



AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE NEURÔNIOS HU/MNOS DO PLEXO SUBMUCOSO DO CÓLON DE RATOS DIABÉTICOS SUPLEMENTADOS COM QUERCETINA.

Maiara Neves Borgo¹; Jéssica Mayumi Abiko¹; Paulo Alexandre Galvanini²

RESUMO: A população diabética tem aumentado significativamente nos últimos anos, chegando a um número de quase 380 milhões de portadores no mundo. Com isso, há um aumento de problemas gastrintestinais como dispepsia, constipação intestinal, dores abdominais, diarreia, neuropatias, entre outros. Isso pode estar relacionado à produção de radicais livres, também chamado de estresse oxidativo, responsável por lesionar células e levar a apoptose. Como consequência, os neurônios do plexo submucoso são afetados, perdendo suas funções e comprometendo o funcionamento do trato gastrintestinal. O estresse oxidativo excede a capacidade do organismo de produzir substâncias antioxidantes, sendo necessária suplementação, para auxiliar na eliminação dos radicais livres. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade antioxidante da quercetina sobre os neurônios do plexo submucoso do cólon de ratos diabéticos.

PALAVRAS-CHAVE: Quercetina, neurônios entéricos, diabetes.

ABSTRACT: The diabetic population has increased significantly in recent years, reaching a number of almost 380 million carriers worldwide. Thus, there is an increase of gastrointestinal problems such as dyspepsia, constipation, abdominal pain, diarrhea, neuropathy, among others. This is due to the production of free radicals, also called oxidative stress is responsible for injured cells and lead to apoptosis. As a result, the neurons of the submucosal plexus are injured, losing its functions and affecting the gastrointestinal tract. Oxidative stress exceeds the body's ability to produce antioxidants, supplementation being necessary to assist in the elimination of free radicals. The aim of this study was to evaluate the antioxidant capacity of quercetin on neurons of the submucosal plexus of the colon of diabetic rats.

KEYWORDS: Quercetin, enteric neurons, diabetes.

¹Acadêmicas do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá (UNICESUMAR), Maringá – Paraná. Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). maiaraborgo@hotmail.com; jessicamayumi_abiko@hotmail.com

²Orientador, Professor Doutor do Centro Universitário de Maringá (UNICESUMAR). paulo_galvanini@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, há mais de 371 milhões de pessoas com diabetes no mundo. Sendo que, 4,8 milhões de pessoas morrem em decorrência da doença (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2012). No Brasil, existem aproximadamente 12 milhões de diabéticos, dados baseados no Censo IBGE 2010 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2012).

O diabetes mellitus é um distúrbio metabólico lipídico e protéico, que possui a hiperglicemia decorrente da resistência à insulina, secreção insuficiente do hormônio ou ambos (FRAGUAS et al., 2009). O diabetes é caracterizado por hiperglicemia em jejum, podendo apresentar outros estados. Seus efeitos incluem lesão à longo prazo, disfunção e insuficiência de vários órgãos, principalmente olhos, rins, coração e vasos sanguíneos. A doença pode apresentar sintomas característicos como polidipsia, poliúria, visão turva, perda de peso e polifagia (KAHN et al.; 2009).

Os tipos mais comuns de diabetes são: Diabetes mellitus do tipo 1 ou insulino dependente e diabetes do tipo 2 ou insulino não-dependente. O diabetes do tipo 1, acomete 5 a 10% da população do hemisfério ocidental. É caracterizada pela deficiência grave de insulina, devido à destruição de células beta pancreáticas causada por mecanismo auto-imunes, onde as concentrações de insulina são insignificantes ou inexistentes. Geralmente pacientes com DM do tipo 1, apresentam além de hiperglicemia, predisposição à acidose. Sendo assim, esses indivíduos são dependentes de insulina para sobreviver (INZUCCHI et al., 2007). O diabetes do tipo 2 é causada pela resistência periférica a insulina e uma resposta inadequada das células beta pancreáticas, 90 a 95% da população diabética apresenta DM do tipo 2, e a grande maioria das pessoas são obesas (KUMAR et al., 2010). A doença quando não tratada pode desenvolver complicações como, hiperglicemia, cetoacidose, acidose e desidratação. Á longo prazo, aterosclerose, retinopatia, nefropatia e neuropatia (SAAD et al., 2007).

De acordo com Troncon et al. 2001, a presença de queixas digestivas de pacientes diabéticos são frequentes, sendo disfagia, dispepsia, dor abdominal, constipação intestinal, diarreia e incontinência fecal, como sendo sintomas mais comuns. Essas queixas podem estar associadas ao estresse oxidativo, que é um estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade antioxidante endógena, que ocorre frequentemente em pacientes diabéticos (REIS et al., 2008).

A hiperglicemia é a principal alteração clínica, pois contribui com o aumento de ligações da glicose circulante com proteínas plasmáticas como a albumina (SAAD et al., 2007). Essa ligação é responsável pela formação de produtos avançados da glicosilação não-enzimática, esses produtos resultantes pioram a neuropatia diabética, pois reduzem a velocidade de condução nervosa e fluxo sanguíneo para os nervos periféricos (REIS et al., 2008).

A neuropatia diabética é caracterizada pela perda de função dos neurônios afetados, e possui diferentes formas clínicas como a polineuropatia distal, que acomete principalmente pernas e pés causando dores, queimação e formigamento; a neuropatia autonômica causa hipotensão postural, impotência sexual e problemas no trato gastrointestinal; e ainda a neuropatia focal, que se desenvolve quando o fluxo sanguíneo é interrompido (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2013).

O estresse oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade antioxidante endógena, causando assim graves complicações. A lesão celular oxidativa causada por radicais livres, contribui

para o desenvolvimento do diabetes do tipo 1. As espécies reativas de oxigênio são íons que contém oxigênio com um elétron não pareado, caracterizados por grande instabilidade a alta reatividade podendo reagir com radicais livres, que através de eventos bioquímicos, levam ao estresse oxidativo, causando lesão e morte celular (REIS et al., 2008). Grande parte dos diabéticos possuem problemas gastrointestinais devido aos danos causados aos neurônios do plexo mioentérico e submucoso do intestino (GOWER, 2007).

O Sistema Nervoso Entérico atua independentemente do Sistema Nervoso Central e reveste toda a parede do tubo digestivo por uma rede de gânglios de neurônios motores, sensitivos e interneurônios. Se distende da faringe até o esfíncter anal, onde os neurônios dos plexos submucoso e mioentérico exercem o controle da motilidade, proliferação celular, transporte de íons pela mucosa e liberação de hormônios gastrointestinais. Os dois plexos, embora espacialmente separados, compreendem uma unidade integradora (FURNESS; COSTA, 1980).

Os neurônios liberam alguns neurotransmissores importantes, dentre eles, destaca-se o óxido nítrico. É uma substância que possui capacidade potencializadora, atua como mensageiro intra ou extracelular e também pode atuar como toxina. O óxido nítrico é uma molécula simples, produzida pela reação de oxirredução da L-arginina. No sistema nervoso, quando atua como mensageiro, auxilia na conservação da memória tardia, fluxo sanguíneo e controle visual e olfativo. Quando atua como toxina, causa neurotoxicidade, aumento da irritabilidade, enxaqueca e hiperalgesia (REIS et AL., 2008; BARBOSA et al., 2006). Sendo o óxido nítrico um neurotransmissor e também uma toxina, sua alteração em pacientes diabéticos pode estar relacionada com sintomas intestinais, essa alteração pode ser observada de acordo com a função do neurônio, que podem ser marcados com a técnica nNOS, para observação em microscópio (GALVANINI; 2013). Como consequência pode ocorrer oxidação celular, processo que pode ser neutralizado por antioxidantes como a quercetina (ZANONI et al, 2005).

A quercetina é um flavonóide antioxidante efetivo devido à sua capacidade de sequestrar radicais livres e por quelar íons metálicos, protegendo os tecidos dos radicais livres e peroxidação lipídica. A capacidade antioxidante atua sobre o radical hidroxil (OH) e o ânion superóxido (O₂⁻), que são espécies altamente reativas envolvidos no dano tecidual. Esse flavonóide está associado benéficamente na melhora de doenças cardiovasculares, câncer e função hepática (ANTUNES; BIANCHI; et al., 2004). A quercetina é encontrada em muitas plantas, como a cebola, brócolis e chá. A quercetina atenua as complicações do diabetes, pois apresenta um grande efeito antioxidante se combinado com espécies de radicais livres para formar radicais fenoxi menos reativos (MARTINEZ et al., 2008).

Vários trabalhos tem demonstrado que o tratamento com antioxidantes como a quercetina previne a formação ou neutraliza radicais livres oriundas do estresse oxidativo, minimizando complicações do diabetes (ALVES et al., 2010; ANTUNES; BIANCHI, 2004; GALVANINI, 2013; MARTINEZ, 2008). Espera-se que o flavonóide atue também sobre os neurônios entéricos diminuindo os sintomas gastrointestinais causados pela liberação de radicais livres.

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos da quercetina sobre aspectos morfológicos de neurônios HU/nNOS do plexo submucoso do cólon de ratos diabéticos.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Preparação dos Grupos Experimentais

Todos os procedimentos experimentais descritos no presente artigo estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos de acordo com a Lei Federal nº. 11.794 (outubro/2008) e o Decreto nº. 66.689 (Julho/2009) da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foram previamente submetidos à análise e posteriormente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM) com o Parecer nº. 053/2009.

Foram utilizados 24 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram divididos em quatro grupos (n = 6), sendo eles: normoglicêmicos (N), normoglicêmicos suplementados com quercetina (NQ), diabéticos (D) e diabéticos suplementados com quercetina (DQ).

Os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno por um período de 120 dias, com foto-período de 12 horas (6:00 – 18:00) e temperatura controlada ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$), recebendo *ad libitum* ração padrão balanceada Nuvilab[®] (Nuvital, Colombo, PR, Brasil).

Aos 90 dias de idade os animais dos grupos D e DQ foram submetidos a jejum prévio de quatorze horas, antes de serem injetados com estreptozotocina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) por via endovenosa (veia peniana), na dose de 35 mg/kg de peso corporal para indução do diabetes tipo 1. Após três dias, uma gota de sangue, obtida a partir da cauda, foi utilizada para a determinação da glicose pelo exame de glicose-oxidase (Accu-Chek Active; Roche Diagnóstics, Mannheim, Alemanha) para confirmar o estabelecimento do diabetes nos animais.

Após a injeção de estreptozotocina e confirmação do diabetes, os animais dos grupos NQ e DQ receberam diariamente água suplementada com quercetina na dosagem de 40 mg/dia. Os animais dos grupos N e D receberam água sem suplementação.

Para o cálculo da quercetina (40 mg/dia) foi realizada uma avaliação prévia da ingestão de água pelos animais dos grupos NQ e DQ por três dias consecutivos a fim de obter a média da quantidade de água consumida por cada animal e ainda, os animais foram pesados periodicamente e a média do grupo foi usada para ajustar a quantidade de quercetina que foi administrada durante o período experimental.

3.1.2 Coleta e processamento do material

Após os 120 dias, os animais foram mortos após serem pesados e anestesiados com 40 mg/kg intraperitoneal de Tiopental (Abbott Laboratories, Chicago, IL, EUA). Através de punção cardíaca, o sangue foi coletado para determinação dos níveis de glicose no plasma utilizando o método de glicose-oxidase (Hu, 1974). A celiotomia foi realizada e o cólon dos animais foi coletado e submetidos às técnicas imunohistoquímicas HuC/D e Oxido Nítrico Sintase neuronal (nNOS).

3.1.3 Dupla marcação Imunohistoquímica para Proteína HuC/D e enzima nNOS

Os cólons de todos os animais foram coletados, lavados em tampão fosfato salinado (PBS, 0,1 M, pH 7,3) e cuidadosamente inflados com fixador Zamboni (Stefanini e De Martino *et al.*, 1967). Em seguida, os cólons foram mantidos por 18 horas na mesma solução a 4°C. Após a fixação, os cólons foram cortados ao longo da borda mesocólica e sucessivamente lavados em álcool 80% até a remoção visível do fixador. A desidratação

em séries crescentes de álcool (95 e 100%), a clarificação em xilol e a reidratação em séries decrescentes de álcool (100, 90, 80, e 50%) foram realizadas. Os cólons foram então armazenados a 4°C em PBS com a adição de azida sódica 0,08%.

Os cólons foram dissecados sob estereomicroscópio para obtenção de preparados totais da túnica muscular para avaliar o plexo submucoso. O cólon foi fragmentado em amostras com cerca de 1cm².

A imunohistoquímica para HuC/D (Lin et al., 2002) e nNOS (Wrzos et al., 1997) foi realizada em conjunto através da dupla marcação, para estudo da população total de neurônios e da subpopulação de neurônios nitrérgicos, respectivamente.

Para a dupla marcação imunohistoquímica da proteína HuC/D e da enzima nNOS, os preparados totais foram incubados em solução contendo ambos os anticorpos primários: anti-HuC/D (produzido em camundongo; 1:500; Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) e anti-nNOS (produzido em coelho; 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), respectivamente. Após 48 h de incubação, os cólons foram lavados duas vezes em solução de PBS contendo Triton X-100 0,5% por 10 min e incubados por 2 h em temperatura ambiente com os seguintes anticorpos secundários: AlexaFluor 488 IgGanti-camundongo produzido em burro (1:250; Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA), como um marcador de HuC/D, e AlexaFluor 568 IgGanti-coelho produzido em burro (1:500; Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA), como um marcador de nNOS. Os preparados totais foram então lavados duas vezes em solução de PBS, montados em lâminas com glicerol tamponado. Para o controle negativo, o anticorpo primário foi omitido.

3.1.4 Análise Morfométrica

As áreas dos corpos celulares neuronais submucosos HuC/D-IR e nNOS-IR foram mensuradas usando um sistema computadorizado de análise de imagens Image Proplus 4.1, após serem capturadas através de um microscópio óptico com câmera acoplada. A área (µm²) de 100 corpos celulares neuronais para cada animal foi mensurada usando o Image-Pro Plus, com um total de 600 áreas por grupo.

3.1.5 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando os programas Statistica 7.1 e GraphPadPrism 5.1 e são expressos como média ± erro padrão. Dados morfométricos foram submetidos ao delineamento em blocos seguido pelo teste de Tukey. Valores de *P* < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

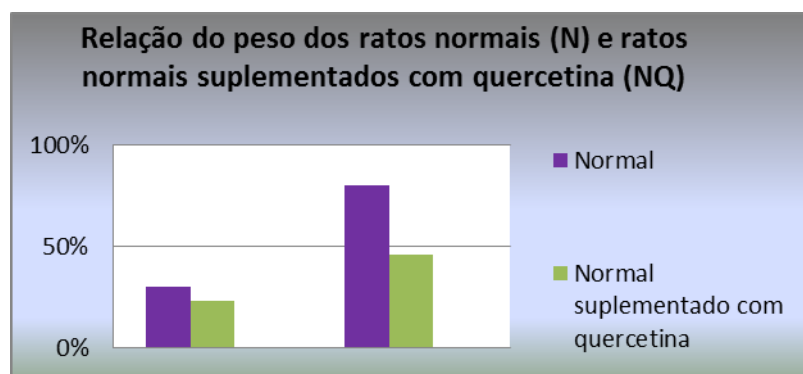
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1- Área do corpo celular (µm²) de neurônios do plexo submucoso (PS) HuC/D, nNOS no cólon de ratos: normoglicêmicos (N), normoglicêmicos suplementados com quercetina (NQ), diabéticos (D), diabéticos suplementados com quercetina (DQ).

		N	NQ	D	DQ
HU	PS	149.10±3.27 ^a	150.33±3.65 ^a	174.67±4.75 ^b	164.38±3.95 ^b
nNOS	PS	158.68±3.78 ^a	166.57±2.91 ^a	181.00±2.88 ^b	173.69±2.98 ^b

Os valores médios seguidos por letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. $n = 6$ ratos por grupo.

Figura 1- O gráfico a baixo demonstra a variação de peso dos animais do grupo normal (N), em relação ao grupo suplementado com quercetina (NQ).



O grupo N obteve um ganho de peso heterogêneo, variando de 30 a 80%. Nos animais do grupo NQ, o ganho de peso variou de 23% a 46%. Embora estatisticamente não haja diferença significativa entre os dois grupos, nota-se que em média o ganho de peso nos animais do grupo NQ foi menor e mais homogêneo que no grupo N. Segundo Shisheva e Shichter (1992), a quercetina inibe o efeito estimulador da insulina no transporte, oxidação e conversão de glicose em lipídios nos adipócitos de ratos, podendo ser relacionados os resultados deste experimento com a inibição da lipogênese.

O peso corporal dos grupos D e DQ apresentaram-se muito variáveis, indicando que a quercetina não trouxe efeitos benéficos sobre o metabolismo de lipídeos e carboidratos a ponto de prevenir a perda de peso ocasionada pelo diabetes. Portanto, a quercetina não atua na redução do ganho de peso corporal em diabéticos como nos normoglicêmicos. Os resultados vão de encontro com os resultados obtidos por Lopes et al., 2012.

Por meio da análise morfométrica, estatisticamente não foram observadas diferenças entre os grupos N e NQ assim como em D e DQ. Porém, sabe-se que o diabetes causa intenso desgaste celular e alterações fisiopatológicas que podem levar a aumento no tamanho dos corpos celulares (CHANDRASEKHARAN et al., 2011; TRONCHINI et al., 2012; LOPES et al., 2012). As áreas neuronais do grupo D aumentou em relação ao grupo N, podendo ser atribuído ao aumento da produção de neurotransmissores, efeito da perda neuronal no DM ou alterações metabólicas que conduzem a edema intracelular (VINCENT A.M, 2004). Observou-se pequena redução nos grupos DQ em relação ao grupo D que pode ser atribuível a uma menor perda neuronal em comparação com o grupo diabético sem suplementação e efeito antioxidante da quercetina, que possivelmente restaurou processos oxidativos, reduzindo a produção de radicais livres e dano celular.

Em relação aos neurônios nNOS (nitrérgicos), sugere-se que o aumento se deve a expressão de outros neurotransmissores localizados com NO (SHOTTON, H.R., 2007), acumulação de nNOS no corpo neuronal causada por defeitos no transporte axonal (CELLEK S., 2004.) e alterações metabólicas que conduzem a edema celular (VINCENT A.M., 2004).

Os dados do presente estudo mostram que a quercetina causou ação neuroprotetora nos neurônios de ratos diabéticos, embora os dados estatísticos não

tenham mostrado diferença significativa. Sua ação neuroprotetora é evidenciada pela diminuição da área do corpo neuronal de ratos diabéticos suplementados com quercetina.

5 CONCLUSÃO

Concluimos com o presente estudo que a quercetina obteve ação neuroprotetora nos neurônios Hu/ nNOS do plexo submucoso do cólon de ratos diabéticos, atuando como antioxidante.

REFERÊNCIAS

ALVES A. M. P.; ALVES E. P. B.; BUTTOW N. C.; PERLES J. V. C. M.; ZANONI J. N.; STABILLE S. R. Aspectos gerais e abordagem terapêutica da quercetina sobre as complicações do diabetes causadas pelo estresse oxidativo. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 14, n. 2, p. 179-186, maio/ago. 2010.

ANTUNES H. D. C.; BIANCHI M. de L. P.; BEHLING E. B.; SENDÃO M. C. FRANCESCATO H. D. C. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro - Universidade Federal de Uberaba - 38015-050-Uberaba-MG-Brasil. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BARBOSA, et al.,. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, 05508-900, São Paulo – SP.Quim. Nova, Vol. 29, No. 6, 1352-1360, 2006.

CELLEK S. Point of no return for nitregeric nerves in diabetes: a new insight into diabetic complications. *Curr Pharm Des.* 2004;10:3683–3695

CHANDRASEKHARAN B., ANITHA M., BLATT R., SHAHNAVAZ N., KOOBY D., STALEY C., MWANGI S., JONES D.P., SITARAMAN S.V., SRINIVASAN S. (2011). Colonic motor dysfunction in human diabetes is associated with enteric neuronal loss and increased oxidative stress. *Neurogastroenterol.Motil.* 23, 131-138.

FRAGUAS R.; SOARES S, M de S, R.; BRONSTEIN M, D.; Revisão da literatura: Depressão e diabetes mellitus. Instituto e departamento de psiquiatria do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2009 (*Fráguas R, et al. / RevPsiq Clín.* 2009;36(3):93-9)

FURNESS, J.B.; COSTA, M. Types of nerves in the enteric nervous system. **Neuroscience.** v. 5, n. 1, p. 1-20, 1980.

GALVANINI P. A. Avaliação da inervação mientérica do colon proximal em ratos diabéticos sob suplementação com quercetina. Tese apresentada ao programa de Pós graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá. Maringá-PR. 2013.

GOWER T. Diabetes e problemas digestivos. Disponível em:
<http://saude.hsw.uol.com.br/diabetes-problemas-digestivos.htm> Acesso em 04 jul. 2013.
 HU B. (1974). *Methods of Enzymatic Analysis*. 1 ed. Academic Press. New York.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Disponível em:
<http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/Update2012> > Acesso em: 03 jul. 2013.

INZUCCHI; et al. *Diabete melito: manual de cuidados essenciais*. 6ªe.d. Porto Alegre: Artmed, 2007. P. 17-18.

KHAN; et al.; *Joslin: diabetes melito*. 14 e.d. Porto Alegre: Artmed, 2009. p.345-346.

KUMAR; et al., *Robbins e Cotran, bases patológicas das doenças*. 8ª e.d. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. P. 1140.

LIN Z., GAO N., HU H.Z., LIU S., GAO C., KIM G., REN J., XIA Y., PECK O. C., WOOD J.D. (2002). Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol. Motil.* 14, 197-204.

LOPES C.R., FERREIRA P.E., ZANONI J.N., AALVES A.M., ALVES E.P., BUTTOW N.C. (2012). Neuroprotective Effect of Quercetin on the Duodenum Enteric Nervous System of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Dig. Dis. Sci.* 57, 3106-3115.

MARTINEZ J. A. B.; RAMOS S. G.; MEIRELLES M. S.; VERCEZE A. V.; ARANTES M. R.; VANNUCCHI H. Efeitos da quercetina na lesão pulmonar induzida por bleomicina: um estudo preliminar. Trabalho realizado no Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP/USP – Ribeirão Preto (SP) Brasil. *J Bras Pneumol.* 2008;34(7):445-452.

REIS; et al.; *Estresse oxidativo: Revisão da sinalização metabólica no Diabetes tipo 1*. Belo Horizonte, MG, 2008. (Arq Bras Endocrinol Metab vol.52 no.7 São Paulo Oct. 2008)

SAAD; et al., *Endocrinologia*. São Paulo: Atheneu, 2007. P 809-929.

SHISHEVA A.; SHECHTER Y. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. *Biochemistry.* 31, 8059-8063.1992.

SHOTTON HR, ADAMS A, LINCOLN J. Effect of aminoguanidine treatment on diabetes-induced changes in the myenteric plexus of rat ileum. *Auton Neurosci.* 2007;132:16–26.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Disponível em:
<http://www.diabetes.org.br/tipos-de-diabetes> > Acesso em: 3 jul. 2013.

STEFANINI M., DE MARTINO C., ZAMBONI L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature.* 14, 173-174.

TRONCHINI E.A., TREVIZAN A.R., TASHIMA C.M., PEREIRA R.V., ZANONI J.N. (2012). Supplementation with 0.1% and 2% vitamin e in diabetic rats: analysis of myenteric

neurons immunostained for myosin-V and nNOS in the jejunum. *Arq.Gastroenterol.* 49, 284-290.

VINCENT AM, RUSSELL JW, LOW P, FELDMAN EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev.* 2004;25:612–628.

WRZOS H.F., CRUZ A., POLAVARAPU R., SHEARER D., OUYANG A. (1997). Nitric oxide synthase (NOS) expression in the myenteric plexus of streptozotocin-diabetic rats. *Dig. Dis. Sci.* 42, 2106-2110.

ZANONI J. N.; FREITAS P. Effects of ascorbic acid on the vasoactive intestinal peptide synthesis in the ileum submucous plexus of normal rats. Department of Morphophysiological Sciences, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil. *Arq Gastroenterol* v. 42 – no.3 – jul./set. 2005.

Anais Eletrônico

VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar
UNICESUMAR – Centro Universitário Cesumar
Editora CESUMAR
Maringá – Paraná – Brasil