

Priscila de Freitas

Neurônios mioentéricos e mucosa intestinal

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PRISCILA DE FREITAS

Neurônios mioentéricos e mucosa intestinal de
ratos diabéticos após suplementação

“O amor é a força mais abstrata, e também a mais potente, que há no mundo.”

Mahatma Gandhi

Ao meu querido esposo, Anderson,
pelo seu amor, incentivo e
compreensão durante estes anos.

"Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa sós. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito; mas não há os que não levam nada. Há os que deixam muito; mas não há os que não deixam nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente que duas almas não se encontram ao acaso"

Antoine De Saint-Exupery

Aos meus pais, José (*in memoriam*) e Lourdes, por tudo que sou e pelo exemplo de vida.

"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e arte. O homem que desconhece este encanto, incapaz de sentir admiração e estupefação, esse já está, por assim dizer, morto e tem os olhos extintos"

Albert Einstein

Às minhas orientadoras e amigas Maria Raquel Marçal Natali e Jacqueline Nelisis Zanoni, sempre um farol seguro a indicar o melhor caminho entre os recifes de dificuldades existentes na pesquisa científica.

AGRADECIMENTOS

Sou muito grata a todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço...

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado e Fundação Auracária, por auxílios concedidos ao nosso projeto, que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho.

À todos os colegas pós-graduandos.

Aos amigos e companheiros de projeto Renata, João Roberto (Jr.) e Rafaela.

Aos meus amigos conquistados durante o mestrado, Angélica Cristina, Angélica, Márcia, Cristiano, Eleandro e João Paulo que estiveram comigo e me proporcionaram bons momentos.

Aos meus queridos irmãos Alex e Herivelton pelo amor, apoio e cumplicidade existente entre nós.

À Maria Euride e Maria dos Anjos, pelo apoio técnico e pela presença amiga e companheira que sempre mantivemos no laboratório de Histologia.

À José Antônio de Souza, pelo suporte técnico fornecido no decorrer do estudo.

À Cleonira (Kita) pelo suporte técnico no laboratório de Anatomia do Departamento de Ciências Morfofisiológicas.

Aos funcionários Valéria, Valdir e Elizete pertencentes ao laboratório de Fisiologia do Departamento de Ciências Morfofisiológicas pelo suporte técnico no Biotério Setorial.

À todos os docentes e funcionários da Universidade Estadual de Maringá, em especial do Departamento de Ciências Morfofisiológicas, que sempre me acolheram e me ajudaram.

Aos meus colegas de graduação Lucieni, Fernando, Fabiana, Luciano, Maria Rosa e Marcelo, a “turminha mais ou menos”, que me apoiaram e me incentivaram para este caminho científico.

À todos que embora não estejam citados aqui tiveram sua contribuição em meu trabalho.

E a todos os meus, que me ajudaram nas boas e dura etapas da vida.

.... À Deus pelo dom da vida.

APRESENTAÇÃO

Em consonância com a Resolução Nº 01/2003-CCPBC do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, esta dissertação de mestrado é composta por um artigo científico completo (*full paper*), redigido na forma exigida pela revista científica que pretendemos publicá-lo, assim sendo:

P. Freitas, R.V.F. Pereira, J.N. Zanoni, M.R.M. Natali. Neurônios mioentéricos e mucosa intestinal de ratos diabéticos após suplementação com ácido ascórbico / Myenteric neurons and intestinal mucosa of diabetic rats after ascorbic acid supplementation. Será submetido à apreciação do corpo editorial da revista Diabetes Research and Clinical Practice (ISSN 0168-8227), visando a sua publicação.....Pág. 01

RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. É um importante problema de saúde pública uma vez que é freqüente e está associado a complicações que comprometem a produtividade, qualidade de vida e sobrevida dos indivíduos, além de envolver altos custos no seu tratamento em decorrência de suas complicações.

A expressão clínica completa do DM tem como características, além de complexas alterações metabólicas, complicações vasculares e neurológicas. A neuropatia é uma complicação freqüente no DM, e pode afetar tanto os nervos periféricos quanto o sistema nervoso autônomo. A neuropatia autonômica diabética é a forma mais comum do comprometimento do sistema nervoso. Face à distribuição anatômica do sistema nervoso autonômico, essa síndrome afeta tanto o sistema cardiovascular como o gastrointestinal e urogenital.

O intestino delgado é suprido por fibras nervosas periféricas e fibras parassimpáticas que respondem pela inervação extrínseca do mesmo. O componente periférico intrínseco, denominado de sistema nervoso entérico, é constituído por fibras nervosas e gânglios organizados em plexos. Entre os plexos ganglionados destaca-se o plexo mioentérico localizado entre as camadas de músculo liso da túnica muscular externa, responsável entre outras funções, pela modulação da motilidade intestinal.

Alterações estruturais e ultraestruturais na população neuronal mioentérica bem como na parede dos órgãos (tais como, aumento acentuado da proliferação celular) inervados por estes neurônios estão associados ao DM. O dano neuronal tem sido atribuído principalmente ao aumento intracelular de sorbitol. Esta substância é produzida pela redução de glicose na reação catalisada pela enzima aldose redutase. As drogas que reduzem a concentração do sorbitol, inibindo a aldose redutase, podem ter um papel relevante no tratamento das complicações neurológicas do diabetes. O ácido ascórbico é uma destas substâncias e tem sido estudado no tratamento desta patologia.

O objetivo deste estudo foi o de investigar possíveis alterações no número e tamanho dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos, e o comportamento proliferativo da

túnica mucosa do jejuno de ratos diabéticos crônicos após à suplementação com ácido ascórbico.

Foram utilizados três grupos de animais (*Rattus norvegicus*): não diabéticos, diabéticos e diabéticos tratados com ácido ascórbico (DA). Para a indução do DM foi administrada a droga diabetogênica estreptozotocina, sendo mantida esta condição durante 120 dias. Aos 210 dias de idade, os animais foram anestesiados, mortos e amostras do jejuno foram coletadas.

Para análise da população mioentérica, amostras do jejuno foram submetidas á elaboração de preparados totais para a técnica imunohistoquímica miosina-V. Esta proteína motora está presente nas células nervosas em organelas envoltas por membrana e junto à membrana plasmática, estando relacionada com a dinâmica de membranas, transporte axoplasmático e liberação de neurotransmissores. A condição de DM imposta, comprovada pelos índices glicêmicos provocou redução no número de neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos, a qual foi minimizada pela suplementação com ácido ascórbico ($p > 0,05$).

Após administração prévia de sulfato de vincristina (bloqueador do fuso mitótico), amostras da túnica mucosa do jejuno foram processadas histologicamente com inclusão em 2-hidroxietil-metacrilato e coradas pelo método da hematoxilina-eosina para a determinação do índice metafásico, altura das vilosidades e a profundidade das criptas. Estes parâmetros não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

Nossos resultados permitem concluir que a suplementação do ácido ascórbico para ratos com diabetes mellitus crônico não influenciou os parâmetros glicêmicos analisados, nem as características morfométricas da mucosa intestinal, porém pode-se considerar efeito positivo sobre a população mioentérica miosina-V imunoreativa.

Palavras-Chaves: ácido ascórbico, diabetes mellitus, mucosa intestinal, neurônios mioentéricos, miosina-V

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a syndrome of multiple etiologies, which occurs due to the lack of insulin and/or to the incapacity of the insulin act adequately. It is characterized by chronic hyperglycemia with disturbances in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins. It is a great concern in public health since it is a common problem and it is associated to complications that compromise the productivity, quality of life and life expectancy of individuals. Not to mention the high costs in its treatment due to its complications.

The complete clinical expression of DM has as characteristics vascular and neurological complications, besides complex metabolic alterations. The neuropathy is a common complication in DM, and it can affect both the peripheral nerves and the autonomous nervous system. The diabetic autonomous neuropathy is the most common form of compromising the nervous system. Due to the anatomical distribution of the autonomous nervous system, the syndrome affects both the cardiovascular system and the gastrointestinal and urogenital system as well.

The small intestine is supplied by peripheral nervous fibers and parasympathetic fibers, which are responsible for their extrinsic innervation. The intrinsic peripheral component, called enteric nervous system, is composed by nervous fibers and ganglions arranged in plexus. The myenteric plexus, situated between the smooth muscles layers in the outer muscular tunica, stands out. It is responsible for the modulation of the intestinal motility.

Structural and ultra-structural changes on the myenteric neuron population as well as on the wall of organs (such as the sharp rise in the cell proliferation) innervated by them are associated to DM. The neuronal damage has been blamed mainly on the increase of the intracellular sorbitol. This substance is produced by the glucose reduction in the reaction catalyzed by the enzyme aldose reductase. Drugs that reduce the sorbitol concentration, inhibiting the aldose reductase, may play an important role in the treatment of the neurological complications due to diabetes. The ascorbic acid is one of these substances and it has been studied in the treatment of this pathology.

The purpose of our study was to investigate possible alterations on the number and size of myenteric neurons stained by myosin-V as well as the proliferative behavior of the mucosa layer of the jejunum of chronic diabetic rats after to the supplementation with ascorbic acid.

Three groups of animals were used (*Rattus norvegicus*): non-diabetic, diabetic and diabetic treated with ascorbic acid (DA). DM was induced by the administration of streptozotocin and kept for 120 days. At the 210 days of age the animals were anesthetized, killed and samples of their jejunum were collected.

Some of the samples were prepared as whole mounts for the myosin-V immunohistochemical technique so that we could analyze the myenteric population. This protein is present in nervous cells in organelles, wrapped by a membrane and close to the plasmatic membrane. They are related to the dynamics of membranes, axoplasmatic transport and release of neurotransmitters. The onset of DM, verified by the glucose indexes, caused a reduction in the number of myenteric neurons stained by myosin-V, which was minimized by the supplementation with ascorbic acid ($p > 0.05$).

After a prior administration of vincristine sulfate (a mitotic fuse blocker), samples of the jejunum mucosa layer were histologically processed with immersion in 2-hydroxyethyl-metacrilate and stained by the hematoxylin-eosin method in order to determinate the metaphasic index, the height of villusities and the depth of crypts. These parameters did not show significative differences among the groups.

Our results allow us to come to the conclusion that the ascorbic acid supplementation for rats with chronic diabetes mellitus neither influenced the analyzed glucose parameters nor the morphometric characteristics of the intestinal mucosa. However, it may be considered as having a positive effect on the myenteric population myosin-V stained.

Keywords: ascorbic acid, diabetes mellitus, intestinal mucosa, myenteric neurons, myosin-V.

Neurônios mioentéricos e mucosa intestinal de ratos diabéticos após
suplementação com ácido ascórbico

P. Freitas, R.V.F. Pereira, J.N. Zanoni, M.R.M. Natali

*Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Laboratório de Neurônios Entéricos,
Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, CEP 87020-900, Maringá,
Paraná, Brasil.*

Autor para correspondência: Priscila de Freitas. Avenida Gov. Parigot de Souza, 491 apto.
701, CEP 87013-300, Maringá, Paraná, Brasil - Tel.: +55 44 3031 9319.

E-mail: priscilamga2@yahoo.com.br

Resumo

Avaliamos o efeito da suplementação com ácido ascórbico sobre os neurônios mioentéricos e proliferação celular epitelial da mucosa do jejuno de ratos adultos com diabetes mellitus crônico. Trinta ratos com 90 dias de idade foram divididos nos grupos: não diabéticos, diabéticos e diabéticos tratados com ácido ascórbico (DA) (1 g/l). Depois de 120 dias de tratamento com ácido ascórbico os animais foram mortos. Os neurônios mioentéricos foram imunomarcados para miosina-V e analisados quantitativamente em uma área de 11,2 mm²/animal, sendo realizada a mensuração da área do perfil celular de 500 neurônios por grupo. Determinou-se o índice metafásico em cerca de 2500 células presentes nas criptas intestinais e também mensurada a altura e a profundidade de 30 vilos e 30 criptas/animal. Observamos no grupo DA aumento de 14 % e 4,4 % na densidade neuronal e no perfil celular respectivamente quando foram comparados aos animais diabéticos ($p > 0,05$). Quanto aos parâmetros de índice metafásico, altura dos vilos e profundidade de criptas, não verificamos diferenças significativas entre os grupos. Concluimos que a suplementação do ácido ascórbico para ratos com diabetes crônico não influenciou os parâmetros glicêmicos analisados nem as características morfométricas da mucosa intestinal, porém consideramos seu efeito positivo sobre a população mioentérica miosina-V imunoreativa.

Palavras-chave: ácido ascórbico, diabetes mellitus, mucosa intestinal, neurônios mioentéricos, miosina-V.

Introdução

O diabetes mellitus é caracterizado por concentrações plasmáticas de glicose anormalmente elevadas, causadas por secreção de insulina inadequada, células-alvo com reações anormais, ou ambas as situações. A hiperglicemia crônica e as anormalidades metabólicas associadas causam as muitas complicações da doença, incluindo danos aos vasos sanguíneos, olhos, rins e sistema nervoso [1].

Em decorrência do diabetes mellitus o intestino delgado sofre alterações morfológicas na mucosa [2,3], comprometendo o movimento do alimento através da luz intestinal, a secreção de sucos entéricos e a absorção dos produtos de digestão, que são dependentes da integridade do epitélio que reveste este órgão. O epitélio intestinal é caracterizado por rápida renovação celular com contínua proliferação de células tronco dentro das criptas de Lieberkühn, migração celular ao longo do eixo cripta-vilo, diferenciação celular, polarização, apoptose apical e perda luminal [4].

Tem sido demonstrado que o sistema nervoso autônomo desempenha um papel na renovação do epitélio intestinal e esta influência pode ser estudada através da eliminação do parassimpático [5], simpático [6] ou inervação mioentérica [7]. O sistema nervoso entérico é uma divisão do sistema nervoso autônomo que é intrínseca no trato gastrointestinal, capaz de mediar reflexos independentes (motilidade, absorção e secreção), sendo composto de neurônios sensoriais, interneurônios e neurônios motores interconectados [8]. O diabetes mellitus atua provocando diminuição da inervação entérica com conseqüente ocorrência da neuropatia diabética [9-11] implicando em alterações morfofisiológicas.

Numerosas teorias têm sido propostas para explicar a neuropatia no diabetes mellitus dentre elas: o metabolismo danificado de ácidos graxos, redução no fornecimento sanguíneo ao nervo, produtos avançados de glicação não enzimática, estresse oxidativo, inadequado suporte trófico e a ativação da via dos polióis [12,13]. A aldose redutase

converte excesso de glicose em sorbitol [14,15]. O sorbitol é o principal responsável pela ocorrência de edema, lesão neuronal [16,17] e conseqüente redução da velocidade da condução nervosa [14]. A concentração de sorbitol pode ser reduzida no diabetes mellitus

Aos 210 dias de idade, os ratos foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental sódico - Thionembusal ® (40 mg/kg do peso corporal). O sangue foi coletado por punção cardíaca para mensuração dos níveis de hemoglobina glicada [21], glicose [22] e ácido ascórbico [23]. Os animais usados neste estudo foram tratados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá.

Imunolocalização da Miosina-V neuronal [24]

Quinze animais foram perfundidos com 1ml por grama de peso corporal de solução salina seguida por perfusão com 1ml por grama de peso corporal de solução fixadora contendo periodato de sódio (10 mM), lisina (75 mM), paraformaldeído (1%) em tampão fosfato (37 mM, pH 7.4) [25]. Imediatamente após a perfusão, cada jejuno foi removido, lavado com solução salina, inflado com solução fixadora e amarrado nas extremidades (bexigas). Após trinta minutos de imersão na solução fixadora, foi aberto e deixado nesta solução por mais trinta minutos. Subseqüencialmente, os segmentos foram abertos ao longo da borda mesentérica e desidratados em etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%), permanecendo em cada solução por 10 min, clareados em xilol (10 min), reidratados com etanol (100%, 95%, 90%, 80% e 70%) e armazenados em etanol (70%). Em seguida, os segmentos foram dissecados sob estereomicroscópio com trans-iluminação através da remoção da túnica mucosa e túnica submucosa, obtendo-se preparados totais de membrana da túnica muscular. Estes preparados foram lavados quatro vezes em tampão fosfato salinado (PBS) (0,1 M, pH 7.4) e bloqueado por duas horas com PBS contendo soro bovino albumina (2%), soro de cabra (2%) e Triton X-100 (0,5%) à temperatura ambiente. Seqüencialmente, em eppendorfs, os segmentos foram incubados em uma solução contendo

0,86 µg/ml do anticorpo primário anti miosina-V cauda medial purificado (extraído de coelhos) (1:750) diluído em PBS contendo soro albumina bovina (1%), Triton X-100 (0,1%) e soro de cabra (2%) com temperatura ambiente sob agitação (48h). Depois da incubação, os tecidos foram lavados duas vezes em PBS (0,1M), Triton X-100 (0,1%) e duas vezes em solução de PBS (0,1M) acrescida de Tween-20 (0,05%). Em seguida, os tecidos foram incubados no anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1 µg/ml) (1:1000) em temperatura ambiente sob agitação (24 h). Por último, eles foram lavados quatro vezes durante 15 min com PBS (0,1M) acrescido de Tween-20 (0,05%). A imunoreação com anticorpo conjugado com peroxidase foi revelada por incubação com 0,75 mg/ml de diaminobenzidina e 0,03% de H₂O₂ em água (1ml) e PBS 0,1M (1ml) por 15 minutos em temperatura ambiente sob agitação. Amostras foram montadas em meio de glicerol gel, contendo glicerol (50%), gelatina em água (0,07 g/ml) e fenol (2 µl/ml). O controle negativo foi realizado com a omissão do anticorpo primário.

Análise quantitativa e morfométrica dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos

Análise quantitativa

Foi realizada na região intermediária da circunferência intestinal do jejuno (60-120°; 240-300°), considerando 0° como inserção mesentérica [26]. Neurônios mioentéricos foram contados sob microscópio de luz (Olympus BX40) com objetiva de 40x, em cinquenta campos aleatórios. A área de cada campo microscópio foi de 0,224 mm².

Análise morfométrica

As imagens foram obtidas através de câmera de alta resolução, transmitidas ao computador e gravadas em disco compacto. A área (µm²) de 100 corpos celulares do

jejuno, perfazendo um total de 500 neurônios por grupo, foi mensurada através de um sistema de análise de imagens Image-Pro-Plus 4.0. Os neurônios foram distribuídos em intervalos de classes de $100 \mu\text{m}^2$.

Análise morfológica da mucosa intestinal

Outros quinze animais foram injetados com sulfato de vincristina, um agente bloqueador do fuso mitótico, na dose de 1 mg/Kg por peso corporal, na veia peniana duas horas antes da coleta dos segmentos.

O jejuno foi coletado, aberto ao longo da borda mesentérica e lavado com solução salina, sendo a seguir fixado em formol tamponado (10%) por 6 horas. Após a fixação procedeu-se a desidratação e inclusão em resina 2-hidroxietil-metacrilato. Posteriormente foram feitos cortes semi-seriados transversais (um corte a cada cinco desprezados) de $2 \mu\text{m}$, em micrótomo Leica RM 2145, com navalha de vidro. As secções de resina foram coradas pelo método hematoxilina-eosina (HE).

Índice Metafásico

O índice metafásico (IM), expressa o número de células metafásicas / número total de células (%), que foi obtido a partir da contagem de células epiteliais interfásicas e metafásicas, nas criptas do jejuno. Foram quantificadas em microscópio de luz Olympus BX-40, cerca de 2500 células por animal.

Comportamento vilos e criptas

Foi mensurada a altura de 30 vilosidades e a profundidade de 30 criptas por animal,

perfazendo no total 900 medidas (300 medidas/tratamento), em microscópio de luz com ocular micrometrada. As alturas dos vilos foram medidas a partir da junção cripta-vilo até o seu ápice. A profundidade das criptas foi mensurada considerando a extensão entre a junção cripta-vilo até sua base.

Produtos químicos

Ácido ascórbico, Soro albumina bovino (BSA), diaminobenzidina (DAB), estreptozotocina (STZ), Tween-20, paraformaldeído e Triton X-100 foram obtidos da Companhia Química Sigma (Sigma Chemical Company, USA)

ascórbico (DA) apresentaram níveis similares de hemoglobina glicada ($p > 0,05$). O nível plasmático de ácido ascórbico apresentou-se reduzido em 48,7 % nos animais diabéticos quando comparados com os não diabéticos ($p < 0,05$). No grupo DA à suplementação elevou os níveis de ácido ascórbico em 25,7 % em relação aos não diabéticos ($p > 0,05$) e 61,9 % em relação ao grupo diabético ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Análise quantitativa dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos

A condição de diabetes experimental provocou uma redução na densidade neuronal mioentérica em uma área de 11,2 mm² no jejuno, como demonstrado na Figura 1 ($p > 0,05$). No grupo de animais diabéticos ($680,6 \pm 30,27$) e DA ($792,6 \pm 46,52$), ocorreu redução na proporção de 28 % e 16 % respectivamente quando comparados ao grupo não diabético ($947,6 \pm 87,47$). A suplementação com ácido ascórbico nos animais diabéticos promoveu um aumento de 14 % na densidade dos neurônios miosina-V em relação aos dos animais diabéticos não tratados ($p > 0,05$).

Perfil celular dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos

Os resultados referentes à média do perfil neuronal (μm^2) foi de $289,41 \pm 5,19$ no grupo não diabético, $290,1 \pm 6,02$ no grupo diabético e $303,4 \pm 5,19$ no grupo DA (Figura 2). As médias dos perfis celulares foram similares nos três grupos analisados ($p > 0,05$). O intervalo de 201 a 300 μm^2 foi o perfil celular predominante para todos os grupos (Tabela 2).

Análise morfométrica da mucosa intestinal

A mucosa intestinal avaliada através da determinação do índice metafásico e mensuração da altura dos vilos e profundidade de criptas não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

O índice metafásico (IM) do grupo diabético ($12 \pm 0,79$ %) foi 1,5 % maior em comparação com grupo não diabético ($10,5 \pm 0,84$ %) ($p > 0,05$). O IM obtido para o grupo DA ($10,23 \pm 1,58$ %) foi 1,77 % menor do que o observado em relação ao grupo diabético ($p > 0,05$). Os dados relativos à quantificação são apresentados na Figura 3.

A altura (μm) dos vilos dos animais diabéticos ($494,87 \pm 18,24$) foi 7% inferior em relação ao grupo não diabético ($534,23 \pm 18,57$). Os animais do grupo DA ($473,8 \pm 16,25$) apresentaram vilos com alturas inferiores aos grupos não diabético e diabético (11% e 4% de decréscimo, respectivamente). As criptas do grupo diabético ($148,27 \pm 7,57$) apresentaram profundidade 10% maior que as criptas evidenciadas no grupo não diabético ($134,65 \pm 8,35$).

Os animais do grupo DA ($123,17 \pm 6$) sofreram 17% de redução na profundidade de suas criptas quando comparados com o grupo diabético, e redução de 8% quando comparados com o grupo não diabético ($p > 0,05$). Os dados são apresentados na Figura 4.

Discussão

O quadro clínico do diabetes mellitus foi instalado nos animais diabéticos e do grupo DA, caracterizado pela ocorrência de poliúria, polidipsia e polifagia nestes animais, validando este modelo de diabetes experimental induzido pela droga estreptozotocina. Observamos este quadro clínico instalado nos primeiros dias da indução do diabetes estando associados à elevação dos níveis glicêmicos observados pelo teste da glicose oxidase e hemoglobina glicada.

Comprovamos também que no estado diabético houve acentuada redução do nível plasmático de ácido ascórbico, o que também foi verificado por Young et al., Garg et al. e Lindsay et al. em ratos diabéticos [28-30]. Esta redução estaria associada ao consumo aumentado do ácido ascórbico em função do aumento do estresse oxidativo ocasionado pelo diabetes [20,31]. A suplementação com ácido ascórbico, permitiu para os ratos do grupo DA um aumento no seu nível plasmático em 61,9 % quando comparados aos ratos diabéticos, com manutenção da glicemia e do quadro clínico típico do diabetes para estes animais.

Para examinar a possível ação neuroprotetora do ácido ascórbico na população de neurônios mioentéricos, utilizamos a técnica imunohistoquímica para evidenciar os neurônios que apresentam a miosina-V, uma vez que estes neurônios possuem uma alta concentração desta proteína, semelhante ao sistema nervoso central [24].

Nossos resultados demonstraram uma redução do número de neurônios mioentéricos do grupo de ratos diabéticos ($680 \pm 30,2$ neurônios/ $11,2 \text{ mm}^2$) quando comparados ao grupo dos ratos não diabéticos ($947 \pm 87,47$ neurônios/ $11,2 \text{ mm}^2$). Resultados similares em vários segmentos do aparelho digestório em condição de diabetes mellitus crônico induzidos experimentalmente pela droga estreptozotocina foram relatados previamente [32,10]. Por outro lado, verificamos que a densidade dos neurônios miosina-V no grupo DA

espécies reativas de oxigênio, as quais estão associadas à ativação de uma cascata de eventos que geram a apoptose [34,35]. Nível de apoptose de 1 a 2 % no plexo mioentérico de ratos diabéticos foi verificado por Guo et al. [36]. Acreditamos que a suplementação com ácido ascórbico poderia ter minimizado o desencadeamento dos eventos associados à apoptose com conseqüente diminuição da perda neuronal como observado no grupo DA.

Ao analisarmos os resultados obtidos através da média do perfil celular verificamos que não houve diferenças significativas quando os três grupos foram comparados. Ao considerarmos especificamente a condição de diabetes com o grupo não diabético, verificamos divergências de nossos resultados. Perfil celular aumentado foi observado por Hernandez et al. e Fregonesi et al. os quais atribuíram como possível causa, o aumento da concentração de sorbitol que levaria a alterações da osmolaridade intracelular, aumentando-a e resultando em edema e lesão neuronal [37,38]. Semelhante aos nossos resultados, Zanoni et al. também não observaram diferenças ao compararem o perfil celular dos neurônios mioentéricos miosina-V do íleo de ratos diabéticos com os ratos diabéticos tratados com ácido ascórbico [10]. Por outro lado neurônios VIP-érgicos do íleo apresentaram aumento do perfil celular nos ratos diabéticos e a suplementação com ácido ascórbico preveniu este aumento [39]. A nosso ver, a suplementação com ácido ascórbico exerce um possível efeito sobre a população neuronal, porém isso ocorre de forma específica conforme a sub-população neuronal estudada, ficando evidente o papel neuroprotetor por exemplo para a população VIP-érgica.

A instalação do quadro de diabetes experimental no jejuno de ratos não promoveu alterações no índice metafásico ou na morfometria da mucosa intestinal (altura de vilosidades e profundidade de criptas) dos nossos animais. Dados da literatura revelam que o intestino delgado de ratos responde ao diabetes experimental com hiperplasia e hipertrofia da mucosa [40,41] e aumento da espessura da túnica submucosa e parede total [41]. Estes

resultados não podem ser considerados contraditórios aos nossos, uma vez que estes autores mantiveram um quadro de diabetes agudo. Também concordam parcialmente com os dados de Zoubi et al. que não detectaram alterações na morfometria das criptas intestinais no intestino delgado de ratos após 84 dias de indução do diabetes mellitus, porém obtiveram um aumento no índice mitótico [3].

A integridade do epitélio intestinal depende do equilíbrio entre a proliferação, migração e a morte celular ao longo do eixo cripta-vilosidade. Contudo, a despeito da constante eliminação das células, em condições de normalidade, esta integridade é mantida [42].

Como o sistema nervoso entérico intrínseco medeia o sinal do sistema nervoso autônomo na regulação da dinâmica do epitélio intestinal, acreditamos que os resultados encontrados para a proliferação celular da mucosa intestinal possam estar relacionados com uma adaptação da túnica mucosa à patogênese crônica do diabetes mellitus, considerando o período prolongado (120 dias) de manutenção do quadro diabético. Apesar da manutenção morfológica da túnica mucosa, acreditamos que o diabetes não levou a um prejuízo funcional do jejuno revelando um importante mecanismo de adaptação intestinal ao diabetes crônico.

Por outro lado, a não ocorrência de variações sobre a morfometria da mucosa intestinal dos animais diabéticos suplementados com ácido ascórbico justifica-se uma vez que o efeito deste antioxidante sobre os neurônios mioentéricos miosina-V, apesar de existir, não foi suficiente para promover alterações significativas e conseqüentemente não interferiu na mucosa intestinal.

A suplementação do ácido ascórbico para ratos com diabetes crônico não influenciou os parâmetros glicêmicos analisados nem as características morfológicas da mucosa intestinal, porém consideramos seu efeito positivo sobre a população mioentérica

miosina-V imunoreativa.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio amável de Maria Euride do Carmo Cancino, Maria dos Anjos Fortunato, Valdir Trombela e José Antônio de Souza pelo excelente apoio técnico.

Este trabalho foi apoiado através de fundos do CNPq e Fundação Araucária.

Referências

- [1] D.U. Silverthorn, *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*, Barueri, SP, Manole, 2003, p. 816.
- [2] H. Lorenz-Meyer, F. Thiel, H.G. Menge, E.O. Riecke, Structural and functional on the transformation of the intestinal mucosa in rats with experimental diabetes, *Res Exp Med* 170 (1977) 89-99.
- [3] S.A. Zoubi, M.D. Williams, T.M. Mayhew, R.A. Sparrow, Number and ultrastructure of epithelial cells in crypts and villi along the streptozotocin-diabetic small intestine: a quantitative study on the effects of insulin and aldose reductase inhibition, *Virchows Arch* 427 (1995) 187-193.
- [4] A.P. Zbar, C. Simopoulos, A.J. Karayiannakis, Cadherins: an integral role in inflammatory bowel disease and mucosal restitution, *J Gastroenterol* 39 (2004) 413-21.
- [5] F. Musso, J.J. Lachat, A.R. Cruz, R.P. Gonçalves, Effect of denervation on the mitotic index of the intestinal epithelium of the rat, *Cell Tissue Res* 163 (1975) 395-402.
- [6] G.E. Holle, T. Granat, S.B. Reiser, F. Holle, Effects of superior mesenteric and coeliac ganglionectomy on the small intestinal mucosa in the Hanford mini pig. I. Histological and enzyme-histochemical study, *J Auton Nerv Syst* 26 (1989) 135-45.
- [7] L. Hernandez, S. Zucoloto, E.P. Álvares, Effect of myenteric denervation on intestinal epithelium proliferation and migration of suckling and weanling rats, *Cell Prolif* 33 (2000) 127-138.
- [8] P.R. Wade, Aging and neural control of the GI tract. I. Age-related changes in the enteric nervous system, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283 (2002) G489-95.
- [9] A. Belai, J. Lincoln, P. Milner, G. Burnstock, Differential effect of streptozotocin induced on the ileum and distal colon, *Gastroenterology* 100 (1991) 1024-32.

- [10] J.N. Zanoni, N.C. Buttow, M.H. Miranda Neto, Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid, *Auton Neurosci* 104 (2003) 32-8.
- [11] H.R. Shotton, S. Broadbent, J. Lincoln, Prevention and partial reversal of diabetes-induced changes in enteric nerves of the rat ileum by combined treatment with alpha-lipoic acid and evening primrose oil, *Auton Neurosci* 111 (2004) 57-65.
- [12] N.E. Cameron, M.A. Cotter, E.K. Maxfield, Anti-oxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats, *Diabetologia* 36 (1993) 299-304.
- [13] M.J. Stevens, S.A. Lattimer, M. Kamijo, C. Van Huysen, A.A. Sima, D.A. Greene, Osmotically-induced nerve taurine depletion and the compatible osmolyte hypothesis in experimental diabetic neuropathy in the rat, *Diabetologia* 36 (1993) 608-14.
- [14] D.A. Greene, S.A. Lattimer, Impaired rat sciatic nerve sodium-potassium adenosine triphosphatase in acute streptozocin diabetes and its correction by dietary myo-inositol supplementation, *J Clin Invest* 72 (1983) 1058-63.
- [15] E.L. Feldman, M.J. Stevens, D.A. Greene, Pathogenesis of diabetic neuropathy, *Clin Neurosci* 6 (1997) 365-70.
- [16] D.J. Hosking, T. Bennett, J.R. Hampton, Diabetic autonomic neurophaty, *Diabetes* 27 (1978) 1043-1055.
- [17] C.B. Silva, M.J. Teixeira, Neuropatia diabética, *Rev Med* 78 (1999) 150 -162.
- [18] J.C. Will, T. Byer, Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C?, *Nutr Rev* 54 (1996) 193-202.
- [19] J.J. Cunningham, Micronutrients as nutraceutical interventions in diabetes mellitus, *J Am Coll Nut* 17 (1998) 7-10.

- [20] I.S. Young, J.J. Torney, E.R. Trimble, The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat, *Free Radic Biol Med* 13 (1992) 41-46.
- [21] R.J. Koenig, C.M. Peterson, R.L. Jones, C. Saudek, M. Lehrman, A. Cerami. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus, *N Engl J Med* 295 (1976) 417-20.
- [22] H.U. Bergmeyer, E. Bernet, Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase, In. *Methods of enzymatic analysis*, Academic Press, New York, NY, 1974.
- [23] R.J. Henry, D.C. Cannon, J.W. Winkilman, *Química clínica: bases e técnicas*, Editorial JIMS, 1980.
- [24] A.C. Drengk, J.K. Kajiwarra, S.B.Garcia, V.S. Carmo, R.E. Larson, S. Zucoloto, E.M. Espreafico, Immunolocalisation of myosin-V in the enteric nervous system of the rat, *J Auton Nerv Syst* 78 (2000) 109-12.
- [25] I.W. McLean, P.K. Nakane, Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative, A new fixation for immunoelectron microscopy, *J Histochem Cytochem* 22 (1974) 1077-83.
- [26] J.N. Zanoni, P. Freitas, R.V. Pereira, M.A. Santos Pereira, M.H. Miranda Neto, Effects of Supplementation with Ascorbic Acid for a Period of 120 days on the Myosin-V and NADPHd Positive Myenteric Neurons of the Ileum of Rats, *Anat Histol Embryol* 34 (2005) 149-153.
- [27] E.M. Espreafico, R.E. Cheney, M. Matteoli, A.A. Nascimento, P.V. De Camilli, R.E. Larson, M.S. Mooseker, Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains, *J Cell Biol* 119 (1992)1541-57.
- [28] I.S. Young, S. Tate, J.H. Lightbody, D. McMaster, E.R. Trimble, The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat, *Free Radic Biol Med* 18 (1995) 833-40.

- [29] M.C. Garg, K.P. Singh, D.D. Bansal, Effect of vitamin C supplementation on oxidative stress in experimental diabetes, *Indian J Exp Biol* 35 (1997) 264-66.
- [30] R.M. Lindsay, N.S. Jamieson, S.A. Walker, C.C. McGuigan, W. Smith, J.D. Baird, Tissue ascorbic acid and polyol pathway metabolism in experimental diabetes, *Diabetologia* 41 (1998) 516-23.
- [31] F. Sun, K. Iwaguchi, R. Shudo, Y. Nagaki, K. Tanaka, K. Ikeda, S. Tokumaru, S. Kojo, Change in tissue concentrations of lipid hydroperoxides, vitamin C and vitamin E in rats with streptozotocin-induced diabetes, *Clin Sci (Lond)* 96 (1999) 185-90.
- [32] T. Takahashi, K. Nakamura, H. Itoh, A.A. Sima, C. Owyang, Impaired expression of nitric oxide synthase in the gastric myenteric plexus of spontaneously diabetic rats, *Gastroenterology* 113 (1997) 1535-44.
- [33] J.M. May, Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?, *FASEB J* 13 (1999) 995-1006.
- [34] S. Srinivasan, M. Stevens, J.W. Wiley, Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction, *Diabetes* 49 (2000) 1932-8.
- [35] A.J. Barber, A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27 (2003) 283-90.
- [36] C. Guo, A. Quobatari, Y. Shangguan, S. Hong, J.W. Wiley, Diabetic autonomic neuropathy: evidence for apoptosis in situ in the rat, *Neurogastroenterol Motil* 16 (2004) 335-45.
- [37] L. Hernandez, R.B. Bazotte, P. Gama, M.H. de Miranda Neto, Streptozotocin-induced diabetes duration is important to determine changes in the number and basophilicity of myenteric neurons, *Arq Neuropsiquiatr* 58 (2000) 1035-39.
- [38] C.E.P.T. Fregonesi, M.H. de Miranda Neto, S.L. Molinari, J.N. Zanoni, Quantitative

study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes, *Arq Neuropsiquiatr* 59 (2001) 50-53.

[39] J.N. Zaroni, L. Hernandez, R.B. Bazotte, M.H. Miranda Neto, Terminal ileum submucous plexus: Study of the VIP-ergic neurons of diabetic rats treated with ascorbic acid, *Arq Neuropsiquiatr* 60 (2002) 32-37.

[40] D.L. Miller, W. Hanson, H.P. Scheld, J.W. Osborne, Proliferation rate and transit time of mucosal cells in small intestine of the diabetic rat, *Gastroenterology* 73 (1977) 1326-332.

[41] J. Zhao, J. Yang, H. Gregersen, Biomechanical and morphometric intestinal remodelling during experimental diabetes in rats, *Diabetologia* 46 (2003) 1688-97.

[42] T.M. Mayhew, R. Myklebust, A. Whybrow, R. Jenkins, Epithelial integrity, cell death and cell loss in mammalian small intestine, *Histol Histopathol* 14 (1999) 257-267.

Tabela 1. Glicemia (GLI), hemoglobina glicada (GHb) e ácido ascórbico (AA) nos animais dos grupos: não diabético (ND), diabético (D) e diabético tratado com ácido ascórbico (DA). Média \pm erro-padrão (n=10).

	GLI/mg.dl ⁻¹	GHb/%	AA/ μ g.ml ⁻¹
ND	129 \pm 3,9 ^a	4,1 \pm 0,3 ^a	24,58 \pm 5,5 ^a
D	466,4 \pm 24,6 ^b	8,1 \pm 0,2 ^b	12,6 \pm 1,9 ^{ab}
DA	493,0 \pm 10,1 ^b	7,9 \pm 0,5 ^b	33,1 \pm 2,5 ^{ac}

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

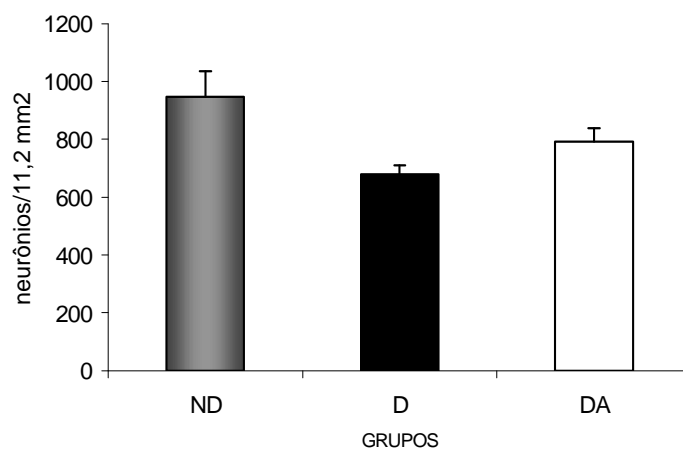


Figura 1. Número de neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos quantificados em 11,2 mm² no jejuno dos animais dos grupos: não diabético (ND), diabético (D) e diabético tratado com ácido ascórbico (DA). Média \pm erro-padrão (n=05). Não houve diferenças significativas quando os três grupos foram comparados pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

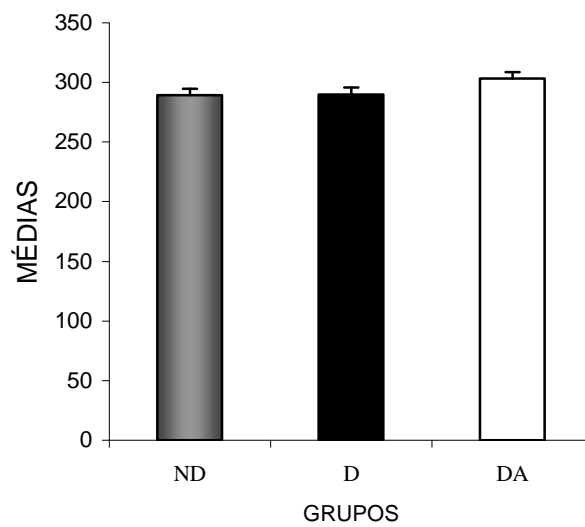


Figura 2. Médias (μm^2) dos perfis celulares dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos nos animais dos grupos: não diabético (ND), diabético (D) e diabético tratado com ácido ascórbico (DA). Média \pm erro-padrão (n=05). Não houve diferenças significativas quando os três grupos foram comparados pelo teste “*t*” de Student ($p > 0,05$).

Tabela 2. Distribuição de neurônios mioentéricos imunoreativos miosina-V, classificados quanto ao perfil celular em intervalos de $100\mu\text{m}^2$ nos animais dos grupos: não diabético (ND), diabético (D) e diabético tratado com ácido ascórbico (DA). n = 5 ratos por grupo.

Tamanho	Grupos		
	ND	D	DA
<100 μm^2	07	02	00
101-200 μm^2	113	117	96
201-300 μm^2	175	172	190
301-400 μm^2	125	136	114
401-500 μm^2	53	53	62
501-600 μm^2	19	17	30
601-700 μm^2	06	02	07
>700 μm^2	02	01	01
Total de neurônios	500	500	500

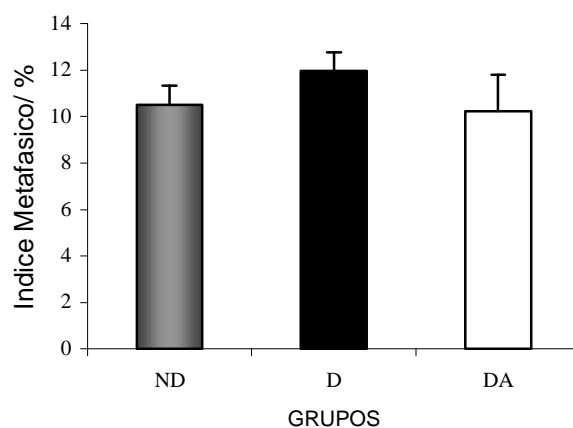


Figura 3. Índices metafásicos (%) dos animais dos grupos: não diabético (ND), diabético (D) e diabético tratado com ácido ascórbico (DA). Média \pm erro-padrão (n=05) Não houve diferenças significativas quando os três grupos foram comparados pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

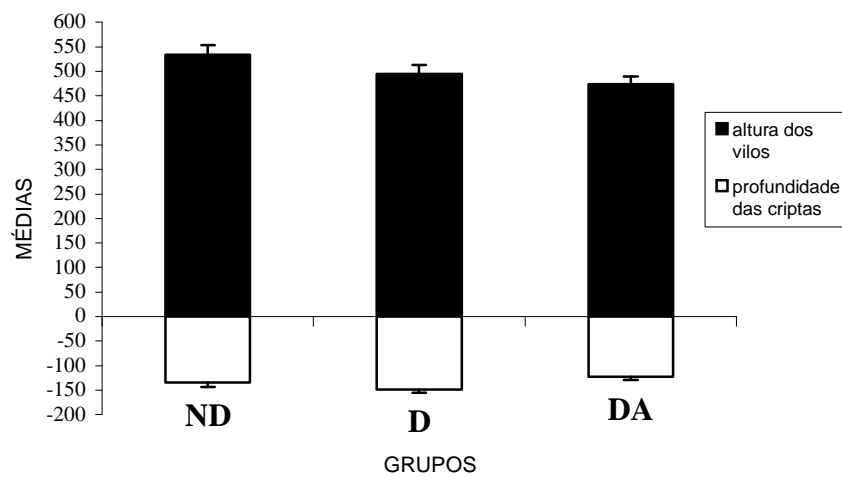


Figura 4. Altura dos vilos (μm) e profundidade das criptas (μm) na mucosa jejunal dos animais dos grupos: não diabético (ND), diabético (D) e diabético tratado com ácido ascórbico (DA). Média \pm erro-padrão (n=5). Não houve diferenças significativas quando os três grupos foram comparados pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

**Myenteric neurons and intestinal mucosa of diabetic rats after ascorbic acid
supplementation**

P. Freitas, R.V.F. Pereira, J.N. Zanoni, M.R.M. Natali

Department of Morphophysiological Sciences, Enteric Neurons Laboratory, State University of Maringá, Avenida Colombo, 5790, ZIP CODE 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

Author address: Priscila de Freitas. Avenida Gov. Parigot de Souza, 491 apartment 701, ZIP CODE 87013-300, Maringá, Paraná, Brazil - Tel.: +55 44 3031 9319.

E-mail: priscilamga2@yahoo.com.br

Abstract

We evaluated the effect of the ascorbic acid (AA) supplementation on the myenteric neurons as well as the epithelial cell proliferation of the jejunum of adult rats with chronic diabetes mellitus. Thirty rats with 90 days of age were divided in three groups: non-diabetic, diabetic and diabetic treated with ascorbic acid (DA) (1 g/l). After 120 days of treatment with AA the animals were killed. The myenteric neurons were stained to myosin-V and analyzed quantitatively in an area of 11.2 mm²/animal. We also measured the cellular profile of 500 neurons per group. We determined the metaphasic index of the jejunum mucosa layer of about 2500 cells in the intestinal crypts and also measured the height and depth of 30 villi and 30 crypts/animal. There was an increase of 14% and 4.4 % in the neuronal density and in the cellular profile respectively of group DA when compared to the diabetic animals ($p > 0.05$). There were no significant differences as for the metaphasic index parameters, villi height and crypt depth of crypts among the groups. Our conclusion was that the AA supplementation for rats with chronic diabetes mellitus neither influenced the glucose parameters analyzed nor the morphometric characteristics of the intestinal mucosa layer. However, we considered it had a positive effect on the immunoreactive myosin-V myenteric population.

Keywords: ascorbic acid, diabetes mellitus, intestinal mucosa layer, myenteric neurons, myosin-V.

Introduction

The diabetes mellitus is characterized by abnormally high glucose plasmatic concentrations due to the inadequate secretion of insulin and target-cells with abnormal reactions, or both situations. The chronic hyperglycemia and the associated metabolic abnormalities are responsible for many of the disease complications, including damages to the blood vessels, eyes, kidneys and nervous system [1].

Due to the diabetes mellitus, the small intestine undergoes morphologic changes in the mucosa [2,3], impairing the traffic of food through the intestinal lumen, the secretion of enteric juices and the absorption of the digestion products, which depend on the epithelium integrity lining this organ. The intestinal epithelium is characterized by fast cellular renewal with continuous proliferation of stem cells inside Lieberkühn crypts, cellular migration along the crypt-villi axis, cellular differentiation, polarization, apical apoptosis and luminal loss [4].

It has been shown that the autonomous nervous system has a role in the intestinal epithelium renewal and this influence can be studied through the elimination of the parasympathetic [5], sympathetic [6] or myenteric innervation [7]. The enteric nervous system is a division of the autonomous nervous system that is intrinsic in the gastrointestinal tract, capable to mediate independent reflexes (motility, absorption and secretion). It is constituted of sensorial neurons, interneurons and interconnected motor neurons [8]. The diabetes mellitus causes a decrease in the enteric innervation with a consequent onset of the diabetic neuropathy [9-11] causing morphological, physiological alterations.

Several theories have been proposed to explain the neuropathy in the diabetes mellitus such as: the impaired metabolism of fatty acids, reduction in the blood supply to the nerve, advanced products of non enzymatic glycation, oxidative stress, inadequate

trophic support and the activation of the polyol pathway [12,13]. The aldose reductase converts glucose excess in sorbitol [14,15]. The sorbitol is the main responsible for edema occurrence, neuronal lesion [16,17] and the consequent reduction on the speed of the nervous transport [14]. The sorbitol concentration can be reduced in the diabetes mellitus through the use of the ascorbic acid, an inhibitor of the enzyme aldose reductase [18,19].

Therefore, the use of ascorbic acid may be beneficial to prevent this neuropathy and maintain the integrity of the intestinal epithelium in the chronic diabetes mellitus, justifying the present study. Our aim was to verify its effect on the myenteric neurons myosin-V immunoreactive and on the intestinal mucosa of the jejunum of rats.

Materials and Methods

Animal procedure

Albino male rats (*Rattus norvegicus*), Wistar strain weighing about 300g and aged 90 days were used in this study. The rats were submitted to a 14-hours-fast and after injected with streptozotocin (35 mg/kg of body weight) dissolved in citrate buffer (10 mM, pH 4.5) in the penial vein to induce the diabetes mellitus. The onset of diabetes mellitus was verified by the glycosuria and polyuria.

Thirty rats, divided in three groups of ten animals each, were used as follows: non diabetic rats, diabetic rats and diabetic treated with ascorbic acid (DA). The ascorbic acid was given for 16 weeks (from the 90 days of age) in water (1 g/L prepared daily) [20]. The rats were kept in individual cages with photoperiod (6:00am - 6:00pm) and at room temperature (RT) ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) with water and food (Nuvital® lab chow) *ad libitum*.

At 210 days of age, the rats were anesthetized intraperitoneally with sodium thiopental - Thionembutal ® (40 mg/kg of body weight). The blood was collected by heart

puncture for measuring the levels of glycated hemoglobin [21], glucose [22] and ascorbic acid [23]. The animals used in this study were treated under the ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by Ethics Committee in Animal Experimentation of the State University of Maringá.

Myosin-V neuronal staining [24]

Fifteen animals were perfused with 1ml/body weight of saline solution followed by perfusion with 1ml/g/body weight of fixation solution containing sodium periodate (10 mM), lysine (75 mM), paraformaldehyde (1 %) in phosphate buffer (PB) (37 mM, pH 7.4) [25]. Immediately after perfusion, each treated fragment of jejunum was removed, rinsed with saline solution, flushed with fixative solution and tied in its extremities (balloons). Thirty minutes after immersed in fixative solution, the jejunum was opened and left in this solution for more thirty minutes. Subsequently, the segments were opened along the mesenteric border and dehydrated in alcohols (50, 70, 80, 90, 95 and 100 %), remained in each solution 10 min, cleared in xylol (10 min), rehydrated back through the ethanol 100, 95, 90, 80, 70 %, and stored in ethanol 70 %. Afterwards, the segments were dissected under stereomicroscopy with trans-illumination, through the removal of the mucosa and submucosa layer, obtaining muscular layer whole mounts. These mixtures were washed four times in phosphate buffered saline (PBS) (0.1 M, pH 7.4) and blocked for two hours with PBS containing bovine serum albumin (2%), goat serum (2%) and Triton X-100 (0.5%) at room temperature. Later, the segments were incubated in eppendorfs in a solution containing 0.86 µg/ml of the myosin-V primary antibody (extracted from rabbits) (1:750) diluted in PBS, BSA (1%), Triton X-100 (0.1%) and goat serum (2%) at room temperature under agitation (48:00). After incubation, the tissues were rinsed twice in PBS (0.1M), Triton X-100 (0.1%) and twice in solution of PBS (0.1M) + Tween-20 (0.05%). Then, the

tissues were incubated in peroxidase-conjugated secondary antibodies (1 $\mu\text{g/ml}$) (1:1000) at room temperature under shaking (24 h). Finally, they were rinsed four times during 15 min in PBS (0.1M) + Tween-20 (0.05%). The staining with peroxidase-conjugated antibody was developed by incubation with 0.75 mg/ml diaminebenzidine and 0.03% of H_2O_2 in water (1ml) and PBS 0.1M (1ml) for 15 minutes at room temperature under shaking. Samples were mounted in glycerol gel, containing glycerol (50%), gelatin in water (0.07 g/ml) and phenol (2 $\mu\text{l/ml}$). The negative control was performed with the omission of the primary antibody.

Quantitative and morphometric analyses of myosin-V stained myenteric neurons

Quantitative analysis

It was performed in the intermediate area of the jejunum intestinal circumference (60-120°; 240-300°), considering the mesenteric intersection as 0° [26]. Myenteric neurons were counted in fifty random fields, under light microscope (Olympus BX40) with 40x lens. The area of each microscope field was 0.224 mm^2 .

Morphometric analysis

The images were taken with a high-resolution camera, transmitted to the microcomputer and recorded into compact disk. The area (μm^2) of 100 cell bodies of the jejunum, in a total of 500 neurons per group, was measured through an image analysis system, the Image-Pro-Plus 4.0. The neurons were distributed in classes intervals of 100 μm^2 .

Morphometric analysis of the intestinal mucosa

Additional 15 animals were injected with vincristine, a blocking agent of the mitotic fuse, at a dose of 1 mg/Kg of body weight, in the penial vein two hours before the segments collection.

The jejunum was collected, open along the mesenteric border and washed with saline solution, fixed in buffered paraformaldehyde (10%) for 6 hours. After fixation, they were dehydrated and immersed in resin 2-hydroxyetil-metacrilate. Later, 2 μ m transverse semi-serial sections were made (a section for each five discarded), in Leica RM 2145 microtome, with a glass razor. The resin section were stained by the hematoxylin-eosin method (HE).

Metaphasic Index

The metaphasic index (IM) shows the number of metaphasic cells / total number of cells (%) that was obtained from the interphasic and metaphasic epithelial cells in the crypts of the jejunum. 2500 cells per animal were quantified under a light microscope.

Villi and crypts

We measured the height of 30 villosities and the depth of 30 crypts per animal, in a total of 900 measurements (300 measurements/treatment), under light microscope with ocular micrometer. The heights of the villi were measured from the crypt-villus junction to its apex. The depth of the crypts was measured considering the extension between the crypt-villus junction to its base.

Chemical products

Ascorbic acid, Serum albumin bovine (BSA), diaminebenzidine (DAB), streptozotocin (STZ), Tween-20, paraformaldehyde and Triton X-100 were obtained at Sigma Chemical Company, USA); Vincristine sulfate (Eli Lilly of Brazil, Brazil); Historesin kit (Leica); secondary antibody conjugated with peroxidase serum anti-rabbit IgG (Pierce, Rockford, USES). The polyclonal antibody anti myosin-V was characterized by Espreafico et al. [27].

Statistical analysis

The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the test of Tukey as a post-test to compare the means. Since the cell bodies areas of the neurons did not have an even distribution, we used the Variance Analysis, ANOVA and the "t" of Student to compare the means. The analyses were accomplished with the prism 3.0 software. The data are shown as means (M) \pm standard error (EP) as an indicator of the observation number (n). The level of significance was $P < 0.05$.

Results

The streptozotocin promoted the onset of the diabetic syndrome with accentuated hyperglycemia. The diabetic rats and the diabetic-treated with ascorbic acid (DA) had similar levels of glycosylated hemoglobin ($p > 0.05$). There was a reduction of 48.7% in the plasmatic level of ascorbic acid in the diabetic animals when compared to the non-diabetics ($p < 0.05$). The supplementation in group DA increased their level of ascorbic acid in 25.7% when compared to the non-diabetics ($p > 0.05$) and 61.9% when compared to the diabetic group ($p < 0.05$) (Table 1).

Quantitative analysis of the myosin-V stained myenteric neurons

The experimental diabetes mellitus condition caused a reduction in the myenteric neuronal density in an area of 11.2 mm² in the jejunum, as shown in Figure 1 (p > 0.05). There was a reduction of 28% and 16% in the diabetic group and DA respectively when compared to the non-diabetic group. The ascorbic acid supplementation in the diabetic animals caused a 14 % increase in the density of the myosin-V stained neurons when compared to the non-treated diabetic animals (p > 0.05).

Cellular profile of myenteric neurons myosin-V stained

The results regarding the neuronal profile means (μm²) were 289.41 ± 5.19 for the non-diabetic group, 290.1 ± 6.02 for the diabetic group and 303.4 ± 5.19 for group DA (Figure 2). The means of the cellular profiles were similar for the three studied groups (p > 0.05). The 201-300 μm² interval was the predominant cellular profile for all groups (Table 2).

Morphometric analysis of the intestinal mucosa

The intestinal mucosa, assessed through the determination of the metaphasic index and measurements of the height of the villus and depth of crypts, did not show statistically significant differences among the groups.

The metaphasic index (IM) of the diabetic group was 1.5% higher when compared with the non-diabetic group (p > 0.05). The MI obtained for group DA was 1.77% smaller than the one observed in the diabetic group (p > 0.05). The quantification data are presented in Figure 3.

The villus height (μm) of the diabetic animals was 7% inferior in relation to the non-diabetic group. The animals from the DA group had villus with lower heights than the non-diabetic and diabetic groups (11% and 4% lower, respectively) (p > 0.05).

The crypts of the diabetic group were 10% deeper than the crypts observed in the non-diabetic group. The animals from group DA showed a 17% reduction in the depth of their crypts when compared to the diabetic group, and an 8% reduction when compared to the non-diabetic group ($p > 0.05$). The data are shown in Figure 4.

Discussion

We observed the onset of diabetes mellitus in the diabetic animals and the DA group, characterized by polyuria, polydipsia and polyphagia, thus, validating this experimental model of streptozotocin-induced diabetes mellitus. The onset occurred in the first days of the induction and is associated to the elevation of the glucose levels observed by the glucose oxidase and glycated hemoglobin test.

We also verified a sharp reduction of the plasmatic level of ascorbic acid due to the diabetes mellitus, which was also verified by Young et al., Garg et al. and Lindsay et al. in diabetic rats [28-30]. This reduction might be associated to the increased consumption of the ascorbic acid due to the increase of the oxidative stress caused by the diabetes mellitus [20,31]. The supplementation with ascorbic acid allowed the rats from the DA group an increase of 61.9% in their plasmatic level when compared to the diabetic rats, maintaining the glycemia and typical state of diabetes mellitus for these animals.

In order to examine the possible neuroprotector action of the ascorbic acid in the population of myenteric neurons, we used the immunohistochemical technique for staining the neurons that had myosin-V, since these neurons have a high concentration of this protein, similar to the central nervous system [24].

Our results showed a reduction in the number of myenteric neurons of the diabetic rats group (680 ± 30.2 neurons/ 11.2 mm^2) when compared to the non-diabetic rats (947 ± 87.47 neurons/ 11.2 mm^2). Similar results in several segments of the digestive tract of

streptozotocin-induced chronic diabetes mellitus have already been reported previously [32,10]. On the other hand, we observed that the density of the myosin-V neurons of group DA was 14% bigger than the diabetic rats group. Although the data regarding the neuronal quantification were not statistically significant, but we consider these results positive when compared diabetic group and DA respectively.

The small loss observed in group DA could be attributed to the ascorbic acid being an inhibitor of the enzyme aldose reductase, leading to a smaller production of sorbitol [18] and also for being an antioxidant [33]. Moreover, the onset of the diabetic neuropathy is associated to the mitochondrial dysfunction with the consequent formation of oxygen reactive species, which are associated to the activation of a cascade of events that generate the apoptosis [34,35]. Guo et al. observed apoptosis levels ranging from 1 to 2% in the myenteric plexus of diabetic rats [36]. We believe that the acid ascorbic supplementation may have lessened the triggering of events associated to the apoptosis with the consequent decrease of the neuronal loss as observed in group DA.

When analyzing the results obtained through the cellular profile mean we verified there were no significative differences when the three groups were compared. When considering specifically the diabetic condition with the non-diabetic group, we noticed some divergences in our results. Hernandez et al. and Fregonesi et al. observed an increase in the cellular profile [37,38]. They attributed as a possible cause the increase on the sorbitol concentration that would lead to changes of the intracellular osmolality, increasing it and resulting in edema and neuronal lesion. Similar to our results, Zanoni et al. also did not observe differences when they compared the cellular profile of the myosin-v-stained myenteric neurons of the ileum of diabetic rats with the acid ascorbic diabetic-treated rats [10]. On the other hand, VIP-ergic neurons of the ileum showed an increase in their cellular profile in the diabetic rats and the supplementation with ascorbic acid prevented this

increase [39]. We believe that the ascorbic acid supplementation has a possible effect on the neuronal population. However, this happens in a specific way, depending on the subpopulation studied: for example, it is evident its neuroprotector role for the Vip-ergic.

The onset of the experimental diabetes mellitus in the jejunum of rats did not cause alterations in the metaphasic index or in the morphometry of the intestinal mucosa (villosities height and depth of crypts) of our animals. The literature data reveal that the small intestine of rats responds to the experimental with hyperplasia and hypertrophy of the mucosa [40,41] and increase of the thickness of the submucosa layer and total wall [41]. These results cannot be considered contradictory to ours, since these authors maintained acute diabetes. They also agree partially with the data of Zoubi et al., who did not detect alterations in the morphometry of the intestinal crypts in the small intestine of rats after 84 days of inducing the diabetes mellitus [03]. However, they observed an increase in the mitotic index.

The integrity of the intestinal epithelium depends on the balance among the proliferation, migration and cellular death along the crypt-villus axis. However, despite the constant elimination of cells, in normal conditions, this integrity is maintained [42].

As the intrinsic enteric nervous system mediates the signal of the autonomous nervous system in regulating the dynamics of the intestinal epithelium, we believe that the results found for the cellular proliferation of the intestinal mucosa may be related to an adaptation of the mucosa layer to the chronic pathogenesis of the diabetes mellitus (if we consider the long period (120 days) of maintaining the diabetes mellitus). Despite maintaining the morphometry of mucosa layer, we presume that the diabetes mellitus did not lead to a functional damage of the jejunum revealing an important mechanism of intestinal adaptation to chronic diabetes mellitus.

On the other hand, the absence of morphometric variations on the intestinal mucosa of the diabetic rats supplemented with ascorbic acid is justified since the effect of this antioxidant on the myenteric neurons, although present, was not enough to promote significant changes and, consequently, did not interfere in the intestinal mucosa.

The ascorbic acid supplementation for rats with chronic diabetes mellitus neither influenced the analyzed glycemia parameters nor the morphometric characteristics of the intestinal mucosa. However, we consider its effect on the myosin-V-stained myenteric population as positive.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the kind support of the Maria Euride do Carmo Cancino, Maria dos Anjos Fortunato, Valdir Trombeli and José Antônio de Souza for their excellent technical support. This work was supported by funds from CNPq and Fundação Araucária.

References

- [1] D.U. Silverthorn, *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*, Barueri, SP, Manole, 2003, p. 816.
- [2] H. Lorenz-Meyer, F. Thiel, H.G. Menge, E.O. Riecke, Structural and functional on the transformation of the intestinal mucosa in rats with experimental diabetes, *Res Exp Med* 170 (1977) 89-99.
- [3] S.A. Zoubi, M.D. Williams, T.M. Mayhew, R.A. Sparrow, Number and ultrastructure of epithelial cells in crypts and villi along the streptozotocin-diabetic small intestine: a quantitative study on the effects of insulin and aldose reductase inhibition, *Virchows Arch* 427 (1995) 187-193.
- [4] A.P. Zbar, C. Simopoulos, A.J. Karayiannakis, Cadherins: an integral role in inflammatory bowel disease and mucosal restitution, *J Gastroenterol* 39 (2004) 413-21.
- [5] F. Musso, J.J. Lachat, A.R. Cruz, R.P. Gonçalves, Effect of denervation on the mitotic index of the intestinal epithelium of the rat, *Cell Tissue Res* 163 (1975) 395-402.
- [6] G.E. Holle, T. Granat, S.B. Reiser, F. Holle, Effects of superior mesenteric and coeliac ganglionectomy on the small intestinal mucosa in the Hanford mini pig. I. Histological and enzyme-histochemical study, *J Auton Nerv Syst* 26 (1989) 135-45.
- [7] L. Hernandez, S. Zucoloto, E.P. Álvares, Effect of myenteric denervation on intestinal epithelium proliferation and migration of suckling and weanling rats, *Cell Prolif* 33 (2000) 127-138.
- [8] P.R. Wade, Aging and neural control of the GI tract. I. Age-related changes in the enteric nervous system, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283 (2002) G489-95.
- [9] A. Belai, J. Lincoln, P. Milner, G. Burnstock, Differential effect of streptozotocin

induced on the ileum and distal colon, *Gastroenterology* 100 (1991) 1024-32.

[10] J.N. Zanoni, N.C. Buttow, M.H. Miranda Neto, Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid, *Auton Neurosci* 104 (2003) 32-8.

[11] H.R. Shotton, S. Broadbent, J. Lincoln, Prevention and partial reversal of diabetes-induced changes in enteric nerves of the rat ileum by combined treatment with alpha-lipoic acid and evening primrose oil, *Auton Neurosci* 111 (

Am Coll Nut 17 (1998) 7-10.

[20] I.S. Young, J.J. Torney, E.R. Trimble, The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat, *Free Radic Biol Med* 13 (1992) 41-46.

[21] R.J. Koenig, C.M. Peterson, R.L. Jones, C. Saudek, M. Lehrman, A. Cerami. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus, *N Engl J Med* 295 (1976) 417-20.

[22] H.U. Bergmeyer, E. Bernet, Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase, In. *Methods of enzymatic analysis*, Academic Press, New York, NY, 1974.

[23] R.J. Henry, D.C. Cannon, J.W. Winkilman, *Química clínica: bases e técnicas*, Editorial JIMS, 1980.

[24] A.C. Drengk, J.K. Kajiwara, S.B.Garcia, V.S. Carmo, R.E. Larson, S. Zucoloto, E.M. Espreafico, Immunolocalisation of myosin-V in the enteric nervous system of the rat, *J Auton Nerv Syst* 78 (2000) 109-12.

[25] I.W. McLean, P.K. Nakane, Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative, A new fixation for immunoelectron microscopy, *J Histochem Cytochem* 22 (1974) 1077-83.

[26] J.N. Zanoni, P. Freitas, R.V. Pereira, M.A. Santos Pereira, M.H. Miranda Neto, Effects of Supplementation with Ascorbic Acid for a Period of 120 days on the Myosin-V and NADPHd Positive Myenteric Neurons of the Ileum of Rats, *Anat Histol Embryol* 34 (2005) 149-153.

[27] E.M. Espreafico, R.E. Cheney, M. Matteoli, A.A. Nascimento, P.V. De Camilli, R.E. Larson, M.S. Mooseker, Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains, *J Cell Biol* 119 (1992)1541-57.

[28] I.S. Young, S. Tate, J.H. Lightbody, D. McMaster, E.R. Trimble, The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat, *Free*

Radic Biol Med 18 (1995) 833-40.

[29] M.C. Garg, K.P. Singh, D.D. Bansal, Effect of vitamin C supplementation on oxidative stress in experimental diabetes, *Indian J Exp Biol* 35 (1997) 264-66.

[30] R.M. Lindsay, N.S. Jamieson, S.A. Walker, C.C. McGuigan, W. Smith, J.D. Baird, Tissue ascorbic acid and polyol pathway metabolism in experimental diabetes, *Diabetologia* 41 (1998) 516-23.

[31] F. Sun, K. Iwaguchi, R. Shudo, Y. Nagaki, K. Tanaka, K. Ikeda, S. Tokumaru, S. Kojo, Change in tissue concentrations of lipid hydroperoxides, vitamin C and vitamin E in rats with streptozotocin-induced diabetes, *Clin Sci (Lond)* 96 (1999) 185-90.

[32] T. Takahashi, K. Nakamura, H. Itoh, A.A. Sima, C. Owyang, Impaired expression of nitric oxide synthase in the gastric myenteric plexus of spontaneously diabetic rats, *Gastroenterology* 113 (1997) 1535-44.

[33] J.M. May, Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?, *FASEB J* 13 (1999) 995-1006.

[34] S. Srinivasan, M. Stevens, J.W. Wiley, Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction, *Diabetes* 49 (2000) 1932-8.

[35] A.J. Barber, A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27 (2003) 283-90.

[36] C. Guo, A. Quobadari, Y. Shangguan, S. Hong, J.W. Wiley, Diabetic autonomic neuropathy: evidence for apoptosis in situ in the rat, *Neurogastroenterol Motil* 16 (2004) 335-45.

[37] L. Hernandez, R.B. Bazotte, P. Gama, M.H. de Miranda Neto, Streptozotocin-induced diabetes duration is important to determine changes in the number and basophilicity of myenteric neurons, *Arq Neuropsiquiatr* 58 (2000) 1035-39.

- [38] C.E.P.T. Fregonesi, M.H. de Miranda Neto, S.L. Molinari, J.N. Zanoni, Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes, *Arq Neuropsiquiatr* 59 (2001) 50-53.
- [39] J.N. Zanoni, L. Hernandez, R.B. Bazotte, M.H. Miranda Neto, Terminal ileum submucous plexus: Study of the VIP-ergic neurons of diabetic rats treated with ascorbic acid, *Arq Neuropsiquiatr* 60 (2002) 32-37.
- [40] D.L. Miller, W. Hanson, H.P. Scheld, J.W. Osborne, Proliferation rate and transit time of mucosal cells in small intestine of the diabetic rat, *Gastroenterology* 73 (1977) 1326-332.
- [41] J. Zhao, J. Yang, H. Gregersen, Biomechanical and morphometric intestinal remodelling during experimental diabetes in rats, *Diabetologia* 46 (2003) 1688-97.
- [42] T.M. Mayhew, R. Myklebust, A. Whybrow, R. Jenkins, Epithelial integrity, cell death and cell loss in mammalian small intestine, *Histol Histopathol* 14 (1999) 257-267.

Table 1. Glycemia (GLI), glyated hemoglobin (GHb) e ascorbic acid (AA) for animals in groups: non-diabetic (ND), diabetic (D) e diabetic-treated with ascorbic acid (DA). Mean \pm standard error (n=10).

	GLI/mg.dl ⁻¹	GHb/%	AA/ μ g.ml ⁻¹
ND	129 \pm 3.9 ^a	4.1 \pm 0.3 ^a	24.58 \pm 5.5 ^a
D	466.4 \pm 24.6 ^b	8.1 \pm 0.2 ^b	12.6 \pm 1.9 ^{ab}
DA	493.0 \pm 10.1 ^b	7.9 \pm 0.5 ^b	33.1 \pm 2.5 ^{ac}

Means followed by different letters in the same column are different by test of Tukey (p < 0.05)

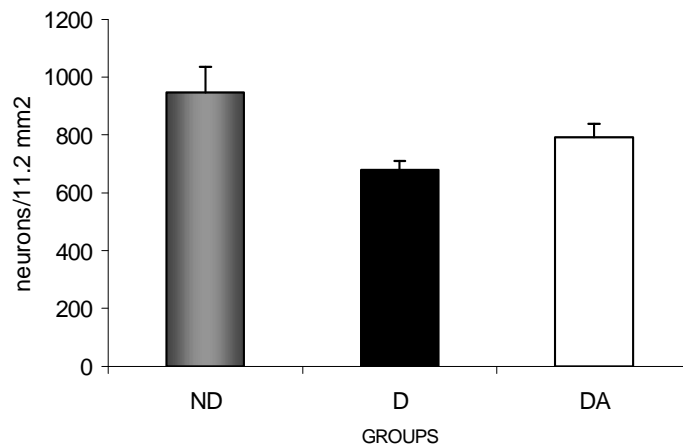


Figure 1. Number of myenteric neurons myosin-V stained quantified in 11.2 mm² in the jejunum of rats from groups: non-diabetic (ND), diabetic (D) e diabetic-treated with ascorbic acid (DA). Mean \pm standard error (n=05). There were no significative differences when comparing the three groups by test of Tukey ($p > 0.05$).

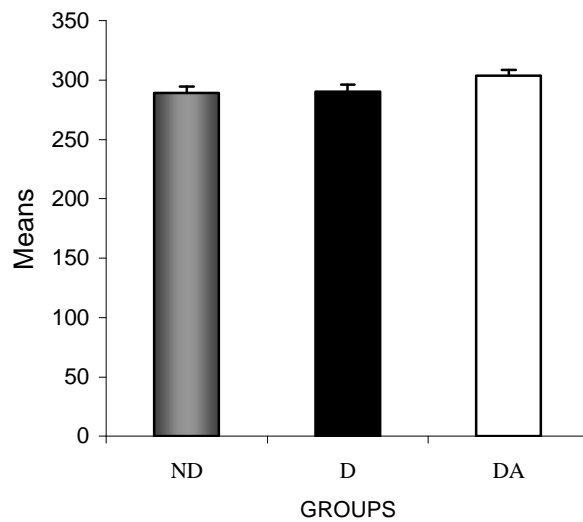


Figure 2. Means (μm^2) of cellular profiles of myosin-V-stained myenteric neurons in animals from groups: non-diabetic (ND), diabetic (D) e diabetic-treated with ascorbic acid (DA). Mean \pm standard error (n=05). There were no significative differences when comparing the three groups by test “t” of Student ($p > 0.05$).

Table 2. Distribution of myosin-V stained myenteric neurons, classified according to their cellular profile in intervals of $100\mu\text{m}^2$ in animals from groups: non-diabetic (ND), diabetic (D) e diabetic-treated with ascorbic acid (DA). n = 5 rats per group.

Size	Groups		
	ND	D	DA
<100 μm^2	07	02	00
101-200 μm^2	113	117	96
201-300 μm^2	175	172	190
301-400 μm^2	125	136	114
401-500 μm^2	53	53	62
501-600 μm^2	19	17	30
601-700 μm^2	06	02	07
>700 μm^2	02	01	01
Total of neurons	500	500	500

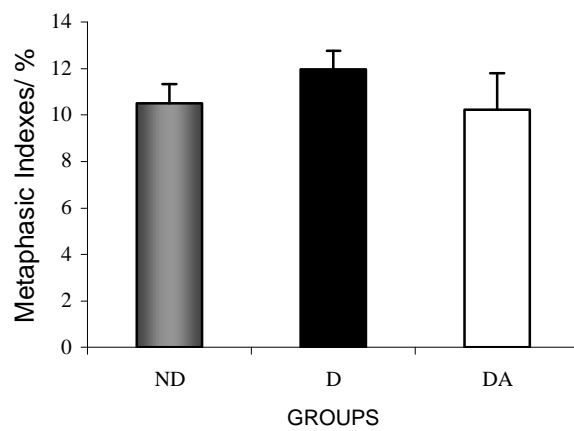


Figure 3. Metaphasic indexes (%) of animals from groups: non-diabetic (ND), diabetic (D) and diabetic-treated with ascorbic acid (DA). Mean \pm standard error (n=05). There were no significant differences when comparing the three groups by test of Tukey ($p > 0.05$).

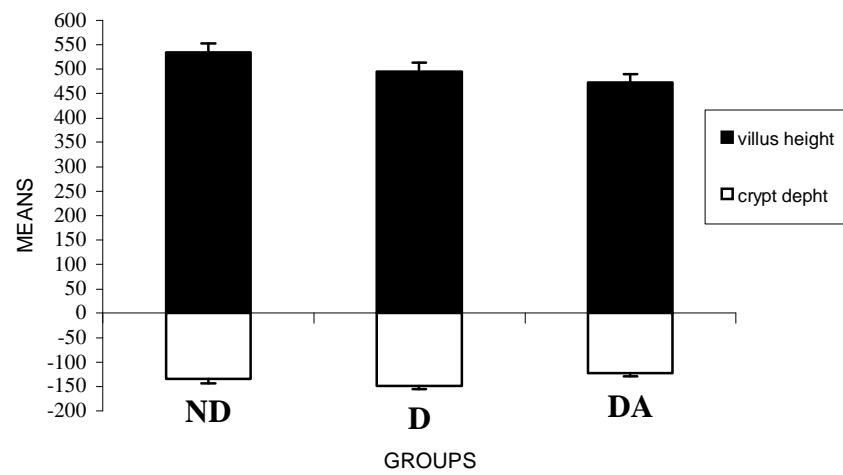


Figure 4. Villus height (μm) and crypt depth (μm) in the jejunal mucosa of animals from groups: non-diabetic (ND), diabetic (D) and diabetic-treated with ascorbic acid (DA). Mean \pm standard-error (n=5). There were no significant differences when comparing the three groups by test of Tukey ($p > 0.05$).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)