em grupo. Em 2015 ingressou na pós-graduação em Ciências biológicas e sob a orientação da professora Maria Raquel Marçal Natali desenvolveu projeto de pesquisa que se concentrou nas seguintes áreas de conhecimento: neurônios entéricos, diabetes mellitus e morfologia intestinal.

JÉSSICA MEN DE CAMPOS

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR EM RATOS DIABÉTICOS:  
PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS DO  
INTESTINO GROSSO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Aprovado em:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Raquel Marçal Natali  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nilza Cristina Buttow  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Eduardo José de Almeida Araújo  
Universidade Estadual de Londrina

Dedico este trabalho à minha família,  
sempre presente e dispostos a me dar  
todo apoio que precisei para chegar  
até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela minha vida e pelas oportunidades que me deu neste caminho, e principalmente pela sabedoria que me concedeu para que eu possa fazer minhas escolhas.

À minha mãe Nilva, meu pai Adilson e meu irmão Matheus por serem a representação do amor incondicional que sempre recebi, por todo incentivo e apoio que me deram até aqui. Serei eternamente grata por confiarem em mim e por tudo o que fizeram desde o dia em que nasci, vocês são o meu alicerce e sei que sempre fizeram o melhor que puderam em tudo.

À minha tia Nilsa, especialmente presente, sempre torcendo e sonhando junto comigo. Obrigada pela amizade e por tudo que fez e faz por mim.

Ao meu amor, Mateus, por me mostrar como esse sentimento pode nos impulsionar de uma forma única a buscar sempre o melhor de nós e por se alegrar com minhas mais pequenas conquistas! Obrigada por me envolver em tanto carinho, dedicação e paz.

À minha orientadora Maria Raquel Marçal Natali, pessoa que admiro tanto, obrigada por seu apoio, por me cobrar quando foi necessário e por me ouvir com paciência mesmo em momentos de agenda cheia, sempre pronta a me receber. Gratidão imensa por poder estar perto de uma pessoa que me transmite tantos bons sentimentos!

Aos meus parceiros de trabalhos, Carlos e Leonardo, agradeço por todo o conhecimento que me transmitiram, todas as tarefas que dividiram comigo todos os dias, inclusive domingos e feriados!! Obrigada pelos bons momentos que pudemos compartilhar durante esses dois anos. Sem o trabalho em equipe, este trabalho não teria sido o mesmo.

Às técnicas e amigas dos laboratórios, Maria Euride, Maria dos Anjos e Maria Ângela, Valéria, Márcia e Elizete que me acompanharam desde o início, que me auxiliaram muito em tudo e que me ensinaram tanto naquilo que foi a base para que eu pudesse obter os resultados deste trabalho. Foi uma honra trabalhar com todas vocês!!

Aos professores do Departamento de Ciências Morfológicas e de Ciências Fisiológicas que de alguma forma foram presentes, em especial a professora Nilza Buttow, com quem dividi muitas das minhas dúvidas, conversas e momentos que foram importantes para mim durante os últimos meses. Agradeço também à professora Vilma Godoi, por abrir as portas do laboratório de fisiologia para que pudéssemos realizar todas as técnicas bioquímicas que foram realizadas neste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório: Larissa, Ana Paula, Débora Weber, Camila, Stephanie, Jean, Carlos, Leonardo, Débora Rissato, Taiana, Evandro e Alessandro. Obrigada pela companhia, pelas conversas que dividimos e pelos momentos divertidos que fazem toda a diferença nos meus dias.

Aos meus amigos de longa data e àqueles que conheci durante este período. Obrigada por estarem presentes, me apoiando, mesmo as vezes estando distantes, fazendo parte do meu crescimento e dividindo comigo momentos tão especiais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por financiar a minha pesquisa e fornecer a bolsa que foi essencial para que eu pudesse me dedicar exclusivamente a este projeto.

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (PBC) pela minha formação e pela estrutura que tornou tudo isso possível.

Aos membros titulares e suplentes da banca por aceitarem meu convite e contribuírem com o meu trabalho.

E a todos aqueles que de alguma maneira participaram deste trabalho possam sentir o quanto sou grata.



“Quando seu coração está pleno de gratidão,  
qualquer porta aparentemente fechada pode  
ser uma abertura para uma bênção maior.”

**Osho**

## **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação é composta por um artigo científico, o qual investiga e apresenta os efeitos da restrição alimentar sobre parâmetros fisiológicos, bioquímicos e morfológicos do intestino grosso em ratos Wistar com diabetes mellitus experimentalmente induzido. Adotando assim a restrição alimentar como forma de tratamento e avaliando se o mesmo pode ou não reverter parâmetros alterados quando instalado o quadro de diabetes. Em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, o artigo foi redigido de acordo com a revista *Neurogastroenterology and Motility*.ISSN (1365-2982).

Campos, JM; Rosa, CVD; Gomes, LB; Godoi, VAF; Natali, MRM. Efeitos da restrição alimentar em ratos diabéticos: parâmetros fisiológicos, bioquímicos e morfológicos do intestino grosso. *Neurogastroenterology and Motility*.

## RESUMO

O diabetes mellitus é uma doença crônica decorrente da dificuldade do organismo em metabolizar a glicose, que pode ser resultante da resistência à insulina ou deficiência na produção de insulina pelas células beta pancreáticas. Os danos causados pelo diabetes são sistêmicos e podem ser observados por alterações nos parâmetros fisiológicos, bioquímicos e em vários órgãos, incluindo o intestino grosso e sua morfofisiologia. Considerando que a incidência do diabetes está intensamente relacionada com o estilo de vida e hábitos alimentares, a restrição alimentar pode ser utilizada como uma estratégia para manejar e reduzir os danos causados por esta patologia. Desta forma, este trabalho teve o intuito avaliar os efeitos da restrição alimentar sobre os parâmetros fisiológicos, bioquímicos e morfofisiológicos (parede e inervação) do intestino grosso de ratos diabéticos. Para isso, foram utilizados 20 ratos Wistar machos, com 90 dias divididos, inicialmente, em 2 grupos (n=10/grupo): C (controle) e D (diabético), e após o período de uma semana de aclimação no biotério, os ratos do grupo D passaram pelo processo de diabetização com injeção intravenosa de estreptozotocina (35mg/Kg). No período de 0-2 meses (pré-restrição) o grupo C recebeu ração padrão Nuvilab® e água *ad libitum* e o grupo D recebeu dieta estilo cafeteria (33% ração padrão Nuvilab, 33% leite condensado Nestlé® e 7% açúcar) e água *ad libitum*. Para o período de 3-4 meses (durante restrição alimentar) os grupos C e D foram redistribuídos em C (controle), CR (controle com restrição), D (diabético) e DR (diabético com restrição) (n=5/grupo). Todos passaram a receber apenas ração padrão, porém os grupos em restrição receberam apenas 15g/dia e os grupos sem restrição receberam ração *ad libitum*. Os parâmetros fisiológicos e bioquímicos avaliados pré e pós restrição foram: glicemia em jejum, teste de tolerância à glicose, teste de tolerância à insulina, massa corporal, consumo de ração e água, proteínas totais, frutossamina, triglicerídeos, colesterol total, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e análise do trânsito intestinal. Ao final do tratamento também foram avaliados parâmetros intestinais: morfometria das túnicas e parede total do intestino grosso (colos proximal e distal), índice de células caliciformes e quantificação e morfometria de neurônios mientéricos (HuC/D<sup>+</sup> e nNOS<sup>+</sup>). Os grupos D e DR apresentaram os sinais clássicos do diabetes, porém o grupo DR

demonstrou melhoras significativas nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos avaliados: redução no consumo de ração e água, melhora no perfil lipídico e enzimas hepáticas, redução da glicemia em jejum e curvas glicêmicas (ITT e GTT) com valores também reduzidos quando comparado ao grupo D. Com relação às túnicas intestinais observou-se aumento significativo na espessura das túnicas mucosa e muscular na espessura do grupo D em relação ao grupo C. Para morfometria e quantificação da população neuronal mientérica geral e nitrérgica a restrição alimentar não se mostrou significativa, sendo assim os danos causados pelos diabetes sobre a parede intestinal e redução morfoquantitativa na população neuronal mientérica prevaleceu, e estes parâmetros não foram revertidos naqueles grupos submetidos à restrição alimentar.

**Palavras-chave:** Diabetes mellitus, Intestino grosso, Neurônios mientéricos, Parâmetros bioquímicos, Restrição alimentar.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic disease due to the body's difficulty in metabolizing glucose, which may be a result of insulin resistance or deficiency in insulin production by pancreatic beta cells. Damages caused by diabetes are systemic and can be observed by changes in physiological, biochemical, and many other parameters, including the large intestine and its morphology. Considering that the incidence of diabetes is strongly related to lifestyle and eating habits, dietary restriction can be used as a strategy to manage and reduce the damage caused by diabetes mellitus. Thus, this study aimed to evaluate the effects of dietary restriction on the physiological, biochemical and morphophysiological parameters (intestinal wall and innervation) of the large intestine of diabetic rats. 20 male Wistar rats were divided into two groups (n = 10 / group): C (control) and D (diabetic), and for diabetization the D group rats received intravenous injection of streptozotocin (35mg / kg). In the 0-2 month period (pre-restriction) group C received standard feed Nuvilab® and water ad libitum and group D received cafeteria-style diet (33% Nuvilab standard feed, 33% Nestlé® condensed milk and 7% sugar) and water ad libitum. For the 3-4 month period (during food restriction), the C and D groups branched into C (control), CR (control with restriction), D (diabetic) and DR (diabetic with restriction) (n = 5 / group). All fed only standard feed, but the restriction groups received only 15g / day and the unrestricted groups received ad libitum feed. The physiological and biochemical parameters evaluated were: fasting glycemia, glucose tolerance test, insulin tolerance test, body mass, feed and water consumption, total proteins, fructosamine, triglycerides, total cholesterol, aspartate aminotransferase, Alanine aminotransferase and alkaline phosphatase, intestinal transit velocity. At the end of the treatment, intestinal parameters were also evaluated: tunica morphometry and total wall of the large intestine (proximal and distal colon), goblet cells index and quantification and morphometry of myenteric neurons (HuC/D<sup>+</sup> and nNOS<sup>+</sup>). Groups D and DR showed the classic signs of diabetes, but the DR group showed significant improvements in the physiological and biochemical parameters evaluated: reduction in feed and water intake, improvement in lipid profile and liver enzymes, reduction of fasting glycemia and glycemic curves (ITT and GTT) with values also reduced when compared to group D. For morphometry of the intestinal tunics we observed more significant changes in group D in relation to the other groups. For morphometry and

quantification of the general and nitrergic neuronal population the food restriction did not present significance, thus the damage caused by the diabetes on the intestinal wall and reduction in the neuronal population prevailed, and these parameters were not reversed in those groups submitted to food restriction.

**Keywords:** Diabetes mellitus, Large intestine, Myenteric neurons, Biochemical parameters, Food restriction.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Evolução semanal da glicemia em jejum ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) de ratos dos grupos controle (C) e diabético (D) pelo período de 0-2 meses (pré-restrição) e dos grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabético (D) e diabético com restrição (CR) pelo período de 2-4 meses de tratamento. (\*) Indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (C) dos períodos pré e pós restrição alimentar. Análise de Variância One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey ( $n=5/\text{grupo}$ )..... **61**
- Figura 2** Testes de tolerância à glicose ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) de ratos dos grupos controle (C) e diabético (D) ao final de 2 meses (A) (pré-restrição alimentar) e dos grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabético (D) e diabético com restrição (CR) aos 4 meses de tratamento (B) (pós-restrição alimentar). (\*) Curvas que apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (C). Análise de Variância One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey ( $n=5/\text{grupo}$ )..... **62**
- Figura3** Testes de tolerância à insulina ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) de ratos dos grupos controle (C) e diabético (D) ao final de 2 meses (A) (pré-restrição alimentar) e dos grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabético (D) e diabético com restrição (CR) ao final de 4 meses de tratamento (B) (pós-restrição alimentar). (\*) Curvas que apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (C). Análise de Variância One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey ( $n=5/\text{grupo}$ )..... **63**

**Figura 4** Velocidade de trânsito intestinal (horas) de ratos dos grupos controle (C) e diabético (D) após 2 meses de tratamento (pré restrição alimentar) e dos grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabético (D) e diabético com restrição (CR) após 4 meses de tratamento (pós restrição alimentar). Análise de Variância One-way ANOVA, seguidos de pós teste de Tukey. Resultados expressos como média\*  $\pm$  erro padrão (n=5/grupo). \*p < 0,05 quando comparado ao grupo C no período pós restrição alimentar e \*\*p < 0,05 quando comparado ao grupo D no período pós restrição alimentar..... **67**



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição dos grupos experimentais durante 4 meses de tratamento..  
.....60
- Tabela 2** –Anticorpos primários e secundários utilizados na imunomarcação para HuC/D<sup>+</sup> e nNOS<sup>+</sup> .....60
- Tabela 3** - 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 restrição alimentar) e de 2-4 meses (durante restrição alimentar) de ratos dos grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabético (D) e diabético com restrição (DR). Resultados expressos como média\* ± erro padrão (n=5/grupo). .....64
- Tabela 4** - Parâmetros bioquímicos: proteínas totais, frutossamina, triglicerídeos, colesterol, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina do sangue de ratos após 2 meses de tratamento (pré restrição alimentar) para os grupos controle (C) e diabéticos (D). Resultados expressos como média\* ± erro padrão (n=5/grupo).....65
- Tabela 5** - Parâmetros bioquímicos: proteínas totais, frutossamina, triglicerídeos, colesterol, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina do sangue de ratos após 4 meses de tratamento (pós restrição alimentar) para os grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabéticos (D) e diabéticos com restrição (DR). Resultados expressos como média\* ± erro padrão (n=5/grupo).....66
- Tabela 6** - Comprimento total do intestino grosso (cm), índice de células calciformes (%) e morfometria (µm) da parede total e túnicas muscular, submucosa e mucosa dos colos proximal e distal de ratos após 4 meses de tratamento para os grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabético (D) e diabético com restrição (DR).Resultadosexpressoscomo média\* ± erro padrão (n=5/grupo)..... 68
- Tabela 7** - Quantificação (neurônios/gânglio) e morfometria do perfil celular dos

neurônios mientéricos imunomarcados HuC/D<sup>+</sup> e nNOS<sup>+</sup> ( $\mu\text{m}^2$ ) nos colos proximal e distal de ratos após 4 meses de tratamento para os grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabético (D) e diabético com restrição (DR). Resultados expressos como média\*  $\pm$  erro padrão (n=5/grupo).....**69**

## SUMÁRIO

1.	<b>RESUMO</b> .....	23
1.1.	<b>ABSTRACT</b> .....	24
2.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	25
3.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
3.1.	ASPECTOS ÉTICOS.....	27
3.2.	ANIMAIS E TRATAMENTO.....	27
3.3.	AVALIAÇÕES REALIZADAS APÓS OS PERÍODOS PRÉ E PÓS RESTRIÇÃO ALIMENTAR.....	28
3.3.1.	<b>Teste de tolerância à glicose (GTT)</b> .....	28
3.3.2.	<b>Teste de tolerância à insulina (ITT)</b> .....	28
3.3.3.	<b>Análise da velocidade do trânsito intestinal</b> .....	29
3.4.	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	29
3.5.	EUTANÁSIA E COLETA DO INTESTINO GROSSO.....	29
3.6.	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA PAREDE INTESTINAL.....	30
3.7.	CÉLULAS CALICIFORMES.....	30
3.8.	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA IMUNOHISTOQUÍMICA DE DUPLA MARCAÇÃO (HuC/D <sup>+</sup> E nNOS <sup>+</sup> ).....	31
3.8.1.	<b>Estudo dos neurônios mientéricos imunorreativos às proteínas HuC/D e nNOS</b> .....	31
3.8.2.	<b>Análise quantitativa dos neurônios HuC/D<sup>+</sup> e nNOS<sup>+</sup> do plexo mientérico</b> .....	32
3.8.3.	<b>Análise morfométrica dos neurônios HuC/D<sup>+</sup> e nNOS<sup>+</sup> do plexo</b>	

	<b>mientérico.....</b>	<b>32</b>
3.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4.	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
4.1.	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....	33
4.1.1.	<b>Parâmetros fisiológicos e constatação do quadro diabético.....</b>	<b>33</b>
4.1.2.	<b>Evolução da glicemia em jejum.....</b>	<b>33</b>
4.1.3.	<b>Teste de tolerância à glicose.....</b>	<b>34</b>
4.1.4.	<b>Teste de tolerância à insulina.....</b>	<b>34</b>
4.2.	PARÂMETROS SANGUÍNEOS.....	35
4.2.1.	<b>Parâmetros sanguíneos avaliados pré restrição alimentar.....</b>	<b>35</b>
4.2.2.	<b>Parâmetros sanguíneos avaliados pós restrição alimentar.....</b>	<b>36</b>
4.3.	ANÁLISES INTESTINAIS.....	36
4.3.1.	<b>Velocidade do trânsito intestinal.....</b>	<b>36</b>
4.3.2.	<b>Caracterização macro e microscópica do intestino grosso.....</b>	<b>36</b>
4.3.3.	<b>Morfometria das túnicas mucosa, submucosa, muscular e parede total dos colos proximal e distal.....</b>	<b>37</b>
4.3.3.1.	Colo proximal.....	37
4.3.3.2.	Colo distal.....	37
4.3.4.	<b>Índice de células caliciformes.....</b>	<b>38</b>
4.3.5.	<b>Análise quantitativa (neurônios/gânglio) e morfometria dos neurônios mientéricos da população geral (HuC/D<sup>+</sup>) e nitrérgica (nNOS<sup>+</sup>) dos colos proximal e distal.....</b>	<b>38</b>
4.3.5.1.	Colo proximal.....	38
4.3.5.2.	Colo distal.....	38
5.	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>

5.1.	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS.....	40
5.2.	PARÂMETROS SANGUÍNEOS.....	43
5.3.	ANÁLISES INTESTINAIS.....	45
5.3.1.	<b>Velocidade de trânsito intestinal.....</b>	<b>45</b>
5.3.2.	<b>Morfologia intestinal e células caliciformes.....</b>	<b>46</b>
5.3.3.	<b>Inervação: Quantificação e morfometria da população geral e nitrérgica.....</b>	<b>48</b>
6.	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>50</b>
7.	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
7.1.	<b>ANEXOS .....</b>	<b>58</b>
7.2.	PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NORMAS DA REVISTA	

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR EM RATOS DIABÉTICOS:  
PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS DO  
INTESTINO GROSSO**

Jéssica Men de Campos<sup>1,2</sup>, Carlos Vinícius Dalto da Rosa<sup>1,2</sup>, Leonardo Beni Gomes<sup>1</sup>, Vilma Aparecida Ferreira de Godoi<sup>3</sup>, Maria Raquel Marçal Natali<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, CEP: 870020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (PBC), Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, CEP: 870020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 590, CEP: 870020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

Autor correspondente: Endereço de e-mail: [jessicamen.salus@gmail.com](mailto:jessicamen.salus@gmail.com) Tel.: +55-041-44-99942-6825; Fax: +55-44-3011-4340.

## 1. RESUMO

Neste estudo foram analisados os efeitos da restrição alimentar (RA) sobre parâmetros fisiológicos, bioquímicos e morfofisiologia do intestino grosso de ratos diabéticos. Para isso, foram utilizados 20 ratos (CEA/UEM N<sup>o</sup>. 7590050415/2015) (90 dias) divididos, inicialmente, em 2 grupos (n=10/grupo): C (controle) e D (diabético), e para a diabetização os ratos do grupo D receberam injeção intravenosa de estreptozotocina (35mg/Kg). De 0-2 meses o grupo C recebeu ração padrão Nuvilab® e água *ad libitum* e o grupo D recebeu ração estilo cafeteria (33% ração padrão Nuvilab®, 33% leite condensado Nestlé® e 7% açúcar) e água *ad libitum*. Para o período de 3-4 meses os grupos C e D ramificaram-se em C (controle), CR (controle com restrição), D (diabético) e DR (diabético com restrição) (n=5/grupo) e todos os grupos passaram a receber apenas ração padrão, porém os grupos com restrição receberam 15g/dia e os grupos sem restrição receberam ração *ad libitum*. Os parâmetros fisiológicos e bioquímicos avaliados pré/pós RA foram: glicemia em jejum, teste de tolerância à glicose, teste de tolerância à insulina, massa corporal, consumo de ração/água, proteínas totais, frutamina, triglicerídeos, colesterol total, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina, trânsito intestinal. Após 4 meses foram avaliados: morfometria das túnicas intestinais e parede total do colo proximal e distal, índice de células calciformes e quantificação e morfometria de neurônios mientéricos (HuC/D<sup>+</sup> e nNOS<sup>+</sup>). O grupo DR demonstrou melhoras nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos avaliados: redução no consumo de ração e água, melhora no perfil lipídico e enzimas hepáticas, redução da glicemia em jejum e curvas glicêmicas comparado ao grupo D. Para morfometria e quantificação da população neuronal mientérica geral e nitrérgica a restrição alimentar não se mostrou significativa, sendo assim os danos causados pelos diabetes sobre a parede intestinal e redução morfoquantitativa na população neuronal mientérica prevaleceu, e estes parâmetros não foram revertidos naqueles grupos submetidos à restrição alimentar.

**PALAVRAS-CHAVE:** Diabetes mellitus, Intestino grosso, Neurônios mientéricos, Parâmetros bioquímicos, Restrição alimentar.

## ABSTRACT

In this study the effects of food restriction (FR) on physiological, biochemical and morphophysiology parameters of the large intestine of diabetic rats were analyzed. For this, 20 rats (CEA / UEM No. 7590050415/2015) (90 days) were initially divided into 2 groups (n = 10 / group): C (control) and D (diabetic), and for diabetization The D group rats received intravenous injection of streptozotocin (35mg / kg). From 0-2 months, group C received standard feed Nuvilab® and water *ad libitum* and group D received cafeteria-style diet (33% Nuvilab® standard feed, 33% Nestlé® condensed milk and 7% sugar) and water *ad libitum*. For the period of 3-4 months the groups C and D branched into C (control), CR (control with restriction), D (diabetic) and DR (diabetic with restriction) (n = 5 / group). All fed standard feed only, but the restriction groups received 15 g/day and the unrestricted groups received *ad libitum* feed. The physiological and biochemical parameters evaluated before/after FR were: fasting glycemia, glucose tolerance test, insulin tolerance test, body mass, feed / water consumption, total proteins, fructosamine, triglycerides, total cholesterol, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase, intestinal transit. After 4 months, large intestine morphometry, goblet cells and neuronal quantification and morphometry (HuC / D + and nNOS +) were evaluated. The DR group showed improvements in the physiological and biochemical parameters evaluated: reduction in feed and water intake, improvement in lipid profile and liver enzymes, reduction of fasting glycemia and glycemic curves compared to group D. For morphometry and quantification of the general and nitrergic neuronal population the food restriction did not present significance, thus the damage caused by the diabetes on the intestinal wall and reduction in the neuronal population prevailed, and these parameters were not reversed in those groups submitted to food restriction.

**KEY WORDS:** Diabetes mellitus, Large intestine, Myenteric neurons, Biochemical parameters, Food restriction.



## 2. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica caracterizada por desordens metabólicas e suas incidência e prevalência têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. Entre os principais fatores responsáveis por este aumento estão o crescimento populacional, maior população idosa, urbanização, obesidade, sedentarismo e uma alimentação cada vez mais rica em produtos industrializados (1).

Esta doença é uma epidemia global na sociedade moderna, que afeta mais de 387 milhões de pessoas (8,3% da população mundial), e é responsável por 11% de todos os gastos de saúde de pessoas jovens e adultas. A perspectiva é de que estes números cheguem a 592 milhões em 2035. Só no Brasil há mais 12 milhões de pessoas com o DM (2).

Entre os principais tipos estão: o diabetes tipo 1 (insulino dependente) cujo principais sintomas são hiperglicemia e cetose sanguínea, sendo causado pela ausência ou muito baixa produção de insulina, e o diabetes tipo 2 que é caracterizado por hiperglicemia e hiperinsulinemia, sendo causado pela resistência das células e seus receptores à ação da insulina, gerado pela associação de vários fatores e dentre eles o estilo de vida, alimentação rica alimentos processados e industrializados, má gestão do estresse e sedentarismo (3).

Além de todo o quadro hormonal que apresenta-se em desbalanço, o DM desencadeia uma série de alterações agudas e crônicas em outros parâmetros importantes dentre os quais pode-se destacar: parâmetros fisiológicos (hiperfagia, polidipsia, poliúria, diarreia e/ou constipação), parâmetros bioquímicos (alterações no perfil lipídico, desbalanço iônico com maior excreção de sódio, hiperglicemia, alterações em enzimas hepáticas, glicosilação de proteínas plasmáticas, hiperinsulinemia) (4).

Órgãos como rins, pâncreas, fígado e intestino são muito afetados por este quadro de DM e, especialmente no intestino, já foi constatado que o DM pode alterar a morfofisiologia deste órgão e reduzir o número de neurônios do plexo mientérico. Estes neurônios são responsáveis por liberar mais de 60% dos neurotransmissores que atuam em conjunto com o sistema nervoso central modulando várias outras funções do organismo e influenciando na qualidade de vida (5).

Santoro (6) sugere a hipótese de que o tubo digestivo não está preparado para as alterações que ocorreram nos hábitos de vida do homem nos últimos séculos: atividade

social intensa, sedentarismo e acesso a alimentos de fácil absorção e altamente calóricos. Há décadas, diferentes estudos relatam alterações morfofisiológicas intestinais detectadas na presença ou no desenvolvimento do DM (7-9). No DM, em geral, os trabalhos supra citados relatam espessamento da mucosa, submucosa e muscular do intestino grosso, esta alteração relaciona-se com a hiperfagia encontrada nos ratos diabéticos e alto índice de proliferação celular induzido pela glicose em excesso na alimentação, que promove efeito trófico na porção proximal do intestino grosso.

A restrição alimentar (RA) e/ou calórica já tem sido apresentada por alguns estudos, como uma possível estratégia nutricional para manejar, reduzir e até mesmo reverter vários parâmetros que podem ser alterados no DM. Jazet (10) demonstrou que uma imposição de RA por 30 dias melhorou a dislipidemia, hipertensão e glicemia de pacientes diabéticos. Estes efeitos foram mantidos por 18 meses após a intervenção dietética, junto com melhora da resposta a insulina e do perfil cardiovascular. Além disso, a frequência de refeições também afeta os benefícios da RA, portanto menor quantidade de refeições foi associada a maiores benefícios da RA em indivíduos com DM, como melhora da resistência à insulina, níveis glicêmicos e depósitos lipídicos do fígado (11).

Em outro modelo de DM a RA de 50% melhorou a resistência à insulina e tolerância a glicose dos ratos, além de preservar a função e massa das células  $\beta$  pancreáticas por meio da redução do estresse oxidativo, inflamação e apoptose destas células (12).

A RA já mostrou benefícios em indivíduos com DM (13-15), porém estes trabalhos não consideram se os danos causados pelo DM aos neurônios mientéricos são revertidos após um período de restrição alimentar. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da restrição alimentar sobre parâmetros fisiológicos, bioquímicos e morfofisiologia do intestino grosso de ratos diabéticos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Aspectos éticos

O delineamento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual de Maringá sob parecer número 7590050415/2015.

#### 3.2. Animais e tratamento

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) com 90 dias de idade provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, mantidos individualmente em caixas de polipropileno, com iluminação de claro e escuro de 12 horas e temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas.

Após uma semana de aclimação no biotério, iniciou-se o tratamento que teve duração total de 120 dias. Inicialmente, os animais foram distribuídos em 2 grupos (n=10/grupo): C (controle) e D (diabético), e para a diabetização os ratos do grupo D receberam injeção intravenosa de estreptozotocina (35mg/Kg). De 0-2 meses o grupo C recebeu ração padrão Nuvilab® e água *ad libitum* e o grupo D recebeu ração estilo cafeteria (33% ração padrão Nuvilab®, 33% leite condensado Nestlé® e 7% açúcar) e água *ad libitum*. Para o período de 3-4 meses os grupo C e D ramificaram-se em C (controle), CR (controle com restrição), D (diabético) e DR (diabético com restrição) (n=5/grupo) (Tabela 1).

Após a subdivisão do grupo C (n=10), pelo período de 3-4 meses este grupo (n=5) continuou recebendo ração padrão *ad libitum* e o grupo CR (n=5) passou a receber apenas 15g, constituindo o quadro de restrição alimentar de 50%.

O grupo D (n=10) foi submetido ao protocolo de diabetização que compreendeu a administração de estreptozotocina, seguida de 2 meses de dieta estilo cafeteria *ad libitum*. Desta forma, após jejum noturno de 15 horas, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina/xilazina (100/10 mg.Kg<sup>-1</sup>), seguida de injeção intravenosa de estreptozotocina Sigma-Aldrich® (35 mg.Kg<sup>-1</sup> de massa corporal) dissolvida em tampão citrato pH 4,5 (10mM). O mesmo protocolo foi aplicado aos ratos do grupo C, porém estes receberam apenas injeção intravenosa de solução salina 0,9%.

Após uma semana da aplicação do protocolo de diabetização os ratos do grupo D tiveram suas glicemias aferidas e foram considerados diabéticos os animais com glicemias pós-prandiais  $> 250\text{mg.mL}^{-1}$  e receberam a partir disso uma dieta estilo

cafeteria pelo período de 0-2 meses, constituída por 33% de ração padrão Nuvilab, 33% de leite condensado da marca Nestlé®, 7% de açúcar cristal e água. Após a subdivisão do grupo D (n=10), pelo período de 3-4 meses de tratamento, os animais do grupo D (n=5) deixaram de receber ração estilo cafeteria e passaram a receber ração padrão *ad libitum*, ao passo que o grupo DR (n=5) deixou de receber a ração estilo cafeteria e passou a receber apenas 15g da ração Nuvilab, constituindo então o quadro de restrição alimentar de 50% (Tabela 1).

Para calcular a quantidade de ração que seria dada aos animais dos grupos CR e DR durante o período de restrição alimentar, foi tomado como base o consumo diário médio de ração pelos animais do grupo C durante os 2 primeiros meses de tratamento, e a partir desta média de consumo reduziu-se em 50% o total de ração disponibilizado para cada rato para que chegasse ao valor de 15g por dia para os grupos em restrição.

Durante todo o tratamento foi monitorado diariamente o consumo de ração, semanalmente o consumo de água, massa corporal dos animais e quinzenalmente foi aferida a glicemia em jejum.

### **3.3. Avaliações realizadas após os períodos pré e pós restrição alimentar**

Após os 2 primeiros meses de tratamento e ao final dos 4 meses foram realizados testes de tolerância à glicose, teste de tolerância à insulina, análise da velocidade de trânsito intestinal e análises dos seguintes parâmetros bioquímicos: frutossamina, proteínas totais, colesterol total, triglicerídeos, ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e fosfatase alcalina.

#### **3.3.1. Teste de tolerância à glicose (GTT)**

O teste de tolerância à glicose foi realizado em dois momentos: ao final dos primeiros dois meses de tratamento e ao final dos quatro meses de tratamento. Para avaliação da curva glicêmica administrou-se aos ratos, via gavagem, uma solução de glicose (1,5g.Kg<sup>-1</sup>), sendo a glicemia foi aferida com glicosímetro (OptimusXceed ®) nos tempos 0, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos.

#### **3.3.2. Teste de tolerância à insulina (ITT)**

O teste de tolerância à insulina foi realizado ao final dos dois primeiros meses e ao final dos quatro meses de tratamento. Para avaliar a curva de tolerância à insulina foi aplicada a cada um dos ratos uma injeção intraperitoneal de insulina ( $1\text{U.Kg}^{-1}$ ) que tiveram suas glicemias aferidas por glicosímetro (OptimusXceed®) nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 minutos.

### **3.3.3. Análise de trânsito gastrointestinal**

A análise de trânsito gastrointestinal foi realizada em dois momentos do tratamento: ao final dos dois primeiros meses e ao final dos quatro meses. O teste foi realizado por meio da administração, via gavagem, de 300  $\mu\text{L}$  de solução contendo 3% de corante Carmin hidro 52% e 0,5% de etilcelulose (Corantec®, São Paulo, Brasil) diluídos em água destilada. Após receberem a solução, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso a ração e água, por um período total e pré estabelecido de 15 horas. Sendo, então, o resultado expresso em horas, no exato momento que apareceu o primeiro pellet fecal marcado com o corante.

### **3.4. Análises bioquímicas**

Para as análises bioquímicas coletou-se 1mL de sangue/rato, por punção cardíaca, ao final do período de 2 meses e mais 5 mL de sangue de cada rato ao final dos 4 meses, após eutanásia realizada com dose letal de  $120\text{ mg.Kg}^{-1}$  de peso corporal de Tiopental Sódico® (Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, SP, Brasil). As amostras foram coletadas sem adição de anticoagulantes e centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm para obtenção do soro. Em seguida as amostras foram submetidas às análises bioquímicas para as seguintes substâncias: frutossamina, proteínas totais, colesterol total, triglicérides, ALT (Alanina aminotransferase), AST (Aspartato aminotransferase) e fosfatase alcalina. Os testes foram realizados com os kits comerciais (Gold Analisa®) e a leitura de resultados em espectrofotômetro (BioPlus2000®, São Paulo, Brasil) no comprimento de onda conforme instruções do fabricante dos respectivos testes.

### **3.5. Eutanásia e coleta do intestino grosso**

A coleta do intestino grosso foi realizada ao final dos 4 meses de tratamento, imediatamente após eutanásia. Após ser coletado, foi mensurado o comprimento total com auxílio de uma fita métrica e separado o colo proximal do colo distal. Uma porção de cada colo foi destinada à fixação para as técnicas histológicas de Hematoxilina-Eosina (HE), histoquímica com Ácido Periódico de Schiff (PAS) e outra porção foi fixado para a realização de preparados totais da túnica muscular.

### **3.6. *Processamento histológico e análise morfométrica da parede intestinal***

Para análise histológica por meio da coloração de Hematoxilina-Eosina seguindo o protocolo padrão para execução desta técnica, basicamente em seis principais etapas: fixação em solução de paraformaldeído 4%, desidratação, inclusão em parafina, microtomia (cortes semi-seriados de 5 µm de espessura), coloração e montagem das lâminas.

A análise morfométrica da parede intestinal foi realizada com microscópio óptico Nikon Eclipse 80i ®, acoplado a um sistema computadorizado de análise de imagens. Com a objetiva de 10x mensurou-se a espessura da parede total e túnicas mucosa, submucosa e muscular. Foram capturadas 50 imagens de colo distal e 50 imagens de colo proximal (apenas regiões sem pregas) e a partir destas imagens, foram realizadas 100 medidas para parede total e para cada uma das túnicas intestinais/animal.

### **3.7. *Células caliciformes***

Para a quantificação de células caliciformes amostras dos colos proximal e distal foram submetidas ao protocolo da técnica histoquímica de PAS (Ácido Periódico de Schiff), em seguida as lâminas com cortes semi-seriados de 5 µm de espessura, foram analisadas em microscópio óptico, acoplado a um sistema computadorizado de análise de imagens e com a objetiva de 40x foram capturadas 50 imagens/animal. A análise quantitativa das células caliciformes foi realizada por meio do cálculo do índice das células com coloração positiva em 2500 células epiteliais (enterócitos) contadas por animal, através da fórmula: *Índice de células caliciformes = (número de células caliciformes/2500 enterócitos) x 100.*

### **3.8. Imunohistoquímica de dupla marcação de neurônios mientéricos (HuC/D<sup>+</sup> e nNOS<sup>+</sup>)**

Após ser lavado em Tampão Fosfato de Sódio (PBS 0,1 M, pH 7,4) e fixado por 3 horas em solução de paraformaldeído 4 % (pH 7,4), as amostras do colo proximal e distal foram abertas ao longo da borda mesocólica e lavadas novamente em PBS, para a remoção do excesso de fixador. O intestino foi cortado em segmentos transversais menores de aproximadamente 1 cm de comprimento e dissecados com o auxílio de pinças sob estereomicroscópio para obtenção de preparados totais da túnica muscular, através da remoção da túnica mucosa e tela submucosa. Os preparados totais foram então armazenados sob refrigeração em PBS e azida sódica a 0,08%, para a realização das técnicas imunohistoquímicas.

#### **3.8.1. Estudo dos neurônios mientéricos imunorreativos às proteínas HuC/D, nNOS.**

Os preparados totais da túnica muscular do colo proximal e distal de cada rato foram submetidos às técnicas imunohistoquímicas para a marcação da população geral de neurônios mientéricos (HuC/D-IR) e da subpopulação de neurônios nitrérgicos (nNOS-IR), presentes na túnica muscular.

Os segmentos foram lavados por duas vezes durante 10 minutos em PBS (0,1M, pH 7,4) e Triton-X100 a 0,5% (PBS-T), e incubados por 1 hora em solução de bloqueio contendo albumina de soro bovino (BSA) a 2% e soro de burro a 10% em PBS-T. Em seguida, de acordo com a marcação pretendida, foi realizado dupla marcação com os anticorpos primário anti-HuC/D e anti-nNOS (tabela 2) durante 48 horas à temperatura ambiente sob agitação, em meio de incubação composto por PBS-T, BSA a 2% e soro de burro a 2%.

Após incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes em PBS-T por 10 minutos. Foram então incubadas com anticorpo conforme tabela 2, durante 2 horas ao abrigo da luz, em meio de incubação contendo PBS-T, BSA a 2% e soro de burro a 2%. As membranas foram então lavadas 3 vezes em PBS-T por 10 minutos e montadas em lâminas histológicas contendo antifade® (Life Technologies do Brasil Com. Ind. Prod. Biotec. Ltda, SP, Brasil), sendo armazenadas sob refrigeração e ao abrigo da luz.

### **3.8.2. Análise quantitativa dos neurônios HuC/D<sup>+</sup> e nNOS<sup>+</sup> do plexo mientérico.**

As análises quantitativas foram realizadas por amostragem no preparado total de amostras do colo proximal e distal, por meio de imagens capturadas por câmera de alta resolução acoplada ao microscópio de fluorescência FSX100<sup>®</sup> (Olympus) e transferidas para o computador através do programa Axio Vision Rel (v. 4.6). As imagens foram posteriormente analisadas através do programa Image-Pro Plus, (v. 4.5.029; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Para a quantificação na técnica de dupla marcação HuC/D e nNOS foram contados todos os corpos celulares de neurônios mientéricos presentes em 50 imagens de gânglios capturadas em objetiva de 20x e os resultados foram expressos como número de neurônios por gânglio.

### **3.8.3. Análise morfométrica dos neurônios HuC/D<sup>+</sup> e nNOS<sup>+</sup> do plexo mientérico.**

Para a morfometria dos corpos celulares dos neurônios do plexo mientérico, as imagens capturadas em objetiva de 20x para HuC/D e nNOS e mensuradas com o auxílio do software de análise de imagens Image-Pro Plus. Para os neurônios HuC/D e nNOS, mensurou-se a área de 100 corpos celulares por animal e os resultados expressos em  $\mu\text{m}^2$ .

## **3.9. Análise Estatística**

Os dados obtidos foram inicialmente submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação de normalidade. Constatada a normalidade os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de pós teste de Tukey. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média e nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). A estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa GraphPadPrism (GraphPad Software, versão 5.1, São Diego, CA, USA).



## 4. RESULTADOS

### 4.1. *Parâmetros Fisiológicos*

#### 4.1.1. *Parâmetros fisiológicos e constatação do quadro diabético*

Os animais diabéticos apresentaram durante o período experimental os sinais característicos da doença como perda de massa corporal, polifagia e polidipsia.

A massa corporal foi verificada durante os 4 meses de tratamento e os grupos diabético (D) e diabético com restrição (DR) apresentaram uma redução significativa da massa corporal ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (C) e controle com restrição (CR) (Tabela 3).

Para avaliar o consumo de ração os dados foram analisados no período pré restrição (0-2 meses) e durante restrição (2-4 meses). No período pré restrição os grupos diabéticos consumiram uma quantidade de ração maior ( $p < 0,05$ ) em relação à quantidade consumida diariamente pelos grupos controle. Entretanto, para o período no qual os ratos estavam sob restrição alimentar, os grupos CR e DR receberam quantidades constantes, portanto não houve alteração de consumo. O grupo D continuou consumindo uma quantidade significativamente superior àquela consumida pelo grupo C, confirmando assim a polifagia característica no diabetes (Tabela 3).

O consumo de água foi igualmente registrado nos períodos pré e durante restrição alimentar. No período pré restrição alimentar (0-2 meses) observa-se que o consumo de água foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nos grupos diabéticos em relação aos controles, constatando a polidipsia característica do diabetes. No período durante restrição os grupos controle (C) e controle com restrição (CR) apresentaram semelhante consumo de água, ao passo que o grupo diabético com restrição (DR) diminuiu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o consumo de água em relação ao grupo diabético (D), demonstrando a influência da restrição alimentar sobre o consumo de água de ratos diabéticos (Tabela 3).

Também foi constatada de forma qualitativa, poliúria e constante diarreia nos grupos diabéticos, mesmo após serem submetidos à restrição alimentar.

#### 4.1.2. *Evolução da glicemia em jejum*

Durante os primeiros 2 meses de tratamento (pré restrição alimentar) os ratos diabéticos apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) da glicemia em jejum, cerca de 10 dias após o procedimento de diabetização, em relação ao grupo controle (C), o qual manteve-se normoglicêmico (Figura 1). Com a evolução do tratamento e a partir do início da restrição alimentar para ambos os grupos, pode-se observar que o grupo diabético (D) continuou hiperglicêmico, o grupo diabético com restrição (DR) apresentou uma queda significativa ( $p < 0,05$ ) na glicemia e não recuperou a normoglicemia quando comparado aos grupos controle (C) e controle com restrição (CR), porém apresentou uma melhora na glicemia em jejum durante o período de restrição alimentar, quando comparado ao grupo D (Figura 1).

Já os grupos controle (C) (pré restrição alimentar) e os grupos controle (C) e controle com restrição (CR) (durante restrição alimentar) não apresentaram grandes oscilações na glicemia, mantendo-se normoglicêmicos durante todo o tratamento mesmo quando submetidos à restrição alimentar (Figura 1).

#### **4.1.3. Teste de tolerância à glicose**

A figura 2 apresenta os testes de tolerância à glicose em dois pontos do tratamento: figura 2A representa as curvas glicêmicas dos grupos controle (C) e diabético (D) ao final do período de 2 meses (pré restrição alimentar) e figura 2B representa as curvas glicêmicas aos 4 meses (pós restrição alimentar) dos grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabético (D) e diabéticos com restrição (DR).

A figura 2A demonstra como a curva glicêmica do teste de tolerância à glicose do grupo diabético apresenta-se valores significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em relação àqueles obtidos no grupo controle, para todos os tempos nos quais a glicemia foi aferida.

Para o teste de tolerância à glicose realizado ao final dos 4 meses (figura 2B) os grupos controle (C) e controle com restrição (CR) apresentaram curvas glicêmicas com valores de glicemia semelhantes ao longo da curva, demonstrando que a restrição alimentar aplicada ao grupo controle não teve efeito significativo na glicemia destes ratos. Entretanto, o grupo diabético com restrição (DR) apresentou uma curva glicêmica com valores de glicemia significativamente menores ( $p < 0,05$ ) em relação àqueles obtidos na curva glicêmica dos ratos diabéticos (D).

#### **4.1.4. Teste de tolerância à insulina**

O teste de tolerância à insulina demonstrou as curvas glicêmicas dos diferentes grupos após os ratos receberem uma dose de insulina. Este teste foi realizado em dois períodos diferentes: ao final de 2 meses (pré restrição alimentar) para os grupos controle (C) e diabético (D) (Figura 3A) e ao final dos 4 meses (pós restrição alimentar) para os grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabéticos (D) e diabéticos com restrição (Figura 3B).

A figura 3A demonstra como curva glicêmica do grupo diabético (D) apresentou valores de glicemia significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos na curva glicêmica do grupo controle, demonstrando uma alteração clássica decorrente do quadro diabético.

Na figura 3B, que representa o teste realizado após o período de restrição alimentar, nota-se que o grupo controle com restrição (CR) apresentou uma curva de valores glicêmicos muito semelhantes àqueles encontrados na curva do grupo controle, demonstrando que para estes ratos a restrição alimentar não mudou o padrão da curva, por não influenciar a glicemia. Entretanto, para os animais diabéticos com restrição (DR) os valores obtidos na curva glicêmica foram relevantemente menores ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores de glicemia representados na curva glicêmica do grupo diabético (D).

## **4.2. Parâmetros sanguíneos**

### **4.2.1. Parâmetros sanguíneos avaliados pré restrição alimentar**

Os parâmetros bioquímicos analisados, proteínas totais, frutamina, triglicerídeos, colesterol total, AST, ALT e fosfatase alcalina estão representados na tabela 4.

A análise de proteínas totais não apresentou alteração significativa entre os grupos controle (C) e diabético (D) enquanto que, a frutamina foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior para o grupo diabético (D)

Quanto ao perfil lipídico representado pelas dosagens de triglicerídeos e colesterol total obteve-se resultados significativamente elevados ( $p < 0,05$ ) no grupo diabético (D) em relação ao grupo controle (C).

Os parâmetros de potenciais indicadores de dano hepático: as enzimas AST, ALT e fosfatase alcalina apresentaram-se significativamente elevadas ( $p < 0,05$ ) no grupo diabético (D) em relação ao grupo controle (C) (Tabela 4).

#### **4.2.2. Parâmetros sanguíneos avaliados pós restrição alimentar**

A tabela 5 representa os resultados obtidos para as dosagens de: proteínas totais, frutossamina, triglicerídeos, colesterol total, AST, ALT e fosfatase alcalina.

Para proteínas totais não houve diferença estatística para nenhum dos grupos experimentais. Entretanto, para a análise de frutossamina observou-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) apenas do grupo controle com restrição (CR) em relação aos demais grupos. Os grupos diabético (D) e diabético com restrição (DR) mantiveram-se semelhantes.

Quanto ao perfil lipídico os grupos que estiveram sob restrição alimentar (CR e DR) apresentaram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) de triglicerídeos e de colesterol total em relação aos grupos que não passaram por restrição alimentar (C e D).

Para AST e ALT observa-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) do grupo diabético com restrição (DR) em relação ao grupo diabético (D). Para fosfatase alcalina houve uma redução significativa no grupo diabético com restrição (DR) em relação ao diabético (D), porém o grupo controle com restrição (CR) apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (C) (Tabela 5).

### **4.3. Análises intestinais**

#### **4.3.1. Velocidade do trânsito intestinal**

A velocidade do trânsito intestinal realizada ao final do período pré restrição alimentar (aos 2 meses) não demonstrou diferença estatística entre os grupos controle (C) e diabético (D) (Figura 4). Apesar disso, o grupo diabético (D) apresentou uma tendência a maior velocidade de trânsito intestinal.

Entretanto, para o período pós restrição alimentar (ao final dos 4 meses), os grupos que foram submetidos à restrição alimentar (CR e DR) constatou-se maior velocidade trânsito intestinal ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos não submetidos à restrição (C e D) (Figura 4).

#### **4.3.2. Caracterização macro e microscópica do intestino grosso**

Ao final dos 4 meses de tratamento, constatou-se que nos ratos do grupo controle (C) e controle com restrição (CR) os intestinos possuíam uma coloração vívida e brilhante e textura elástica, porém com resistência. Entretanto, nos grupos diabético (D) e diabético com restrição (DR) o intestino grosso apresentou-se opaco e apesar de elástico, menos resistente. O comprimento total do intestino grosso foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior para o grupo diabético (D) em relação aos demais grupos (Tabela 6).

Quanto à morfologia do intestino grosso, os colos proximal e distal, independente do grupo experimental, apresentaram organização histológica padrão, compostas de células e elementos extracelulares bem preservados.

### ***4.3.3. Morfometria das túnicas mucosa, submucosa, muscular e parede total dos colos proximal e distal.***

#### ***4.3.3.1. Colo proximal***

Como apresentado na tabela 6, a espessura da túnica mucosa do grupo D demonstrou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos experimentais (C, CR e DR). Com relação à túnica submucosa apenas o grupo diabético (D) apresentou uma redução significativa da espessura ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos (C, CR e DR).

Na túnica muscular observa-se que o grupo controle com restrição (CR) apresentou um aumento significativo na espessura ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (C) e o grupo diabético com restrição (DR) apresentou uma redução significativa na espessura ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo diabético (D). Para parede total, apenas o grupo diabético com restrição (DR) demonstrou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos (C, CR e D) (Tabela 6).

#### ***4.3.3.2. Colo distal***

Para a túnica mucosa observa-se um aumento significativo na espessura ( $p < 0,05$ ) no grupo controle com restrição (CR) em relação ao grupo controle (C) e uma redução significativa na espessura ( $p < 0,05$ ) do grupo diabético com restrição (DR) em relação ao grupo diabético (D). A redução na espessura da túnica submucosa destaca-se no grupo

diabético com restrição (DR) em relação aos demais grupos experimentais (C, CR e D) (Tabela 6).

Na tabela 6 nota-se que a túnica muscular apresentou aumento para o grupo DR ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos experimentais (C, CR e D). E a parede total apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) para os grupos controle com restrição (CR), diabético (D) e diabético com restrição (DR) em relação ao grupo controle (C).

#### **4.3.4. Índice de células caliciformes**

Para os colos proximal e distal não houveram alterações significativas no índice de células caliciformes dos grupos experimentais (C, CR, D e DR) (Tabela 6).

#### **4.3.5. Análise quantitativa (neurônios/gânglio) e morfométrica dos neurônios mientéricos da população geral (HuC/D<sup>+</sup>) e nitrérgica (nNOS<sup>+</sup>) nos colos proximal e distal**

##### **4.3.5.1. Colo proximal**

A quantificação da população neuronal geral HuC/D<sup>+</sup> está representada na tabela 7, a qual demonstra uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no número de neurônios/gânglio desta população (HuC/D<sup>+</sup>) nos grupos diabético (D) e diabético com restrição (DR) em relação aos grupos controle (C) e controle com restrição (CR). Para os neurônios nitrérgicos (nNOS<sup>+</sup>) nota-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no número de neurônios/gânglio nos grupos controle com restrição (CR), diabéticos (D) e diabéticos com restrição (DR) em relação ao grupo controle (C).

Em relação à morfometria dos neurônios HuC/D<sup>+</sup> não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos experimentais. Entretanto, para a população nitrérgica, a morfometria deste perfil celular apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos grupos controle com restrição (CR) e diabético com restrição (DR) em relação ao grupo controle (C) (Tabela 7).

##### **4.3.5.2. Colo distal**

A quantificação da população neuronal geral HuC/D<sup>+</sup> está representada na tabela 7, a qual demonstra uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no número de neurônios/gânglio desta população (HuC/D<sup>+</sup>) nos grupos controle com restrição (CR) e diabético (D) em relação ao grupo controle (C). Para os neurônios nitrérgicos (nNOS<sup>+</sup>) nota-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no número de neurônios/gânglio nos grupos controle com restrição (CR), diabéticos (D) e diabéticos com restrição (DR) em relação ao grupo controle (C).

Para a morfometria de neurônios HuC/D<sup>+</sup> o grupo controle com restrição (CR) apresenta um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo diabético com restrição (DR). Entretanto, para a morfometria de neurônios nNOS<sup>+</sup> do colo distal, observa-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) para o grupo controle com restrição (CR) em relação aos demais grupos (C, D e DR) (Tabela 7).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. *Parâmetros fisiológicos*

A estreptozotocina, agente indutor do diabetes responsável por lesar células beta pancreáticas, atuou de forma eficiente nos grupos diabéticos (D e DR) auxiliando na elevação da glicemia associada à dieta estilo cafeteria, rica em carboidratos, que foi oferecida aos ratos destes dois grupos. A dose utilizada foi de  $35\text{mg.Kg}^{-1}$ , valores semelhantes (16), inferiores (17) e superiores (18) para roedores são freqüentes na literatura.

Desta forma, o que caracteriza o quadro diabético induzido por estreptozotocina e a dieta estilo cafeteria nos grupos diabéticos é o aumento da glicemia em jejum nestes animais. No período pré restrição alimentar (0-2 meses) os grupos controle (C) e diabético (D) apresentaram glicemias significativamente diferentes por volta da segunda semana de tratamento, logo nota-se a instalação do diabetes nos ratos do grupo D, que mantiveram-se hiperglicêmicos por todo o período pré restrição alimentar (RA) (Figura 1).

Porém, a partir do terceiro mês de tratamento, quando os ratos diabéticos foram submetidos à RA, houve queda significativa nos valores da glicemia em jejum destes ratos. Isto pode ser observado na figura 1, na qual o gráfico demonstra a comparação entre o grupo diabético (D) e diabético com restrição (DR) por volta da quinta semana de tratamento.

A redução na glicemia do grupo DR demonstra que a menor quantidade de alimento oferecida a estes ratos melhorou este parâmetro em relação ao grupo D e que, apesar de não retornar a valores normoglicêmicos como os dos grupos controle (C) e controle com restrição (CR), a RA foi eficiente.

Quando há um quadro diabético, o organismo não tolera bem os carboidratos, isto deve-se ao fato de que os hormônios responsáveis pelo metabolismo deste macronutriente não estão agindo de forma eficiente sobre seus receptores celulares (19). Logo, quando aplicou-se a RA ao grupo DR, a menor ingestão de carboidratos, mesmo diante de resistência à insulina, promoveu metabolização mais eficiente da glicose. Isto também foi observado no trabalho de Li et al. (20), que comprovaram melhora no quadro de resistência à insulina em ratas com diabetes gestacional submetidas à restrição alimentar.



Concomitante ao início da RA houve a troca da ração dos grupos D e DR, que deixaram de receber a ração estilo cafeteria e passaram a receber ração padrão (Nuvilab). A troca de ração fornecida aos ratos pode ser considerada uma melhora na composição alimentar, pois deixaram de receber uma ração rica em carboidratos e passaram a receber uma ração que possuía a quantidade de cada um dos macronutrientes mais balanceada. A mudança da composição alimentar aliada à RA foi importante para melhorar o padrão glicêmico dos animais diabéticos do grupo DR.

Para os grupos C e CR as glicemias em jejum mantiveram-se em níveis normais, sem grandes oscilações e também não apresentaram quadros de hipoglicemia ao longo do tratamento, demonstrando que para os ratos do grupo CR a restrição alimentar não alterou os níveis glicêmicos, que foram semelhantes àqueles do grupo C.

O teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado após os períodos pré e pós RA. No período pré RA o grupo D apresenta curva com valores glicêmicos bem mais elevados do que os valores da curva do grupo C, demonstrando a dificuldade encontrada pelo metabolismo dos ratos diabéticos em utilizar a glicose como fonte energética, em um espaço de tempo de uma hora (duração total do teste), e desta forma, a glicose permanece na corrente sanguínea mantendo estes ratos hiperglicêmicos durante todo o período no qual o teste foi realizado.

Após serem submetidos à RA a curva do grupo DR apresenta valores menores de glicemia quando comparado ao grupo D, e da mesma forma que a glicemia em jejum, este parâmetro foi alterado pela RA e pela mudança da ração oferecida aos animais.

O mesmo padrão foi observado no teste de tolerância à insulina (ITT), demonstrando como a resistência à insulina influencia na eficácia do metabolismo da glicose. No diabetes os receptores celulares de insulina estão pouco sensíveis, o sinal de que a insulina está presente não chega de forma eficaz, interferindo no transporte de glicose para o interior da célula (21). E isto ocorre mesmo quando a insulina é proveniente de fontes exógenas (administração intraperitoneal) como ocorre no ITT. Isso demonstra que o rato pode ter produção de insulina pelo pâncreas, porém este hormônio não consegue realizar sua função de forma plena (figura 3A e B).

Com isso a glicose disponível não é metabolizada e permanece por mais tempo na corrente sanguínea e o pâncreas é sinalizado a produzir ainda mais insulina para compensar este desequilíbrio.

Após a RA o grupo DR tende a apresentar valores de glicemia menores na curva do ITT em relação aos valores de glicemia da curva do grupo D, apesar de não atingir

valores normoglicêmicos como os dos grupos C e CR. Porém, devido à RA aplicada por um longo período e aliada à troca da ração a curva glicêmica do grupo DR foi significativamente melhor.

Tanto para o GTT, quanto para o ITT, os grupos C e CR mantiveram suas curvas com valores normoglicêmicos, demonstrando que a RA não influenciou estes ratos saudáveis. Uma possível justificativa para esta resposta é que por terem seus hormônios pancreáticos funcionando adequadamente e as células se manterem sensíveis aos sinais da insulina e da glicose, quando receberam a insulina ou glicose exógenas, estes grupos (C e CR) responderam rapidamente ao estímulo para retornar à homeostase.

Além das alterações na glicemia que confirmaram o quadro diabético por meio da dificuldade em metabolizar a glicose e da resistência à insulina, os ratos dos grupos D e DR apresentaram os demais sinais clássicos da doença. No período pré RA o grupo diabético apresentou consumo alimentar muito maior do que o grupo controle, caracterizando a hiperfagia. Este alto consumo alimentar observado no DM está associado à resistência à insulina. Os receptores celulares de insulina não são sinalizados, com isso glicose que permanece na corrente sanguínea e não se liga aos seus transportadores (GLUTs) para entrar na célula e ser degradada, a célula por sua vez interpreta que há falta de nutrientes e de energia e logo sinaliza o sistema nervoso central de que mais alimento precisa ser ingerido para suprir esta falsa falta de nutrientes (22). Este processo desencadeia um comportamento de compulsão alimentar nos ratos diabéticos, que quando recebem ração *ad libitum* passam o dia se alimentando.

Quando avaliado o consumo de água no período pré RA, os ratos diabéticos apresentaram um consumo significativamente maior quando comparados aos controles, caracterizando assim a polidipsia presente no DM. No entanto, este alto consumo hídrico ocorre em consonância com a alta taxa de excreção de líquidos que também foram observadas nos ratos com DM (poliúria e diarreia).

A alta excreção de líquidos ocorre devido à hiperglicemia constante e na tentativa de restabelecer o equilíbrio osmótico das células a água desloca-se do meio intracelular para o meio extracelular e juntamente com a água deslocam-se também para o meio extracelular eletrólitos como sódio, cálcio e potássio.

Entretanto, ao avaliar este mesmo parâmetro, ou seja, o consumo de água nos ratos dos grupos CR e DR (durante RA) constatou-se redução significativa do consumo de água pelo grupo DR em relação ao período pré RA. Este resultado mostra que para este parâmetro a RA alimentar atuou de forma eficiente, pois ao reduzir a oferta de alimentos

aos ratos do grupo DR, houve uma melhora nas taxas glicêmicas, conseqüentemente menor ingestão e excreção de água para restabelecer o equilíbrio osmótico e eletrolítico intra e extracelular.

Durante todo o tratamento avaliou-se a massa corporal (tabela 3) dos grupos experimentais, este parâmetro mostrou que os animais do grupo C apresentaram a maior massa corporal, pois permaneceram saudáveis e não foram submetidos à RA, preservando sua composição corporal. Entretanto o grupo CR apresentou uma redução significativa na massa corporal ao longo do tratamento, isto pode ser associado à RA, menor ingestão calórica e conseqüente perda de peso.

Quanto aos grupos diabéticos, a massa corporal dos animais dos grupos D e DR foram menores ao longo do tratamento em relação aos grupos C e CR. Constatou-se então outro possível efeito do diabetes sobre o metabolismo: o recrutamento de energia derivada de outras fontes que não carboidratos e, portanto, advindas de tecido adiposo e proteínas (23).

Como já discutido nos parágrafos anteriores, no quadro de DM há dificuldade de sensibilização das células pela insulina e conseqüente falha na ligação da glicose a seus transportadores (GLUTs). Sem a entrada e metabolização da glicose no meio intracelular, não há produção de energia suficiente advinda desta molécula, e então o metabolismo cria estratégias para suprir esta falta: ativando vias de degradação de gorduras (peroxidação lipídica) e, em última instância, proteínas (23).

Devido a todas estas alterações pode-se justificar a redução de massa corporal observada nos animais dos grupos D e DR, sendo que esta redução de massa corpórea foi ainda mais expressiva no grupo DR, justamente pelo fato destes ratos terem recebido menor quantidade de alimento e provavelmente precisarem recorrer muito mais a outras reservas energéticas.

## **5.2. Parâmetros sanguíneos**

Os parâmetros sanguíneos foram avaliados após os períodos pré e pós RA e ao analisar a taxa de proteínas totais (tabelas 4 e 5) nos ratos em ambos os períodos, não foi constatado diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Isso demonstra que, apesar do estado catabólico que DM provoca no organismo, não houve degradação protéica acentuada para destinar aminoácidos à neoglicogênese (24).

Entretanto, quando foi avaliada a frutossamisa, um importante marcador de glicosilação de proteínas plasmáticas (globulinas), verificou-se que após o período pré RA (tabela 4) o grupo D já apresentava frutossamina significativamente mais elevada em relação ao grupo C, confirmando também o quadro diabético destes ratos. Após o período de RA (tabela 5), os grupos D e DR apresentam valores menores e muito semelhantes, aqui percebe-se que a RA pouco pode ter influenciado na redução da frutossamina, porém a mudança da composição da ração parece ter sido um fator determinante na redução dos valores de frutossamina para ambos os grupos (D e DR).

Quando analisado o perfil lipídico após o período pré RA o grupo D apresentou taxas significativamente mais elevadas de triglicerídeos e colesterol total. Esta alteração de perfil lipídico é clássica no DM (25). Isto deve-se principalmente ao excesso de carboidrato presente na dieta e pela dificuldade em metabolizar este macronutriente.

A insulina, além de ser o hormônio responsável por sinalizar a entrada de glicose nas células, é também um hormônio essencialmente anabólico, responsável por sinalizar o organismo para estocar gordura quando a glicose está em excesso. No DM a hiperglicemia é constante e o fígado torna-se responsável por converter o excesso de glicose em triglicerídeos (armazenamento de gordura) e colesterol total, o que justifica o aumento deste parâmetro nos ratos diabéticos (26).

Em relação ao perfil lipídico nos grupos CR e DR após o período de RA (tabela 5), constatou-se uma redução significativa, que vai de encontro ao descrito por Volek et al. (27), estudo o qual apresenta a mudança da composição corporal de homens e mulheres com sobrepeso quando submetidos a uma dieta restrita em carboidratos. Quando há menor oferta de alimentos não há excesso de carboidratos disponível para que o fígado possa convertê-lo em gordura, além da maior utilização da glicose como fonte de energia e por isso os grupos CR e DR apresentaram melhora em seus perfis lipídicos quando submetidos à RA.

Ainda considerando o fígado como uma importante via metabólica para conversão de macronutrientes e que pode ser alterado por patologias como o DM, avaliou-se as enzimas hepáticas AST, ALT e fosfatase alcalina. Após o período pré restrição o grupo D apresentou todas as enzimas elevadas em relação ao grupo C. Como já demonstrado por Cassidy et al. (28), pacientes diabéticos têm suas enzimas hepáticas elevadas não pelo consumo excessivo de gorduras e sim por uma esteatose hepática causada pelo excesso de carboidratos na dieta, que é estocado no fígado e convertido em gordura no interior dos hepatócitos (tabelas 4 e 5).

Após a restrição alimentar observa-se uma tendência à diminuição de AST, ALT e fosfatase alcalina para todos os grupos, porém destacam-se os grupos submetidos à RA (CR e DR). Estes grupos tiveram uma queda acentuada nos valores séricos destas enzimas, portanto pode-se inferir que a RA e a troca da dieta promoveram melhoras nestes parâmetros, principalmente para o grupo DR.

### **5.3. Análises intestinais**

#### **5.3.1. Velocidade de trânsito intestinal**

A hiperglicemia é uma condição que está invariavelmente ligada ao DM. O conceito da doença demonstra de forma pontual esta associação (29). Entre as complicações relacionadas ao DM, a neuropatia diabética e o acometimento do trato gastrointestinal podem ser destacados.

A disfunção do trato digestório no DM é secundária ao controle inadequado da glicemia e a consequente neuropatia diabética exerce grande influência nas funções motora e sensorial do TGI, desde o estômago até a porção terminal do reto (30).

A hipótese de que o controle inadequado da glicemia é a principal causa de sintomas gastrointestinais tem sido levantada em alguns estudos (31-33). Variações agudas na glicose sérica, mesmo nos limites das taxas normais, podem ter grande influência na função motora e sensitiva do trato digestório, com destaque para a motilidade e o esvaziamento gástrico (34,35).

Quando avaliada a velocidade do trânsito intestinal após o período pré restrição alimentar nota-se pouca diferença entre os grupos C e D, porém o grupo D tende a uma velocidade de trânsito intestinal maior em relação ao grupo C. Isto pode ser justificado pelas fezes diarréicas nos animais diabéticos e pela maior quantidade de alimento ingerido por eles diariamente. Estes dois fatores associados às alterações de motilidade intestinal causadas pelo DM foram determinantes para que o tempo de evacuação do grupo D fosse menor em relação ao grupo C.

Entretanto quando analisado este mesmo parâmetro para o período após RA, constata-se que os grupos que passaram por RA (CR e DR) apresentaram uma velocidade de trânsito intestinal significativamente maior em relação aos grupos C e D. Este resultado provavelmente representa que a menor quantidade de alimento ingerida por estes ratos facilitou o esvaziamento gástrico.

### **5.3.2. Morfologia intestinal e células caliciformes**

Neste trabalho constatou-se que o comprimento total do intestino grosso foi maior nos ratos do grupo diabético (D) em relação aos demais grupos, este resultado está de acordo com os trabalhos de Jervis et al., Miller et al. e Schedl et al. (37-39). Nestes estudos também foi encontrado aumento do comprimento total do intestino delgado e grosso de ratos diabéticos. E uma das possíveis causas relacionadas a este crescimento intestinal é o aumento da ingestão de alimento (hiperfagia) decorrente do quadro diabético nos animais do grupo D, o que também foi constatado nos ratos diabéticos do estudo de Levin (1966) (40). No grupo DR verificou-se manutenção do comprimento do intestino grosso a valores semelhantes aos grupos C e CR, que demonstra a influência da RA nos animais diabéticos, que tiveram esta alteração revertida devido à menor ingestão de alimentos.

A presença de alimento e sua quantidade ingerida influenciam o crescimento epitelial, tanto por ação direta como pelo estímulo à secreção de hormônios como a insulina (41). A natureza e a quantidade desses nutrientes interferem no processo de crescimento intestinal e no estudo de Weser et al. (42) foi demonstrado em ratos, que a glicose promoveu crescimento das porções mais proximais do intestino grosso, mostrando um papel trófico dos carboidratos, já que sua maior absorção ocorre neste segmento.

Em nosso estudo foi constatado que a morfologia dos colos proximal e distal foi preservada entre os grupos. No entanto a morfometria das túnicas e parede dos colos proximal e distal demonstraram alterações semelhantes para estes parâmetros. Quando avaliada a túnica mucosa em ambos os segmentos (proximal e distal) nota-se o aumento significativo da espessura desta túnica principalmente no grupo diabético (D). Esta mudança possivelmente está relacionada ao estresse oxidativo decorrente da hiperglicemia que acontece no DM, que ao afetar os neurônios do plexo mientérico, pode estar relacionada com a hiperplasia presente na mucosa dos ratos diabéticos quando comparados aos demais grupos experimentais.

No grupo DR a restrição mostrou-se capaz de interferir na espessura da túnica mucosa nos dois segmentos, reduzindo esses valores de forma significativa. Estes resultados podem estar relacionados à queda e melhor controle da glicemia que ocorreu neste grupo (DR), diminuindo o estresse oxidativo e a hiperplasia da túnica mucosa (43).

A túnica submucosa demonstrou alteração contrária àquela encontrada na túnica mucosa dos ratos diabéticos (D). O grupo D apresentou uma redução desta túnica em ambos os segmentos, que pode estar relacionada com a glicação de proteínas desta túnica, principalmente o colágeno (44), afetando as propriedades mecânicas e motoras do intestino (45).

A túnica muscular dos ratos diabéticos (D), independente do segmento apresentou-se aumentada em relação aos demais grupos. Esta túnica exerce grande influência sobre a motilidade e velocidade de trânsito intestinal (46), sendo o intestino grosso responsável pela formação e carreamento do bolo fecal até sua excreção. Desta forma, quando foi avaliada a velocidade de trânsito intestinal constatou-se que os animais dos grupos CR, D e DR apresentaram maior velocidade de trânsito intestinal em relação ao grupo C.

A alteração da espessura muscular da parede intestinal pode estar relacionada a maior velocidade de trânsito intestinal encontrada nestes grupos e não somente relacionada com a menor quantidade de alimento ingerida (CR e DR).

As alterações morfométricas observadas na parede total dos colos proximal e distal refletem as alterações constatadas nas demais túnicas intestinais. Ressalta-se que a maior espessura da parede total foi encontrada no grupo D e este aumento decorre da maior espessura das túnicas mucosa e muscular (47).

Quando analisado o grupo DR, constata-se que a restrição alimentar interferiu nas alterações morfométricas observadas, mantendo principalmente a túnica mucosa e parede total menos espessas nos colos proximal e distal.

O índice de células calciformes quantificado nas criptas do colo proximal e distal foi mantido entre os grupos experimentais. Estes resultados vão de encontro aos resultados encontrados no estudo de Roldi et al. (48), no qual ratos diabéticos não tiveram redução da quantidade de células calciformes no colo proximal. Essa manutenção do número de células calciformes pode estar associada ao espessamento da mucosa e ao fator trófico que os carboidratos exercem sobre esta túnica, estimulando a proliferação celular. O estudo de Miller et al. (8) confirmam o fator trófico exercido pela glicose sobre as células da mucosa de ratos diabéticos, promovendo a proliferação destas células, inclusive de células calciformes, mantendo assim proporção destas células entre os grupos experimentais, já que foi um parâmetro analisado por índice/taxa.

Outro fator que pode influenciar a manutenção do índice de células calciformes no grupo diabético é o maior consumo de alimento por estes animais. Quanto maior a quantidade de alimento presente no lúmen intestinal, mais as células calciformes são

estimuladas a produzir muco e, por estarem em constante atividade estão em constante renovação (49).

### **5.3.3. Inervação: Quantificação e morfometria da população geral e nitrérgica**

A fisiopatologia do DM favorece alterações das funções gastrointestinais, e o papel do sistema nervoso entérico e seus neurotransmissores têm grande relevância. Em decorrência do comprometimento do tubo digestório, com danos no sistema nervoso entérico (SNE), pacientes portadores de DM podem apresentar quadros específicos de distúrbios de motilidade, alguns de grande relevância clínica, como gastroparesia diabética, constipação e diarreia (50,51). Desta forma, a enteropatia diabética reflete comprometimento autonômico generalizado (52-54).

As implicações resultantes da redução de populações neuronais avaliadas no plexo mientérico estão relacionadas com mudanças no padrão de absorção de nutrientes, motilidade e trânsito intestinal, liberação de neurotransmissores que afetam diretamente o sistema nervoso central e alterações na microbiota (55).

Os resultados obtidos revelam alterações quantitativas e morfométricas (perfil celular) na população neuronal mientérica geral e subpopulação nitrérgica nos colos proximal e distal. Nestes segmentos houve redução significativa no número de neurônios HuC/D e nNOS para os grupos D e DR em relação aos grupos C e, comprovando o comprometimento da inervação mientérica nestes animais, a perda neuronal em ratos diabéticos também foi verificada no trabalho de Rosa (56). Os resultados indicam que apesar de a RA ter atuado de forma eficiente revertendo alguns parâmetros bioquímicos alterados no DM, ela não foi capaz de reverter a perda de neurônios mientéricos decorrente desta patologia.

No colo proximal, a morfometria dos neurônios da população geral (HuC/D) não apresentou diferença significativa entre os grupos, porém para a população nitrérgica constata-se hipertrofia nos grupos CR e DR em relação aos demais grupos, demonstrando que a restrição alimentar pode ter influenciado no processo de hipertrofia destes neurônios, diante da perda neuronal que ocorre no diabetes.

Quando avaliada a morfometria para os neurônios do colo distal, observa-se que para a população geral houve hipertrofia dos neurônios apenas para o grupo CR em relação ao DR, demonstrando que neste caso, para os animais diabéticos, a restrição



alimentar não atuou de forma favorável à hipertrofia destes neurônios. Para a população nitrérgica apenas o grupo CR apresentou uma redução na morfometria dos neurônios em relação aos demais grupos.

Nos trabalhos de Gangula e Izbeki (57,58) a quantificação de neurônios da população geral e nitrérgica apresentam resultados que confirmam a perda neuronal no diabetes, porém diferente de nosso trabalho, confirmam a hipertrofia que ocorre nos neurônios que permaneceram ativos, como resposta compensatória à perda neuronal.

A RA não demonstrou efeito sobre estas duas populações avaliadas, tampouco reverteu a redução neuronal provocada pelo DM, porém não agravou esta perda, mantendo-a estabilizada até o final do tratamento. Quando observa-se a morfometria dos neurônios de ambos os segmentos avaliados, não é constatado um padrão de influência da restrição alimentar, sendo assim muito variável entre os grupos e entre as populações neuronais analisadas.

## 6. CONCLUSÃO

A restrição alimentar promoveu efeitos benéficos sobre os parâmetros fisiológicos e sanguíneos avaliados nos ratos diabéticos. Dentre eles pode-se destacar a melhora do perfil lipídico, redução das enzimas hepáticas, redução na glicemia em jejum, melhora no quadro de resistência à insulina.

O diabetes afetou a morfometria das túnicas intestinais e parede total, assim como promoveu perda neuronal das populações geral e nitrérgica em ambos segmentos do intestino grosso. Porém, neste caso a restrição alimentar não foi capaz de reverter estas alterações nos animais diabéticos.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Wild S, Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; **27**:1047-53.
2. International Diabetes Federation. *Atlas do Diabetes* 2016;**6**. Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>.
3. Harris MI. Classification and diagnostic criteria for diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Prim Care* 1988;**15**:205-25.
4. Brereton MF, Reversible changes in pancreatic islet structure and function produced by elevated blood glucose. *Nat. Commun* 2014;**22**:4639.
5. Furness JB, Costa M. The enteric nervous system. *Edinburgh: Churchill Livingstone* 1987.
6. Santoro S. Is the Metabolic syndrome a disease of the foregut? Yes, excessive foregut. *Ann Surg.* 2008;**247**:1074-75.
7. Jervis EL, Levin RJ. Anatomic adaptation of the alimentary tract of the rat to the hyperphagia of chronic alloxan-diabetes. *Nature.* 1966;**210**:391-93.
8. Miller DL, Hanson W, Schedl HP, Osborne JW. Proliferation rate and transit time of mucosal cells in small intestine of the diabetic rat. *Gastroenterology.* 1977;**73**:1326-32.
9. Schedl H, Wilson H. Effects of diabetes on intestinal growth in rat. *Journal of experimental zoology.* 1971;**176**:487-96.
10. Jazet IM. Sustained beneficial metabolic effects 18 months after a 30-day very low calorie diet in severely obese, insulin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2009;**77**:70-6.

11. Kahleova H. Eating two larger meals a day (breakfast and lunch) is more effective than six smaller meals in a reduced-energy regimen for patients with type 2 diabetes: a randomised crossover study. *Diabetologia* 2014; **57**: 1552-60.
12. Lim EL. Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. *Diabetologia* 2011; **54**: 2506-14.
13. Malandrucco I. Very-low-calorie diet: a quick therapeutic tool to improve  $\beta$  cell function in morbidly obese patients with type 2 diabetes. *American Journal Clinical Nutrition* 2012; **95**: 609-13.
14. Hussain TA. Effect of low-calorie versus low-carbohydrate ketogenic diet in type 2 diabetes. *Nutrition* 2012; **28**: 1016-21.
15. Kanda Y. Dietary restriction preserves the mass and function of pancreatic  $\beta$  cells via cell kinetic regulation and suppression of oxidative/ER stress in diabetic mice. *J. Nutr. Biochem.* pii: S0955-2863(14)00225-3, (in press).
16. Izbék F, Wittman T, Rosztóczy A. Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations and loss of nitrergic neurons in the ileum and colon of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2008;**80**:192-8
17. Lopes CR, Ferreira PE, Zanoni JN, Alves AM, Alves EP, Buttow NC. Neuroprotective effect of quercetin on the duodenum enteric nervous system of streptozotocin-induced diabetic rats. *DigDisSci.*2012;**15**:3106-15.
18. Zhang L, Zalewski A, Liu Y, Mazurek T, Cowan S. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation.* 2003;**108**:472-8.

19. Hygum K, Starup-Linde J, Harsløf T, Vestergaard P, Langdahl BL. Mechanisms in endocrinology: Diabetes mellitus, a state of low bone turnover - a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2017;**176**:137-57.
20. Li T, Chen K, Liu G, Huang LP, Chen L, Wang QW, Hu CL, Hou LJ. Calorie restriction prevents the development of insulin resistance and impaired lipid metabolism in gestational diabetes offspring. *Pediatr Res.* 2016;doi: 10.1038/pr.2016.265. [IN PRESS].
21. Emanuel AL, Meijer RI, Muskiet MH, van Raalte DH, Eringa EC, Serné E. Role of Insulin-Stimulated Adipose Tissue Perfusion in the Development of Whole-Body Insulin Resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;doi: 10.1111/tops.12183 [IN PRESS].
22. Mariani HS, Layden BT, Aleppo G. Continuous Glucose Monitoring: A Perspective on Its Past, Present, and Future Applications for Diabetes Management. *Clin Diabetes.* 2017;**35**:60-65.
23. Stolf AM, Cardoso CC, Acco A. Effects of Silymarin on Diabetes Mellitus Complications: A Review. *Phytother Res.* 2017 Jan 25. doi: 10.1002/ptr.5768. [Epub ahead of print]
24. Hebert SL, Nair KS. Protein and energy metabolism in type 1 diabetes. *Clin Nutr.* 2010;**29**:13-7.
25. Goldberg RB. Lipid disorders in diabetes. *Diabetes Care.* 1981;**4**:561-72.
26. Loria P, Lonardo A, Anania F. Liver and diabetes. A vicious circle. *Hepatol Res.* 2013;**43**:51-64.
27. JS Volek JS, MJ Sharman, AL Gómez, DA Judelson, MR Rubin, G Watson, B Sokmen, R Silvestre, DN French, WJ Kraemer. Comparison of an energy-restricted very

low-carbohydrate and low-fat diet on weight loss and body composition in overweight men and women. *Nutrition and Metabolism*. 2004;**13**:20-6.

28. Cassidy S, Thoma C, Hallsworth K, Parikh J, Hollingsworth KG, Taylor R, Jakovljevic DG, Trenell MI. High intensity intermittent exercise improves cardiac structure and function and reduces liver fat in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2016;**59**:56-66.

29. World Health Organization, Department of Noncommunicable Disease Surveillance. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Part1. Diagnosis and classification of diabetes. *Geneva: WHO*; 1999.

30. Bytzer P, Talley NJ, Hammer J, Young LJ, Jones MP, Horowitz M. GI symptoms in diabetes mellitus are associated with both poor glycemic control and diabetic complications. *Am J Gastroenterol*. 2002;**97**:604-11.

31. Ebert EC. Gastrointestinal complications of diabetes mellitus. *Dis Mon*. 2005;**51**:620-63.

32. Sogabe M, Okahisa T, Tsujigami K, Okita Y, Hayashi H, Taniki T. Ultrasonographic assessment of gastric motility in diabetic gastroparesis before and after attaining glycemic control. *J Gastroenterol*. 2005;**40**:583-90.

33. Quan C, Talley NJ, Jones MP, Spies J, Horowitz M. Gain and loss of gastrointestinal symptoms in diabetes mellitus: associations with psychiatric disease, glycemic control, and autonomic neuropathy over 2 years of follow-up. *Am J Gastroenterol*. 2008;**103**:2023-30.

34. Adib S, Rizvi A, Jahan F, Rabbani F, Islam N, Khan MH. Poor glycaemic control is the major factor associated with increased frequency of gastrointestinal symptoms in patients with diabetes mellitus. *J Pak Med Assoc*. 2007;**57**:345-9.

35. Rayner CK, Samsom M, Jones KL, Horowitz M. Relationships of upper gastrointestinal motor and sensory function with glycemic control. *Diabetes Care*. 2001;**24**:371-81
36. Feldman M, Schiller LR. Disorders of gastrointestinal motility associated with diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 1983;**98**:378-84.
37. Jervis EL, Levin RJ. Anatomic adaptation of the alimentary tract of the rat to the hyperphagia of chronic alloxan-diabetes. *Nature*. 1966;**210**:391-93.
38. Miller DL, Hanson W, Schedl HP, Osborne JW. Proliferation rate and transit time of mucosal cells in small intestine of the diabetic rat. *Gastroenterology*. 1977;**3**:1326-1332.
39. Schedl H, Wilson H. Effects of diabetes on intestinal growth in rat. *Journal of experimental zoology*.1971;**176**:487-496.
40. Levin RJ. Digestion and absorption of carbohydrates from molecules and membranes to humans. *Am J Clin Nutr*. 1994;**59**:690-8.
41. Johnson, LR. Regulation of gastrointestinal mucosal growth. *Physiol Ver*. 1988;**68**:456-502.
42. Weser E, Babbitt J, Hoban M, Vandeventer A. Intestinal adaptation: different growth responses to disaccharides compared with monosaccharides in rat small bowel. *Gastroenterology*. 1986;**91**:1521-7.
43. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*.1997;**43**:61-8.
44. Paul RG, Bailey AJ. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996;**28**:1297-310.

45. Zhao J, Yang J, Gregersen H. Biomechanical and morphometric intestinal remodeling during experimental diabetes in rats. *Diabetology*. 2003;**46**:1688-97.
46. Phillips SF. Functions of the large bowel: an overview. *Scand J Gastroenterol*. 1984;**93**:1-12
47. Mantle M, Thakore E, Atkins E. Effects of streptozotocindiabetes on rat intestinal mucin and goblet cells. *Gastroenterology* 1988;**97**:66-75.
48. Roldi LP, Pereira RVF, Tronchini EA, Rizo GV, Scoaris CR, Zanoni JN, Natali, MRM. Supplementation with vitamin E (alpha-tocopherol) in diabetic rats: effects on the proximal colon. *BMC Gastroenterology*. 2009;**9**:88.
49. Troncon LE, Lopes RP, Simão MN, Iquegami M, Rosa e Silva L, Nobre-e-Souza MA, et al. Frequência de sintomas digestivos em pacientes brasileiros com diabetes mellitus. *Rev Ass Med Brasil*. 2001;**47**:157-64.
50. Sierra VA. Manifestaciones gastrointestinales de la diabetes mellitus. *Rev Col Gastroenterol*. 2006;**21**:39-56.
51. Chucciara S, Borrelli O. Diabetes and gastrointestinal tract: the intrigue continues. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;**38**:4-6.
52. Mashimo H, May RJ, Goyal RK. Efeitos do diabetes mellitus no sistema digestório. *Artmed*. 2009;1081-114.
53. Wang X, Pitchumoni CS, Chandrarana K, Shah N. Increased prevalence of symptoms of gastroesophageal reflux diseases in type 2 diabetics with neuropathy. *World J Gastroenterol*. 2008;**14**:709-12.



54. Buttow NC, Miranda-Neto MH, Bazotte RB. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the duodenum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arg gastroenterol.* 1997;**34**:32-42.
55. Pereira RV, Tronchini EA, Tashima CM, et al. L-glutamine supplementation prevents myenteric neuron loss and has gliatrophic effects in the ileum of diabetic rats. *Dig Dis Sci* 2011;**56**:3507-16
56. Rosa CVD, Azevedo SCSF, Bazotte RB, Peralta RM, Buttow NC, Pedrosa MMD, Godoi VAF, Natali MRM. Supplementation with L-Glutamine and L-Alanyl-L-Glutamine Changes Biochemical Parameters and Jejunum Morphophysiology in Type1 Diabetic Wistar Rats. *Plos One.* 2015;**10**:25-32.
57. Gangula PR, Mukhopadhyay S, Pasricha PJ. Sepiapterin reverses the changes in gastric nNOS dimerization and function in diabetic gastroparesis. *Neurogastroenterol Motil* 2010;**22**:1325-31.
58. Izbeki F, Wittman T, Rosztoczy A, et al. Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations and loss of nitreergic neurons in the ileum and colon of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008;**80**:192-8

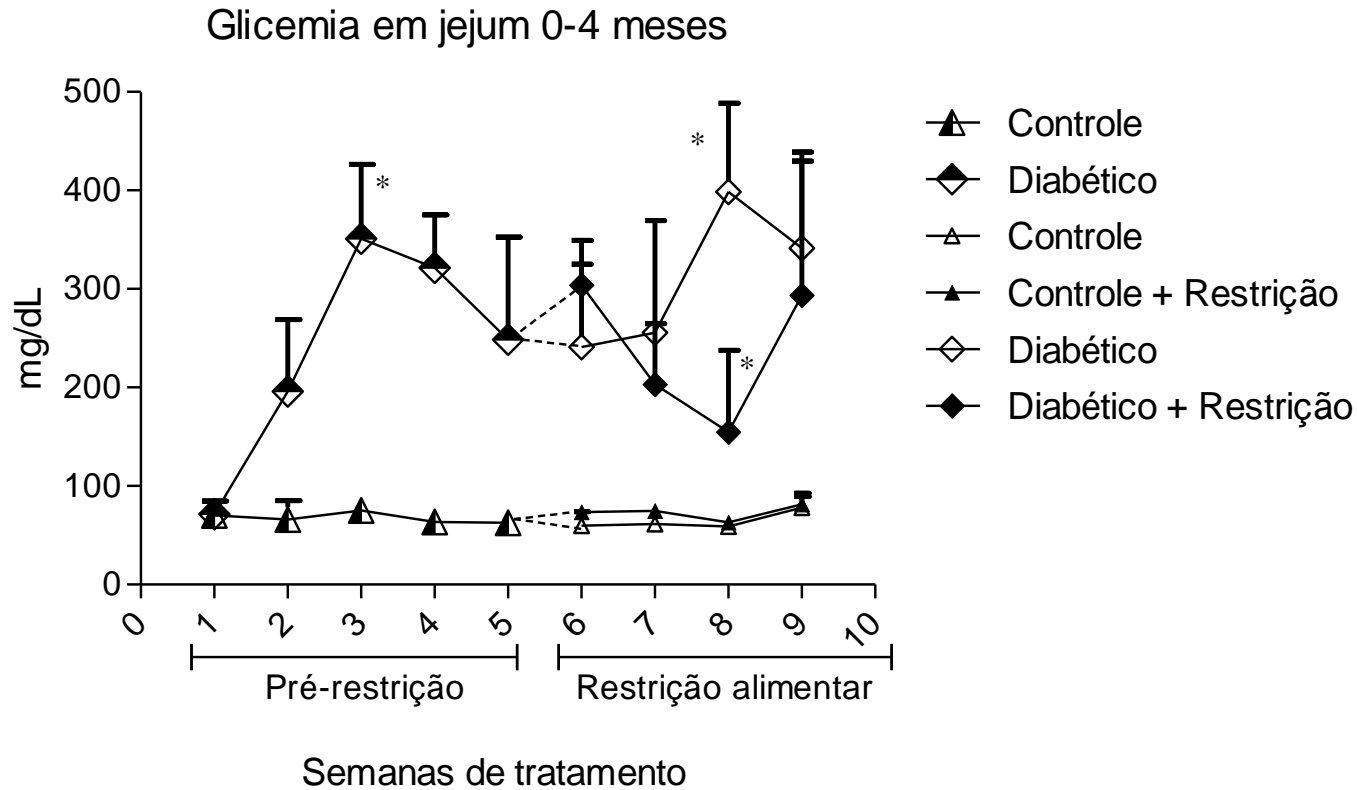


**Tabela 1.** Distribuição dos grupos experimentais durante 4 meses de tratamento.

0-2 Meses		2-4 Meses	
<b>Grupo C</b>	Ração padrão Nuvilab + água <i>ad libitum</i>	<b>Grupo C</b>	Ração padrão Nuvilab + água <i>ad libitum</i>
		<b>Grupo CR</b>	Ração padrão Nuvilab em regime de restrição (15g) + água <i>ad libitum</i>
<b>Grupo D</b>	Ração estilo cafeteria + Água <i>ad libitum</i>	<b>Grupo D</b>	Ração padrão Nuvilab + água <i>ad libitum</i>
		<b>Grupo DR</b>	Ração padrão Nuvilab em regime de restrição (15g) + água <i>ad libitum</i>

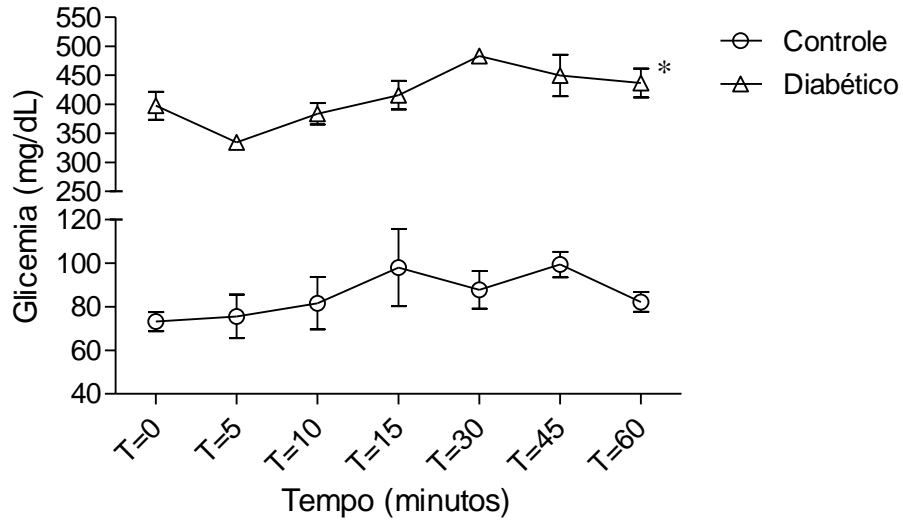
**Tabela 2.** Anticorpos primários e secundários utilizados na imunomarcagem para HuC/D<sup>+</sup> e nNOS<sup>+</sup>.

Primário	Hospedeiro	Diluição	Empresa	Secundário	Diluição	Empresa
HuC/D	Camundongo	1:500	A21271 Molecular Probes, Invitrogen	Anti-mouse Alexa Flúor 546	1:500	Molecular Probes, Invitrogen
nNOS	Coelho	1:500	SC-49055	Anti-coelho	1:500	Molecular Probes,

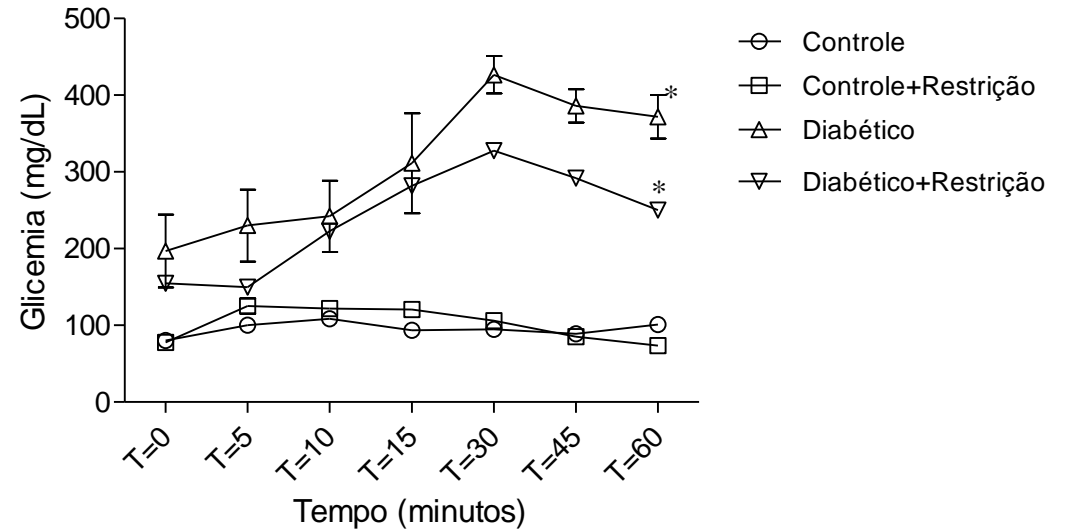


**Figura 1.** Evolução semanal da glicemia em jejum (mg/dL) de ratos dos grupos controle (C) e diabético (D) pelo período de 0- 2 meses (pré-restrição) e dos grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabético (D) e diabético com restrição (CR) pelo período de 2-4 meses de tratamento. (\*) Indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (C) dos períodos pré e pós restrição alimentar. Análise de Variância One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey ( $n=5$ /grupo).

**A** Teste de tolerância à glicose pré-restrição

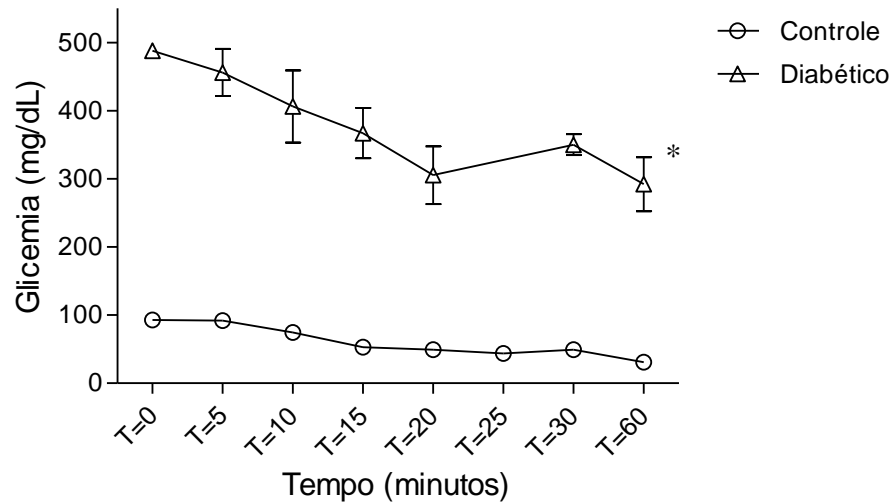


**B** Teste de tolerância à glicose pós-restrição

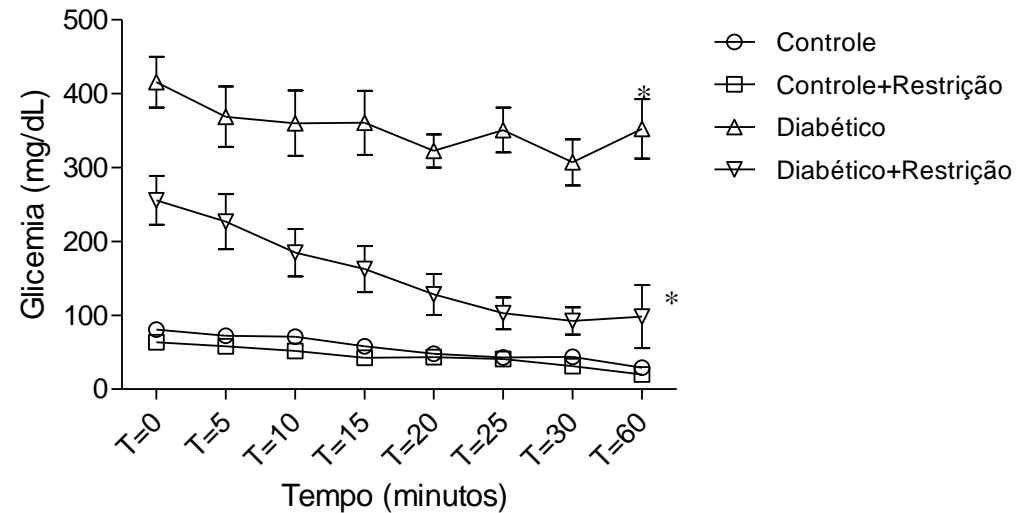


**Figura 2.** Testes de tolerância à glicose (mg/dL) de ratos dos grupos controle (C) e diabético (D) ao final 2 meses (A) (pré-restrição alimentar) e dos grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabético (D) e diabético com restrição (CR) aos 4 meses de tratamento (B) (pós-restrição alimentar). (\*) Curvas que apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (C). Análise de Variância One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey ( $n=5$ /grupo).

### A Teste de tolerância à insulina pré-restrição



### B Teste de tolerância à insulina pós-restrição



**Figura 3.** Testes de tolerância à insulina (mg/dL) de ratos dos grupos controle (C) e diabético (D) ao final de 2 meses (A) (pré-restrição alimentar) e dos grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabético (D) e diabético com restrição (CR) ao final de 4 meses de tratamento (B) (pós-restrição alimentar). (\*) Curvas que apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (C). Análise de Variância One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey ( $n=5$ /grupo).

**Tabela 3.** 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 restrição alimentar) e de 2-4 meses (durante restrição alimentar) de ratos dos grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabético (D) e diabético com restrição (DR). Resultados expressos como média\*  $\pm$  erro padrão (n=5/grupo).

	<b>C</b>	<b>CR</b>	<b>D</b>	<b>DR</b>
<b>Massa corporal</b>	489,8 $\pm$ 9,31 <sup>a</sup>	372,0 $\pm$ 9,70 <sup>b</sup>	334,8 $\pm$ 10,68 <sup>b</sup>	200,4 $\pm$ 8,11 <sup>c</sup>
<b>Consumo/ração 0-2 meses</b>	31,8 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	33,6 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	49,5 $\pm$ 1,29 <sup>c</sup>	47,8 $\pm$ 1,05 <sup>c</sup>
<b>Consumo/ração 2-4 meses</b>	29,3 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>	15,0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	47,5 $\pm$ 1,12 <sup>c</sup>	15,0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>
<b>Consumo/água 0-2 meses</b>	58,4 $\pm$ 4,99 <sup>a</sup>	63,8 $\pm$ 7,24 <sup>a</sup>	237,3 $\pm$ 27,44 <sup>b</sup>	276,9 $\pm$ 32,19 <sup>b</sup>
<b>Consumo/água 2-4 meses</b>	51,0 $\pm$ 2,30 <sup>a</sup>	50,1 $\pm$ 3,54 <sup>a</sup>	196,4 $\pm$ 15,11 <sup>b</sup>	83,0 $\pm$ 30,54 <sup>ab</sup>

\*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Análise de Variância One-way ANOVA, seguidos de pós teste de Tukey .

**Tabela 4.** Parâmetros bioquímicos: proteínas totais, frutossamina, triglicerídeos, colesterol, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina do sangue de ratos após 2 meses de tratamento (pré restrição alimentar) para os grupos controle (C) e diabéticos (D). Resultados expressos como média\*  $\pm$  erro padrão (n=5/grupo).

	<b>C</b>	<b>D</b>
<b>Proteínas totais (g.dL<sup>-1</sup>)</b>	6,95 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	6,88 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
<b>Frutossamina (mg.dL<sup>-1</sup>)</b>	0,57 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	1,27 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
<b>Triglicerídeos (mg.dL<sup>-1</sup>)</b>	109,7 $\pm$ 19,69 <sup>a</sup>	245,8 $\pm$ 71,77 <sup>b</sup>
<b>Colesterol total (mg.dL<sup>-1</sup>)</b>	77,6 $\pm$ 5,04 <sup>a</sup>	117,8 $\pm$ 9,16 <sup>b</sup>
<b>AST (U.L<sup>-1</sup>)</b>	22,8 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>	177,6 $\pm$ 23,28 <sup>b</sup>
<b>ALT (U.L<sup>-1</sup>)</b>	41,40 $\pm$ 2,04 <sup>a</sup>	309,4 $\pm$ 17,30 <sup>b</sup>
<b>Fosfatase alcalina (U.L<sup>-1</sup>)</b>	139,8 $\pm$ 27,18 <sup>a</sup>	540,8 $\pm$ 60,97 <sup>b</sup>

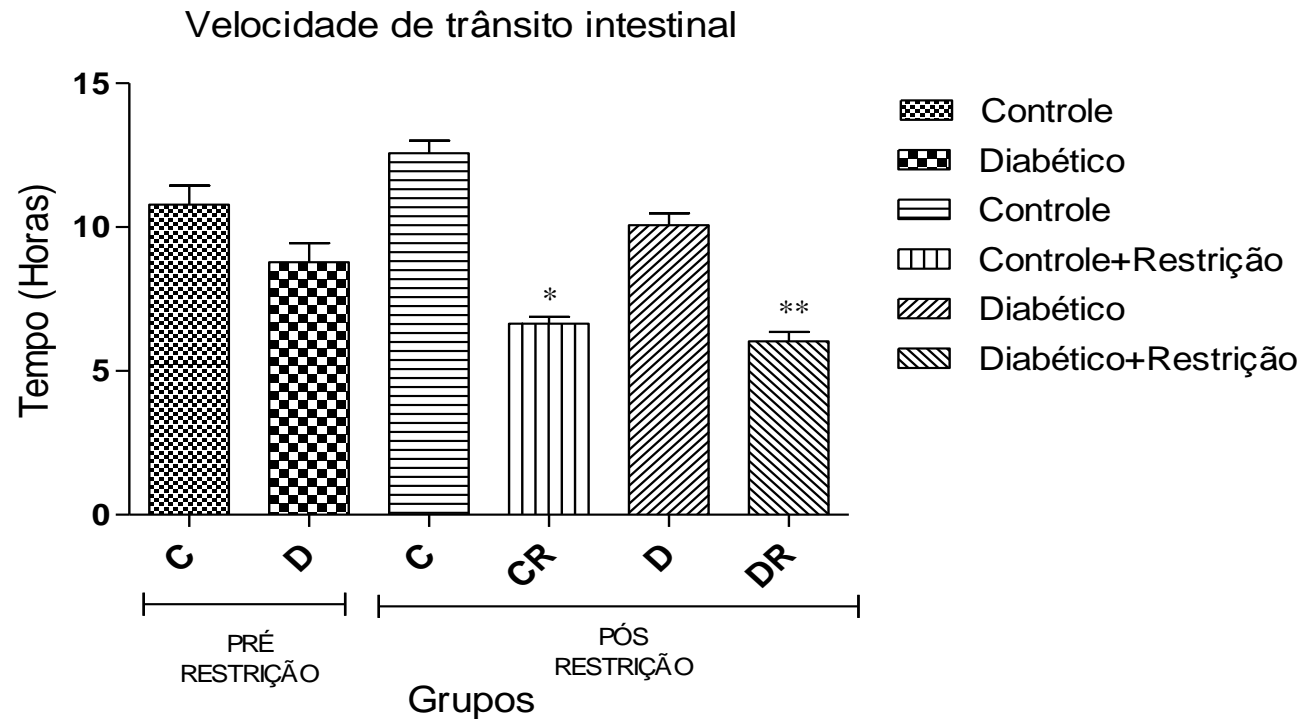
\*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Análise de Variância One-way ANOVA, seguidos de pós teste de Tukey.



**Tabela 5.** Parâmetros bioquímicos: proteínas totais, frutossamina, triglicerídeos, colesterol, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina do sangue de ratos após 4 meses de tratamento (pós restrição alimentar) para os grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabéticos (D) e diabéticos com restrição (DR). Resultados expressos como média\*  $\pm$  erro padrão (n=5/grupo).

	<b>C</b>	<b>CR</b>	<b>D</b>	<b>DR</b>
<b>Proteínas totais (g.dL<sup>-1</sup>)</b>	5,32 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	4,96 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	5,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	5,58 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>
<b>Frutossamina (mg.dL<sup>-1</sup>)</b>	0,28 $\pm$ 0,014 <sup>a</sup>	0,21 $\pm$ 0,006 <sup>b</sup>	0,31 $\pm$ 0,017 <sup>a</sup>	0,31 $\pm$ 0,018 <sup>a</sup>
<b>Triglicerídeos (mg.dL<sup>-1</sup>)</b>	122,7 $\pm$ 19,91 <sup>a</sup>	41,00 $\pm$ 2,93 <sup>b</sup>	112,7 $\pm$ 20,72 <sup>a</sup>	26,0 $\pm$ 3,29 <sup>b</sup>
<b>Colesterol total (mg.dL<sup>-1</sup>)</b>	63,1 $\pm$ 4,34 <sup>a</sup>	57,1 $\pm$ 4,14 <sup>ac</sup>	73,20 $\pm$ 4,79 <sup>a</sup>	44,10 $\pm$ 4,1 <sup>bc</sup>
<b>AST (U.L<sup>-1</sup>)</b>	49,9 $\pm$ 1,74 <sup>a</sup>	38,20 $\pm$ 3,98 <sup>a</sup>	117,4 $\pm$ 27,77 <sup>b</sup>	43,0 $\pm$ 2,62 <sup>a</sup>
<b>ALT (U.L<sup>-1</sup>)</b>	31,40 $\pm$ 2,04 <sup>a</sup>	30,4 $\pm$ 17,30 <sup>a</sup>	42,40 $\pm$ 3,01 <sup>b</sup>	31,40 $\pm$ 3,19 <sup>a</sup>
<b>Fosfatase alcalina (U.L<sup>-1</sup>)</b>	83,0 $\pm$ 14,7 <sup>a</sup>	130,8 $\pm$ 15,04 <sup>ac</sup>	916,3 $\pm$ 161,9 <sup>b</sup>	484,9 $\pm$ 88,1 <sup>c</sup>

\*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Análise de Variância One-way ANOVA, seguidos de pós teste de Tukey.



**Figura 4.** Velocidade de trânsito intestinal (tempo) de ratos dos grupos controle (C) e diabético (D) após 2 meses de tratamento (pré restrição alimentar) e dos grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabético (D) e diabético com restrição (CR) após 4 meses de tratamento (pós restrição alimentar). Análise de Variância One-way ANOVA, seguidos de pós teste de Tukey. Resultados expressos como média\* ± erro padrão (n=5/grupo). \*p < 0,05 quando comparado ao grupo C no período pós restrição alimentar e \*\*p < 0,05 quando comparado ao grupo D no período pós restrição alimentar.

**Tabela 6.** Comprimento total do intestino grosso (cm), índice de células caliciformes (%) e morfometria ( $\mu\text{m}$ ) das túnicas mucosa, submucosa, muscular e parede total dos colos proximal e distal de ratos após 4 meses de tratamento para os grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabético (D) e diabético com restrição (DR). Resultados expressos como média\*  $\pm$  erro padrão (n=5/grupo).

		<b>C</b>	<b>CR</b>	<b>D</b>	<b>DR</b>
<b>Intestino grosso</b>		17,4 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	17,1 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	22,4 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	17,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
<b>Colo Proximal</b>	<b>Mucosa</b>	50,65 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	57,93 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>	61,07 $\pm$ 0,46 <sup>c</sup>	53,04 $\pm$ 0,33 <sup>d</sup>
	<b>Submucosa</b>	25,5 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	25,31 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	23,97 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	25,66 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
	<b>Muscular</b>	103,8 $\pm$ 0,77 <sup>a</sup>	119,6 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup>	114,3 $\pm$ 0,95 <sup>c</sup>	103,8 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>
	<b>Parede total</b>	214,60 $\pm$ 1,35 <sup>a</sup>	213,2 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup>	215,4 $\pm$ 1,47 <sup>a</sup>	208,0 $\pm$ 1,293 <sup>b</sup>
	<b>Células caliciformes</b>	18,0 $\pm$ 3,02 <sup>a</sup>	25,42 $\pm$ 2,59 <sup>a</sup>	19,39 $\pm$ 2,51 <sup>a</sup>	22,56 $\pm$ 3,05 <sup>a</sup>
	<b>Mucosa</b>	102 $\pm$ 0,85 <sup>a</sup>	119 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>	121 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>	113 $\pm$ 0,55 <sup>c</sup>
<b>Colo Distal</b>	<b>Submucosa</b>	22,0 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	22,26 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	21,66 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>	18,89 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>
	<b>Muscular</b>	40,58 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	42,21 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	51,85 $\pm$ 0,36 <sup>c</sup>	63,42 $\pm$ 0,41 <sup>d</sup>
	<b>Parede total</b>	194,2 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup>	202,1 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>	230,4 $\pm$ 1,52 <sup>c</sup>	222,1 $\pm$ 0,76 <sup>c</sup>
	<b>Células caliciformes</b>	15,89 $\pm$ 3,88 <sup>a</sup>	23,74 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup>	16,38 $\pm$ 1,31 <sup>a</sup>	19,71 $\pm$ 1,82 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Análise de Variância One-way ANOVA, seguidos de pós teste de Tukey.

**Tabela 7.** Quantificação (neurônios/gânglio) e morfometria do perfil celular dos neurônios mientéricos imunomarcados HuC/D<sup>+</sup> e nNOS<sup>+</sup> (μm<sup>2</sup>) nos colos proximal e distal de ratos após 4 meses de tratamento para os grupos controle (C), controle com restrição (CR), diabético (D) e diabético com restrição (DR). Resultados expressos como média\* ± erro padrão (n=5/grupo).

		C	CR	D	DR
Colo Proximal	Quantificação HuC/D <sup>+</sup>	21.29±0.63 <sup>a</sup>	19.31±0.57 <sup>a</sup>	16.46±0.62 <sup>b</sup>	16.79±0.54 <sup>b</sup>
	Quantificação nNOS <sup>+</sup>	9.57±0.34 <sup>a</sup>	8.21±0.28 <sup>b</sup>	7.60±0.28 <sup>b</sup>	7.58±0.28 <sup>b</sup>
	Morfometria HuC/D <sup>+</sup>	350.8±6.78 <sup>a</sup>	352.8±5.90 <sup>a</sup>	336.0±6.64 <sup>a</sup>	356.8±5.40 <sup>a</sup>
	Morfometria nNOS <sup>+</sup>	330.7±5.57 <sup>a</sup>	378.1±6.06 <sup>b</sup>	347.6±6.10 <sup>ab</sup>	363.0±6.51 <sup>b</sup>
Colo Distal	Quantificação HuC/D <sup>+</sup>	19.43±0.65 <sup>a</sup>	15.17±0.52 <sup>b</sup>	16.80±0.57 <sup>bc</sup>	18.64±0.65 <sup>ac</sup>
	Quantificação nNOS <sup>+</sup>	9.76±0.44 <sup>a</sup>	7.98±0.33 <sup>b</sup>	8.42±0.26 <sup>b</sup>	8.48±0.30 <sup>b</sup>
	Morfometria HuC/D <sup>+</sup>	336.1±6.23 <sup>a</sup>	354.1±6.31 <sup>ab</sup>	345.8±7.31 <sup>a</sup>	330.6±5.40 <sup>ac</sup>
	Morfometria nNOS <sup>+</sup>	362.2±6.27 <sup>a</sup>	335.4±6.08 <sup>b</sup>	367.0±6.98 <sup>a</sup>	360.6±5.78 <sup>a</sup>

\*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05). Análise de Variância One-way ANOVA, seguidos de pós teste de Tukey.





## **8. ANEXOS**



## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR SOBRE A NEUROPATIA DIABÉTICA EM MODELO ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2", protocolado sob o CEUA nº 7590050415, sob a responsabilidade de **Maria Raquel Marçal Natali e equipe; Carlos Vinicius Dalto Da Rosa; Jéssica Men De Campos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) em reunião de 14/08/2015.

We certify that the proposal "INVESTIGATION OF THE FOOD RESTRICTION EFFECTS ON DIABETIC NEUROPATHY IN ANIMAL MODEL OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS", utilizing 60 Isogenic rats (60 males), protocol number CEUA 7590050415, under the responsibility of **Maria Raquel Marçal Natali and team; Carlos Vinicius Dalto Da Rosa; Jéssica Men De Campos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringa (CEUA/UEM) in the meeting of 08/14/2015.

Vigência da Proposta: de 05/2015 a 12/2017

Laboratório: Ciências Morfológicas (dcm)

Procedência: BIOTÉRIO CENTRAL DA UEM

Espécie: Rato isogênico

Gênero: Machos

idade: 90 dias

N: 60

Linhagem: Wistar

Peso: 250g

Resumo: O diabetes mellitus tipo 2 eleva o nível glicêmico gerando aumento do estresse oxidativo em vários tecidos. O trato gastrointestinal também é comprometido pelo diabetes, gerando disfunções, como disfagia e constipação. Há vários modelos animais de indução do diabetes, porém, não há completa similaridade com a doença humana, carecendo de melhor caracterização e comparação entre modelos. A restrição alimentar gera vários benefícios ao organismo, como no processo de envelhecimento e no combate a doenças pela redução da formação de radicais livres e, conseqüentemente, do estresse oxidativo. A restrição alimentar já mostrou benefícios sobre os indivíduos diabéticos, mas a literatura não considera se este modelo é capaz de recuperar as funções gastrointestinais. O objetivo deste estudo é avaliar as diferenças de modelos de diabetes sobre o jejuno e o íleo, e suas respostas à restrição alimentar. Para isto serão utilizados 60 ratos Wistar, dos quais 20 serão animais controle, distribuídos em animais não tratados e animais sob restrição alimentar. Os animais restantes serão submetidos a dois protocolos de diabetização, com indução química por meio de injeção de nicotinamida e estreptozotocina, ou dieta de cafeteria por dois meses seguida de injeção de estreptozotocina. Para cada protocolo 10 animais receberão ração padrão ad libitum e 10 sofrerão restrição alimentar baseada no grupo controle restringido. A restrição alimentar utilizada será de 50% do consumo diário de ração. Após 60 dias de restrição os animais serão eutanasiados, e terão seu sangue coletado para realização de dosagens bioquímicas de proteínas totais, uréia, frutossamina, níveis de aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, malondialdeído e atividade de GLP-1. O intestino delgado será coletado e terá o jejuno e íleo separados e fixados para técnicas imunohistoquímica de avaliação da população geral e subpopulações colinérgica, nitrérgica e vipérgica neuronal, e glia do plexo mioentérico. Outra porção destes segmentos serão destinadas a técnicas de imunoidentificação para avaliar células enteroendócrinas serotoninérgicas e GLP-1 imunoreativas, além da apoptose por meio do TUNEL em cortes histológicos. Também será realizada determinação de alguns parâmetros do estresse oxidativo tecidual por meio das técnicas da superóxido dismutase e do ácido tiobarbitúrico. Os dados serão submetidos à análise estatística utilizando o teste K-S, seguidos pelos testes de análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey, ou teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, conforme a normalidade dos dados.

Maringá, 18 de agosto de 2015



## **Author Guidelines – Neurogastroenterology and Motility**

Effective with the 2014 volume, this journal will be published in an online-only format.

### **PUBLICATION POLICY**

Submission is considered on the conditions that papers are previously unpublished, and are not offered simultaneously elsewhere, that all authors (defined below) have read and approved the content, that authors have declared all competing interests and the work has been conducted under internationally accepted ethical standards after relevant ethical review.

### **Copyright**

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

#### **For authors signing the copyright transfer agreement**

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

#### **For authors choosing OnlineOpen**

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

## Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

## **Ethics**

The Journal's ethical policies are outlined in the separate document Ethical Policies of *Neurogastroenterology & Motility*. Submitted work must comply with this policy, which is based on the Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines on good publication and comply with their Code of Conduct.

Please note that the journal employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to the journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

## **Accepted Articles**

Upon acceptance for publication, all authors must complete and submit

- a Conflict of Interests Form (COI)

Authors are responsible for securing (and funding) permission to use any figures or tables previously published. Accepted papers will not be transferred for publication until these permissions are in place.

## **SUBMISSION**

*Neurogastroenterology & Motility* only accepts submission at <http://mc.manuscriptcentral.com/nmo>. This enables rapid and effective peer review. Contributions will be acknowledged automatically by the editors and assigned a unique manuscript number that must be quoted in correspondence. Papers and Reviews are refereed by experts in the field; the Editors reserve the right to reject an article without review.

Full uploading instructions and support are available online from the submission site via the "Get Help Now" button. Please submit your covering letter or comments to the editor as well as the names of potential referees when prompted online.

Manuscripts that do not meet the formal criteria listed below will be returned for reformatting, which will delay the review process and possible acceptance. Exceptions to these guidelines may be made in certain circumstances, at the discretion of the Editors. If you require an exemption, please indicate this in your cover letter.

Over the past few years, *Neurogastroenterology & Motility* has become one of the leading journals in the field of gastroenterology and related areas of physiology. This is reflected by the steadily increasing number of high-quality manuscripts submitted to the Journal. The length of a manuscript needs to be closely adhered to, with any additional material to be published as supporting information. Authors need not pay for the publication of figures in colour.

Manuscripts that do not meet these formal criteria will be returned for reformatting, which will delay the review process and possible acceptance.

## Article types

### Original Articles

Original Articles describe the results of basic or clinical studies, clinical trials or significant **Case Reports**. The length of an Original Article should be no longer than **5000** words, excluding acknowledgements and disclosures, references, tables, figures, table legends and figure legends, and to limit the number of figures and tables to a maximum of eight in the regular edition of the Journal (e.g. five figures and three tables) in normal circumstances, with any additional material to be published as supporting information.

We work together with Wiley's open access journal, *Clinical Case Reports*, to enable rapid publication of good quality case reports that we are unable to accept for publication in our journal. Authors of case reports rejected by our journal will be offered the option of having their case report, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by the *Clinical Case Reports* editorial team. Authors will not need to reformat or rewrite their manuscript at this stage, and publication decisions will be made a short time after the transfer takes place. *Clinical Case Reports* will consider case reports from every clinical discipline and may include clinical images or clinical videos. *Clinical Case Reports* is an open access journal, and article publication fees apply. For more information please go to [www.clinicalcasesjournal.com](http://www.clinicalcasesjournal.com).

### Review Articles

Topical reviews of basic or clinical areas are commissioned by the Reviews Editor. Review Articles are focused topical accounts that highlight new and/or controversial areas. Manuscript length is limited to **5000** words. All Review articles are subject to review by experienced referees. The Journal welcomes unsolicited Reviews, but the Reviews Editor reserves the right to reject these without formal review. As Reviews are commissioned by the Editors far in advance of publication, if you wish to submit a non-commissioned review please contact the Reviews Editor, Gary Mawe ([gary.mawe@uvm.edu](mailto:gary.mawe@uvm.edu)) for consideration.

### Hot Topics

Manuscripts submitted for the "Hot Topics" section should be no more than **1500** words in total and include only one figure. They will be reviewed and accepted by the Editors on the basis of their outstanding scientific value and the presentation of novel insights into neural control on gut functions in health or disease. "Hot Topics" articles will be only accepted with minor changes. Publication will be in the next available issue with the aim to publish the manuscript about two months after submission. The Editors reserve the right to reject manuscripts without formal review. Rejection for inclusion in the "Hot Topics" section does not disqualify manuscripts for resubmission as an Original Article.

### Letters to the Editor

Letters to the Editor offer opinions on papers published in *Neurogastroenterology & Motility*. Text should not exceed **400** words. Letters commenting on papers are sent to the authors of those papers for a response. Letters are selected for their importance, relevance, and originality; not all letters submitted can be published.

### Technical Notes

Technical Notes papers are restricted to a maximum of **1500** words. The manuscript should focus on technique, validation of the technique, and include relevant references and up to two figures.

## Book Reviews

*Neurogastroenterology & Motility* does not publish Book Reviews.

## Revisions

To make it easier for re-review, we encourage authors to make the revisions in their manuscript using a colored font (blue or red) and/or a colored highlighter (yellow). They should also provide a point by point response to the editor of the changes that were made in a letter that describes the requested change and the responses.

The editors have designated two types of revision for manuscripts in the Journal: (i) Minor revisions: these in general require only changes to the manuscript or easily conducted experiments. Revised manuscripts must be submitted in their final form no later than four weeks of receipt of a revision letter from the Editor. (ii) Major revisions: these require changes to the manuscript and significant additional experiments. Revised manuscripts must be submitted in their final form within three months of receipt of a revision letter from the editor.

In all cases, resubmissions after the allotted time will be considered as new submissions.

## Language

Please note that the Journal uses American spelling (e.g. 'esophagus', not 'oesophagus'). Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at [http://authorservices.wiley.com/bauthor/english\\_language.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication. Authors of manuscripts with a poor standard of English will be directed towards the abovementioned editing services.

## PRESENTATION

### Acceptable file formats

**Text:** Manuscript should be submitted as one text file in either Word document (.doc), or RTF (.rtf). Manuscripts submitted as PDF (.pdf) will be rejected and delay the submission process.

**Tables:** Should form an integral part of the text file. Tables submitted as photographs or graphics will be rejected and delay the submission process.

**Figures for review:** Must be uploaded separately.

**Figures for publication:** On acceptance, you will be required to upload high resolution graphics files. Unlabelled micrographs (tone) should be supplied as TIFF (.tif), and will not be accepted as PDF (.pdf) format. Labelled micrographs (combination) or charts/ graphs/ diagrams (line) must be supplied as PDF (.pdf) or as EPS (.eps) format and created in vector based software.

### Text

Manuscripts should be typed in a standard, easy to read font, either 11 or 12pt in size. Manuscripts should be double-spaced, with 2.5cm (1 inch) margins on all sides and run in one single column. Please ensure that you have turned "track changes off" and removed any reviewing notes from your manuscripts else

these will be visible throughout the review process. Place the page number and first author's last name in the upper right-hand corner of each page.

Review articles should be divided onto the following sections and appear in the following order: (1) title page (with short running page heading, title, authors names and affiliations), (2) abstract and keywords, (3) body of the article, (4) acknowledgments, funding, and disclosures; (5) references, (6) tables, (7) figure legends, and (8) figures.

Original articles should be divided into the following sections and appear in the following order: (1) title page (with short running page heading, title, authors names and affiliations) (2) abstract and keywords, (3) introduction, (4) materials and methods, (5) results, (6) discussion, (7) acknowledgments, funding, and disclosures, (8) references, (9) appendices, (10) supporting information, (11) tables, (12) figure legends, and (13) figures.

### **Title Page**

On the title page, provide the complete title and a running title (not to exceed 45 characters and spaces). List each contributor's name and institutional affiliation. Provide the name, postal and e-mail address, fax and telephone number of the contributor responsible for the manuscript and proofs. This is the person to whom all correspondence will be sent. The corresponding author is responsible for keeping the editorial office updated with any change in details until the paper is published.

### **Abstract and Keywords**

The abstract must not exceed 250 words. It should summarize the aim of the study and describe the work undertaken, results and conclusions. For Original Articles and Technical Notes, the abstract should be structured under four subheadings: **Background, Methods, Key Results and Conclusions & Inferences**. For Review Articles, the abstract should be structured under **Background and Purpose**. For Mini-review editorials, "Hot Topics" and Case Reports, the abstract should be unstructured, i.e. without the subheadings. In addition, you should list up to six keywords in alphabetical order. For ideas on optimising your abstract, see [here](#).

### **Key Points**

The Key Points of research papers should provide readers with a concise, but precise, synopsis of the paper, and make the research accessible to readers from overlapping disciplines.

Key Points should be written clearly, in lay English that can be understood by a non-expert in the area, and the use of scientific language should be kept to a minimum. Only those abbreviations in common usage will be allowed.

The Key Points summary should be written in short sentences, should not exceed 80 words total, and should be presented as 3 bulleted points as follows:

- The first point should describe, in one or two short sentences, the state of current knowledge and the key question(s) being addressed in the research paper
- The second point should describe the results of the current paper. It is neither appropriate nor necessary to provide numerical results or statistical details
- The third point should state the importance of these results in the context of the broader field of neurogastroenterology and motility, in health and disease.

## Introduction

This section should not exceed more than 500 words and should not have a separate heading. The Introduction should briefly discuss the objectives of the study and provide the background information to explain why the study was undertaken, and what hypotheses were tested.

## Materials and methods

Animal preparation and experimentation should cite the approving governing body. Equipment and apparatus should cite the make and model number and the company name and address (town, state/city, country) at first mention.

Give all measurements in metric units and use negative indexing ( $\text{mg mL}^{-1}$ , not  $\text{mg/mL}$ ). Use generic names of drugs. Symbols, units and abbreviations should be expressed as Système International (SI) units. In exceptional circumstances, others may be used, provided they are consistent. If necessary, please contact the editorial office for further advice.

### Experimental Methods Reporting Checklist for Authors

## Results

**Tables and text should not duplicate each other.**

## Discussion

This section should not exceed more than 1500 words and should be concise. The Discussion should include a brief statement of the principal findings, a discussion of the validity of the observations, a discussion of the findings in light of other published work dealing with the same or closely related subjects, and a statement of the possible significance of the work. Authors are encouraged to conclude with a brief paragraph that highlights the main findings of the study.

## Acknowledgments, Funding, and Disclosures

It is the duty of authors to acknowledge funding sources, technical assistance, provision of materials or reagents and other matters that relevant to the paper. Authors must acknowledge individuals who do not qualify as authors but who contributed to the research. If the work was sponsored by an organization, charity or industry, it is essential this be declared and, in the case of industry-sponsored research, the authors need to indicate that they had complete access to the data that supports the publication. If the paper was written by a professional medical writer, this must be disclosed and follow the Ethical Policies of *Neurogastroenterology & Motility*.

The Journal insists that authors disclose their contributions to the work described in the submitted manuscript. Some examples include:

- AB performed the research
- CD designed the research study
- EF contributed essential reagents or tools
- GH analyzed the data
- IJ wrote the paper.

An author may list more than one contribution, and more than one author may have contributed to the same element of the work.

Example:

- AB performed the research; AB & CD analyzed the data and wrote the paper; EF contributed the knockout mice for the study and GH designed the research study and wrote the paper.

All sources of funding must be disclosed clearly and in full via a Funding Statement. This statement will be published in the Funding section of the paper (please see further information on NIH funding below). List governmental, industrial, charitable, philanthropic and/or personal sources of funding used for the studies described in the manuscript. Attribution of these funding sources is preferred. Please indicate "No funding declared" if no funding is associated with the paper.

Examples:

- This work was supported by a grant from the National Institutes of Health, USA (DKxxxx to AB).
- This work was supported by the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (grant to AB and CD).
- This work was supported by a grant from Big Pharma Inc. (to AB) and equipment was donated by Small Pharma Inc. EF received a graduate studentship award from the University of xxxxx.

The Journal insists on full disclosure of competing financial and other interests from all authors. This is mandatory and a condition of publication. At the end of the acknowledgments section, there must to be a statement of these interests or the following statement: "No competing interests declared". Authors are also required to submit a Conflicts of Interests (COI) form upon acceptance (see Supporting Documents).

## References

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. Sample references follow:

Journal article:

1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book:

2. Voet D, Voet JG. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

For more information about AMA reference style - AMA Manual of Style.

## Abbreviations

Include in the manuscript a list of new or special abbreviations along with the spelled out form or definition. For commonly accepted abbreviations, word usage, symbols, etc., authors are referred to the

CBE Style Manual published by the American Institute of Biological Sciences or Units, Symbols and Abbreviations published by the Royal Society of Medicine. The abbreviations should be derived from the American spelling convention [e.g. 'TLESR' (American: esophagus), not 'TLOSR' (British: oesophagus)].

## Tables

Tables should be numbered consecutively within the text. Tables and text should not duplicate each other. If possible, hold tables to one standard manuscript page; if the table continues past one page, repeat all column headings and the stub (left-hand column). Explain all abbreviations in a footnote. Provide a number and title for each table. Regardless of authorship or publisher, permission must be received in writing for its use if a table has been previously published. Include an acknowledgment of the original source in a footnote. Tables should not be submitted as photographs or graphics files.

## Figures

Labelling should be in 8pt Helvetica or Arial. Figure sections should be designated with upper case letters. Magnification (scale) bars should be given on electron and light micrographs. Details of the magnification bar should be noted in the figure legends. Guidance on the preparation and submission of figures, links to useful websites and access to both the Wiley house and journal-specific style guides can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/author.asp>.

## Guidelines for cover submissions

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please follow these general guidelines.

## Manipulation of images

The Journal follows the guidelines and procedures established by the Council of Science Editors for digital imaging data. Please note the following in particular:

- Images cannot be modified to change the overall appearance or appearance of any specific feature.
- Adjustments of brightness and contrast or colour balance are acceptable but must be applied to the entire image.
- Features cannot be obscured and any rearrangements must be explicitly indicated by the insertion of dividing lines.
- Images will be examined for any indication of improper modifications. The final acceptance of all manuscripts is contingent on any concerns raised in our review of the figures being resolved.

## Figure and table legends

Cite all tables and figures in the text, numbering them sequentially as they are cited. Each figure must have a corresponding legend. The legend must be numbered with an Arabic number that corresponds to the illustration as it appears in the text. Each should begin with a short title for the figure. Legends to tables (where necessary) and figures should contain sufficient information to be understood without reference to the text. Explain all symbols, arrows, numbers, or letters used in the figure and provide information on scale and/or magnification. For photomicrographs, include information on the method of staining or preparation.

## Supporting Information



Quantitative or qualitative data too extensive for inclusion in the regular edition of the Journal may be presented as supporting information. It must be included as part of the original submission and will be reviewed as an integral part of the paper. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript, to appear after the references at the end of the paper, providing titles of figures, tables, etc. formatted as if the material was to appear in the print edition. We welcome audio and video material, if relevant to your paper. Full details on how to submit supporting information, including videos, can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>.

## **ELocators**

This journal now uses eLocators. For more information, please visit the Author Services eLocator page [here](#).

## **SUPPORTING DOCUMENTS**

The Conflict of Interests (COI) form must accompany your accepted manuscript and is a condition of publication. It is available for download from the *Neurogastroenterology & Motility* submission site at <http://mc.manuscriptcentral.com/nmo>. It can either be uploaded as a supporting document to your manuscript (preferred), or where this is not possible, e-mailed to the journal managing editor Mrs. Maggy Barber at [maggy.barber@gmail.com](mailto:maggy.barber@gmail.com).

## **Conflict of Interests (COI) Form**

Authors are required to disclose financial interests (e.g. employment, significant share ownership, patent rights, consultancy, research funding, etc.) in any company or institution that might benefit from their publication. All authors must provide details of any other potential competing interests of a personal nature that readers or editors might consider relevant to their publication. Upon acceptance for publication, all authors must complete the Conflicts of Interests (COI) form.

## **POST ACCEPTANCE**

### NIH-Funded Articles and Open Access

Authors can continue to publish in the journal safe in the knowledge that they will be compliant with the NIH mandate, which applies to all articles based on research that has been wholly or partially funded by the NIH that have been accepted for publication on or after 7 April 2008. The accepted version of these articles will be deposited into PubMed Central upon acceptance by the journal. There will be an embargo period of 12 months. The accepted version is the version that incorporates all amendments made during peer review, but prior to the publisher's copy editing and typesetting. The publisher will deposit the accepted version on the author's behalf.

Authors should ensure that they clearly mark their research as funded by the NIH (or other funding body) via a Funding statement, which is published at the end of their article. If it is not clearly labelled as funded, this could affect the archiving process.

## **Online Open**

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online

Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. See the full list of [terms and conditions](#).

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website [here](#). Prior to acceptance, there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

### **Article Tracking**

Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit [http://authorservices.wiley.com/bauthor/tracking\\_production.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/tracking_production.asp) for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

### **Proofs**

Proofs will be available as a PDF to download from the e-proofing website. Full instructions will be sent via e-mail notification when the proof is ready for review. Adobe Acrobat Reader is required in order to read this file, which can be downloaded (free of charge) from <http://get.adobe.com/reader>.

In your absence, please arrange for a named colleague to correct on your behalf. Major alterations will be charged to the author and could delay publication.

Proofs must be returned by fax/email only to the [proof collator](#) within three days of receipt of the e-proofing notification e-mail. We will not accept proofs by snail-mail, and any late return of proofs will lead to delayed publication of your paper to avoid any delay in publication of an issue. Authors will receive one set of proofs only. Please check these carefully.

### **Archiving Policy**

**Unless specifically requested at submission, the publisher will dispose of all material submitted 2 months post publication.**

