



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Suplementação com Vitamina E em Ratos com Diabetes Mellitus
Experimental: Análise dos Neurônios Mioentéricos Miosina-V e nNOS
Imunoreativos do Íleo Terminal

RENATA VIRGINIA FERNANDES PEREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jacqueline Nelisis Zanoni

MARINGÁ

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

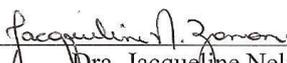
RENATA VIRGINIA FERNANDES PEREIRA

**SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E EM RATOS COM DIABETES
MELLITUS EXPERIMENTAL: ANÁLISE DOS NEURÔNIOS
MIOENTÉRICOS MIOSINA-V E
RATOS IMUNOREATIVOS DO ÍLEO TERMINAL**

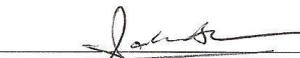
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 17 de outubro de 2007

BANCA EXAMINADORA



Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni
Universidade Estadual de Maringá



Dra. Mirian Hideco Takahashi
Universidade Estadual de Maringá



Dr. Celso Ivan Conegero
Universidade Estadual de Maringá

Agradecimentos

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... A vida é muita para ser insignificante” (Charles Chaplin)

A Deus, pela vida em primeiro lugar, e pela possibilidade de poder lutar e de vencer ao longo de mais uma caminhada.

“O amor e a verdade estão unidos entre si, como as faces de uma moeda. É impossível separá-los. São as forças mais abstratas e poderosas desse mundo”

(Mahatma Gandhi)

*Aos meus pais, **Vanildo e Elisabete**, pelos exemplos de vida, pela paciência e pelo amor incondicional.*

“A felicidade é um bem que se multiplica ao ser dividido” (Marxwell Maltz)

*A minha irmã, **Rafaela**, pela alegria, amizade e
cumplicidade constantes.*

“... Só preciso de alguém que viva por mim, que queira estar junto de mim, me abraçando... Quero poder fechar meus olhos e imaginar alguém... e poder ter a absoluta certeza de que esse alguém também pensa em mim quando fecha os olhos, que faço falta quando não estou por perto...” (Mário Quintana)

*Ao meu noivo, **Everton**, pelo apoio e compreensão, pelo companheirismo em todas as horas e, principalmente, pelo amor.*

“A arte de interrogar não é tão fácil como se pensa. É mais uma arte de mestres do que de discípulos; é preciso ter aprendido muitas coisas para saber perguntar o que não se sabe” (Jean Jacques Rousseau)

*A minha orientadora, **Jacqueline Nelisis Zanoni**, pelo exemplo de dedicação e incentivo constante, pelas palavras de sabedoria e, acima de tudo, pela amizade.*

AGRADECIMENTOS

A todos, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, fica expressa a minha gratidão...

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado e por disponibilizar os recursos necessários para a realização desta pesquisa.

A Capes, pela concessão da bolsa de Mestrado, e a Fundação Araucária, pelo auxílio institucional.

A Helena, secretária do Programa de Pós-graduação, pelo auxílio e paciência constantes.

A todos os Professores do curso de Farmácia, Análises Clínicas, e do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, que contribuíram para a minha formação e sempre me incentivaram para este caminho científico.

Ao Professores Doutores Celso Ivan Conegero, Eneri Vieira de Souza Leite Mello, Miriam Hideco Takahashi e Rubia Maria Weffort de Oliveira, por terem aceitado participar como membros das bancas de qualificação e de defesa do Mestrado, e por suas idéias e sugestões, que contribuíram para os ajustes necessários.

As Professoras de Histologia do Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Ângela, Elaine, Eneri, Luzmarina, Marli, Nilza e Raquel, pela acolhida e pelo apoio.

A Professora Doutora Rosângela Geritana Santana, pelo auxílio estatístico.

A todos os funcionários do Departamento de Ciências Morfofisiológicas, em especial a Ana Paula, Maria Euride e Maria dos Anjos, técnicas do Laboratório de Histologia, pelo apoio, disposição e amizade; e Elizete, Valéria e Valdir, do laboratório de Fisiologia, pelo auxílio técnico.

A Veriza e a minha prima Paula, pelo companheirismo e amizade constantes.

As minhas amigas Francine Oliveira, Karina, Lilian, Patrícia, Simone e Thaiz Malakoski, que estiveram comigo durante os anos do curso de graduação.

As amigas conquistadas durante o curso de Mestrado, Débora, Miriam e Regina.

Aos colegas do laboratório de Histologia, Célia Regina, Cristiano, Éder, Eleandro, Gabriela, Ivan, Janine, Luciana Patrícia, Marcelo, Mariana, Priscila de Freitas, Priscila Pereira, Sônia e Thaís.

Ao Grupo Fisioquântic, que me acolheu, incentivou e apoiou, possibilitando a conclusão de meus estudos referentes ao Mestrado.

Aos que, embora não citados, contribuíram para a realização deste estudo científico.

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

Apresentação e Resumo

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado é composta por uma Introdução Ampliada, seguindo a NBR 6027/2003 e a NBR 14724/2005, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e por um Artigo Científico completo redigido em português e em inglês, na forma exigida pela revista científica *Journal of Gastroenterology* (ISSN 0944-1174 print version e 1435-5922 electronic version), escolhida visando a sua publicação.

1	Introdução Ampliada	23
	Referências	29
2	Renata Virginia Fernandes Pereira, Marcílio Hubner de Miranda-Neto, Ivan Domicio da Silva Souza, Jacqueline Nelisis Zanoni. Suplementação com vitamina E em ratos com diabetes mellitus experimental: análise dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos do íleo terminal. <i>Journal of Gastroenterology</i>	34
3	Renata Virginia Fernandes Pereira, Marcílio Hubner de Miranda-Neto, Ivan Domicio da Silva Souza, Jacqueline Nelisis Zanoni. Vitamin E supplementation in rats under experimental diabetes mellitus: analysis of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons from the terminal ileum. <i>Journal of Gastroenterology</i>	65

RESUMO

O Sistema Nervoso Entérico é formado por uma variedade de neurônios que se organizam em dois plexos ganglionados principais, mioentérico e submucoso, responsáveis pelo controle de diversas funções gastrintestinais: motilidade, secreção, fluxo sanguíneo, crescimento mucosal e aspectos do sistema imune local. Condições patológicas, como a neuropatia diabética, estão envolvidas com alterações dos neurônios entéricos. A neuropatia autonômica é uma das complicações crônicas do diabetes mellitus (DM) e está diretamente relacionada com as manifestações gastrintestinais da doença. Alterações no número e na área do corpo celular de diferentes sub-populações de neurônios entéricos são observadas em animais diabéticos. O desequilíbrio entre antioxidantes celulares e radicais livres, com o conseqüente aumento do estresse oxidativo, é considerado um dos principais responsáveis pelas alterações neuronais provocadas pelo DM. Drogas que reduzem o estresse oxidativo podem ter um papel relevante no tratamento das complicações neurológicas do diabetes, como é o caso da vitamina E, uma substância antioxidante que atua principalmente inibindo o processo de peroxidação lipídica. Em células neuronais, a elevada concentração de vitamina E nas membranas sugere um provável efeito neuroprotetor. O trabalho teve como objetivo investigar o efeito da suplementação com vitamina E sobre a população geral de neurônios mioentéricos (miosina-V imunoreativos) e a sub-população de neurônios nitrérgicos (imunoreativos à óxido nítrico sintase neuronal - nNOS) de ratos com DM experimental. Quarenta ratos machos de 90 dias foram divididos nos grupos: normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com vitamina E (NE), diabéticos (D) e diabéticos tratados com vitamina E (DE). O DM foi induzido nos animais dos grupos D e DE através da estreptozotocina. Os animais dos grupos NE e DE receberam ração suplementada com vitamina E (1g/kg de peso corporal) durante 120 dias. Após esse período, os animais foram mortos e os íleos terminais foram submetidos às técnicas imunohistoquímicas (miosina-V e nNOS). Os animais diabéticos (D e DE) apresentaram perda de peso, níveis elevados de glicose e hemoglobina glicada, além de poliúria, polidipsia e polifagia. Análises quantitativas e morfométricas foram realizadas em imagens capturadas em objetiva de 20X da região intermediária da circunferência do íleo terminal. Quarenta imagens foram quantificadas por animal. A morfometria foi realizada através da mensuração dos corpos celulares dos neurônios (100 neurônios/animal) e da área ocupada pelo plexo terciário (10 imagens/animal). O DM promoveu redução do número de neurônios miosina-V, acompanhada do aumento da área do plexo terciário (grupo D). A suplementação com vitamina E preservou significativamente a densidade neuronal no grupo NE. Os neurônios nitrérgicos não sofreram alteração em seu número com o DM ou quando tratados com a vitamina. As áreas dos corpos celulares dos neurônios miosina-V e nNOS imunoreativos sofreram aumento com o DM. A vitamina E elevou o tamanho dos neurônios mioentéricos dos animais do grupo NE. No grupo DE, esse aumento ocorreu somente nos neurônios nitrérgicos. Concluímos que no processo de envelhecimento natural a vitamina E atuou como neuroprotetora e neurotrófica. No DM, a suplementação com a vitamina exerceu um efeito neurotrófico sobre a sub-população de neurônios mioentéricos nNOS imunoreativos.

Palavras-chave: Diabetes mellitus. Neurônios Mioentéricos. Miosina-V. Óxido Nítrico Sintase Neuronal. Vitamina E.

ABSTRACT

The Enteric Nervous System is composed by a variety of neurons organized in two ganglionated main plexus, myenteric and submucous, responsible for the control of several gastrointestinal functions: motility, secretion, blood flow, mucosal growth and aspects of the local immune system. Pathologic conditions, such as diabetic neuropathy, are involved with myenteric neurons alterations. Autonomic neuropathy is one of the chronic complications of diabetes mellitus (DM) and is directly related to gastrointestinal manifestations of the disease. Alterations in number and cell body area of different subpopulations of enteric neurons are reported in diabetic animals. The imbalance between cellular antioxidants and free radicals, with consequent elevation of oxidative stress, is considered the main responsible factor for neuronal alterations in DM. Drugs that reduce oxidative stress may play an important role in the treatment of diabetes neurological complications, like vitamin E, an antioxidant substance able to prevent lipidic peroxidation. In neuronal cells, the high concentration of vitamin E in membranes suggests a probable neuroprotective effect. The objective of this study was to investigate the effect of vitamin E supplementation on general myenteric neurons population (myosin-V immunoreactive) and on nitrergic neurons subpopulation (neuronal nitric oxide synthase immunoreactive - nNOS) of rats under experimental DM. Forty male rats 90 days-old were divided in groups: normoglycemics (N), normoglycemics treated with vitamin E (NE), diabetics (D) and diabetics treated with vitamin E (DE). Streptozotocin was administered in animals D and DE in order to induce DM. Animals in groups NE and DE received food supplemented with vitamin E (1g/kg body weight) for 120 days. After this period, the animals were killed and the terminal ileums were subjected to immunohistochemistry techniques (myosin-V and nNOS). Diabetic animals (D and DE) presented weight loss, high levels of glucose and glycated hemoglobin, beyond polyuria, polydipsia and polyphagia. Quantitative and morphometric analyses were performed with images captured in a 20X objective from the intermediate region of the ileum. Forty images per animal were counted. Morphometry was performed by the measure of neuronal cell bodies area (100 neurons/animal) and of the area occupied by the tertiary plexus (10 images/per animal). DM caused a reduction on the number of myosin-V neurons, accompanied by an increase in the area of the tertiary plexus (group D). Vitamin E supplementation promoted a significant increase in group NE neuronal density. Nitrergic neurons did not present any alteration in density as a consequence of diabetes, or when treated with the vitamin. Cell bodies area of myosin-V and nNOS immunoreactive neurons increased with DM. Vitamin E increased myenteric neurons size in animals of group NE. In group DE, this increase affected only nitrergic neurons. We conclude that in natural ageing process vitamin E acted as neuroprotective and neurotrophic. In DM, vitamin supplementation promoted a neurotrophic effect on nNOS immunoreactive myenteric neurons.

Key words: Diabetes mellitus. Myenteric Neurons. Myosin-V. Neuronal Nitric Oxide Synthase. Vitamin E.

Lista de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução Ampliada

- Figura 1 - Estrutura química das diferentes formas de vitamina E (DEBIER; LARONDELLE, 2005) 27

Artigo Científico

- Figura 1 - Neurônios mioentéricos imunoreativos à miosina-V (**A, B, C, D**) e nNOS (**E, F, G, H**) da região intermediária do íleo dos animais dos grupos normoglicêmicos (**A, E**), normoglicêmicos tratados com vitamina E (**B, F**), diabéticos (**C,G**) e diabéticos tratados com vitamina E (**D,H**). Barra de calibração: 50 µm..... 60
- Figura 2 - Densidade dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos observados em objetiva de 20X na região intermediária do íleo dos animais dos grupos normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com vitamina E (NE), diabéticos (D) e diabéticos tratados com vitamina E (DE). n = 5 ratos por grupo para cada técnica imunohistoquímica..... 61
- Figura 3 - Distribuição de freqüências relativas das áreas dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos do íleo dos animais dos grupos normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com vitamina E (NE), diabéticos (D) e diabéticos tratados com vitamina E (DE). n = 5 ratos por grupo..... 62
- Figura 4 - Distribuição de freqüências relativas das áreas dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos nitrérgicos do íleo dos animais dos grupos normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com vitamina E (NE), diabéticos (D) e diabéticos tratados com vitamina E (DE). n = 5 ratos por grupo..... 63
- Tabela 1 - Anticorpos primários e secundários utilizados nas imunoreações para miosina-V e nNOS 56

Tabela 2 - Áreas dos intestinos delgados e fatores utilizados para correção da densidade neuronal dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos do íleo dos animais dos grupos normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com vitamina E (NE), diabéticos (D) e diabéticos tratados com vitamina E (DE). n = 5 ratos por grupo..... 57

Tabela 3 - Áreas dos intestinos delgados e fatores utilizados para correção da densidade neuronal dos neurônios mioentéricos nitrérgicos do íleo dos animais dos grupos normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com vitamina E (NE), diabéticos (D) e diabéticos tratados com vitamina E (DE). n = 5 ratos por grupo..... 58

Tabela 4 - Pesos iniciais (90 dias de idade) e finais (210 dias de idade), glicemia e hemoglobina glicada dos animais dos grupos normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com vitamina E (NE), diabéticos (D) e diabéticos tratados com vitamina E (DE). n = 10 ratos por grupo..... 59

Journal Article

Figure 1 - Myosin-V (**A, B, C, D**) and nNOS (**E, F, G, H**) immunoreactive myenteric neurons from the intermediate region of the ileum of animals of groups normoglycemics (**A, E**), normoglycemics treated with vitamin E (**B, F**), diabetics (**C, G**) and diabetics treated with vitamin E (**D, H**). Calibration bar: 50 μm 90

Figure 2 - Density of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons observed in a 20X objective in the intermediate region of the ileum of animals of groups normoglycemics (N), normoglycemics treated with vitamin E (NE), diabetics (D) and diabetics treated with vitamin E (DE). n = 5 rats per group in each immunohistochemistry technique..... 91

Figure 3 - Relative frequencies distribution of cell bodies areas of myosin-V immunoreactive myenteric neurons from the ileum of animals of groups normoglycemics (N), normoglycemics treated with vitamin E (NE), diabetics (D) and diabetics treated with vitamin E (DE). n = 5 rats per group 92

Figure 4 - Relative frequencies distribution of cell bodies areas of nitrergic myenteric neurons from the ileum of animals of groups normoglycemics (N), normoglycemics treated with vitamin E (NE), diabetics (D) and diabetics treated with vitamin E (DE). n = 5 rats per group.....	93
Table 1 - Primary and secondary antibodies used in myosin-V and nNOS immunoreactions	86
Table 2 - Small intestines areas and factors used to correct the neuronal density of myosin-V immunoreactive myenteric neurons from the ileum of the animals of groups normoglycemics (N), normoglycemics treated with vitamin E (NE), diabetics (D) and diabetics treated with vitamin E (DE). n = 5 rats per group	87
Table 3 - Small intestines areas and factors used to correct the neuronal density of nitrergic myenteric neurons from the ileum of the animals of groups normoglycemics (N), normoglycemics treated with vitamin E (NE), diabetics (D) and diabetics treated with vitamin E (DE). n = 5 rats per group.....	88
Table 4 - Inicial weight (90 days-old), final weight (210 days-old), glycemia and glycated hemoglobin of the animals of groups normoglycemics (N), normoglycemics treated with vitamin E (NE), diabetics (D) and diabetics treated with vitamin E (DE). n = 10 rats per group.....	89

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO AMPLIADA	23
REFERÊNCIAS	29
2 ARTIGO CIENTÍFICO: Suplementação com vitamina E em ratos com diabetes mellitus experimental: análise dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos do íleo terminal	34
RESUMO	35
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
<i>Animais</i>	37
<i>Coleta e processamento do material</i>	38
<i>Imunolocalização da miosina-V neuronal: estudo da população geral de neurônios mioentéricos</i>	39
<i>Imunolocalização da nNOS: estudo dos neurônios mioentéricos nitrérgicos</i>	40
<i>Análise quantitativa dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos</i>	41
<i>Correção da densidade neuronal</i>	41
<i>Análise morfológica dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos</i>	42
<i>Área do plexo terciário</i>	42
<i>Análise estatística</i>	43
RESULTADOS	43
<i>Morfologia dos componentes nervosos do plexo mioentérico dos íleos submetidos às técnicas imunohistoquímicas para miosina-V e nNOS</i>	44
<i>Densidade neuronal dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos</i>	44
<i>Morfometria dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos</i>	45
<i>Área do plexo terciário</i>	45
DISCUSSÃO	46
AGRADECIMENTOS	50
REFERÊNCIAS	51
TABELAS E FIGURAS.....	56

3 JOURNAL ARTICLE: <i>Vitamin E supplementation in rats under experimental diabetes mellitus: analysis of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons from the terminal ileum</i>	65
ABSTRACT	66
INTRODUCTION	67
MATERIALS AND METHODS	68
<i>Animals</i>	68
<i>Material resection and processing</i>	69
<i>Immunolocalization of neuronal myosin-V: a study of general myenteric neurons population</i>	70
<i>Immunolocalization of nNOS: a study of nitrergic myenteric neurons</i>	71
<i>Quantitative analysis of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons</i>	72
<i>Neuronal density correction</i>	72
<i>Morphometric analysis of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons</i>	73
<i>Area of the tertiary plexus</i>	73
<i>Statistical analysis</i>	73
RESULTS.....	74
<i>Morphology of nervous components of the myenteric plexus from the ileums subjected to myosin-V and nNOS immunohistochemistry techniques</i>	74
<i>Neuronal density of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons</i>	75
<i>Morphometry of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons</i>	75
<i>Area of the tertiary plexus</i>	76
DISCUSSION.....	76
ACKNOWLEDGEMENTS	80
REFERENCES	81
TABLES AND FIGURES.....	86

Introdução Ampliada

1 INTRODUÇÃO AMPLIADA

O Sistema Nervoso Entérico (SNE) é o componente nervoso que se localiza nas camadas que formam a parede do trato gastrointestinal (TGI), estendendo-se desde as porções iniciais do esôfago até o esfíncter anal interno (BREHMER, 2006). Apresenta a habilidade de funcionar independentemente do Sistema Nervoso Central (SNC) e é formado por uma variedade de neurônios distintos funcionalmente (neurônios aferentes, interneurônios e neurônios motores), responsáveis pelo controle de todas as funções gastrointestinais, incluindo motilidade, secreção, fluxo sanguíneo, crescimento mucosal e aspectos do sistema imune local (FURNESS; COSTA, 1987).

Além do componente neuronal, o SNE é formado também por terminações axonais de neurônios extrínsecos (simpáticos e parassimpáticos) e células gliais entéricas, que se assemelham a astrócitos do SNC. Os neurônios entéricos, localizados dentro da parede do TGI, se organizam em plexos ganglionados e não-ganglionados. Os dois plexos ganglionados principais que constituem o SNE são os plexos mioentérico, cujos gânglios se localizam entre as camadas de músculo liso da túnica muscular, e o submucoso, que possui gânglios na tela submucosa (FURNESS; COSTA, 1987; BREHMER, 2006).

Os neurônios entéricos são heterogêneos quanto a papéis fisiológicos e neurotransmissores (SAFFREY, 2004). Estudos químicos, histoquímicos, imunohistoquímicos e fisiológicos comprovam a diversidade morfológica do SNE. Em relação aos neurotransmissores, as células nervosas intestinais podem expressar um número variado deste tipo de substâncias além dos clássicos acetilcolina e adrenalina/noradrenalina. Várias sub-populações neuronais podem ser distinguidas de acordo com o tipo de neurotransmissor que expressam, destacando-se: neurônios colinérgicos (acetilcolina - ACh); noradrenérgicos (noradrenalina - NE); serotonérgicos (serotonina - 5-HT); purinérgicos (adenosina trifosfato - ATP); peptidérgicos (peptídeos como polipeptídeo vasoativo intestinal - VIP, substância P, somatostatina e/ou encefalinas) e nitrérgicos (óxido nítrico - NO) (GERSHON; ERDE, 1981; OLSSON; HOLMGREN, 2001).

As células nervosas do SNE podem sofrer mudanças estruturais e/ou funcionais como resultado de respostas adaptativas a diferentes estímulos, na tentativa de manter a homeostase das funções intestinais (GIARONI et al, 1999; LOMAX; FERNANDEZ; SHARKEY, 2005). Algumas condições patológicas também estão envolvidas com alterações dos neurônios entéricos e outros neurônios autonômicos, incluindo doenças intestinais (colite ulcerativa ou

doença de Crohn), doenças extra-intestinais (doença de Parkinson) e as neuropatias entéricas, incluindo a neuropatia autonômica, promovida pelo diabetes (GIARONI et al, 1999; MICIELI et al, 2003; VINIK; FREEMAN; ERBAS, 2003).

O diabetes mellitus (DM) é um importante problema de saúde pública que, devido à sua elevada prevalência nos últimos anos, vem sendo considerado como uma epidemia mundial. Atinge não só países subdesenvolvidos, mas também Estados Unidos e Inglaterra, além de países emergentes (MAINOUS III et al, 2006). Estimativas e projeções indicam que em 2010, cerca de 23 milhões de indivíduos do mundo todo terão diabetes tipo 1 e 216 milhões, tipo 2 (McCARTY; ZIMMET, 1994). Um estudo feito nos Estados Unidos mostra que somente no país 37,7 milhões de indivíduos terão diabetes diagnosticado ou não no ano de 2031. Fatores de risco como a obesidade e o sedentarismo têm aumentado na população e contribuído para o aumento da incidência da doença (MAINOUS III et al, 2006). O DM está relacionado com morbidade considerável, além de incapacitações e encurtamento da vida útil, mortalidade prematura e altos custos para o paciente, incluindo custos psicológicos, profissionais, sociais, familiares e financeiros. Além disso, é sub-diagnosticado e inadequadamente tratado (principalmente o tipo 2).

A hiperglicemia, comum em ambos os tipos de DM (tipo 1 e 2), está fortemente relacionada com o desenvolvimento das complicações crônicas macro e microvasculares características da doença. A macroangiopatia se manifesta através da aterosclerose, que aumenta os riscos de infarto do miocárdio, derrame e/ou amputação em pacientes diabéticos. A neuropatia autonômica é uma das complicações microvasculares comuns no DM, e atinge especialmente os nervos do TGI. Está relacionada com as manifestações observadas com a evolução da doença, como disfagia ou dificuldade de deglutição, azia, vômitos, náuseas e constipação alternada com diarreia (geralmente noturna). Outros órgãos são afetados pela neuropatia autonômica, como é o caso da bexiga, que pode sofrer disfunção ou paralisia. Em homens, é comum a ocorrência de impotência ou ejaculação retrógrada. A patologia microvascular específica do DM também é caracterizada por nefropatia e retinopatia. (HARRISON, 1994; BROWNLEE, 2001; ZOCHODNE, 2007).

Os níveis elevados de glicose sanguínea provocam inicialmente anormalidades no fluxo sanguíneo e aumento irreversível da permeabilidade vascular, seguidos de diminuição de fatores tróficos para células endoteliais e neuronais (BROWNLEE, 2001). O estado hiperglicêmico também está envolvido com distúrbios no fluxo da via dos polióis, além de eventos metabólicos como glicosilação autoxidativa e glicosilação não-enzimática, que juntos induzem ao aumento do estresse oxidativo, considerado um dos principais responsáveis pelas

alterações neuronais ocasionadas pelo DM. Estudos realizados em ratos diabéticos relatam que a doença promove alterações na densidade e na área do corpo celular de neurônios entéricos de diferentes segmentos intestinais, como íleo (HERNANDES et al, 2000; ZANONI et al, 2003), colo (ROMANO; MIRANDA-NETO; CARDOSO, 1996; TASHIMA et al, 2007; ZANONI et al, 2007) e ceco (ZANONI et al, 1997). Tais alterações refletem sobre as diferentes sub-populações neuronais, incluindo os neurônios nitrérgicos (BULT et al, 1990; JARVINEN et al, 1999), que sofrem incremento da síntese de NO, podendo também ser observado aumento da área do corpo celular (ZANONI et al, 2003; FREGONESI et al, 2005).

Na via dos polióis, a enzima aldose redutase atua catalisando a redução dependente de NADPH de vários compostos carbonílicos a sorbitol, inclusive a glicose. Em concentrações normais de glicose (não diabéticos), devido à baixa afinidade da aldose redutase pela mesma, apenas um pequeno percentual do açúcar é metabolizado por esta via. Entretanto, em condições hiperglicêmicas (diabéticos), o aumento da glicose dentro de células como os neurônios (não insulino-dependentes), resulta em uma produção elevada de sorbitol, com concomitante diminuição da concentração de NADPH (BROWNLEE, 2001). A elevação de sorbitol nas células neuronais também é responsável por provocar estresse osmótico, alterações nas subunidades da proteína quinase C (PKC) e redução da atividade da Na^+/K^+ ATPase. Esta última está diretamente relacionada com o aumento do conteúdo intra-axonal de Na^+ e uma conseqüente redução da velocidade de condução nervosa (BROWNLEE, 2001; ZOCHODNE, 2007).

Além disso, a grande atividade da via dos polióis provoca redução dos níveis de glutatona (GSH), pois a glutatona redutase compete com a enzima aldose redutase pelo NADPH para regenerar a GSH (CAMERON; COTTER; MAXFIELD, 1993; PARTHIBAN et al, 1995). A GSH é um antioxidante endógeno responsável pela manutenção da homeostase iônica, à medida que atua nos tecidos impedindo a ocorrência de lesões ocasionadas por compostos reativos. Juntamente com as enzimas reparadoras glutatona peroxidase e glutatona redutase, constitui um importante sistema de proteção celular (AMORES-SÁNCHEZ; MEDINA, 1999; DINCER et al, 2002; VINCENT et al, 2004). Portanto, a redução dos níveis citossólicos de NADPH, com a conseqüente diminuição do processo de regeneração da GSH, é responsável pela indução e/ou exacerbação do estresse oxidativo intracelular (ZOCHODNE, 2007).

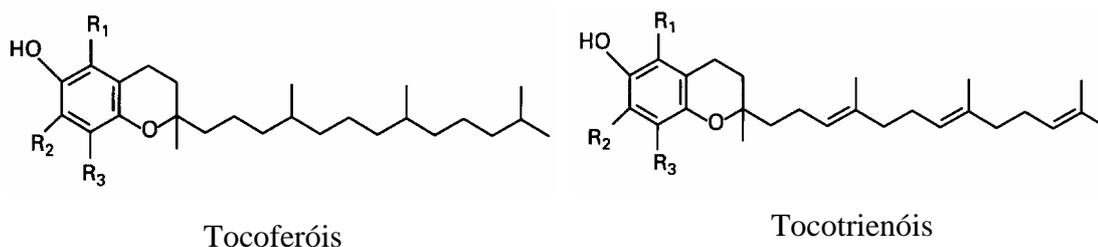
Os radicais livres são espécies oxidativas altamente reativas que causam danos irreversíveis às células, inclusive os neurônios, tais como perda das funções celulares e morte por necrose ou apoptose (IMAI; NAKAGAWA, 2002; YOSHIDA et al, 2005). Isso porque,

reagem com constituintes celulares importantes, ou seja, DNA, proteínas e lipídios das membranas (peroxidação lipídica) (ROMERO, 1996). Dentre os radicais mais importantes, estão os radicais superóxido, hidroxila, peroxila, NO e ainda o não radical peróxido de hidrogênio (KUYVENHOVEN; MEINDERS, 1999).

O desequilíbrio entre as espécies reativas oxidantes e os antioxidantes celulares durante o DM, também está envolvido na elevação do estresse oxidativo. Yoshida et al (2005), relatam que em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina, a expressão de enzimas antioxidantes endógenas como superóxido dismutase hepática, catalase e glutathione peroxidase diminui. Resultados semelhantes foram encontrados por Aksoy et al (2005) em eritrócitos, após 6 semanas de indução do DM. Os autores observaram que o diabetes promove redução dos níveis de GSH e da atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase, além do aumento da concentração de malondialdeído, um marcador do processo de peroxidação lipídica. Níveis elevados de peroxidação lipídica e de AGEs, encontrados em humanos e animais diabéticos, confirmam que o DM induz ao aumento do estresse oxidativo (ROMERO, 1996).

Drogas que reduzem o estresse oxidativo podem ter um papel relevante no tratamento das complicações neurológicas do DM, como é o caso da vitamina E, uma substância antioxidante que pode ser uma esperança promissora para o tratamento de algumas manifestações crônicas da doença.

A vitamina E apresenta oito formas naturais diferentes: α -, β -, γ -, δ -tocoferóis e α -, β -, γ -, δ -tocotrienóis. Todas têm um anel 2-metil-6-cromanol ligado a uma cadeia hidrofóbica, sendo insolúveis em água e solúveis em óleo, álcool e outros solventes orgânicos. Nos tocoferóis a cadeia isoprenóide é saturada e nos tocotrienóis é insaturada, com duplas ligações nas posições 3', 7' e 11' (Figura 1). A forma biologicamente mais ativa é o α -tocoferol (DEBIER; LARONDELLE, 2005).



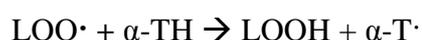
	R1	R2	R3
α	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H	CH ₃
γ	H	CH ₃	CH ₃
δ	H	H	CH ₃

Figura 1 - Estrutura química das diferentes formas de vitamina E (DEBIER; LARONDELLE, 2005)

A vitamina E atua principalmente como uma molécula antioxidante, além de exercer um importante papel no desenvolvimento e na manutenção do sistema imunológico em geral. Devido à sua atividade sobre os radicais livres, é fundamental na prevenção ou no retardo da patogênese de várias doenças degenerativas, como câncer, catarata, doenças cardiovasculares e inflamatórias, degeneração celular relacionada com o processo de envelhecimento e desordens neurológicas (PACKER, 1991; BRAMLEY et al, 2000).

A função antioxidante da vitamina E está localizada no anel cromanol. Ou seja, o grupamento hidroxila (OH) ligado ao anel fenólico da molécula é responsável por doar seu átomo de hidrogênio para os radicais livres, originando assim o radical α -tocoferil (α -T \cdot). A presença de pelo menos um grupo metil ligado ao anel aromático também é essencial para a atividade antioxidante. O fato do α -tocoferol apresentar o maior número de grupamentos metil em relação aos β -, γ - e δ -tocoferóis, o torna o homólogo biologicamente mais ativo (DEBIER; LARONDELLE, 2005).

O α -tocoferol (α -H) é a principal molécula lipídica que exerce efeito antioxidante. Ele atua principalmente no processo de peroxidação lipídica, à medida que protege os vários ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares e as lipoproteínas das reações de oxidação. Seu efeito é exercido primariamente na inibição da propagação dos radicais peróxil (LOO \cdot) através da seguinte reação:



O radical $\alpha\text{-T}\cdot$ formado é bastante estável e não reage com os ácidos graxos polinsaturados de membrana, por isso a propagação da reação de oxidação lipídica é inibida.

Vários estudos relatam o efeito benéfico da vitamina E sobre o estresse oxidativo e o processo de peroxidação lipídica no DM. Yoshida et al (2005), observaram que o tratamento com vitamina E suprime o aumento da excreção urinária de peróxido lipídico, um marcador do índice de peroxidação lipídica in vivo, após 8 e 15 semanas de DM. Também foi relatado que a vitamina inibe a oxidação protéica no fígado e nos rins de animais diabéticos (JE et al, 2001). Além disso, a combinação da vitamina E com outros antioxidantes, como o ácido ascórbico (vitamina C), exerce efeitos benéficos sobre o estresse oxidativo, como mostram Aksoy et al (2005). Os autores observaram que a associação das duas vitaminas, após 6 semanas de DM, potencializa o sistema antioxidante, à medida que promove o aumento de GSH e das enzimas superóxido dismutase e glutatona peroxidase em eritrócitos.

A neuroproteção promovida pela vitamina E, graças à sua presença em elevadas concentrações nas membranas neuronais, sujeitas à ação dos radicais livres, também vem sendo demonstrada. Estudos relatam que a vitamina atua protegendo contra a diminuição da velocidade de condução nervosa ocasionada pelo DM. Segundo Cotter et al (1995), a dosagem de 1g/kg de vitamina E protege o nervo ciático em 80% contra essa redução. A suplementação com doses farmacológicas da vitamina (900mg/dia), em pacientes diabéticos, promove uma melhora em alguns déficits existentes na condução nervosa (TUTUNCU; BAYRAKTAR; VARLI, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da suplementação com vitamina E, na forma de α -tocoferol, sobre os neurônios mioentéricos do íleo terminal de ratos (*Rattus norvegicus*) com DM experimental.

REFERÊNCIAS

AKSOY, N.; VURAL, H.; SABUNCU, T., ARSLAN, O.; AKSOY, S. Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats. **Nutrition Research**, v. 25, p. 625-630, 2005.

AMORES-SÁNCHEZ, M. I.; MEDINA, M. Á. Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 67, n. 2, p. 100-105, 1999.

BRAMLEY, P. M.; ELMADFA, I.; KAFATOS, A.; KELLY, F. J.; MANIOS, Y.; ROXBOROUGH, H. E.; SCHUCH, W.; SHEEHY, P. J. A.; WAGNER, K. H. Vitamin E. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 77, p. 913-938, 2000.

BREHMER, A. Structure of enteric neurons. **Advances in Anatomy, Embriology, and Cell Biology**, v. 186, p. 1-91, 2006.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-820, 2001.

BULT, H.; BOECKXSTAENS, G. E.; PELCKMANS, P. A.; JORDAENS, F. H.; VAN MAERCKE, Y. M.; HERMAN, A. G. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. **Nature**, v. 345, n. 6289, p. 131-132, 1990.

CAMERON, N. E.; COTTER, M. A.; MAXFIELD, E. K. Anti-oxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia**, v. 36, n. 4, p. 299-304, 1993.

COTTER, M. A.; LOVE, A.; WATT, M. J.; CAMERON, N. E.; DINES, K. C. Effects of natural free radical scavengers on peripheral nerve and neurovascular function in diabetic rats. **Diabetologia**, v. 38, n. 11, p. 1285-1294, 1995.

DEBIER, C.; LARONDELLE, Y. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. **British Journal of Nutrition**. v. 93, n. 2, p. 153-174, 2005.

DINCER, Y.; AKCAY, T.; ALADEMIR, Z.; ILKOVA, H. Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 51, n. 10, p. 1360-1362, 2002.

FREGONESI, C. E. P. T.; MOLINARI, S. L.; ALVES, Â. M. P., DEFANI, M. A., ZANONI, J. N., BAZOTTE, R. B., DE MIRANDA-NETO, M. H. Morphoquantitative aspects of nitrergic myoenteric neurons from the stomach of diabetic rats supplemented with acetyl-L-carnitine. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 34, n. 2, p. 93-97, 2005.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. **The Enteric Nervous System**. New York: Churchill Livingstone, 1987.

GERSHON, M. D.; ERDE, S. M. The nervous system of the gut. **Gastroenterology**, v. 80, n. 6, p. 1571-1594, 1981.

GIARONI, C.; DE PONTI, F.; CONSETINO, M.; LECCHINI, S.; FRIGO, G. Plasticity in the enteric nervous system. **Gastroenterology**, v. 117, n. 6, p. 1438-1458, 1999.

HARRISON, T. R. **Principles of internal medicine - Volume 2**. 13 ed. McGraw-Hill, 1994.

HERNANDES, L.; BAZOTTE, R. B.; GAMA, P.; MIRANDA-NETO, M. H. Streptozotocin-induced diabetes duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 58, n. 4, p. 1035-1039, 2000.

IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 2, p. 145-169, 2002.

JARVINEN, M. K.; WOLLMANN, W. J.; POWROZEK, T. A.; SCHULTZ, J. A.; POWLEY, T. L. Nitric oxide synthase-containing neurons in the myenteric plexus of the rat gastrointestinal tract: distribution and regional density. **Anatomy and Embryology**, v. 199, n. 2, p. 99-112, 1999.

JE, H. D.; SHIN, C. Y. PARK, H. S.; HUH, I. H.; SOHN, U. D. The comparison of vitamin C and vitamin E on the protein oxidation of diabetic rats. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 21, n. 5-6, p. 231-236, 2001.

KUYVENHOVEN, J. P.; MEINDERS, A. E. Oxidative stress and diabetes mellitus - Pathogenesis of long-term complications. **European Journal of Internal Medicine**, v. 10, n. 1, p. 9-19, 1999.

LOMAX, A. E.; FERNANDEZ, E; SHARKEY, K. A. Plasticity of the enteric nervous system during inflammation. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 17, n. 1, p. 4-15, 2005.

MAINOUS III, A. G.; BAKER, R.; KOOPMAN, R. J.; SAXENA, S.; DIAZ, V. A.; EVERETT, C. J.; MAJEED, A. Impact of the population at risk of diabetes on projections of diabetes burden in the United States: an epidemic on the way. **Diabetologia**, v. 50, n. 5, p. 934-940, 2006.

McCARTY, D.; ZIMMET, P. Z. **Diabetes 1994 to 2010: global estimates and projects**. Melbourne: International Diabetes Institute, 1994.

MICIELI, G.; TOSI, P.; MARCHESELLI, S.; CAVALLINI, A. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. **Neurological Sciences**, v. 24, n. 1, S32-S34, 2003.

OLSSON, C.; HOLMGREN, S. The control of gut motility. **Comparative Biochemistry and Physiology: CBP. Part A, Molecular and Integrative Physiology**, v. 128, n. 3, p. 481-503, 2001.

PACKER, L. Protective role of vitamin E in biological systems. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, n. 4, p. 1050S-1055S, 1991.

PARTHIBAN, A.; VIJAYALINGAM, S.; SHANMUGASUNDARAM, K. R.; MOHAN, R. Oxidative stress and the development of diabetic complications-antioxidants and lipid peroxidation in erythrocytes and cell membrane. **Cell Biology International**, v. 19, n. 12, p. 987-993, 1995.

ROMANO, E. B.; MIRANDA-NETO, M. H.; CARDOSO, R. C. S. Preliminary investigation about the effects of streptozotocin-induced chronic diabetes on the nerve cell number and size of myenteric ganglia in rat colon. **Revista Chilena de Anatomia**, v. 14, n. 2, p. 139-145, 1996.

ROMERO, F. J. Antioxidants in peripheral nerve. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 925-932, 1996.

SAFFREY, M. J. Ageing of the enteric nervous system. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, n. 12, p. 899-906, 2004.

TASHIMA, C. M.; TRONCHINI, E. A.; PEREIRA, R. V. F.; BAZOTTE, R. B.; ZANONI, J. N. Diabetic rats supplemented with L-glutamine: a study of immunoreactive myosin-V myenteric neurons and the proximal colonic mucosal. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 5, p. 1233-1241, 2007.

TUTUNCU, N. B.; BAYRAKTAR, M.; VARLI, K. Reversal of the defective nerve conduction with vitamin E supplementation in type 2 diabetes: a preliminary study. **Diabetes Care**, v. 21, n. 11, p. 1915-1918, 1998.

VINCENT, A. M.; RUSSEL, J. W., LOW, P.; FELDMAN, E. L. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 612-628, 2004.

VINIK, A. I.; FREEMAN, R.; ERBAS, T. Diabetic autonomic neuropathy. **Seminars in Neurology**, v. 23, n. 4, p. 365-372, 2003.

YOSHIDA, M.; KIMURA, H.; KYUKI, K.; ITO, M. Effect of combined vitamin E and insulin administration on renal damage in diabetic rats fed a high cholesterol diet. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 11, p. 2080-2086, 2005.

ZANONI, J. N.; PEREIRA, R. V. F.; DE FREITAS, P. Effect of the ascorbic acid treatment on the NADHD-positive myenteric neurons of diabetic rats proximal colon. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 31-38, 2007.

ZANONI, J. N.; BUTTOW, N. C.; BAZOTTE, R. B., MIRANDA-NETO, M. H. 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. **Autonomic Neuroscience**, v. 104, n. 1, p. 32-38, 2003.

ZANONI, J. N.; MIRANDA-NETO, M. H.; BAZOTTE, R. B.; SOUZA, R. R. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin diabetic rats. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 55, n. 4, p. 696-702, 1997.

ZOCHODNE, D. W. Diabetes mellitus and the peripheral nervous system: manifestations and mechanisms. **Muscle Nerve**, v. 36, n. 2, p. 144-166, 2007.

Artigo Científico

Suplementação com vitamina E em ratos com diabetes mellitus experimental: análise dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos do íleo terminal

Vitamina E e neuropatia diabética entérica

Renata Virginia Fernandes Pereira¹, Marcílio Hubner de Miranda-Neto¹, Ivan Domicio da Silva Souza¹, Jacqueline Nelisis Zanoni¹

¹Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, nº 5790 Bloco H-79 – CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

Autor para correspondência: Telefone: +55 44 32614705; Fax: +55 44 32614340; E-mail: jnzanoni@uem.br

Resumo

Objetivo. Investigar o efeito da suplementação com vitamina E sobre os neurônios mioentéricos imunoreativos à miosina-V e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) do íleo terminal de ratos diabéticos. **Métodos.** Quarenta ratos foram divididos nos grupos normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com vitamina E (NE), diabéticos (D) e diabéticos tratados com vitamina E (DE). Os animais tratados receberam ração suplementada com vitamina E (1g/kg de peso corporal) durante 120 dias. Após esse período, os íleos foram submetidos às técnicas imunohistoquímicas para miosina-V e nNOS. Foram realizadas análises quantitativas e morfométricas dos neurônios mioentéricos da região intermediária do íleo terminal. A área do plexo terciário também foi determinada. **Resultados.** O diabetes promoveu redução de 24% do número de neurônios miosina-V do grupo D em relação a N, acompanhada do aumento da área do plexo terciário ($p < 0,05$). No grupo NE, a densidade neuronal foi superior em 27%, quando comparado com N ($p < 0,05$). Os neurônios nitrérgicos não apresentaram alteração em sua densidade com o diabetes ou quando tratados com a vitamina. As áreas dos corpos celulares dos neurônios miosina-V e nNOS imunoreativos dos animais normoglicêmicos suplementados (NE) aumentaram significativamente. O diabetes (D) também promoveu a elevação da área dos neurônios mioentéricos (miosina-V e nitrérgicos). O tratamento com vitamina E (DE) promoveu aumento de tamanho somente nos neurônios nitrérgicos. **Conclusões.** A vitamina E atuou como neuroprotetora e neurotrófica no processo de envelhecimento natural. No DM, a suplementação com a vitamina exerceu um efeito neurotrófico sobre a sub-população de neurônios nNOS imunoreativos.

Palavras-chave: diabetes mellitus, neurônios mioentéricos, miosina-V, óxido nítrico sintase neuronal, vitamina E.

Introdução

A neuropatia é uma das complicações secundárias do diabetes mellitus (DM), uma das desordens metabólicas mais comuns em humanos. Vários autores têm estudado as causas da neuropatia diabética. Segundo Romero,¹ três mecanismos estão envolvidos com as modificações eletrofisiológicas dos nervos periféricos durante o DM experimental: hiperglicemia, geração de radicais livres e diminuição da atividade da Na⁺/K⁺ATPase.

A hiperglicemia crônica, característica de todas as formas de DM, apresenta uma forte ligação com a patologia microvascular específica da doença, que atinge não só os nervos periféricos, mas também a retina e os glomérulos renais, provocando neuropatias debilitantes, cegueira e doenças renais, respectivamente.²

A geração de radicais livres e o decréscimo das defesas antioxidantes endógenas durante o DM, também estão diretamente relacionados com as alterações micro e macrovasculares (doença aterosclerótica), consideradas as principais causas de morbidade e mortalidade dos pacientes diabéticos.³ A enzima reparadora glutatona peroxidase é um exemplo de antioxidante endógeno que sofre diminuição com o DM, pois é inativada precocemente nos nervos periféricos através de reações de glicosilação não enzimáticas.¹ Níveis elevados de peroxidação lipídica e de produtos de glicoxidação em humanos e animais com diabetes confirmam a indução e/ou o aumento do estresse oxidativo pela doença.⁴

No trato gastrintestinal, o desenvolvimento da neuropatia atinge os diferentes tipos de neurônios entéricos, responsáveis pelo controle de importantes funções, como motilidade, secreção, fluxo sanguíneo, crescimento mucosal e aspectos do sistema imune local.⁵ Conseqüentemente, as alterações neurológicas que atingem o Sistema Nervoso Entérico estão relacionadas com manifestações gastrintestinais que incluem constipação, diarreia ou incontinência fecal, disfagia, azia, vômitos e náuseas.^{6,7}

Estudos realizados mostram que o DM reduz o número de neurônios mioentéricos⁸⁻¹¹ e provoca mudanças na área do corpo celular.¹²⁻¹⁵ As sub-populações neuronais são afetadas diferentemente pela doença, sendo observado um incremento do conteúdo de peptídeo vasoativo intestinal (VIP) e de óxido nítrico sintase (NOS) no plexo mioentérico, após 8 semanas de DM.¹⁶ As sub-populações neuronais também respondem de maneira diferenciada aos diversos tratamentos para a neuropatia diabética.^{17,18}

Substâncias com ação antioxidante têm sido testadas com o intuito de proteger os neurônios mioentéricos no DM experimental, como é o caso do ácido ascórbico,^{12,13} da aminoguanidina¹⁶ e da glutamina.¹¹ Entretanto, poucos estudos foram feitos relacionando o efeito da vitamina E, um potente antioxidante lipossolúvel, com a neuropatia diabética.

A vitamina E atua sobre o processo de peroxidação lipídica, protegendo os ácidos graxos polinsaturados contra o ataque de radicais livres.¹⁹ Sua presença nas membranas celulares neuronais, em especial na membrana mitocondrial interna, torna o seu uso interessante no DM. O objetivo do trabalho foi investigar os efeitos da suplementação com vitamina E sobre a população geral de neurônios mioentéricos (miosina-V imunoreativos) e a sub-população de neurônios nitrérgicos (imunoreativos à óxido nítrico sintase neuronal - nNOS) do íleo terminal de ratos com DM experimental.

Materiais e Métodos

Animais

Todos os procedimentos descritos no presente trabalho estão de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram

previamente submetidos à análise pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Para a realização da pesquisa, foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério Central da UEM. Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo eles: normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com vitamina E (NE), diabéticos (D) e diabéticos tratados com vitamina E (DE).

A partir dos 90 dias de idade, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais por um período de 120 dias em biotério, com foto-período de 12 horas (6:00 – 18:00) e temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), recebendo água e alimento *ad libitum*. Os animais não tratados (grupos N e D) receberam ração padrão balanceada Nuvital (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). Para a suplementação experimental dos ratos pertencentes aos grupos NE e DE, a vitamina E (Zhejiang NHU, China) foi incorporada à ração padrão (1g/kg de peso corporal).²⁰ Para calcular a quantidade de vitamina E a ser adicionada ao alimento, o peso dos animais e a quantidade de ração ingerida foram mensurados a cada 15 dias.

O DM foi induzido nos animais dos grupos D e DE após jejum prévio de 14 horas, através de uma injeção intravenosa de estreptozotocina (35mg/kg de peso corporal; Sigma, St. Louis, MO, EUA) dissolvida em uma solução de tampão citrato pH 4,5 (10mM). Posteriormente à indução, a glicemia dos animais foi determinada pelo método da glicose oxidase²¹ para confirmar o estabelecimento do modelo experimental. Todos os animais pertencentes aos grupos D e DE apresentaram glicemia superior a 250mg/dl.

Coleta e processamento do material

Após 120 dias de experimento os animais foram mortos, sendo previamente pesados e anestesiados com uma dose de 40mg/kg de peso corporal de tiopental (Laboratórios Abbott,

Chicago, IL, EUA) intraperitoneal. O sangue foi coletado para mensuração da glicemia e da hemoglobina glicada (método da resina de troca iônica).²² Os íleos provenientes de vinte animais (cinco para cada grupo experimental) foram coletados e processados de acordo com a técnica imunohistoquímica para miosina-V, sendo os outros vinte processados para a nNOS.

Imunolocalização da miosina-V neuronal: estudo da população geral de neurônios mioentéricos

Os animais foram perfundidos com solução salina 1,1% gelada, seguida de solução fixadora contendo periodato de sódio (10mM), lisina (75mM) e paraformaldeído (1%) em tampão fosfato pH 7,4 (37mM).²³ Imediatamente após a perfusão, os íleos foram removidos, lavados com solução salina até a remoção completa das fezes, inflados com a mesma solução fixadora, tomando cuidado para não promover a distensão dos segmentos, e amarrados nas extremidades com linha de algodão. Após este procedimento, foram mantidos no fixador por uma hora, sendo na seqüência desidratados em álcool (50%, 70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol e reidratados em série descendente de álcoois (100%, 95%, 90%, 80% e 70%). Os segmentos intestinais foram dissecados sob estereomicroscópio com trans-illuminação para a obtenção de preparados totais da túnica muscular, através da remoção da tela mucosa e da túnica submucosa. Os preparados de membrana obtidos foram submetidos à técnica para evidenciação dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos,²⁴ como descrito a seguir.

Os preparados foram lavados quatro vezes em tampão fosfato salinado pH 7,4 (PBS) (0,1M) e bloqueados por uma hora e meia em solução contendo albumina soro bovina (BSA; Sigma) (2%), soro de cabra (1:50), Triton X-100 (Sigma) (0,5%) e PBS. Seqüencialmente, foram incubados em temperatura ambiente em solução contendo o anticorpo primário

específico para a cauda medial da miosina-V (Tabela 1). Após quarenta e oito horas, foram lavados duas vezes em solução de PBS e Triton X-100 (0,1%), e duas vezes em solução de PBS acrescida de Tween-20 (0,05%). A seguir, os tecidos foram incubados em anticorpo secundário (Tabela 1) por vinte e quatro horas em temperatura ambiente. Por último, foram lavados quatro vezes com PBS acrescido de Tween-20 (0,05%). A imunoreação foi revelada com diaminobenzidina (DAB; Sigma) e as amostras foram montadas em meio de glicerol-gel. O controle negativo foi realizado com a omissão do anticorpo primário.

Imunolocalização da nNOS: estudo dos neurônios mioentéricos nitrérgicos

Após a morte dos animais, os íleos foram coletados, lavados com PBS pH 7,4 (0,1M) e inflados com solução de Zamboni.²⁵ Em seguida, foram fixados por dezoito horas na mesma solução. Ao final deste período, os segmentos foram abertos ao longo da borda mesentérica e sucessivamente lavados em álcool 80% até a remoção completa do fixador. Foram realizadas a desidratação em álcool (95% e 100%), a diafanização em xilol e a reidratação em série descendente de álcoois (100%, 90%, 80%, 50%) e PBS, ao final. A seguir, foi realizada a dissecação para obtenção dos preparados totais da túnica muscular. Os preparados de membrana foram submetidos à técnica imunohistoquímica para evidenciação dos neurônios mioentéricos nitrérgicos,²⁶ como descrito a seguir.

Os preparados de membrana foram inicialmente lavados por três vezes em PBS acrescido de Triton X-100 (0,5%). Em seguida, foram incubados em BSA (1% em PBS) durante uma hora. Seqüencialmente ao bloqueio, os tecidos foram incubados durante quarenta e oito horas em temperatura ambiente em anticorpo primário específico para a nNOS (Tabela 1). Os tecidos foram lavados por três vezes em PBS e incubados com o anticorpo secundário (Tabela 1) por duas horas em temperatura ambiente. A seguir foram realizadas três lavagens

sucessivas em PBS. Por último, as membranas foram incubadas com o complexo ABC avidina-biotina-peroxidase (1:1500) por uma hora, sendo na seqüência reveladas com DAB contendo H₂O₂ (0,02%) e montadas em lâmina com glicerol-gel. O controle negativo foi realizado com a omissão do anticorpo primário.

Análise quantitativa dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos

A quantificação dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos foi realizada através de imagens obtidas por amostragem da região intermediária (60° - 120°; 240° - 300°) da circunferência do íleo de cada animal, considerando-se 0° como a inserção do mesentério.²⁷

As imagens foram capturadas por câmera de alta resolução AxioCam (Zeiss, Jena, Alemanha) acoplada ao microscópio de luz Axioskop Plus (Zeiss), transferidas para microcomputador por meio do programa AxioVision 4 versão 4.1 e gravadas em compact disc (CD). O software de análise de imagens Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) foi utilizado para a realização da quantificação neuronal nas imagens gravadas em CD.

Para cada animal foram contados todos os neurônios presentes em 40 imagens, capturadas em objetiva de 20X. A área de cada imagem, mensurada através do Image-Pro Plus, foi de aproximadamente 0,14mm². Os resultados foram expressos como o número de neurônios por cm².

Correção da densidade neuronal

Os resultados obtidos para a quantificação neuronal devem ser corrigidos, uma vez que alterações no tamanho do intestino, provocadas pelo crescimento intestinal com o processo de

envelhecimento natural e/ou por processos patológicos, podem “diluir” o número de neurônios presentes na área analisada.

Para a correção da densidade neuronal obtida para as duas técnicas imunohistoquímicas empregadas, foi calculado um fator pelo qual os resultados quantitativos foram multiplicados. Para a obtenção do fator de correção, a área média em cm^2 do intestino delgado de cada grupo estudado foi calculada através das medidas do comprimento e da largura intestinais, extraídas logo após a morte de cada animal (Tabelas 2 e 3).²⁸

Análise morfométrica dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos

A mensuração das áreas dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos foi realizada nas mesmas imagens, capturadas em objetiva de 20X, utilizadas para a análise quantitativa. Através do Image-Pro Plus foram mensuradas as áreas em μm^2 de 100 corpos celulares de neurônios para cada animal estudado, totalizando 500 por grupo, e para cada uma das duas técnicas imunohistoquímicas de evidênciação neuronal.

Área do plexo terciário

A área ocupada pelo plexo terciário foi determinada utilizando as imagens capturadas em objetiva de 20X imunomarcadas para a proteína miosina-V. A mensuração foi realizada em 10 imagens por animal através do Image-Pro Plus.

Para obter a área ocupada pelo plexo terciário em μm^2 , foram mensuradas as regiões localizadas entre os gânglios e fibras que compõem os plexos primário e secundário. Os resultados foram expressos como o percentual de área total de cada imagem ($137.670 \mu\text{m}^2$) ocupado pelo plexo terciário.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos às análises estatísticas através dos programas Statistica e GraphPad Prism, sendo expressos como média \pm erro padrão. Foi realizado o delineamento em blocos dos dados morfométricos, seguido de Teste de Tukey. Para os demais resultados, foi realizada análise de variância One-way ANOVA, seguida de Tukey. O nível de significância usado foi de 5%.

Resultados

A estrepto-zotocina promoveu a síndrome diabética nos animais dos grupos D e DE, que apresentaram o quadro clínico característico da doença ao longo de todo o experimento: poliúria, polidipsia e polifagia. Também foram observados após 120 dias, aumento significativo da glicemia e da hemoglobina glicada, além de redução do peso corporal em relação aos animais normoglicêmicos (Tabela 4).

A suplementação com vitamina E não promoveu alteração significativa nos níveis glicêmicos e na hemoglobina glicada. Por outro lado, os animais do grupo DE apresentaram uma menor perda de peso em relação aos animais diabéticos não tratados ($p > 0,05$) (Tabela 4).

As áreas dos intestinos delgados dos animais diabéticos (grupos D e DE) utilizados para as técnicas da miosina-V e nNOS apresentaram um aumento médio de 33% ($p < 0,05$) e 32% ($p > 0,05$) respectivamente, quando comparadas aos valores médios obtidos com as áreas intestinais dos grupos N e NE (Tabelas 2 e 3).

Morfologia dos componentes nervosos do plexo mioentérico dos íleos submetidos às técnicas imunohistoquímicas para miosina-V e nNOS

A técnica imunohistoquímica da miosina-V permitiu a evidenciação dos componentes primário, secundário e das fibras de pequeno calibre que constituem o componente terciário do plexo mioentérico do íleo. Foram observados corpos celulares de neurônios contidos nos gânglios nervosos e/ou ao longo das fibras interganglionares. Uma intensidade de marcação imunohistoquímica heterogênea dos corpos celulares de neurônios que expressam para a proteína miosina-V também foi visualizada. Os neurônios pertencentes aos animais diabéticos (grupos D e DE) encontravam-se menos intensamente marcados do que os dos animais normais (grupos N e NE) (Figura 1).

Corpos celulares de neurônios intensamente marcados foram visualizados nos preparados totais de membrana provenientes de todos os grupos de animais e submetidos à técnica imunohistoquímica para nNOS. Os neurônios encontravam-se isolados ou ocupando a parte periférica dos gânglios mioentéricos. Os componentes primário e secundário foram facilmente visualizados. Pequenas varicosidades foram observadas ao longo das fibras do plexo terciário (Figura 1).

Densidade neuronal dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos

O DM promoveu uma redução do número de neurônios miosina-V em 24% no grupo D em relação aos animais normoglicêmicos (grupo N) ($p < 0,001$). Os animais diabéticos tratados (grupo DE) apresentaram uma densidade neuronal superior ao grupo D em 12% ($p > 0,05$). Nos animais normoglicêmicos suplementados (grupo NE) a densidade neuronal foi superior em 21,2% em relação à encontrada no grupo N ($p < 0,001$) (Figura 2).

Não houve alterações na densidade dos neurônios nitrérgicos quando todos os grupos foram comparados ($p > 0,05$) (Figura 2).

Morfometria dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos

As áreas médias dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos dos grupos N, NE, D e DE foram de $270,8 \pm 5,0$; $313,6 \pm 5,5$; $309,2 \pm 5,3$ e $299,9 \pm 5,1 \mu\text{m}^2$, respectivamente. Houve diferença significativa quando foram comparados os grupos N e NE ($p < 0,05$). Os corpos celulares dos neurônios nitrérgicos apresentaram áreas estatisticamente diferentes quando todos os grupos foram comparados ($p < 0,05$): N ($253,8 \pm 3,9 \mu\text{m}^2$), NE ($287,9 \pm 4,5 \mu\text{m}^2$), D ($311,1 \pm 4,8 \mu\text{m}^2$) e DE ($346,1 \pm 5,0 \mu\text{m}^2$).

Através das frequências relativas, foi possível verificar que os corpos celulares dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos encontravam-se em uma faixa média de tamanho que varia de 201 a $300 \mu\text{m}^2$ (Figuras 3 e 4).

Área do plexo terciário

Os percentuais de área total ($137.670 \mu\text{m}^2$) que foram ocupados pelo plexo terciário dos animais dos grupos N e NE foram de $81 \pm 0,6\%$ e $81 \pm 2,1\%$, respectivamente ($p > 0,05$). O DM alterou significativamente a área do plexo terciário em 7% nos animais do grupo D ($88 \pm 0,5\%$), quando foram comparados com os normoglicêmicos (grupo N) ($p < 0,01$). Não houve diferenças significativas entre os grupos D e DE ($86 \pm 0,7\%$).

Discussão

A administração de estreptozotocina promoveu nos animais diabéticos (grupos D e DE) as alterações típicas da doença, incluindo poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso e níveis elevados de glicose sanguínea e hemoglobina glicada. O tratamento com vitamina E não exerceu efeito sobre estes parâmetros nos animais pertencentes aos grupos NE e DE.

Todas as densidades neuronais obtidas em nosso trabalho foram corrigidas através de fator de correção calculado a partir da área intestinal, o que assegurou que os resultados quantitativos encontrados foram devidos às possíveis intercorrências da patologia do DM, e não a uma dispersão neuronal. Os animais do grupo D utilizados para o estudo dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos apresentaram um aumento médio em suas áreas de aproximadamente 41% e 30% respectivamente, em relação a N, confirmando que o diabetes promove alterações no tamanho do intestino delgado.^{29,30} O aumento da expressão de neurotransmissores inibitórios com a evolução do DM, como VIP e óxido nítrico (NO),¹⁶ com o conseqüente relaxamento da musculatura lisa do trato gastrointestinal, é uma provável hipótese para explicar este fato.

No presente estudo, a marcação da população geral de neurônios mioentéricos foi realizada através de imunoreação envolvendo um anticorpo primário específico para a miosina-V, uma proteína motora encontrada nos corpos celulares e prolongamentos neuronais.³¹ Diferentes intensidades de marcação foram observadas nesta técnica nos quatro grupos de animais. Essa heterogeneidade pode estar relacionada com atividades neuronais diversas.²⁴ Segundo Tashima et al.,¹¹ que observaram resultados semelhantes, a diminuição na intensidade de marcação em animais diabéticos pode ter sido ocasionada por uma redução do conteúdo da proteína miosina-V no tecido nervoso.

Uma densidade neuronal de 37.005 ± 1379 neurônios miosina-V imunoreativos/cm² foi observada nos animais normoglicêmicos (grupo N). No grupo NE (46.987 ± 700 neurônios/cm²), o número de neurônios foi superior em 21,2%. Nossos resultados para a densidade neuronal foram discutidos em proporções (%) e não em números absolutos, pois utilizamos para a análise quantitativa uma objetiva panorâmica de 20X. Zaroni et al.,¹³ em um estudo feito no íleo, relataram redução do número de neurônios mioentéricos em decorrência do processo de envelhecimento natural. Essa diminuição da densidade foi observada pelos autores na proporção de 24,3%. A suplementação com vitamina E, no nosso caso, foi efetiva na condição de envelhecimento natural, pois conservou os neurônios mioentéricos no grupo NE, sugerindo uma atividade neuroprotetora da substância nesta condição. Esse fato se deve à propriedade antioxidante exercida pela vitamina E,^{32,33} que reduz a quantidade de radicais livres, considerados os principais causadores da morte neuronal, por provocarem lesões da membrana celular e fragmentação do DNA.¹

Os resultados encontrados para o grupo D ($28.312 \pm 1172/cm^2$) demonstraram que o DM promoveu uma redução de 24% no número de neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos, em relação ao grupo N ($p < 0,001$). Diversos estudos realizados anteriormente apresentaram resultados semelhantes em diferentes segmentos gastrintestinais, incluindo o estômago,¹⁴ o íleo^{8,13} e o colo proximal.⁹⁻¹¹ O DM é comprovadamente uma patologia que promove alterações no Sistema Nervoso Entérico, em especial, afetando os neurônios do plexo mioentérico. Um importante fator relacionado à neuropatia diabética é o estresse oxidativo,³⁴ que é elevado no DM.³⁵ A concomitante redução das defesas antioxidantes, que incluem as vitaminas A, C e E, além da glutatona e da glutatona peroxidase, contribui para este processo.³⁶

Os dados obtidos para o percentual de área total ocupado pelo plexo terciário, confirmaram os resultados verificados para o número de neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos.

Uma vez que, uma menor densidade neuronal foi acompanhada por uma maior área do componente terciário, composto por axônios que inervam a túnica muscular longitudinal, situados entre os componentes primário e secundário do plexo mioentérico.³⁷

O tratamento com vitamina E (grupo DE = 31.597 ± 1357 neurônios/cm²) resultou em um número de neurônios miosina-V superior em 12% em relação ao grupo D. A preservação da densidade neuronal no grupo DE foi de 50%, em relação à perda de neurônios sofrida pelos animais diabéticos (grupo D), em decorrência da patologia. Cotter et al.,²⁰ utilizando a mesma dose de vitamina E de nosso experimento, obtiveram uma prevenção na redução da velocidade de condução nervosa motora provocada pelo DM. Segundo o autor, os níveis de glicemia observados no diabetes experimental e o conseqüente aumento de radicais livres, são excessivamente superiores ao verificado em pacientes com diabetes relativamente controlado. Isso pode explicar porque uma neuroproteção estatisticamente significativa, exercida pela vitamina E, não foi observada em nossos animais.

Os neurônios nitrérgicos, ou seja, que expressam o NO, produzido a partir da reação catalisada pela nNOS, exercem um importante efeito inibitório sobre a musculatura lisa gastrintestinal.³⁸ Em nosso experimento, verificamos que o número de neurônios nitrérgicos obtido para o grupo de animais normoglicêmicos (grupo N) foi de 8.693/cm², o que equivale a 23,5% da densidade neuronal total do plexo mioentérico, obtida pela técnica da miosina-V (37.005 neurônios/cm²). Esses resultados foram semelhantes aos verificados por Cracco e Filogamo,³⁹ Miranda Neto et al.⁴⁰ e Zanoni et al.,²⁷ que observaram uma proporção de 24%, 21% e 25,5%, respectivamente.

As densidades obtidas para os neurônios nitrérgicos foram similares em todos os grupos estudados ($p > 0,05$), mostrando uma maior resistência por parte desta sub-população neuronal à ação dos radicais livres, presentes em concentrações elevadas durante o estado hiperglicêmico característico do DM. Esses resultados coincidiram com aqueles descritos na

literatura para o estômago,¹⁴ o íleo^{13,26} e o colo distal.⁴¹ Um comportamento semelhante ao que ocorre em situações patológicas como o DM é observado no processo de envelhecimento natural, uma vez que os neurônios imunoreativos a nNOS sobrevivem com a idade.^{27,42,43} Um outro fator a ser considerado em relação à resistência dos neurônios mioentéricos nitrérgicos dos ratos diabéticos (grupo D), se deve ao fato de que quando calculamos a proporção relativa destas células em relação aos neurônios miosina-V imunoreativos (população geral), verificamos um valor de 38,2%. Esse dado é mais um indício de que outras sub-populações neuronais são afetadas pelo DM, enquanto que os neurônios nitrérgicos sobrevivem. Por outro lado, a proporção relativa de neurônios nitrérgicos do grupo DE foi de 27,9%, semelhante ao observado nos animais normoglicêmicos (grupo N).

As áreas dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos sofreram um aumento de aproximadamente 14% no grupo D em relação aos animais normais (grupo N), indicando uma provável alteração da atividade neuronal induzida pelo DM. A vitamina E não alterou significativamente o tamanho dos neurônios miosina-V dos animais do grupo DE quando comparados com D.

Nossos resultados demonstraram que a área (em μm^2) do corpo celular dos neurônios nitrérgicos dos animais diabéticos (grupo D) foi superior em 18,4% em relação aos normoglicêmicos (grupo N) ($p < 0,05$). Esses dados foram concordantes com aqueles obtidos por Fregonesi et al.¹⁴ no estômago e, Zanoni et al.¹³ e Shotton et al.¹⁵ no íleo, que também observaram um aumento das áreas dos neurônios nitrérgicos. Segundo Fregonesi et al.,¹⁴ o aumento da síntese de NO pelos neurônios, na tentativa de compensar a menor disponibilidade de NADPH para a enzima nNOS no diabetes, é uma provável hipótese para o aumento do corpo celular dos neurônios nitrérgicos. Este fato, pode ser confirmado através da expressão aumentada da enzima nNOS no DM, como observado por Adegathe et al.⁴⁴ por meio de técnica de Western blotting. Shotton et al.^{16,17} também verificaram aumento da

atividade desta enzima, por meio de detecção radioquímica da mesma. Em nosso experimento, esse aumento foi verificado através da mensuração da área do corpo celular. A suplementação com vitamina E promoveu uma elevação significativa da área dos neurônios nitrérgicos do grupo DE em relação a D. Em nível especulativo, esse resultado pode ter sido decorrente de um efeito compensatório, como consequência da menor proporção relativa da densidade neuronal nesse grupo.

Concluimos que, no processo de envelhecimento natural, a vitamina E atuou como neuroprotetora e neurotrófica. No DM, a suplementação com a vitamina exerceu um efeito neurotrófico sobre os neurônios nNOS imunoreativos. Não podemos descartar a atividade neuroprotetora da vitamina E sobre a neuropatia diabética, pois dosagens superiores à utilizada neste experimento deverão ser testadas.

Agradecimentos

Agradecemos ao excelente apoio de Ana Paula de Santi Rampazzo, Maria Euride do Carmo Cancino, Maria dos Anjos Fortunato, Valdir Trombeli e, à Prof.^a Dr.^a Rosângela Geritana Santana, pelo auxílio estatístico. Este trabalho foi apoiado através de fundos da Fundação Araucária (Convênio nº 064/2007) e da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Brasil.

Referências

1. Romero FJ. Antioxidants in peripheral nerve. *Free Radic Biol Med* 1996;20:925-32.
2. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.
3. Son SM. Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77:S65-S70.
4. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40:405-12.
5. Furness JB, Costa M. The enteric nervous system. New York: Churchill Livingstone; 1987.
6. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, et al. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 1993;43:817-24.
7. Zochodne DW. Diabetes mellitus and the peripheral nervous system: manifestations and mechanisms. *Muscle Nerve* 2007;36:144-66.
8. Hernandez L, Bazotte RB, Gama P, Miranda-Neto MH. Streptozotocin-induced diabetic duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons. *Arq Neuropsiquiatr* 2000;58:1035-9.
9. Furlan MM, Molinari SL, Miranda Neto MH. Morphoquantitative effect of acute diabetes on the proximal colon of adult rats. *Arq Neuropsiquiatr* 2002;60:576-81.
10. Zanoni JN, Pereira RVF, Freitas P. Effect of the ascorbic acid treatment on the NADHd positive myenteric neurons of diabetic rats proximal colon. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2007;50:31-8.

11. Tashima CM, Tronchini EA, Pereira RV, Bazotte RB, Zanoni JN. Diabetic rats supplemented with L-glutamine: a study of immunoreactive myosin-V myenteric neurons and the proximal colonic mucosal. *Dig Dis Sci* 2007;52:1233-41.
12. Zanoni JN, Hernandez L, Bazotte RB, Miranda Neto MH. Terminal ileum submucous plexus: Study of VIP-ergic neurons of diabetic rats treated with ascorbic acid. *Arq Neuropsiquiatr* 2002;60:32-7.
13. Zanoni JN, Buttow NC, Bazotte RB, Miranda Neto MH. 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* 2003;104:32-8.
14. Fregonesi CE, Molinari SL, Alves AM, Defani MA, Zanoni JN, Bazotte RB, et al. Morphoquantitative aspects of nitrergic myoenteric neurons from the stomach of diabetic rats supplemented with acetyl-L-carnitine. *Anat Histol Embryol* 2005;34:93-7.
15. Shotton HR, Lincoln J. Diabetes only affects nitric oxide synthase-containing myenteric neurons that do not contain heme oxygenase 2. *Brain Res* 2006;1068:248-56.
16. Shotton HR, Adams A, Lincoln J. Effect of aminoguanidine treatment on diabetes-induced changes in myenteric plexus of rat ileum. *Auton Neurosci* 2007;132:16-26.
17. Shotton HR, Clarke S, Lincoln J. The effectiveness of treatments of diabetic autonomic neuropathy is not the same supplying different organs. *Diabetes* 2003;52:157-64.
18. Shotton HR, Broadbent S, Lincoln J. Prevention and partial reverse of diabetes-induced changes in enteric neurons of the rat ileum by combined treatment with alpha-lipoic and evening primrose oil. *Auton Neurosci* 2004;111:57-65.
19. Yoshida M, Kimura H, Kyuki K, Ito M. Effect of combined vitamin E and insulin administration on renal damage in diabetic rats fed a high cholesterol diet. *Biol Pharm Bull* 2005;28:2080-6.

20. Cotter MA, Love A, Watt MJ, Cameron NE, Dines KC. Effects of natural free radical scavengers on peripheral nerve and neurovascular function in diabetic rats. *Diabetologia* 1995;38:1285-94.
21. Bergmeyer HE; Bernet E. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase. New York: Methods of enzymatic analysis; 1974.
22. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A. Correlation of glucose relation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1976;295:417-20.
23. McLean IW, Nakane PK. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new version for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1974;22:1077-83.
24. Drengk AC, Kajiwara JK, Garcia SB, Carmo VC, Larson RE, Zucoloto S, et al. Immunolocalisation of myosin-V in the enteric nervous system of the rat. *J Auton Nerv Syst* 2000;78:109-112.
25. Stefanini M, De Martino C, Zamboni L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 1967;216:173-4.
26. Wrzos HF, Cruz A, Polavarapu R, Shearer D, Ouyang A. Nitric oxide synthase (NOS) expression in the myenteric plexus of streptozotocin-diabetic rats. *Dig Dis Sci* 1997;42:2106-10.
27. Zaroni JN, De Freitas P, Pereira RVF, Dos Santos Pereira MA, De Miranda Neto, MH. 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* 2005;34:149-53.
28. Cowen T, Johnson RJ, Soubeyre V, Santer RM. Restricted diet rescues rat enteric motor neurons from age related cell death. *Gut* 2000;47:653-60.

29. Lincoln J, Bokor JT, Crowe R, Griffith SG, Haven AJ, Burnstock G. Myenteric plexus in streptozotocin-treated rats. Neurochemical and histochemical evidence for diabetic neuropathy in the gut. *Gastroenterology* 1984;86:654-61
30. Schmidt RE. Neuropathology and pathogenesis of diabetic autonomic neuropathy. *Int Rev Neurobiol* 2002;50:257-92.
31. Cheney RE, O'Shea MK, Heuser JE, Coelho MV, Wolenski JS, Espreafico EM, et al. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* 1993;75:13-23
32. Packer L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr* 1991;53:1050S-1055S.
33. Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios Y, Roxborough HE, et al. Vitamin E. *J Sci Food Agric* 2000;80:913-938.
34. Vinson JA, Staretz Me, Bose P, Kassm HM, Basalyga BS. In vitro and in vivo reduction of erythrocyte sorbitol by ascorbic acid. *Diabetes* 1989;38:1036-41.
35. Cameron NE, Cotter MA. Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 1999;45:137-46.
36. Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 2005;59:365-73.
37. Lepard KJ. Choline acetyltransferase and inducible nitric oxide synthase are increased in myenteric plexus of diabetic guinea pig. *Auton Neurosci* 2005;118:12-24.
38. Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990;345:346-7.
39. Cracco C, Filogamo G. Quantitative study of the NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons of the rat ileum. *Neuroscience* 1994;61:351-9.

40. Miranda Neto MH, Molinari SL, Natali Mr, Sant'Ana DM. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of the neuronal evidentiatio. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59:54-9.
41. Yoneda S, Kadowaki M, Kuramoto H, Fukui H, Takaki M. Enhanced colonic peristalsis by impairment of nitrergic enteric neurons in spontaneously diabetic rats. *Auton Neurosci* 2001;92:65-71.
42. Santer RM. Survival of the population of the NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. *J Auton Nerv Syst* 1994;49:115-21.
43. Belai A, Cooper S, Burnstock G. Effect of age on NADPH-diaphorase-containing myenteric neurons of rat ileum and proximal colon. *Cell Tissue Res* 1995;279:379-83.
44. Adeghate E, al-Ramadi B, Saleh AM, Vijayarasathy C, Ponery AS, Arafat K, et al. Increase in neuronal nitric oxide synthase content of the gastroduodenal tract of diabetic rats. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1172-9.

Tabela 1. Anticorpos primários e secundários utilizados nas imunoreações para miosina-V e nNOS

Primário	Hospedeiro	Dose	Empresa	Secundário	Dose	Empresa
Miosina-V	Coelho	1:750	Doado pela Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil	Anticoelho conjugado com peroxidase (1µg/ml)	1:1000	Pierce, Rockford, IL, EUA
nNOS	Coelho	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA	Anticoelho biotinilado	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA

Tabela 2. Áreas dos intestinos delgados e fatores utilizados para correção da densidade neuronal dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos do íleo dos animais dos grupos normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com vitamina E (NE), diabéticos (D) e diabéticos tratados com vitamina E (DE). n = 5 ratos por grupo

	Área (cm ²)	Fator de Correção
N	146 ± 16,5 ^a	Padrão
NE	190 ± 12,8 ^a	1,30
D	246 ± 32,9 ^b	1,68
DE	256 ± 7,7 ^b	1,75

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (p < 0,05)

Tabela 3. Áreas dos intestinos delgados e fatores utilizados para correção da densidade neuronal dos neurônios mioentéricos nitrérgicos do íleo dos animais dos grupos normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com vitamina E (NE), diabéticos (D) e diabéticos tratados com vitamina E (DE). n = 5 ratos por grupo

	Área (cm ²)	Fator de Correção
N	99 ± 15,1 ^a	Padrão
NE	89 ± 4,6 ^a	0,90
D	142 ± 18,6 ^a	1,44
DE	136 ± 11,5 ^a	1,37

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (p < 0,05)

Tabela 4. Pesos iniciais (90 dias de idade) e finais (210 dias de idade), glicemia e hemoglobina glicada dos animais dos grupos normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com vitamina E (NE), diabéticos (D) e diabéticos tratados com vitamina E (DE). n = 10 ratos por grupo

	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Glicemia (mg/dl)	Hemoglobina Glicada (%)
N	347 ± 8,8 ^a	453 ± 10,2 ^a	170 ± 9,3 ^a	3,4 ± 0,12 ^a
NE	312 ± 11,2 ^a	413 ± 7,9 ^a	146 ± 5,2 ^a	4,3 ± 0,45 ^a
D	323 ± 6,7 ^a	271 ± 8,2 ^b	415 ± 18,4 ^b	5,9 ± 0,24 ^b
DE	319 ± 6,7 ^a	291 ± 14,6 ^b	506 ± 14,6 ^c	6,5 ± 0,15 ^b

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

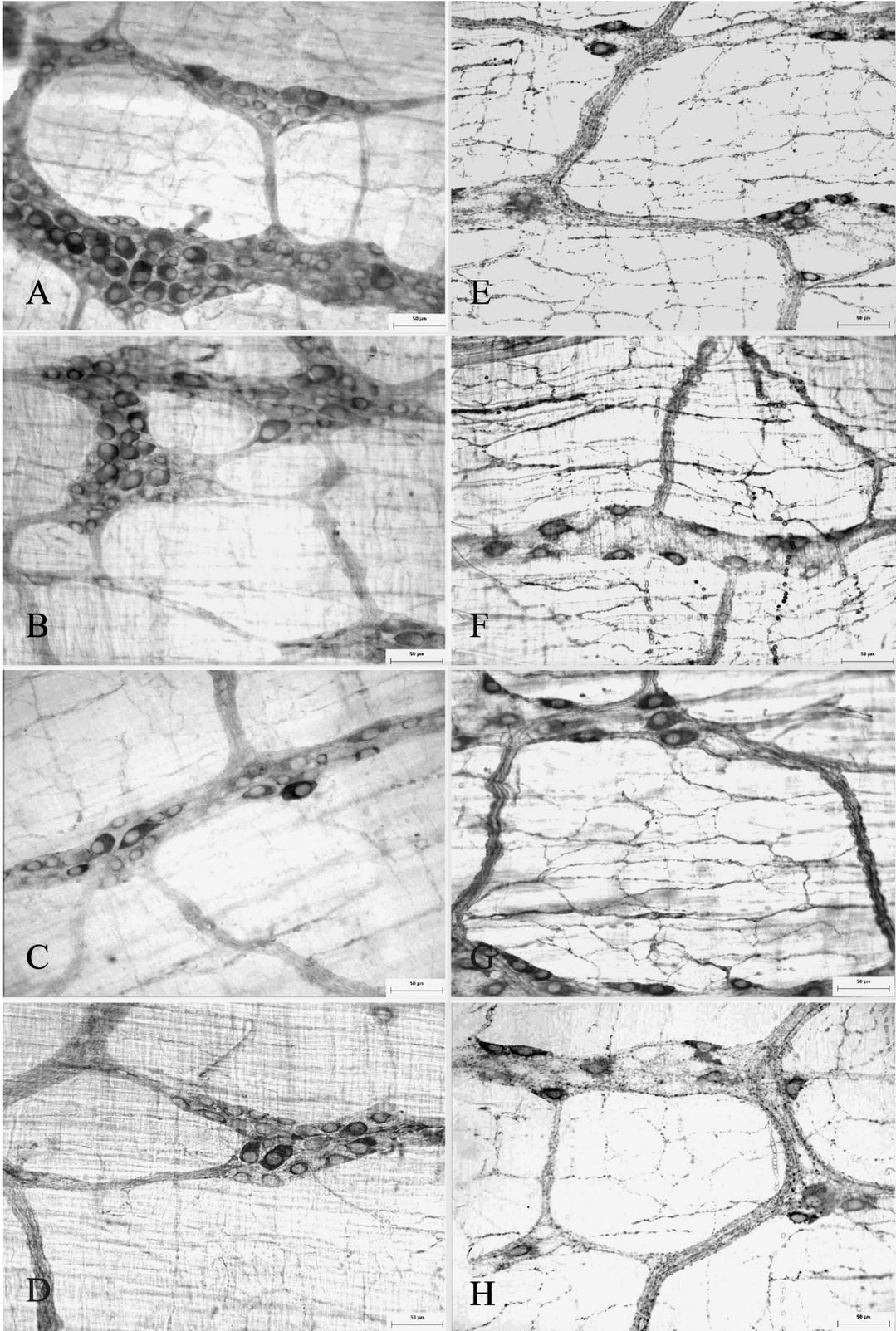


Figura 1

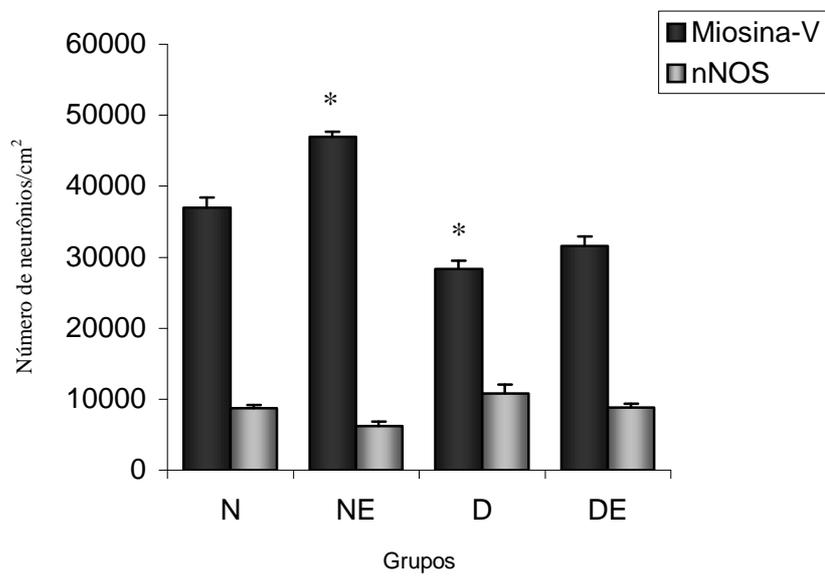


Figura 2

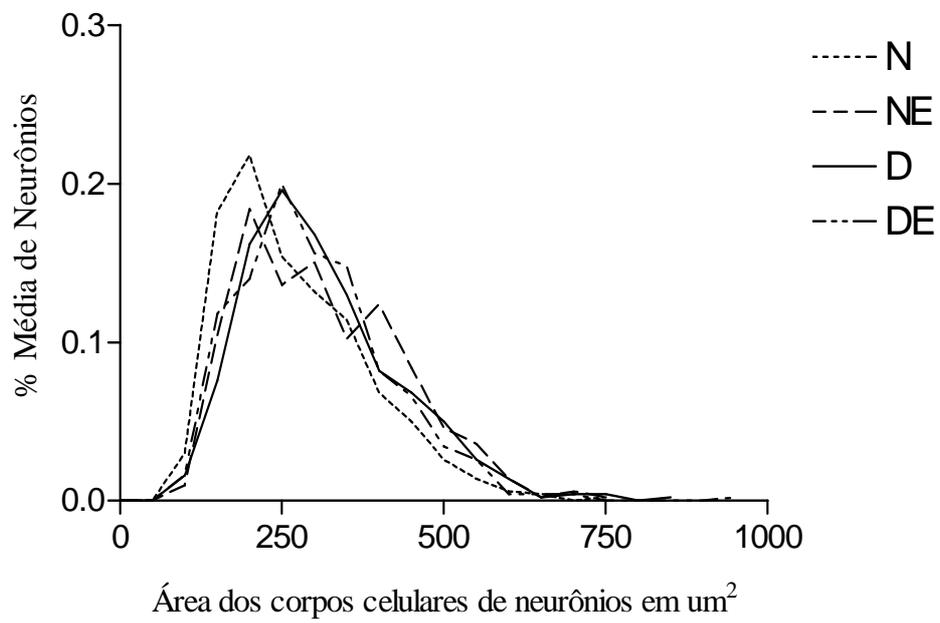


Figura 3

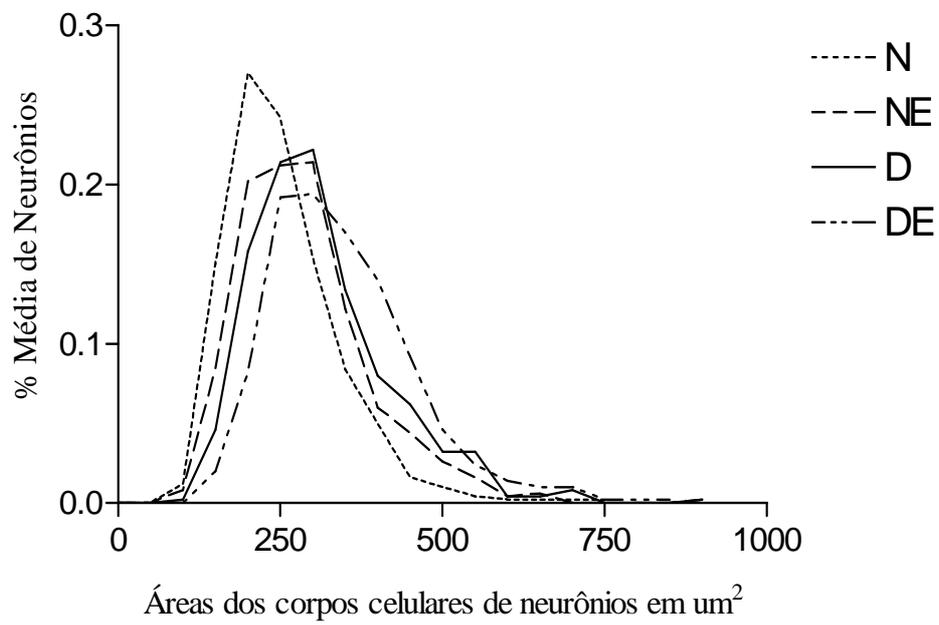


Figura 4

Figura 1. Neurônios mioentéricos imunoreativos à miosina-V (**A, B, C, D**) e nNOS (**E, F, G, H**) da região intermediária do íleo dos animais dos grupos normoglicêmicos (**A, E**), normoglicêmicos tratados com vitamina E (**B, F**), diabéticos (**C, G**) e diabéticos tratados com vitamina E (**D,H**). Barra de calibração: 50 μ m

Figura 2. Densidade dos neurônios mioentéricos miosina-V e nNOS imunoreativos observados em objetiva de 20X na região intermediária do íleo dos animais dos grupos normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com vitamina E (NE), diabéticos (D) e diabéticos tratados com vitamina E (DE). n = 5 ratos por grupo para cada técnica imunohistoquímica

* p < 0,05 quando comparado com o grupo N

Figura 3. Distribuição de freqüências relativas das áreas dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos do íleo dos animais dos grupos normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com vitamina E (NE), diabéticos (D) e diabéticos tratados com vitamina E (DE). n = 5 ratos por grupo

Figura 4. Distribuição de freqüências relativas das áreas dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos nitrérgicos do íleo dos animais pertencentes aos grupos normoglicêmicos (N), normoglicêmicos tratados com vitamina E (NE), diabéticos (D) e diabéticos tratados com vitamina E (DE). n = 5 ratos por grupo

Vitamin E supplementation in rats under experimental diabetes mellitus: analysis of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons from the terminal ileum

Vitamin E and enteric diabetic neuropathy

Renata Virginia Fernandes Pereira¹, Marcílio Hubner de Miranda-Neto¹, Ivan Domicio da Silva Souza¹, Jacqueline Nelisis Zanoni¹

¹Departament of Morphophysiological Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, nº 5790 Bloco H-79 – CEP 87020-900, Maringá, PR, Brazil.

Corresponding author. Phone: +55 44 32614705; Fax: +55 44 32614340; E-mail: jnzanoni@uem.br

Abstract

Purpose. Investigate the vitamin E supplementation effect on myosin-V and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) immunoreactive myenteric neurons from the terminal ileum of diabetic rats. **Methods.** Forty rats were divided in the groups normoglycemics (N), normoglycemics treated with vitamin E (NE), diabetics (D) and diabetics treated with vitamin E (DE). Treated animals received food supplemented with vitamin E (1g/kg body weight) for 120 days. After this period, ileums were subjected to myosin-V and nNOS immunohistochemistry techniques. It was performed quantitative and morphometric analysis of the myenteric neurons from the intermediate region of the terminal ileum. The area of the tertiary plexus was also determined. **Results.** Diabetes promoted a 24% reduction on the number of myosin-V neurons in group D in relation to N, accompanied by an increase in the area of the tertiary plexus ($p < 0.05$). In group NE, neuronal density was 27% higher when compared to group N ($p < 0.05$). Nitrergic neurons did not present any alteration in density as a consequence of diabetes, or when treated with the vitamin. Cell bodies areas of myosin-V and nNOS immunoreactive neurons of the supplemented normoglycemics animals (NE) increased significantly. Diabetes (D) also increased the area of myenteric neurons (myosin-V and nNOS). Vitamin E treatment (DE) promoted increase in the size only in nitrergic neurons size. **Conclusions.** Vitamin E exhibited a neuroprotective and neurotrophic effect in the natural ageing process. Concerning DM, the supplementation with the vitamin exerted a neurotrophic effect on the subpopulation of nNOS immunoreactive neurons.

Key words: diabetes mellitus, myenteric neurons, myosin-V, neuronal nitric oxide synthase, vitamin E.

Introduction

Neuropathy is one of the secondary complications of diabetes mellitus (DM), which in turn is one of the most common human metabolic disorders. The etiology of diabetic neuropathy has been studied by several authors. According to Romero,¹ there are three mechanisms involved with the electrophysiological modifications of peripheral nerves during experimental DM: hyperglycemia, free radicals production and decrease in Na⁺/K⁺ATPase activity.

Chronic hyperglycemia, characteristic of all types of DM, is strongly related to the microvascular pathology specific to the disease, which affects not only peripheral nerves, but also the retina and renal glomeruli, leading to debilitating neuropathies, blindness and renal diseases, respectively.²

Free radicals production and decrease of endogenous antioxidant defenses during DM, are also directly related to the micro and macrovascular alterations (atherosclerotic disease), considered the main causes of morbidity and mortality in diabetic patients.³ The reparative enzyme glutathione peroxidase is an example of reduced endogenous antioxidant in diabetic conditions, once it is prematurely inactivated in peripheral nerves through non-enzymatic glycosilations.¹ In diabetic humans and animals, elevated levels of lipidic peroxidation and glycoxidation products confirm the induction and/or the increase of oxidative stress.⁴

In the gastrointestinal tract, the development of neuropathy affects the different types of enteric neurons, which are responsible for the control of important functions, as motility, secretion, blood flow, mucosal growth and aspects of the local immune system.⁵ Consequently, the neurological alterations that reach the Enteric Nervous System are related to gastrointestinal manifestations such as constipation, diarrhea or fecal incontinence, dysphagia, heartburn, vomit and nauseas.^{6,7}

Previous studies show that DM reduces the number of myenteric neurons⁸⁻¹¹ and causes changes in the area of the cell body.¹²⁻¹⁵ Neuronal subpopulations are differently affected by the disease, in that an increment on the content of vasoactive intestinal peptide (VIP) and nitric oxide synthase (NOS), in the myenteric plexus, is observed after 8 weeks of DM.¹⁶ The neuronal subpopulations also react differently towards the various treatments for diabetic neuropathy.^{17,18}

Substances with antioxidant action, like ascorbic acid,^{12,13} aminoguanidine¹⁶ and glutamine,¹¹ have been tested with the intention of verifying if they could protect myenteric neurons in experimental DM. However, few studies were performed relating the effect of vitamin E, a potent liposoluble antioxidant, with diabetic neuropathy.

Vitamin E interferes in the process of lipidic peroxidation, protecting the polyunsaturated fatty acids against the attack of free radicals.¹⁹ Its presence in the neuronal cells membranes, especially inner mitochondrial membrane, makes its use in DM quite interesting. The objective of this study was to investigate the effects of vitamin E supplementation on the general population of myenteric neurons (myosin-V immunoreactive) and on the subpopulation of nitrergic neurons (neuronal nitric oxide synthase immunoreactive - nNOS) in the terminal ileum of experimental DM rats.

Materials and Methods

Animals

All experimental procedures described in this paper are in agreement with ethical principles stated by the Brazilian Academy of Animal Experimentation (COBEA) and were previously

submitted to the Committee of Ethics in Animal Experimentation from Universidade Estadual de Maringá (UEM) analysis.

Forty male Wistar strain rats (*Rattus norvegicus*) obtained from the Central Biotery of UEM were used. The animals were divided in the following four groups: normoglycemics (N), normoglycemics treated with vitamin E (NE), diabetics (D) and diabetics treated with vitamin E (DE).

From the 90 day-old on, rats were kept in individual cages for a period of 120 days in biotery, with 12-hours fotoperiod (6:00 am - 6:00 pm) and controlled temperature ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$), receiving water and food *ad libitum*. Non-treated animals (groups N and D) received balanced standard chow Nuvital (Nuvilab, Colombo, PR, Brazil). For experimental supplementation of rats in the groups NE and DE, the vitamin E (Zhejiang NHU, China) was incorporated to the standard chow (1g/kg body weight).²⁰ In order to set the amount of vitamin E supposed to be added to the food, the animals weight and food intake were measured every 15 days.

DM was induced in animals of groups D and DE after a 14-hours fast through an intravenous injection of streptozotocin (35mg/kg body weight; Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolved in citrate buffer pH 4.5 (10mM). After induction, glycemia of animals was determined by the method of glucose oxidase²¹ in order to confirm the establishment of experimental model. All animals of groups D and DE presented glycemia superior to 250 mg/dl.

Material resection and processing

In the end of 120 days of experimental period, the animals were killed, being previously weighted and anesthetized with a 40mg/kg body weight intraperitoneal dose of tiopental (Abbott Labs., Chicago, IL, USA). Blood was sampled for determination of the glycemia and

glycated hemoglobin (ion-exchange resin method).²² Twenty ileums (five for each experimental group) were resected and processed according to the immunohistochemistry technique for myosin-V, while the other twenty ones were processed for the nNOS immunohistochemistry.

Immunolocalization of neuronal myosin-V: a study of general myenteric neurons population

The animals were perfused with cold saline solution 1.1%, followed by fixative solution containing sodium periodate (10mM), lysine (75M) and paraformaldehyde (1%) in phosphate buffer pH 7.4 (37mM).²³ Immediately after perfusion, ileums were resected, washed with saline solution until complete removal of feces, carefully inflated with the fixative solution in order not to distend the segments and tied in the extremities with cotton thread. After this procedure, they were maintained in the fixative solution by one hour, and then dehydrated in alcohol (50%, 70%, 80%, 90% and 100%), clarified in xylol and rehydrated in decreasing series of alcohol (100%, 95%, 90%, 80% and 70%). Intestinal segments were dissected with the aid of trans-illumination stereomicroscope obtaining whole-mount muscular layer preparations, through the removal of mucous and submucous layers. Whole-mount preparations obtained were subjected to a technique for detection of myosin-V immunoreactive myenteric neurons, as follows.²⁴

The preparations were washed four times in phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 (0.1M) and blocked for one hour and a half in solution containing bovine serum albumine (BSA; Sigma) (2%), goat serum (1:50), Triton X-100 (Sigma) (0.5%) and PBS. Sequentially, were incubated at room temperature in solution containing the primary antibody specific for the medial tail of myosin-V (Table 1). After forty eight hours, were washed twice in PBS solution of Triton X-100 (0.1%) and twice in PBS solution of Tween-20 (0.05%). Then, the tissues

were incubated with secondary antibody (Table 1) for twenty-four hours at room temperature. Finally, were washed four times with PBS solution of Tween-20 (0.05%). The immunoreaction was revealed by diaminobenzidine (DAB; Sigma) and the preparations were mounted in glycerol gel mounting. Negative control was performed with the omission of the primary antibody.

Immunolocalization of nNOS: a study of nitrergic myenteric neurons

After killed, the animals had their ileums resected, washed in PBS pH 7.4 (0.1M) and inflated with Zamboni fixative.²⁵ Soon afterwards, the ileums were maintained by eighteen hours in the same solution. At the end of this period, the segments were cut along the mesenteric border and successively washed in alcohol 80% until the visible removal of the fixative. Then, they were dehydrated in alcohol (95% and 100%), clarified in xylol, rehydrated in decreasing series of alcohol (100%, 90%, 80%, 50%) and, at the end, PBS. Later, the segments were dissected for obtaining the whole-mount muscular layer preparations. The preparations were subjected to an immunohistochemistry technique for detection of nitrergic myenteric neurons, as follows.²⁶

The preparations were initially washed three times in PBS solution of Triton X-100 (0.5%). Soon afterwards, were incubated in BSA (1% in PBS) during one hour. Once blocked, the tissues were incubated for forty eight hours at room temperature in primary antibody specific for the nNOS (Table 1). The tissues were washed by three times in PBS and incubated with the secondary antibody (Table 1) for two hours at room temperature. After, were washed three successive times in PBS. Finally, the preparations were incubated with ABC complex avidine-biotine-peroxidase (1:1500) per one hour, subsequently revealed by DAB containing

H₂O₂ (0.02%) and mounted in glycerol gel mounting. Negative control was performed with the omission of the primary antibody.

Quantitative analysis of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons

The quantification of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons was performed using images obtained randomly of the intermediate region (60° - 120°, 240° - 300°) intestinal circumference in each animal, considering as 0° the mesenteric insertion.²⁷

The images were captured by an AxioCam (Zeiss, Jena, Germany) high resolution camera coupled to an Axioskop Plus (Zeiss) light microscope, digitalized in a microcomputer by the program AxioVision version 4.1 and recorded in compact disc (CD). The images analysis software Image-Pro Plus version 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) was used for the neuronal quantification of the images recorded in CD.

For each animal, all neurons present in 40 images, captured in 20X lens, were counted. The area of each image, measured through Image-Pro Plus, was approximately 0.14mm². Results were expressed as the number of neurons per cm².

Neuronal density correction

The results obtained from neuronal quantification must be corrected once alterations in the size of the intestine, promoted by intestinal growth as consequence of natural aging and/or pathological processes, can "dilute" the number of neurons present in the analyzed area.

For the correction of neuronal density obtained, in both immunohistochemistry techniques, a factor was calculated and used to multiply quantitative results. The correction factor was calculated using the mean area in cm² of the small intestine of each group studied. The area in

turn, was obtained through the measures of intestinal length and width, verified soon after the death of each animal (Tables 2 and 3).²⁸

Morphometric analysis of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons

The measure of the areas of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neuronal cell bodies was performed using the same images, captured in 20X lens, that in quantitative analysis. The area (in μm^2) of 100 neuronal cell bodies was measured through Image-Pro Plus for each studied animal in each technique, adding up to 500 areas per group.

Area of the tertiary plexus

The area occupied by the tertiary plexus was determined using the same images captured in 20X lens for myosin-V immunoreactive myenteric neurons. The measure was performed in 10 images per animal through Image-Pro Plus.

In order to calculate the area occupied by the tertiary plexus in μm^2 , we measured the area localized between ganglia and fibers which consist in primary and secondary plexuses. Results were expressed as the percentage of each image total area ($137.670 \mu\text{m}^2$) occupied by the tertiary plexus.

Statistical analysis

Results were subjected to statistical analyses through the programs Statistica and GraphPad Prism, being expressed as media \pm standard error. Morphometric data were set in delineation

blocks followed by Tukey's test. For the other results, we used the variance analysis One-way ANOVA, followed by Tukey's test. Significance level was set at 5%.

Results

Streptozotocin promoted the diabetic syndrome in the animals of groups D and DE, that presented the characteristic clinic aspects of the disease along the entire experiment: polyuria, polydipsia and polyphagia. After 120 days, it was also observed a significant increase of glycemia and glycated hemoglobin, besides reduction of body weight in relation to normoglycemic animals (Table 4).

Vitamin E supplementation did not promote significant alteration in glycemic levels or in glycated hemoglobin. On the other hand, the animals of group DE presented a minor weight loss in relation to untreated diabetic animals ($p > 0.05$) (Table 4).

The small intestines mean areas of diabetic animals (groups D and DE), in both myosin-V and nNOS techniques, presented a increase of 33% ($p < 0.05$) and 32% ($p > 0.05$) respectively, when compared to the mean values obtained for the groups N and NE (Tables 2 and 3).

Morphology of nervous components of the myenteric plexus from the ileums subjected to myosin-V and nNOS immunohistochemistry techniques

Myosin-V immunohistochemistry technique allowed us to detect the primary and secondary components and the small fibers that represent the tertiary component of the ileum myenteric plexus. It was observed neuronal cell bodies in nervous ganglia and/or along interganglionic fibers. It was also visualized a heterogeneous intensity in immunohistochemistry staining of

neuronal cell bodies that express myosin-V protein. The neurons of diabetic animals (groups D and DE) were found less intensively stained than normal animals (groups N e NE) (Figure 1).

Neuronal cell bodies intensively stained were observed in whole-mount preparations of all groups of animals subjected to nNOS immunohistochemistry technique. Neurons were found isolated or occupying the peripheric region of myenteric ganglia. Primary and secondary components were visualized easily. Small varicosities were observed along tertiary plexus fibers (Figure 1).

Neuronal density of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons

DM promoted a 24% reduction in the number of myosin-V immunoreactive neurons in the group D in relation to normoglycemic animals (group N) ($p < 0.001$). Diabetic treated animals (group DE) presented a 12% superior neuronal density when compared to group D ($p > 0.05$). Neuronal density in normoglycemic supplemented animals (group NE) was 21.2% superior to that of group N ($p < 0.001$) (Figure 2).

There were no alterations on nitrergic neuronal density when all groups were compared ($p > 0.05$) (Figure 2).

Morphometry of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons

The mean areas of myosin-V immunoreactive neurons of groups N, NE, D and DE were 270.8 ± 5.0 ; 313.6 ± 5.5 ; 309.2 ± 5.3 e $299.9 \pm 5.1 \mu\text{m}^2$, respectively. There was significant difference when groups N and NE were compared ($p < 0.05$). Nitrergic neuronal cell bodies

presented statistically different areas when all groups were compared ($p < 0.05$): N ($253.8 \pm 3.9 \mu\text{m}^2$), NE ($287.9 \pm 4.5 \mu\text{m}^2$), D ($311.1 \pm 4.8 \mu\text{m}^2$) and DE ($346.1 \pm 5.0 \mu\text{m}^2$).

Relative frequencies allowed us to verify that myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons were distributed in an area interval ranging from 201 to $300 \mu\text{m}^2$ (Figures 3 e 4).

Area of the tertiary plexus

The percentage of image total area ($137.670 \mu\text{m}^2$) occupied by the tertiary plexus were $81 \pm 0.6\%$ and $81 \pm 2.1\%$ for groups N and NE, respectively ($p > 0.05$). DM altered significantly in 7% the area occupied by the tertiary plexus in animals of group D ($88 \pm 0.5\%$), when compared to normoglycemics (group N) ($p < 0.01$). There were no significant differences between groups D and DE ($86 \pm 0.7\%$).

Discussion

The administration of streptozotocin in the animals of groups D and DE promoted the peculiar alterations of the disease, including polyuria, polydipsia, polyphagia, weight loss and high levels of blood glucose and glycated hemoglobin. Vitamin E treatment did not affect these parameters in the animals of groups NE and DE.

All neuronal densities obtained in this study were rectified by a correction factor calculated from the small intestine area, what assures that our quantitative results are related to implications of DM instead of a neuronal dispersion. Group D animals used for myosin-V and nNOS immunohistochemistry techniques presented a mean increase in their intestinal areas of

approximately 41% and 30%, respectively, in relation to N, proving that diabetes alters small intestine size.^{29,30} The increased expression of inhibitory neurotransmitters as DM evolves, like VIP and nitric oxide (NO),¹⁶ and the consequent relaxation of gastrointestinal smooth muscles, is a probable hypothesis to explain this fact.

In this study, the general population of myenteric neurons was stained by an immunoreaction involving a primary antibody specific to myosin-V, a motor protein found in neuronal cell bodies and processes.³¹ Different staining intensities were observed in this technique in the four groups of animals. This heterogeneity may be related to different neuronal activities.²⁴ According to Tashima et al.,¹¹ who observed similar results, the reduction in staining intensity might be occasioned by a decrease in the protein myosin-V content in neural tissue.

A neuronal density of 37005 ± 1379 myosin-V immunoreactive neurons/cm² was observed in normoglycemic animals (group N). In group NE (46987 ± 700 neurons/cm²), the neuronal number was 21.2% higher. Our neuronal density results are discussed in proportions (%) instead of absolute numbers, as we used a 20X panoramic objective for the quantitative analysis. Zanoni et al.,¹³ while studying the ileum, stated the reduction in the number of myenteric neurons as a consequence of natural ageing process. This density reduction was observed by the authors in the proportion of 24.3%. Vitamin E supplementation, in our study, was effective in the ageing process as it preserved the myenteric neurons in group NE, suggesting a neuroprotective action of the substance in these terms. This fact is related to the antioxidant property exhibited by vitamin E,^{32,33} which decreases the amount of free radicals, considered the main responsible for neuronal death, once they lead to cell membrane injury and DNA fragmentation.¹

Results reported for group D (28312 ± 1172 /cm²) show that DM promoted a 24% reduction in myosin-V immunoreactive myenteric neurons density, in relation to group N ($p < 0.001$).

Several previous studies describe similar results in different gastrointestinal segments, including the stomach,¹⁴ the ileum^{8,13} and proximal colon.⁹⁻¹¹ DM is definitely a pathology that affects the Enteric Nervous System, especially, the myenteric plexus. An important factor related to diabetic neuropathy is oxidative stress,³⁴ which is pronounced in DM.³⁵ Also, the simultaneous reduction in antioxidant defenses, including vitamins A, C and E, beyond glutathione and glutathione peroxidase, contributes to this process.³⁶

Data verified for the area occupied by the tertiary plexus are congruent with the results obtained for the number of myosin-V immunoreactive myenteric neurons. It was observed that a decrease in neuronal density is compensated by an increase in the area occupied by the tertiary plexus, composed by axons which innervate longitudinal muscular tunica, located between the primary and secondary components of myenteric plexus.³⁷

Vitamin E treatment (group DE = 31597 ± 1357 neurons/cm²) resulted in a 12% higher number of myosin-V immunoreactive myenteric neurons in relation to group D. The neuronal density in group DE was preserved at 50% when compared to the neuronal loss suffered by group D, in function of the pathology. Cotter et al.,²⁰ using the same vitamin E dosage of our experiment, reported a prevention in the decrease of motor nerve conduction velocity caused by DM. According to the author, glycemic levels observed in experimental diabetes and the consequent increase of free radicals, are excessively higher than those verified in patients with controlled diabetes. That may explain why a neuroprotection statistically significant, promoted by vitamin E, was not observed in our animals.

Nitroergic neurons, that is, the ones which express the NO produced from reactions catalyzed by nNOS, have an important inhibitory effect on gastrointestinal smooth muscles.³⁸ In our study, we observed that the number of nitroergic neurons in group N was 8693/cm², what represents 23.5% of the general neuronal density in myenteric plexus, determined by myosin-V immunohistochemistry (37005 neurons/cm²). This result was similar to those stated

by Cracco e Filogamo,³⁹ Miranda Neto et al.⁴⁰ and Zanoni et al.,²⁷ which observed a proportion of 24%, 21% e 25.5%, respectively.

Neuronal density for nitrergic neurons was similar in all groups studied ($p > 0.05$), indicating a high resistance of this subpopulation to the action of free radicals, found in elevated concentrations during DM hyperglycemia. These results are in agreement with the literature in what concerns the stomach,¹⁴ the ileum^{13,26} and distal colon.⁴¹ A situation similar to that of pathologies like DM, is described in natural ageing process, once nNOS immunoreactive neurons survive through age.^{27,42,43} Another point to consider about nitrergic myenteric neurons resistance in diabetic rats (group D) is that the proportion of these cells in relation to myosin-V immunoreactive neurons (general population) is equivalent to 38.2%. This data is another indicative that other neuronal subpopulations are affected by DM, while nitrergic neurons resist. On the other hand, the relative proportion of nitrergic neurons in group DE was 27.9%, similar to that observed in group N.

The area of myosin-V immunoreactive myenteric neurons cell bodies suffered a 14% increase in group D in relation to normoglycemic animals (group N), suggesting a probable altered neuronal activity induced by DM. Vitamin E did not significantly altered the size of myosin-V immunoreactive neurons in group DE, when compared to group D.

Our results showed that the area (in μm^2) of nitrergic neurons cell bodies in diabetic animals (group D) was 18.4% higher in relation to normoglycemic (group N) ($p < 0.05$). These results coincide with those observed by Fregonesi et al.¹⁴ in the stomach and, Zanoni et al.¹³ and Shotton et al.¹⁵ in the ileum. According to Fregonesi et al.,¹⁴ the increased synthesis of NO in the neurons, in order to compensate the low availability of NADPH for the enzyme nNOS provoked by diabetes, is a probable hypothesis to the increase in nitrergic neurons cell bodies area. This statement may be confirmed by the increased expression of nNOS in DM, as observed by Adegathe et al.⁴⁴ with the aid of Western blotting. Shotton et al.^{16,17} also

verified an increase in this enzyme activity through radiochemical detection. In our study, this fact was observed through the measure of cell bodies area. Vitamin E supplementation promoted a significant increase of nitregeric neurons area in group DE in relation to group D. Speculatively, this result may be a compensatory response, as consequence of the reduced neuronal density relative proportion in this group.

In conclusion, vitamin E, in the natural ageing process, exhibited a neuroprotective and neurotrophic effects. Concerning DM, vitamin E supplementation promoted a neurotrophic effect on nNOS immunoreactive neurons. We can not dismiss the neuroprotective activity of vitamin E on diabetic neuropathy, because higher dosages than the one used in this experiment must be tested.

Acknowledgements

We wish to thank the excelent support of Ana Paula de Santi Rampazzo, Maria Euride do Carmo Cancino, Maria dos Anjos Fortunato, Valdir Trombeli and, Professor PhD Rosângela Geritana Santana, for statistical advice. This study was accomplished with grant of Fundação Araucária (064/2007) and CAPES, Brazil.

References

1. Romero FJ. Antioxidants in peripheral nerve. *Free Radic Biol Med* 1996;20:925-32.
2. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.
3. Son SM. Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77:S65-S70.
4. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40:405-12.
5. Furness JB, Costa M. The enteric nervous system. New York: Churchill Livingstone; 1987.
6. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, et al. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 1993;43:817-24.
7. Zochodne DW. Diabetes mellitus and the peripheral nervous system: manifestations and mechanisms. *Muscle Nerve* 2007;36:144-66.
8. Hernandez L, Bazotte RB, Gama P, Miranda-Neto MH. Streptozotocin-induced diabetic duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons. *Arq Neuropsiquiatr* 2000;58:1035-9.
9. Furlan MM, Molinari SL, Miranda Neto MH. Morphoquantitative effect of acute diabetes on the proximal colon of adult rats. *Arq Neuropsiquiatr* 2002;60:576-81.
10. Zanoni JN, Pereira RVF, Freitas P. Effect of the ascorbic acid treatment on the NADHd positive myenteric neurons of diabetic rats proximal colon. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2007;50:31-8.

11. Tashima CM, Tronchini EA, Pereira RV, Bazotte RB, Zanoni JN. Diabetic rats supplemented with L-glutamine: a study of immunoreactive myosin-V myenteric neurons and the proximal colonic mucosal. *Dig Dis Sci* 2007;52:1233-41.
12. Zanoni JN, Hernandez L, Bazotte RB, Miranda Neto MH. Terminal ileum submucous plexus: Study of VIP-ergic neurons of diabetic rats treated with ascorbic acid. *Arq Neuropsiquiatr* 2002;60:32-7.
13. Zanoni JN, Buttow NC, Bazotte RB, Miranda Neto MH. 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* 2003;104:32-8.
14. Fregonesi CE, Molinari SL, Alves AM, Defani MA, Zanoni JN, Bazotte RB, et al. Morphoquantitative aspects of nitrergic myoenteric neurons from the stomach of diabetic rats supplemented with acetyl-L-carnitine. *Anat Histol Embryol* 2005;34:93-7.
15. Shotton HR, Lincoln J. Diabetes only affects nitric oxide synthase-containing myenteric neurons that do not contain heme oxygenase 2. *Brain Res* 2006;1068:248-56.
16. Shotton HR, Adams A, Lincoln J. Effect of aminoguanidine treatment on diabetes-induced changes in myenteric plexus of rat ileum. *Auton Neurosci* 2007;132:16-26.
17. Shotton HR, Clarke S, Lincoln J. The effectiveness of treatments of diabetic autonomic neuropathy is not the same supplying different organs. *Diabetes* 2003;52:157-64.
18. Shotton HR, Broadbent S, Lincoln J. Prevention and partial reverse of diabetes-induced changes in enteric neurons of the rat ileum by combined treatment with alpha-lipoic and evening primrose oil. *Auton Neurosci* 2004;111:57-65.
19. Yoshida M, Kimura H, Kyuki K, Ito M. Effect of combined vitamin E and insulin administration on renal damage in diabetic rats fed a high cholesterol diet. *Biol Pharm Bull* 2005;28:2080-6.

20. Cotter MA, Love A, Watt MJ, Cameron NE, Dines KC. Effects of natural free radical scavengers on peripheral nerve and neurovascular function in diabetic rats. *Diabetologia* 1995;38:1285-94.
21. Bergmeyer HE; Bernet E. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase. New York: Methods of enzymatic analysis; 1974.
22. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A. Correlation of glucose relation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1976;295:417-20.
23. McLean IW, Nakane PK. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new version for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1974;22:1077-83.
24. Drengk AC, Kajiwara JK, Garcia SB, Carmo VC, Larson RE, Zucoloto S, et al. Immunolocalisation of myosin-V in the enteric nervous system of the rat. *J Auton Nerv Syst* 2000;78:109-112.
25. Stefanini M, De Martino C, Zamboni L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 1967;216:173-4.
26. Wrzos HF, Cruz A, Polavarapu R, Shearer D, Ouyang A. Nitric oxide synthase (NOS) expression in the myenteric plexus of streptozotocin-diabetic rats. *Dig Dis Sci* 1997;42:2106-10.
27. Zanoni JN, De Freitas P, Pereira RVF, Dos Santos Pereira MA, De Miranda Neto, MH. 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* 2005;34:149-53.
28. Cowen T, Johnson RJ, Soubeyre V, Santer RM. Restricted diet rescues rat enteric motor neurons from age related cell death. *Gut* 2000;47:653-60.

29. Lincoln J, Bokor JT, Crowe R, Griffith SG, Haven AJ, Burnstock G. Myenteric plexus in streptozotocin-treated rats. Neurochemical and histochemical evidence for diabetic neuropathy in the gut. *Gastroenterology* 1984;86:654-61
30. Schmidt RE. Neuropathology and pathogenesis of diabetic autonomic neuropathy. *Int Rev Neurobiol* 2002;50:257-92.
31. Cheney RE, O'Shea MK, Heuser JE, Coelho MV, Wolenski JS, Espreafico EM, et al. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* 1993;75:13-23
32. Packer L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr* 1991;53:1050S-1055S.
33. Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios Y, Roxborough HE, et al. Vitamin E. *J Sci Food Agric* 2000;80:913-938.
34. Vinson JA, Staretz Me, Bose P, Kassm HM, Basalyga BS. In vitro and in vivo reduction of erythrocyte sorbitol by ascorbic acid. *Diabetes* 1989;38:1036-41.
35. Cameron NE, Cotter MA. Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 1999;45:137-46.
36. Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 2005;59:365-73.
37. Lepard KJ. Choline acetyltransferase and inducible nitric oxide synthase are increased in myenteric plexus of diabetic guinea pig. *Auton Neurosci* 2005;118:12-24.
38. Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990;345:346-7.
39. Cracco C, Filogamo G. Quantitative study of the NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons of the rat ileum. *Neuroscience* 1994;61:351-9.

40. Miranda Neto MH, Molinari SL, Natali Mr, Sant'Ana DM. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of the neuronal evidentiatio. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59:54-9.
41. Yoneda S, Kadowaki M, Kuramoto H, Fukui H, Takaki M. Enhanced colonic peristalsis by impairment of nitrergic enteric neurons in spontaneously diabetic rats. *Auton Neurosci* 2001;92:65-71.
42. Santer RM. Survival of the population of the NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. *J Auton Nerv Syst* 1994;49:115-21.
43. Belai A, Cooper S, Burnstock G. Effect of age on NADPH-diaphorase-containing myenteric neurons of rat ileum and proximal colon. *Cell Tissue Res* 1995;279:379-83.
44. Adeghate E, al-Ramadi B, Saleh AM, Vijayarasathy C, Ponery AS, Arafat K, et al. Increase in neuronal nitric oxide synthase content of the gastroduodenal tract of diabetic rats. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:1172-9.

Table 1. Primary and secondary antibodies used in myosin-V and nNOS immunoreactions

Primary	Host	Dose	Origin	Secondary	Dose	Origin
Myosin-V	Rabbit	1:750	Donated by Universidade de São Paulo (USP), Ribeirao Preto, SP, Brazil	Antirabbit conjugated to peroxidase (1µg/ml)	1:1000	Pierce, Rockford, IL, USA
nNOS	Rabbit	1:500	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA	Antirabbit biotinilated	1:400	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

Table 2. Small intestines areas and factors used to correct the neuronal density of myosin-V immunoreactive myenteric neurons from the ileum of the animals of groups normoglycemics (N), normoglycemics treated with vitamin E (NE), diabetics (D) and diabetics treated with vitamin E (DE). n = 5 rats per group

	Area (cm ²)	Correction Factor
N	146 ± 16.5 ^a	Standard
NE	190 ± 12.8 ^a	1.30
D	246 ± 32.9 ^b	1.68
DE	256 ± 7.7 ^b	1.75

Means followed by different letters in the same column are statistically different according to Tukey's test ($p < 0.05$)

Table 3. Small intestines areas and factors used to correct the neuronal density of nitroergic myenteric neurons from the ileum of the animals of groups normoglycemics (N), normoglycemics treated with vitamin E (NE), diabetics (D) and diabetics treated with vitamin E (DE). n = 5 rats per group

	Area (cm ²)	Correction Factor
N	99 ± 15.1 ^a	Standard
NE	89 ± 4.6 ^a	0.90
D	142 ± 18.6 ^a	1.44
DE	136 ± 11.5 ^a	1.37

Means followed by different letters in the same column are statistically different according to Tukey's test ($p < 0.05$)

Table 4. Inicial weight (90 days-old), final weight (210 days-old), glycemia and glyated hemoglobin of the animals of groups normoglycemics (N), normoglycemics treated with vitamin E (NE), diabetics (D) and diabetics treated with vitamin E (DE). n = 10 rats per group

	Inicial Weight (g)	Final Weight (g)	Glycemia (mg/dL)	Glycated Hemoglobin (%)
N	347 ± 8.8 ^a	453 ± 10.2 ^a	170 ± 9.3 ^a	3.4 ± 0.12 ^a
NE	312 ± 11.2 ^a	413 ± 7.9 ^a	146 ± 5.2 ^a	4.3 ± 0.45 ^a
D	323 ± 6.7 ^a	271 ± 8.2 ^b	415 ± 18.4 ^b	5.9 ± 0.24 ^b
DE	319 ± 6.7 ^a	291 ± 14.6 ^b	506 ± 14.6 ^c	6.5 ± 0.15 ^b

Means followed by different letters in the same column are statistically different according to Tukey's test ($p < 0.05$)

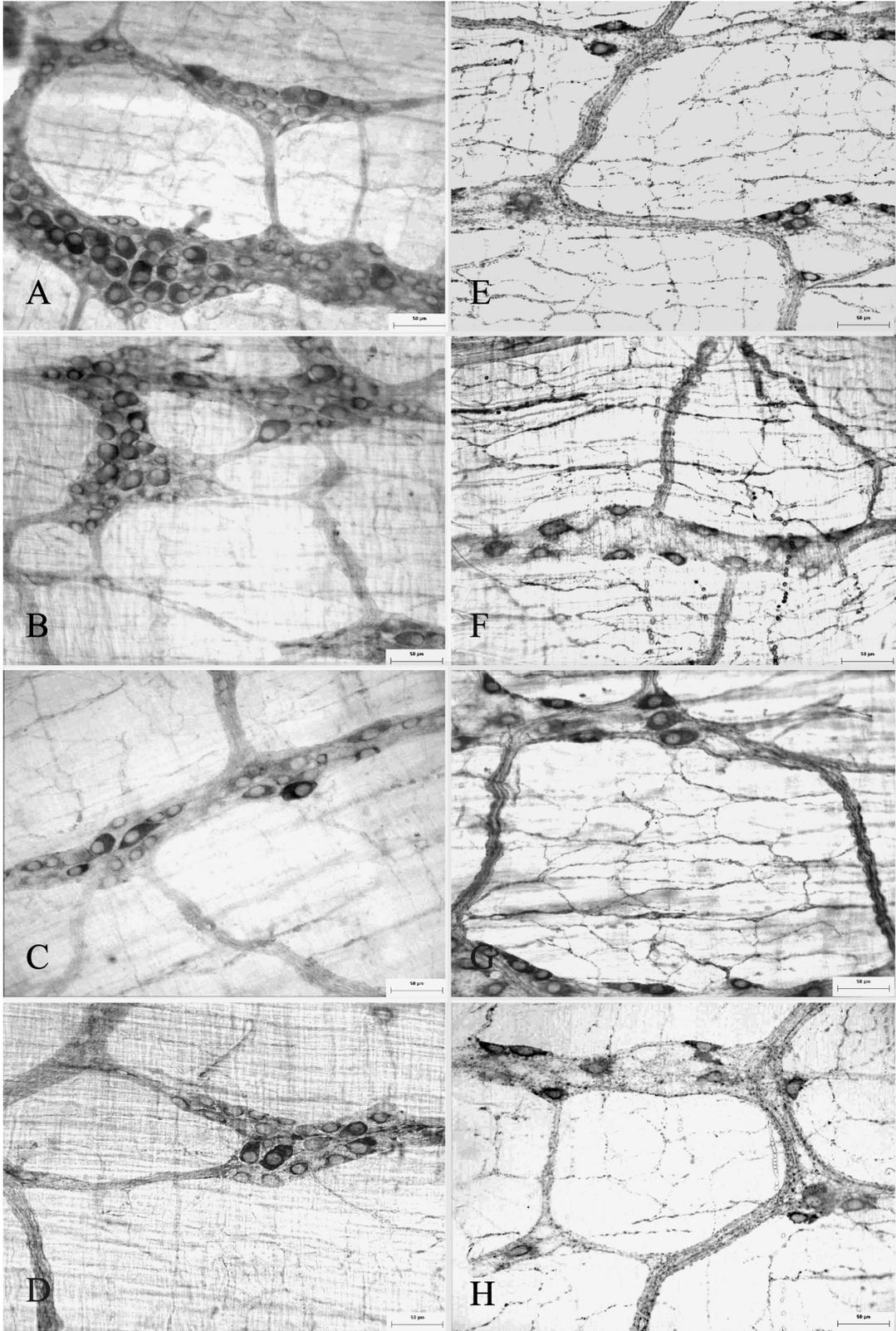


Figure 1

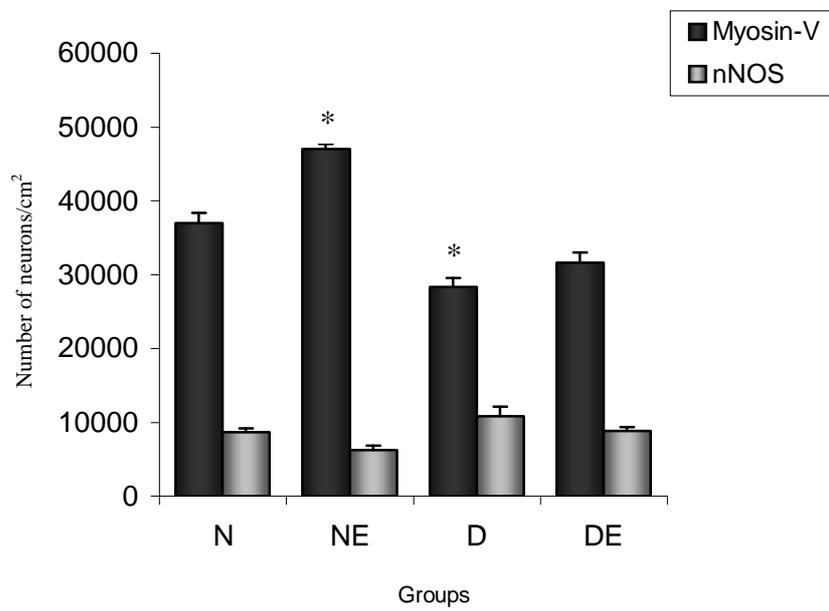


Figure 2

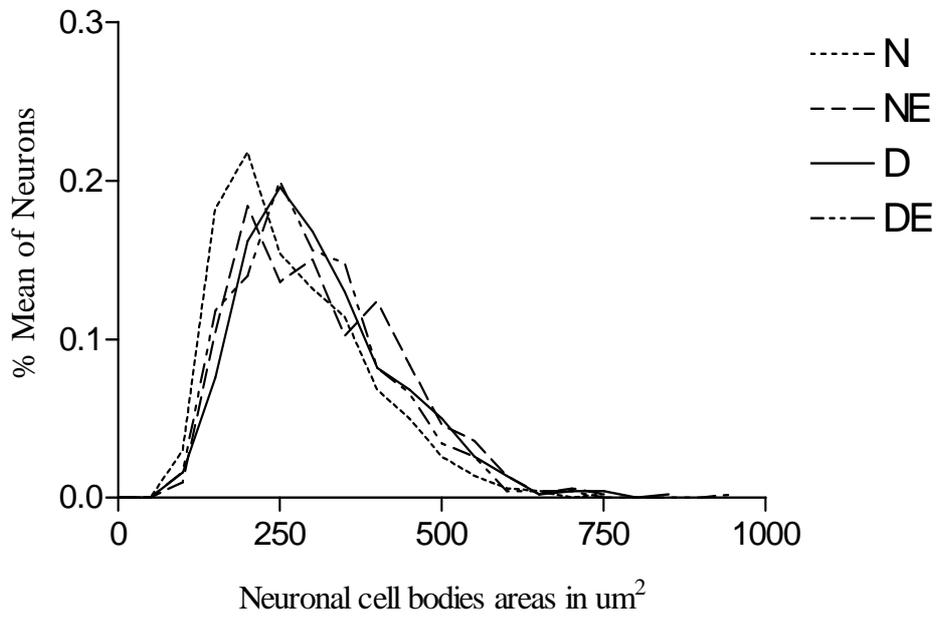


Figure 3

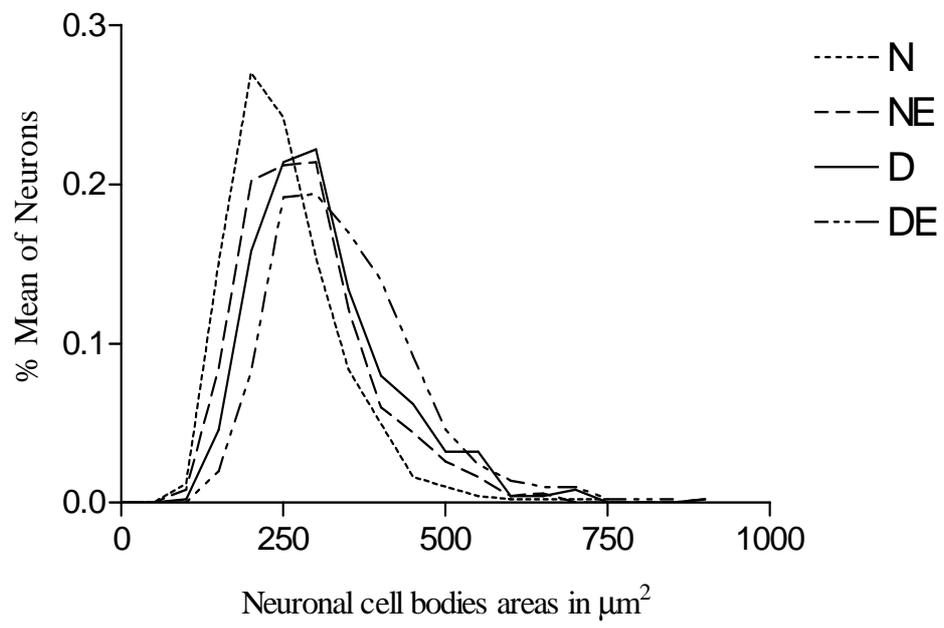


Figure 4

Figure 1. Myosin-V (**A, B, C, D**) and nNOS (**E, F, G, H**) immunoreactive myenteric neurons from the intermediate region of the ileum of animals of groups normoglycemics (**A, E**), normoglycemics treated with vitamin E (**B, F**), diabetics (**C, G**) and diabetics treated with vitamin E (**D, H**). Calibration bar: 50 μ m

Figure 2. Density of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons observed in a 20x objective in the intermediate region of the ileum of animals of groups normoglycemics (N), normoglycemics treated with vitamin E (NE), diabetics (D) and diabetics treated with vitamin E (DE). n = 5 rats per group in each immunohistochemistry technique

* p < 0.05 when compared to group N

Figure 3. Relative frequencies distribution of cell bodies areas of myosin-V immunoreactive myenteric neurons from the ileum of animals of groups normoglycemics (N), normoglycemics treated with vitamin E (NE), diabetics (D) and diabetics treated with vitamin E (DE). n = 5 rats per group

Figure 4. Relative frequencies distribution of cell bodies areas of nitrenergic myenteric neurons from the ileum of animals of groups normoglycemics (N), normoglycemics treated with vitamin E (NE), diabetics (D) and diabetics treated with vitamin E (DE). n = 5 rats per group

Normas para Autores

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](#)