



AValiação DA INERVAÇÃO SUBMUCOSA DO CóLON PROXIMAL EM RATOS DIABÉTICOS SOB SUPLEMENTAÇÃO COM QUERCETINA

Paulo Da Silva Watanabe¹; Heber Martins²; Paulo Alexandre Galvanini³;

RESUMO: O diabetes mellitus (DM) é o resultado da deficiência crônica na produção ou da ação insulínica no organismo, por alguma insuficiência relativa ou absoluta do hormônio, causando um aumento nos níveis séricos de glicose, e a hiperglicemia promove mudanças nos mecanismos bioquímicos que induzem o estresse oxidativo. O estresse oxidativo tem sido intimamente ligada às consequências adversas que afetam a função do trato gastrointestinal, causada por lesões no sistema nervoso entérico (SNE), que por sua vez causa a neurodegeneração entérica. As abordagens terapêuticas têm mostrado que suplementação com antioxidantes, tais como quercetina, promovem a redução do estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com quercetina sobre dois grupos de neurônios, os neurônios HuC/D-imunoreativos (HuC/D-IR) e nNOS-imunoreativos (nNOS-IR), quanto a densidade neuronal no plexo submucoso do colon proximal de ratos, quatro meses após a indução do diabetes mellitus experimental com estreptozotocina. Quatro grupo de ratos foram usados (n = 6), sendo eles: normoglicêmicos (N), normoglicêmicos suplementados com quercetina (NQ), diabéticos (D) e diabéticos suplementados com quercetina (DQ). Foram avaliadas a densidade de 30 campos de cada grupo estudado. No grupo D ocorreu uma redução da densidade quando avaliado os neurônios HuC/D-IR se comparado ao grupo N, e no grupo NQ a quercetina provocou um aumento na densidade se comparado ao grupo diabético.

Palavras-Chave: Diabetes; Quercetina; Plexo submucoso.

ABSTRACT: Mellitus diabetes (DM) is a chronic result of a deficiency in insulin production or action in the body for some relative or absolute insufficiency of the hormone, causing an increase in serum glucose levels, or hyperglycemia promotes changes in the biochemical mechanisms that induce stress oxidative. Oxidative stress has been closely linked to the adverse consequences that affect the function of the gastrointestinal tract caused by lesions in the enteric nervous system (ENS), which in turn causes enteric neurodegeneration. Therapeutic approaches have shown that supplementation with antioxidants, such as quercetin, promote the reduction of oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the effect of supplementation with quercetin on two groups of neurons, neurons HuC / D-immunoreactive (HuC / D-IR) and nNOS-immunoreactive (nNOS-IR), and neuronal density in the submucosal plexus proximal colon of rats, four months after the induction of experimental diabetes mellitus with streptozotocin. Four groups of rats were used (n = 6), namely: normoglycemic (N), normoglycemic supplemented with quercetin (NQ), diabetic (D) and diabetic treated with quercetin (DQ). We evaluated the density of 30 fields for each group studied. In group D, there was a reduction in density when evaluated neurons HuC / D-IR compared to group N and group NQ quercetin caused an increase in density compared to the diabetic group.

Keywords: Diabetes; Quercetin; submucosal plexus.

¹ Acadêmico do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá (UNICESUMAR), Maringá – Paraná. Programa de Bolsas de Iniciação Científica da UniCesumar (PROBIC). pswatanabe@gmail.com

² Co-orientador, Professor Mestre do Centro Universitário de Maringá (UNICESUMAR), Maringá – Paraná. hebermartins@gmail.com

³ Orientador, Professor Doutor do Centro Universitário de Maringá (UNICESUMAR), Maringá – Paraná. paulo.galvanini@cesumar.br.

1 INTRODUÇÃO

O DM tem sido reconhecido mundialmente como a epidemia do século e já afeta cerca de 246 milhões de pessoas em todo o mundo. Até 2025, a previsão é de que esse número chegue a 380 milhões. Estima-se que uma grande parte dos portadores desta doença, que pode afetar em qualquer faixa etária de idade, desconhecem sua condição. (BRASIL, 2013).

Já no Brasil, de acordo com o Vigitel 2011 (Sistema de Monitoramento de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Não Transmissíveis), a ocorrência média de diabetes na população adulta (acima de 18 anos) é de 5,2%, o que representa 6.399.187 de pessoas que confirmaram ser portadoras da doença.

Estima-se que em 2007 existiam aproximadamente 246 milhões de diabéticos em todo mundo, representando quase 6 % da população mundial, podendo chegar até em 380 milhões em menos de 20 anos. (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2008). No Brasil alguns dados relatam que até 2025, o país deverá ter 17,6 milhões de diabéticos, duas vezes mais do que os dados atuais que apontam uma população de oito milhões de portadores (BAZOTTE, 2010).

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

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

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

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

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

O SNE é constituído por redes neurais encontradas entre as camadas de células que constituem a parede do tubo digestivo. O plexo submucoso, situado na submucosa, está distribuído desde o intestino delgado até o canal anal, podendo localizar-se entre os estratos longitudinais e circula da túnica muscular. O SNE é formado por neurônios motores, neurônios sensitivos e interneurônios. De modo geral pode-se afirmar que o SNE é de fundamental importância para o controle da motilidade do intestino e da tonicidade dos vasos sanguíneos intestinais. (MIRANDA NETO, 2008).

Alguns neurônios do plexo submucoso, liberam óxido nítrico em suas terminações nervosas, compõem uma subpopulação importante no SNE. Estes possuem uma função inibitória importante no controle da motilidade do trato gastrointestinal (BULT et al., 1990). O óxido nítrico é produzido quando a L-arginina é reduzida para L-citrulina pela ação da enzima óxido nítrico sintase. Já que o óxido nítrico é o maior neurotransmissor inibitório não adrenérgico e não colinérgico do trato gastrointestinal, sua alteração, causada em condições patológicas como no DM, pode estar relacionada a sinais e sintomas encontrados no trato digestório. (OLSSON e HOLMGREN, 2001)

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

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

demonstra que em suas pesquisas o flavonóide quercetina apresentaram atividades antiinflamatória, agindo como inibidores de algumas enzimas lisossômicas.

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

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

2 MATERIAL E MÉTODO

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

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

Após um período de adaptação ao novo ambiente, os ratos então com 90 dias de idade, foram disponibilizados para o período experimental que tem duração de 120 dias. Portanto, foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, contendo 6 animais cada, segundo os tratamentos a que foram submetidos (tabela 1):

Tabela 1. Divisão dos grupos de animais

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

Os animais dos grupos D e DQ foram submetidos a jejum prévio de quatorze horas, antes de serem injetados com estreptozotocina por via endovenosa (veia peniana), na dose de 35 mg/kg de peso corporal.

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

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

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

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 mientérico. O cólon foi fragmentado em amostras com cerca de 1cm², para obtenção do preparado total foi feita a remoção da túnica mucosa e tela submucosa.

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 IgG anti-camundongo produzido em burro (1:250; Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA), como um marcador de HuC/D, e AlexaFluor 568 IgG anti-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.

Análise Quantitativa

Os neurônios HuC/D-imunoreativos (HuC/D-IR) e nNOS-imunoreativos (nNOS-IR) foram quantificados utilizando imagens obtidas randomicamente da região intermediária do cólon (60°-120°, 240°-300°; da circunferência intestinal em cada animal, considerando 0° como a inserção mesocólica) (Miranda Neto *et al.*, 2001). As imagens foram capturadas por câmera de alta resolução AxioCam (Zeiss, Jena, Alemanha) acoplada a um microscópio de luz Axioskop Plus (Zeiss), digitalizadas em um computador usando AxioVision versão 4.1. O programa de análise de imagens Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) foi utilizado para a quantificação dos neurônios nas imagens. Para cada animal, todos os neurônios HuC/D-IR e nNOS-IR presentes em 30 imagens, capturadas com objetiva de 40X, foram contados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um aumento na produção de radicais livres tem sido associada com a desenvolvimento de neuropatia e outras complicações crônicas no DM. Assim, a redução da densidade neuronal a população em geral em ratos diabéticos não suplementadas com quercetina pode ser atribuível a uma diminuição de antioxidante defesas e distúrbios

metabólicos, resultando em aumento da atividade da via do poliol, a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), estresse oxidativo, peroxidação lipídica, e aumento da produção de radicais livres. Estes mecanismos podem reagir com alguns componentes celulares e causar danos (Andrade et al., 2009).

Com base nos resultados obtidos (Tabela 2) podemos observar que o grupo D sofreu uma redução na densidade neural quando se comparado ao grupo N, quando se trata de neurônios HuC/D-IR, nossos resultados vão de encontro aos resultados obtidos por Ferreira et al., (2010), mostrando o possível efeito neuroprotetor da quercetina em combater os radicais livres, porém não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos N, NQ e DQ ($p < 0.05$).

Analisando os grupos de neurônios tanto os Hu C/D quanto os nNOS observamos que não houve diferença estatística entre os grupos, o que nos leva a crer que este grupo de neurônios, do plexo submucoso possui uma maior resistência ao estresse oxidativo, e o que corrobora este trabalho foi os estudos apresentados por Lopes et al., (2012) quando analisou o duodeno.

O que não ocorre quando se trata de plexo mioentérico onde observamos pelos estudos apresentado por Fregonesi et al., (2005) em estômagos, e Pereira et al., (2008) no segmento íleo, de ratos, onde apontam uma perda na densidade neuronal em casos deDM, demonstrando uma menor resistência ao estresse oxidativo.

Tabela 2. Densidade por unidade de área (cm^2) de neurônios do plexo submucoso HuC/D, nNOS no cólon de ratos: normoglicêmicos (N), normoglicêmicos suplementados com quercetina (NQ), diabéticos (D), diabéticos suplementados com quercetina (DQ).

Técnica		N	NQ	D	DQ
Hu C/D	Submucoso	545.17±25.66 ^a	526.33±24.91 ^a	479.67±16.31 ^a	528.33±17.76 ^a
nNOS	Submucoso	328.67±20.94 ^a	334.83±21.70 ^a	336.67±16.50 ^a	324.50±25.31 ^a

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

4 CONCLUSÃO

Não houve por tanto, diferença estatística entre os grupos. Mostrando que o plexo submucoso é pouco afetado pelo estresse oxidativo ocasionado pela hiperglicemia e a ativação de outras vias metabólicas decorrente do DM.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Henriqueta. et al. **Diabetes mellitus, uma abordagem simplificada para profissionais de saúde**. São Paulo: Atheneu. 1997.

Andrade A.F., Paiva W.S., Amorim R.L.O., Figueiredo E.G., Neto E.R., Teixeira, M.J. (2009). **Mecanismos de lesão cerebral no traumatismo cranioencefálico**. Rev. Assoc. Med. Bras. 55, 75-81.

- ARDUINO, Fransisco. **Diabetes mellitus**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980.
- BAZOTTE, Roberto. **Paciente diabético: Cuidados Farmacêuticos**. Rio de Janeiro: MedBook, 2010.
- BIRKMAYER, George. **Tudo sobre NADH**. Disponível em: <<http://www.ergivit.pt/index.php>>. Acesso em 10 Mar. 2011, 23:05:12.
- BRASIL. Portal Saúde. Sus (Org.). **DADOS ESTATÍSTICOS**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=29793&janela=1>. Acesso em: 08 ago. 2013.
- BRASÍLIA. **Ministério da saúde, secretaria de assistência a saúde. Manual de diabetes**, 1993
- BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo Patologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- BULT, H et al. **Nitric oxide as na inhibitory non-adrenergic, no-cholinergic neurotransmitter**. *Nature*, 1990.
- CAMERON, N.E. et al. **Anti-oxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats**. *Diabetologia*, 1993.
- FREGONESI CE, Molinari SL, Alves AM, et al. **Morphoquantitative aspects of nitreergic myoenteric neurons from the stomach of diabetic rats supplemented with acetyl-L-carnitine**. *Anat Histol Embryol*. 2005;34:93–97.
- GOWER Timoty. **Diabetes e problemas digestivos**. Disponível em <<http://saude.hsw.uol.com.br/diabetes-problemas-digestivos.htm>> Acesso em 12 Mar. 2011, 18:34:45
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. BARNETT ET AL. **Diabetes impact survey report. MSD Diabetes, 2008**. Disponível em: <www.merckfrosst.ca/assets/en/pdf/press/r_d_news/diabetes/press_releases/pr_20081112.pdf> Acesso em 22 de Mar. 2011, 14:50:23.
- JABLONKA, Sylvio. et al. **Diabetes mellitus**. São Paulo: Fundo editorial BYK-Prociencx, 1980.
- KAHN, C.Ronald, et al. **Joslin: Diabetes Melito**. 14.ed. São Paulo: Artmed, 2009.
- LIMA, Leonardo et al. **Efeitos do Flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos**. *Revista de Nutrição*. Campinas, Jul/Set. 2003
- 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, Cláudia Regina Pinheiro et al. Neuroprotective Effect of Quercetin on the Duodenum Enteric Nervous System of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Springer Science Business Media**, Maringá-Pr, n. , p.01-10, 10 ago. 2012.

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

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

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

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

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

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

PEREIRA RV, de Miranda-Neto MH, da Silva Souza ID, Zanoni JN. **Vitamin e supplementation in rats with experimental diabetes mellitus: analysis of myosin-v and nnos immunoreactive myenteric neurons from terminal ileum**. J Mol Histol. 2008;39:595–603.

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

SAÚDE, Secretaria de Vigilância em. **VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO**. **Vigitel Brasil 2011**, Brasília-df, n. , p.01-134, 10 jan. 2012. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2012/Ago/22/vigitel_2011_final_0812.pdf>. Acesso em: 09 ago. 2013.

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

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

Stefanini M., De Martino C., Zamboni L. (1967). **Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy**. **Nature**. 14, 173-174.

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

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

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

Anais Eletrônico

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