



LUCIANA PATRICIA ROLDI PIZZOLI

**SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E (α -TOCOFEROL) EM RATOS
DIABÉTICOS: EFEITOS SOBRE O COLO PROXIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração - Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Maringá

Agosto – 2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

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

P695s Pizzoli, Luciana Patricia Roldi
Suplementação com vitaminas E (a-Tocoferol) em ratos diabéticos : efeitos sobre o colo proximal / Luciana Patricia Roldi Pizzoli. -- Maringá : [s.n.], 2008.
59 f. : il. color.

Orientadora : Prof. Dr. Maria Raquel Marçal Natali.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração - Biologia Celular e Molecular), 2008.

1. Diabetes mellitus (DM) - *Rattus norvegicus* - Vitamina E - Avaliação. 2. Diabetes mellitus (DM) - *Rattus norvegicus* - Suplementação. 3. Diabetes mellitus (DM) - *Rattus norvegicus* - Vitamina E - Neurônios mioentéricos - Influência. 4. Diabetes mellitus (DM) - *Rattus norvegicus* - Vitamina E - Parede intestinal - Influência. 5. Diabetes mellitus (DM) - *Rattus norvegicus* - Vitamina E - Colo proximal - Influência. I. Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração - Biologia Celular e Molecular). II. Título.

CDD 21.ed.616.462

LUCIANA PATRICIA ROLDI PIZZOLI

**SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA E (α -TOCOFEROL) EM RATOS
DIABÉTICOS: EFEITOS SOBRE O COLO PROXIMAL**

Prof.ª Dr.ª Maria Raquel Marçal Natali

Orientadora

BIOGRAFIA

Luciana Patrícia Roldi Pizzoli, filha de Ismael Roldi e Janete Furtado Roldi, nasceu em Jundiaí, estado de São Paulo no dia 11 de março de 1983.

Em dezembro de 2005 concluiu o curso em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá - UEM - Maringá, Paraná.

Em março de 2006 iniciou o Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular) em nível de Mestrado, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Neurônios Entéricos.

Em fevereiro de 2007 iniciou atividade docente na área de Anatomia Humana na Faculdade Integrado de Campo Mourão.

Em junho de 2008, submeteu-se a banca para obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Obrigada meu **Deus**, pela vida em primeiro lugar, e por permitir mais essa conquista.*

*Aos meus pais, **Ismael e Janete**, razão da minha
existência, fonte de amor e estímulo.*

*Ao meu esposo, **Luiz Antonio**, pelo seu amor,
incentivo e compreensão durante estes anos.*

*A minha orientadora, **Maria Raquel Marçal Natali**, pelo exemplo de dedicação e sabedoria, pelas palavras de estímulo e que unidos ao seu alto astral, tornaram a realização desse trabalho uma tarefa agradável, contribuindo valiosamente para minha formação profissional.*

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

À professora Luzmarina Hernandes por ter me orientado durante os anos de graduação e contribuído ricamente para a minha formação profissional.

Aos meus amigos conquistados durante o mestrado, Antonio, Célia Regina, Eduardo, Felipe e Gabriela que sempre estiveram comigo e me proporcionaram bons momentos.

Aos amigos Aline, Carla, Daniele, João Roberto, Maísa, Rita e Vanessa, que estiveram comigo durante os anos do curso de graduação.

As amigas Aline, Lígia, Lílian, Mariana, Miria, Rakel e Tatiana pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos do laboratório de Histologia, Cristiano, Eleandro, Marcelo, Priscila, Renata e Thaís.

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

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta por um artigo científico denominado: *Suplementação com vitamina E (α -tocoferol) em ratos diabéticos: efeitos sobre o colo proximal.*

Em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, o artigo foi redigido de acordo com a revista *Neurogastroenterology & Motility (ISSN 1350-1925 print version)*.

Luciana Patrícia Roldi Pizzoli, Renata Virginia Fernandes Pereira, Eleandro Aparecido Tronchini, Maria Raquel Marçal Natali. *Suplementação com vitamina E (α -tocoferol) em ratos diabéticos: efeitos sobre o colo proximal. Neurogastroenterology & Motility.*

Resumo Geral

Diabetes mellitus (DM) é uma doença que causa anormalidades endócrinas e metabólicas que alteram a homeostase do organismo. Em decorrência dessa doença são observados distúrbios patológicos em diversos tecidos. A neuropatia é uma das complicações do diabetes e está diretamente relacionada com manifestações gastrointestinais da doença, associadas à alterações nos neurônios do Sistema Nervoso Entérico. Esse sistema está presente nas paredes tubulares do trato digestório e funciona independentemente do Sistema Nervoso Central, sendo formado por neurônios aferentes, interneurônios e neurônios motores. Alterações na inervação intrínseca, bem como na área e na espessura da parede intestinal foram observadas em roedores diabéticos. O desequilíbrio entre os antioxidantes com conseqüente aumento do estresse oxidativo é considerado como fator indutor de alterações neuronais observadas durante o DM. Substâncias antioxidantes tem um papel importante na redução dos danos neurológicos causados pelo DM, entre elas destacamos a vitamina E que atua principalmente reduzindo a peroxidação lipídica, minimizando estes danos.

Com o objetivo de avaliar se a vitamina E (α -tocoferol) em diferentes concentrações exerce efeito sobre a morfologia da parede intestinal e sobre os neurônios mioentéricos do colo proximal de ratos diabéticos, foram utilizados 30 ratos albinos (*Rattus norvegicus*) machos, adultos com 90 dias de idade. Estes animais foram distribuídos em grupos: N: normoglicêmicos alimentados com ração padrão para roedores; NE1: normoglicêmicos alimentados com ração padrão suplementada com vitamina E (0,1%); NE2: normoglicêmicos alimentados com ração padrão suplementada com vitamina E (2%); D: diabéticos alimentados com ração padrão para roedores; DE1: diabéticos alimentados com ração padrão suplementada com vitamina E (0,1%); DE2: diabéticos alimentados com ração padrão suplementada com vitamina E (2%).

Para a indução do DM foi utilizada a droga estreptozotocina (35mg/kg de peso corporal) e mantido o estado diabético e de suplementação durante 120 dias. Aos 210 dias de vida os animais foram mortos e avaliado o índice glicêmico através da dosagem da glicose sanguínea e hemoglobina glicada. Após laparotomia, o intestino grosso foi mensurado e coletados segmentos do colo proximal.

Parte destes segmentos foram destinados ao estudo da parede intestinal através de processamento histológico com coloração pelo método de Hematoxilina-Eosina e a técnica histoquímica PAS para evidenciação das células calciformes. As espessuras das túnicas mucosa,

muscular e parede intestinal total foram avaliadas em 10 pontos em 5 cortes/animal. A quantificação das células caliciformes foi realizada a partir de 50 imagens/animal.

Outros segmentos do colo proximal foram coletados e submetidos a técnica de preparado de membrana corados pelo método de Giemsa, destinados ao estudo morfoquantitativo da população mioentérica total. As análises quantitativas e morfométricas dos neurônios mioentéricos foram realizadas nas regiões intermediárias e anti-mesocólicas do colo proximal. Neurônios presentes em 80 campos microscópicos foram quantificados e a mensuração dos corpos celulares de 100 neurônios/animal foi realizada a partir de imagens capturadas.

Os animais diabéticos apresentaram perda de peso, níveis elevados de glicose e hemoglobina glicada, aumento na área do intestino grosso, diminuição da espessura da parede total intestinal e da túnica muscular e redução do número de neurônios mioentéricos. A espessura da túnica mucosa, o número de células caliciformes e a área do corpo celular dos neurônios mioentéricos não sofreram alterações significativas pela condição do diabetes.

A suplementação com vitamina E (2%) reduziu significativamente os níveis glicêmicos e os valores da hemoglobina glicada, preservou o número de neurônios mioentéricos e a área do corpo celular para os animais do grupo DE2 quando comparados aos animais dos grupos D e DE1. No entanto a suplementação com vitamina E nas diferentes concentrações, não afetou o tamanho do intestino grosso, a espessura da túnica mucosa, da túnica muscular e da parede total intestinal em nenhum dos grupos estudados.

Concluimos que a suplementação com vitamina E (2%) para ratos com diabetes mellitus crônico, influenciou positivamente os parâmetros glicêmicos analisados e teve efeito neuroprotetor sobre os neurônios mioentéricos, não afetando as características morfométricas da parede intestinal.

Palavras-chaves: diabetes mellitus, neurônios mioentéricos, parede intestinal, vitamina E.

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a disease which causes endocrinal and metabolic abnormalities that alters the organic homeostasis. Due to this disease pathological disturbances in several tissues are observed. Neuropathy is one of the complications of diabetes and it is related to gastrointestinal manifestations of the disease, associated to the Enteric Nervous System. This system is present in the tubular wall of the digest tract and works independently from the Central Nervous system, being formed by afferent, interneuron and motor neurons. Alterations in intrinsic innervation, as well as in thickness of the intestinal were observed in diabetic rodents. Misbalance between the antioxidants consequently increasing oxidative stress is considered an inducing factor of neuronal alterations observed during DM. Antioxidant substances have an important role in reducing neurological damages caused by DM, among them it can be highlighted the vitamin E which acts mainly reducing lipid peroxidation, minimizing the damages.

In order to analyze if vitamin E (α -tocopherol) in different concentrations performs any effect over the morphology of the intestinal wall and myenteric neurons in the proximal colon of diabetic rats, it was used 30 males albino rats (*Rattus norvegicus*), adult of 90-days-old. These animals were distributed into the following groups: N: normoglycemic supplemented with patronized chow for rodents, NE1: normoglycemic supplemented with patronized chow supplemented with vitamin E (0.1%); NE2: normoglycemic supplemented with patronized chow supplemented with vitamin E (2%); D: diabetic supplemented with patronized chow; DE1: diabetic supplemented with vitamin E (0.1%); DE2: diabetic supplemented with vitamin E (2%)

To induce DM it was used streptozotocin (35mg/kg body weigh) and kept the diabetic state during 120 days. After 120 days of experiment, animal were killed and the glicemic level was evaluated trough blood glucose dosage and glycated hemoglobin. After laparotomy, large intestine was measured and segments of the proximal colon were collected.

Some of these segments were used for the study of the intestinal wall trough histological processing stained with and Hematoxilin and Eosin (HE) and PAS histochemical technique in order to highlight the goblet cells. Thickness of the mucosa and muscular tunics and intestinal wall were evaluated in 10 points in 5 cuts/animal. Goblet cells quantification was performed with 50 images/animal.

Other segments of the proximal colon were collected and submitted to whole mount preparations and stained by the Giemsa technique, in order to perform the morphoquantitative study of the total myenteric population

Quantitative and morphometric analysis of the myenteric neurons were performed in the intermediate and antimesocolic regions of the proximal colon. Neurons of 80 microscopic fields were quantified and the measurements of 100 cellular bodies /animal were performed using the captured images

Diabetic animals presented weigh loss, high levels of glucose and glycated hemoglobin, increase in large intestine area, decrease in thickness of the total intestinal all and reduction in the number of myenteric neurons. The thickness of mucosa, goblet cells and area of myenteric numbers did not present any significant changes by the diabetes condition.

Supplementation with vitamin E (2%) significantly reduced the glycemic levels and the values of glycated hemoglobin, preserving the number of myenteric neurons and area of the cellular bodies for animals in DE2 group when compared to animals from groups D and DE1. Nevertheless supplementation with vitamin E in the different concentrations did not alter the large intestine size and the thickness either of mucosa and muscular tunics or total intestinal all in all studied groups.

It was concluded that supplementation with vitamin E (2%) for rats with chronic diabetes, positively influenced the glycemic parameters evaluated in this study and also it had a neuroprotective effect over myenteric neurons, do not affecting the morphometric characteristics of the intestinal wall.

Keywords: diabetes mellitus, myenteric neurons, intestinal wall, vitamin E.

Suplementação com vitamina E (α -tocoferol) em ratos diabéticos: efeitos sobre o colo proximal

Título resumido: Efeitos da vitamina E no colo de ratos diabéticos

Luciana Patrícia Roldi Pizzoli¹, Renata Virginia Fernandes Pereira¹, Eleandro Aparecido Tronchini¹, Maria Raquel Marçal Natali¹

¹Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Laboratório de Neurônios Entéricos, Universidade Estadual de Maringá.

Endereço para correspondência

Professora Maria Raquel Marçal Natali. Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, nº 5790 Bloco H-79 – CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil. Tel: +55 44 32614706;

e-mail: mrmnatali@uem.br

Resumo: A neuropatia é uma das complicações do diabetes mellitus (DM) que está diretamente relacionada com as manifestações gastrointestinais da doença. Substâncias antioxidantes como a vitamina E podem ter papel importante na redução dos danos neurológicos causados pelo DM. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a vitamina E (α -tocoferol) em diferentes concentrações exerce efeito sobre a morfologia da parede intestinal e inervação intrínseca do colo proximal de ratos diabéticos. Trinta ratos (90 dias de idade) foram distribuídos nos seguintes grupos: N: normoglicêmicos; NE1 e NE2: normoglicêmicos suplementados com vitamina E (0,1%) e (2%), respectivamente; D: diabéticos; DE1 e DE2: diabéticos suplementados com vitamina E (0,1%) e (2%), respectivamente. Os animais receberam a suplementação com vitamina E durante 120 dias, sendo mortos aos 210 dias de vida. O colo proximal de cada animal foi submetido ao processamento histológico para estudo da parede intestinal e das células caliciformes e a preparados de membrana para o estudo morfoquantitativo da população mioentérica total. A suplementação com vitamina E reduziu significativamente a glicemia e os valores da hemoglobina glicada e preservou o número de neurônios mioentéricos para os animais do grupo DE2, sem efeitos para a área do intestino, espessura da parede total intestinal e túnica muscular. Concluimos que a vitamina E (2%) influenciou os parâmetros glicêmicos analisados e teve efeito neuroprotetor sobre a população mioentérica total, porém as características morfométricas da parede intestinal não foram afetadas.

Palavras-chaves: diabetes mellitus, neurônios mioentéricos, parede intestinal, vitamina E.

INTRODUÇÃO

Em decorrência do diabetes mellitus são observados desequilíbrios e mudanças patológicas em diversos tecidos. Todas as formas de diabetes mellitus são caracterizadas pela hiperglicemia e desenvolvimento de patologias microvasculares específicas do diabetes, na retina (retinopatia), nos glomérulos renais (nefropatia) e nervos periféricos (neuropatia), sendo a neuropatia encontrada com maior frequência em pacientes diabéticos.¹

As manifestações da neuropatia diabética causam vários sintomas no trato gastrointestinal, tais como gastroparesia diabética, enteropatia diabética, disfunção motora esofágica, hipomotilidade colônica e disfunção reto-anal.² Repercussões morfológicas também são descritas, tais como aumento da área e da parede total do intestino delgado, hipertrofia³ e hiperplasia da mucosa intestinal⁴ e aumento do número de células caliciformes.⁵

Vinik⁶ ressalta que a neuropatia promovida pelo diabetes observada no trato gastrointestinal está relacionada com alterações nos neurônios do Sistema Nervoso Entérico (SNE). Esse sistema está presente nas paredes tubulares do trato digestório e funciona independentemente do Sistema Nervoso Central, sendo formado por neurônios aferentes, interneurônios e neurônios motores.⁷

Estudos recentes mostram alterações severas nos componentes do SNE de ratos, em modelos de diabetes experimental, como redução do número de neurônios entéricos no estômago⁸, duodeno⁹, íleo^{10,11} colo¹², ceco¹³ e colo proximal¹⁴ e alterações no perfil celular no íleo^{10,11}, colo¹² e ceco.¹³

A hiperglicemia característica do diabetes vem sendo apontada como o pivô do desenvolvimento e progressão da neuropatia, pois ela promove perda da função e diminuição da sobrevivência dos neurônios¹⁵, devido à alterações no fluxo sanguíneo e aumento da

permeabilidade vascular e também pela diminuição de fatores tróficos para as células neuronais.¹⁶ Entre os mecanismos descritos que explicam como a hiperglicemia lesa o sistema nervoso, estão o acúmulo dos produtos finais da glicação (AGEs), a hiperatividade da via dos polióis e ao aumento do estresse oxidativo.

O estresse oxidativo durante o diabetes gera espécies reativas de oxigênio (ROS) e desequilíbrio entre os antioxidantes. Bhor et al.¹⁷ relatam alterada atividade das enzimas antioxidantes primárias: catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase bem como, aumento na peroxidação lipídica e conteúdo de proteínas carbonílicas, confirmando a ocorrência de estresse oxidativo em ratos diabéticos.

Nas células existem vários sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que inativam os radicais livres e reduzem o dano celular que eles causam. Estes antioxidantes incluem a glutatona, sistemas enzimáticos e vitaminas A, C e E.¹⁸ A atividade da vitamina E sobre os radicais livres é de fundamental importância na prevenção ou no retardo de várias doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares inflamatórias, alterações celulares oriundas do processo de envelhecimento e desordens neurológicas.¹⁹

A vitamina E apresenta oito formas naturais diferentes: α -, β -, δ -, γ -tocoferóis e α -, β -, δ -, γ -tocotrienóis. Essas formas possuem um anel 2-metil-6-cromanol ligado a uma cadeia hidrofóbica, assim são insolúveis em água e solúveis em óleo e outros solventes orgânicos. O α -tocoferol constitui a forma biologicamente mais ativa.²⁰

Em pacientes diabéticos, Reunanen et al.²¹ verificaram que a vitamina E promoveu redução dos indicadores de estresse oxidativo e diminuição da glicação protéica. Em ratos diabéticos que foram submetidos ao tratamento com vitamina E, observou-se redução da peroxidação lipídica e aumento da atividade da enzima superóxido dismutase²², aumento da velocidade de condução nervosa^{23,24} e proteção contra disfunção nervosa.^{25,26}

Baseado no exposto o objetivo deste trabalho foi verificar se a vitamina E (α -tocoferol) em diferentes concentrações exerce efeito sobre a morfologia da parede intestinal e sobre os neurônios mioentéricos do colo proximal de ratos diabéticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimento animal

Foram utilizados 30 ratos albinos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, machos adultos, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os procedimentos animais descritos nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEM.

Os animais foram distribuídos em 6 grupos, cada um composto por 5 animais: *N*: normoglicêmicos alimentados com ração padrão para roedores; *NE1*: normoglicêmicos alimentados com ração padrão suplementada com vitamina E (0,1%); *NE2*: normoglicêmicos alimentados com ração padrão suplementada com vitamina E (2%); *D*: diabéticos alimentados com ração padrão para roedores; *DE1*: diabéticos alimentados com ração padrão suplementada com vitamina E (0,1%); *DE2*: diabéticos alimentados com ração padrão suplementada com vitamina E (2%).

A partir dos 90 dias de idade, os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno por um período de 120 dias em biotério, sob condições controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e iluminação (ciclos claro/escuro de 12/12 hr) recebendo água e alimento *ad libitum*. Os animais dos grupos N e D receberam ração padrão balanceada Nuvital (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil).

Para os grupos NE1, NE2, DE1 e DE2, foi incorporada à ração padrão, vitamina E (α -tocoferol) (Zhejiang NHU, China) na concentração de 0,1%²³ e 2%.

Para indução do diabetes, após jejum prévio de quatorze horas os animais dos grupos D, DE1 e DE2, foram injetados (veia peniana) com estreptozotocina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 35mg/kg do peso corporal²⁷, dissolvida em uma solução de tampão citrato pH 4,5 (10mM).

Os níveis de glicose sanguínea após indução foram determinados pelo método da glicose oxidase²⁸ para confirmar o estabelecimento da doença. Somente os animais com glicemia superior a 250mg/dl foram mantidos nos grupos D, DE1 e DE2.

Coleta e processamento do material

Após 120 dias de experimento, os animais foram mortos, sendo previamente pesados e anestesiados intraperitonealmente com tiopental (40mg/kg de peso corporal) (Laboratórios Abbott, Chicago, IL, EUA), sendo coletado o sangue dos animais por punção cardíaca para avaliar os níveis de glicemia e hemoglobina glicada.²⁹ Após laparotomia, coletou-se o intestino grosso e mensurou-se seu comprimento e circunferência para obter a área do mesmo, sendo coletados segmentos do colo proximal. Parte destes segmentos foram destinados ao estudo da parede intestinal através de processamento histológico e a técnica histoquímica PAS (Ácido Periódico de Schiff) para evidenciação das células caliciformes e parte destes submetidos a elaboração de preparados de membrana corados pelo método de Giemsa para estudo morfoquantitativo da população mioentérica total.

Estudo da parede intestinal

Amostras do colo proximal foram abertas na região mesocólica e distendidas sobre uma placa de isopor. Em seguida a mucosa exposta foi lavada com solução salina para remoção das fezes. Posteriormente, os segmentos foram fixados em Bouin por 12 horas e em seguida armazenados em álcool 70%. Os segmentos foram submetidos a dois meios de inclusão, em parafina para obtenção de cortes semi-seriados com 7 μ m de espessura e coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), e em historesina (LKB - Technovit 7100) para obtenção de cortes semi-seriados de 3 μ m de espessura para evidenciação histoquímica de glicoproteínas presentes nas células caliciformes intestinais pelo método PAS.

A partir dos cortes obtidos foram capturadas imagens por câmera de alta resolução (Q Color 3, Olympus América INC) acoplada ao microscópio de luz (Olympus BX40). A análise morfométrica e quantitativa foi realizada com auxílio do sistema de análises de imagem Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

As imagens dos cortes corados com HE foram utilizadas para a mensuração da espessura das túnicas mucosa, muscular e parede intestinal total, em 10 pontos aleatórios em 5 cortes/animal, perfazendo 250 mensurações por grupo. As imagens dos cortes obtidos pelo método histoquímico PAS foram utilizadas para quantificar as células caliciformes presentes em 50 imagens/animal (objetiva de 40X). A área de cada imagem foi de 0,01mm². Os resultados foram expressos como o número de células caliciformes por mm².

Estudo quantitativo e morfométrico dos neurônios mioentéricos

Amostras do colo proximal de 5 animais de cada grupo foram coletadas, para avaliar a população total dos neurônios mioentéricos através do método de Giemsa.³⁰

Após a coleta, os segmentos foram lavados com solução salina e preenchidos com solução fixadora de Giemsa, ficando imersa nesta solução por 24 horas. Os segmentos foram abertos na região mesocólica e microdissecados sob estereomicroscópio com trans-iluminação, retirando-se a túnica mucosa e a tela submucosa, com preservação das túnicas muscular e serosa. Posteriormente as membranas foram coradas pelo método de Giemsa, à base de azul de metileno, em tampão fosfato de Sorensen 0,1N (pH 6,9), durante 24 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram desidratadas por uma série de álcoois de concentrações crescentes e, logo após, diafanizadas através de passagem em xilol e realizada montagem dos preparados de membrana entre lâmina e lamínula com resina sintética Permount.

Análise quantitativa: Através do microscópio óptico Olympus com objetiva de 40X, foi quantificado o número de neurônios mioentéricos presentes em 40 campos microscópicos nas regiões intermediárias (60° - 120°; 240° - 300°) e 40 campos microscópicos na região anti-mesocólica (120° - 240°) da circunferência intestinal, considerando-se 0° como a inserção do mesócolo (figura 1).³¹ Cada campo microscópico correspondia a 0,18mm², perfazendo uma área total de 14,4mm²/animal .

Análise morfométrica: Para avaliar a área do corpo celular (perfil celular) dos neurônios mioentéricos, foram mensurados 500 corpos celulares de neurônios/grupo. As imagens foram obtidas por câmera de alta resolução, acoplada ao microscópio óptico e a análise morfométrica

realizada com auxílio do sistema de análises de imagem computadorizada Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa estatístico GraphPadPrism (GraphPad Software, São Diego, CA, USA). Após análise de variância (ANOVA) foi usado como pós teste para a comparação entre as médias o teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$). Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão.

RESULTADOS

A droga estrepto-zotocina promoveu o desenvolvimento da síndrome diabética nos animais dos grupos D, DE1 e DE2, comprovada pelo aumento da glicemia e hemoglobina glicada (Tabela 1). Durante o período experimental, as manifestações clínicas típicas da doença foram observadas, como poliúria, polidipsia e polifagia, bem como redução do peso corporal quando comparados aos animais normoglicêmicos.

A suplementação com vitamina E (2%) reduziu significativamente os níveis glicêmicos e os valores da hemoglobina glicada, quando comparados com os animais dos grupos D e DE1 ($p < 0,001$). Nesta concentração também observamos redução da hemoglobina glicada para o grupo normoglicêmico suplementado (NE2). Com relação ao peso, os animais do grupo DE1 e DE2 apresentaram menor perda em relação aos animais diabéticos não tratados ($p > 0,05$) (Tabela 1).

A área do intestino grosso apresentou-se significativamente maior nos animais diabéticos quando comparado aos animais do grupo N ($p < 0,001$), não sendo alterada pela suplementação de vitamina E independente da concentração (Tabela 1).

Análise morfológica da parede intestinal

As espessuras da parede total intestinal e da túnica muscular nos animais diabéticos apresentaram-se significativamente reduzidas quando comparados aos animais não diabéticos ($p < 0,05$) (figura 2), mantendo, porém sua organização histológica típica (figura 3). A suplementação com vitamina E não promoveu reversão neste parâmetro. A espessura da túnica mucosa foi mantida entre os grupos.

Análise quantitativa das células caliciformes intestinais

O número de células caliciformes presentes em $0,5\text{mm}^2/\text{animal}$ não foi significativamente diferente quando todos os grupos foram comparados. O número médio obtido para cada grupo foi: N ($8896 \pm 400,1$), NE1 ($7613 \pm 344,5$), NE2 ($8246 \pm 543,7$), D ($8532 \pm 255,4$), DE1 ($7427 \pm 392,5$) e DE2 ($7315 \pm 376,3$).

Análise quantitativa da população total dos neurônios mioentéricos

Os preparados de membrana corados pelo método de Giemsa, permitiram observar manutenção do arranjo ganglionar para os neurônios mioentéricos que variavam em número e tamanho, sendo rara a presença de neurônios isolados, independente do grupo estudado.

Apesar da contagem neuronal ter sido realizada nas regiões antimesócolica e intermediária do colo proximal, estes valores não diferiram significativamente e por esta razão os dados são apresentados agrupados.

A condição do diabetes experimental provocou redução no número de neurônios mioentéricos nos grupos D ($2805 \pm 176,9$) e DE1 ($2797 \pm 70,0$), quando comparados aos grupos N ($3929 \pm 149,7$), NE1 ($3820 \pm 179,0$) e NE2 ($4224 \pm 262,8$) ($p < 0,05$). Verificamos efeito positivo da vitamina E (2%), considerando que a população neuronal para o grupo DE2 ($3923 \pm 78,95$) apresentou diferenças significativas quando comparado aos animais dos grupos D e DE1 ($p < 0,05$) (figura 4).

Análise morfométrica da população total dos neurônios mioentéricos

A área média obtida para os neurônios mioentéricos (μm^2) dos grupos estudados foram as seguintes: N ($283,9 \pm 16,3$), NE1 ($267,7 \pm 13,5$), NE2 ($265,6 \pm 30,4$), D ($304,4 \pm 13,7$), DE1 ($306,5 \pm 13,3$) e DE2 ($267,3 \pm 13,4$). A comparação entre os grupos N e D não revelou diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) (figura 5). Apesar da ausência de diferenças, é pertinente destacar que os animais do grupo DE2 apresentaram redução da área do corpo celular quando

comparados aos animais dos grupos D e DE1 ($p < 0,05$). O intervalo de 201 a 300 μm^2 foi o perfil celular predominante para todos os grupos (Figura 6).

DISCUSSÃO

A estreptozotocina é uma droga amplamente utilizada para indução do diabetes, e sua ação é correlacionada com a dose empregada.²⁷ A concentração de 35mg/kg de peso corporal para ratos é estabelecida^{9,11,32} e apresenta grande eficácia na indução do diabetes. A ação intracelular da estreptozotocina resulta em mudanças no DNA das células β pancreáticas, incluindo sua fragmentação, o que leva a morte dessas células.³³ A eficiência do modelo experimental de diabetes induzido pela estreptozotocina foi comprovada neste experimento considerando a elevação significativa da glicemia e hemoglobina glicada para os animais dos grupos D, DE1 e DE2.

Também foram observadas características típicas do estado diabético, quando estes foram comparados aos animais dos grupos N, NE1 e NE2, tais como polifagia, polidipsia, poliúria (dados não mostrados). Este quadro para roedores diabéticos é freqüente em experimentos que induzem diabetes experimental com a mesma droga e dosagem por nós utilizada.^{14,34}

Os animais diabéticos que receberam a suplementação com vitamina E (2%), apresentaram redução significativa na glicemia e da hemoglobina glicada quando comparados aos animais dos grupos D e DE1, indicando efeito positivo deste antioxidante sobre a glicemia sanguínea. Shirpoor et al.²² em estudo realizado com ratos diabéticos que receberam vitamina E (dose de 300mg), observaram significante redução dos níveis de glicose sanguínea e

diminuição da hemoglobina glicada nos animais diabéticos tratados em relação aos animais diabéticos. Outro estudo também realizado em ratos diabéticos suplementados com vitamina E (650mg/kg de peso corporal) mostrou que os níveis sanguíneos de glicose estavam reduzidos nos animais diabéticos suplementados quando comparados aos animais diabéticos.³⁵ Apesar dos autores citados observarem redução da glicemia com concentrações menores de vitamina E do que a concentração por nós utilizada, visto que na ração a 2% os ratos diabéticos ingeriram diariamente em média 900mg de vitamina E, o meio de administração foi diferente, vitamina E em água²² e vitamina E por gavagem³⁵ o que nos permite inferir que a forma de administração é fundamental ao serem analisados os efeitos deste antioxidante, e que a suplementação na ração exige maiores concentrações de vitamina E.²³

O mecanismo da ação antioxidante na redução dos níveis de glicose sanguínea ainda não está estabelecido. Antioxidantes podem aumentar o metabolismo da glicose nos tecidos periféricos levando a moderada diminuição nos níveis plasmáticos de glicose³⁵, esse fato poderia explicar a redução na hemoglobina glicada promovida pela vitamina E nos animais do grupo NE2. Mais estudos são requeridos para encontrar a relação entre a dose resposta de vitamina E, e estabelecer o mecanismo de ação antioxidante na redução dos níveis sanguíneos de glicose no diabetes experimental.

A área do intestino grosso dos animais diabéticos apresentou-se significativamente maior. Aumento nas dimensões dos órgãos de animais diabéticos é resultado freqüente na literatura, tanto para intestino delgado^{3,17,6,37} como para intestino grosso.^{13,32} Ceco de grandes dimensões em ratos diabéticos foi observado por Zanoni et al.¹³, que atribuíram este aumento a diminuição no tônus das fibras musculares, levando a maior dilatação. Já Miranda Neto et al.³², atribuíram as maiores dimensões encontradas para o colo distal de ratos diabéticos, como efeito do aumento na população nitrérgica (neurônios inibitórios) levando a diminuição no tônus

muscular. Outro fator levantado por Nakabou et al.³⁸ que contribuiria para o aumento do intestino em ratos diabéticos, seria maior ingesta alimentar destes animais.

Consideramos que o aumento nas dimensões do intestino grosso, se deva a um conjunto de fatores que incluiria a redução da inervação intrínseca deste órgão, comprovada pela menor população neuronal mioentérica e pela menor espessura da túnica muscular comprometendo a motilidade intestinal. A hipótese de maior ingesta alimentar provocar maiores dimensões nos órgãos³⁸ também deve ser considerada, uma vez que a polifagia é um sinal típico do quadro diabético^{14,34} e também foi observada neste experimento.

A suplementação com vitamina E não apresentou efeitos sobre as dimensões do intestino grosso em nenhum dos grupos estudados. Shirpoor et al.³⁹ observou que no intestino delgado de ratos diabéticos que receberam a vitamina E (300mg/kg de peso corporal) o comprimento do intestino não foi alterado.

A espessura da parede total intestinal e a túnica muscular apresentaram-se reduzidas nos animais diabéticos. Dados da literatura revelam que o intestino delgado de ratos responde ao diabetes experimental com aumento da espessura da parede total e da túnica muscular.³ Estes resultados não podem ser considerados contraditórios aos nossos, uma vez que estes autores mantiveram um quadro de diabetes agudo e o nosso modelo experimental simula um quadro de diabetes crônico. A diminuição observada na espessura da parede total intestinal é um reflexo da redução da túnica muscular e esta por sua vez é consequência da redução significativa da inervação, promovida pela perda dos neurônios mioentéricos.

A espessura da túnica mucosa não apresentou alterações significantes para todos os grupos. Este resultado é corroborado pela manutenção das criptas do colo proximal em ratos com diabetes crônico³⁴, por possível adaptação fisiológica, já que não foi observado nesse experimento aumento da proliferação nas criptas intestinais. Outros estudos indicam

hipertrofia³ e hiperplasia⁷ da mucosa do intestino delgado em ratos submetidos ao modelo experimental de diabetes agudo. Os resultados que obtivemos com relação a avaliação da espessura da túnica mucosa, muscular e parede total nos permite inferir que, variações nestes parâmetros estão diretamente relacionados com o período de manutenção do estado diabético. Outro fator que deve ser considerado é apontado por Belai et al.³⁷ que mostra que o DM afeta de maneira diferenciada os intestinos, sendo o intestino delgado mais susceptível que o intestino grosso.

A espessura da parede intestinal total, da túnica mucosa e túnica muscular do colo proximal dos animais diabéticos não foi afetada pela suplementação com vitamina E independente da concentração utilizada. A ausência de efeito da vitamina E foi observada por Shirpoor et al.³⁹ para altura das vilosidades e profundidade das criptas do intestino delgado de ratos diabéticos. A suplementação com o aminoácido glutamina, precursor de um importante agente antioxidante, a glutathione, também não alterou a profundidade das criptas e a proliferação celular da mucosa colônica de ratos diabéticos.³⁴

A análise quantitativa das células caliciformes, não mostrou diferenças significantes entre os grupos. Estudo realizado por Mantle et al.⁵ revelou que no intestino delgado de ratos com diabetes agudo, há aumento do número de células caliciformes nas vilosidades intestinais, em resposta a hiperfagia e conseqüente aumento da estimulação luminal dessas células nas vilosidades. Aumento no número de células caliciformes nas criptas do intestino delgado de camundongos diabéticos, foi relatado por Ettarh e Carr⁴⁰, que ressaltam que o aumento das células caliciformes é diretamente relacionado com aumento na túnica mucosa. Nossos resultados referentes a túnica mucosa indicam preservação da mesma nos animais diabéticos e justificariam a manutenção desta população celular, que mostrou-se adaptada morfofuncionalmente ao quadro de diabetes crônico.

Para avaliar a população mioentérica total utilizamos a técnica de Giemsa em preparados de membrana, esta técnica baseia-se na afinidade do corante por estruturas ácidas das células sendo largamente empregada.^{9,10,12-14} A quantificação neuronal mostrou redução significativa no número de neurônios mioentéricos nos animais do grupo diabético quando comparados aos animais normoglicêmicos. Este resultado é comum para ratos, não só com a técnica de Giemsa^{9,10,12-14}, mas também com técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas em diferentes segmentos do trato gastrointestinal.^{11,34,45} A hiperglicemia característica do diabetes vem sendo considerada a principal responsável pelo desenvolvimento e progressão da neuropatia, pois ela promove anormalidades no fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade vascular, além da diminuição de fatores tróficos para as células neuronais.¹⁶ Como o diabetes causa aumento do estresse oxidativo⁴¹ todos os mecanismos que contribuem para a neuropatia diabética estão relacionados a ele.¹⁵ A redução dos sistemas antioxidantes no diabetes, que incluem as vitaminas A, C e E, além da glutathione e da glutathione peroxidase também contribui para o desenvolvimento da neuropatia.⁴²

A administração de vitamina E (2%) apresentou um efeito neuroprotetor, pois conservou o número de neurônios mioentéricos no grupo DE2 quando foram comparados aos animais do grupo D e DE1. Cotter et al.²³ utilizando a concentração de 0,1% de vitamina E mostraram que a redução da velocidade de condução nervosa pode ser diminuída em ratos diabéticos. De acordo com estes autores, no diabetes experimental os níveis glicêmicos e o aumento de radicais livres, são excessivamente superiores ao verificado em pacientes com diabetes controlado. Isso pode explicar porque uma neuroproteção não foi observada no grupo DE1 (0,1%). A menor perda neuronal observada no grupo DE2 poderia ser atribuída ao fato da vitamina E potencializar o sistema antioxidante, pois em eritrócitos de ratos diabéticos ela promoveu o aumento da glutathione e das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase¹⁸ e também

por ser um antioxidante.¹⁹ Além disso, o desenvolvimento da neuropatia diabética está associado à disfunção mitocondrial com conseqüente formação de espécies reativas de oxigênio, as quais estão relacionadas à ativação de uma cascata de eventos que geram a apoptose.^{43,44} Assim a suplementação com vitamina E pode ter minimizado esses eventos e reduzido a morte celular neuronal no grupo DE2.

Ao analisarmos os resultados obtidos através da média da área do corpo celular dos neurônios, verificamos que não houve diferenças significativas quando os grupos diabéticos ($304,4 \pm 5,9$) foram comparados aos normoglicêmicos ($283,9 \pm 5,7$). Aumento na área do corpo celular de neurônios nitrérgicos e vipérgicos foi observado em ratos diabéticos^{8,45} cuja causa foi atribuída ao aumento dos processos de síntese neuronal no intuito de compensar a atividade dos neurônios que morreram, fazendo assim a célula ganhar volume.⁴⁵

Nossos resultados se assemelham aos de Tashima et al.³⁴ em relação a área dos neurônios miosina-V no colo proximal de ratos diabéticos. A técnica imunohistoquímica miosina -V é referida na literatura como um marcador para a população mioentérica total. No entanto Zaroni et al.⁴⁵ observaram aumento da área dos neurônios VIP-érgicos de ratos diabéticos, possivelmente pela maior síntese de neuropeptídeos pelas células. Segundo Tashima et al.³⁴ o diabetes mellitus afeta diferentemente as subpopulações neuronais do trato gastrointestinal, assim as técnicas que evidenciam toda a população neuronal, como é o caso da técnica imunohistoquímica miosina-V e técnica de Giemsa, não demonstram essas alterações.

É pertinente destacar que no grupo DE2 ($267,3 \pm 13,4$), foi observada uma diminuição estatisticamente significativa da área do corpo celular dos neurônios em relação ao grupo D ($304,4 \pm 5,9$) e DE1 ($306,5 \pm 13,3$), o que indica influência positiva da vitamina E (2%), sobre este parâmetro. Esta afirmação é corroborada pelas observações de Zaroni et al.⁴⁵ nos neurônios VIP-érgicos do íleo de ratos diabéticos, onde a suplementação com o antioxidante

ácido ascórbico preveniu o aumento do perfil celular. Nossos resultados indicam que a vitamina E (2%) teve um efeito neurotrófico, pois conservou a área do corpo celular dos neurônios nos animais diabéticos.

A suplementação com vitamina E (2%) para ratos com diabetes mellitus crônico, influenciou positivamente a glicemia e apresentou efeito neuroprotetor sobre os neurônios mioentéricos, não afetando as características morfométricas da parede intestinal.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos as técnicas de laboratório, Ana Paula de Santi Rampazzo, Maria Euride do Carmo Cancino, Maria dos Anjos Fortunato pelo excelente apoio técnico.

REFERÊNCIAS

1. Foss MC. Diabetes mellitus e suas complicações crônicas. Rev Bras Neurol 1991; **27**: 3-6.
2. Guo C, Quobatari A, Shangguan Y, Hong S, Wiley JW. Diabetic autonomy neuropathy: evidence for apoptosis *in situ* in the rat. Neurogastroenterol Motil 2004; **16**: 335-345.
3. Zhao J, Yang J, Gregersen H. Biomechanical and morphometric intestinal remodelling during experimental diabetes in rats. Diabetologia 2003; **46**: 1688-97.
4. Lorenz-Meyer H, Thiel F, Menge HG, Riecke EO. Structural and functional on the transformation of the intestinal mucosa in rats with experimental diabetes, Res Exp Med 1977; **170**: 89-99.
5. Mantle M, Thakore E, Atikins E, Mathison R, Davison JS. Effects of streptozotocin-diabetes on rat intestinal mucin and goblet cells. Gastroenterology 1988; **97**: 66-75.
6. Vinik AI. Diabetic neuropathy: pathogenesis and therapy. Am J Med 1999; **107**: 17-26.
7. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. Journal of the Autonomic Nervous System 2000; **81**: 87-96.
8. Fregonesi CEPT, Miranda-Neto MH, Molinari SL, Zanoni JN. Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes, Arq Neuropsiquiatr 2001; **59**: 50-53.
9. Buttow NC, Miranda Neto MH, Bazotte RB. Morphological and quantitative study of myenteric plexus of the duodenum of streptozotocin-induced diabetic rats. Arq Gastroenterol 1997; **34**: 34-42.

10. Hernandez L, Bazotte RB, Gama P, Miranda-Neto MH. Streptozotocin-induced diabetes duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons. *Arq Neuropsiquiatr* 2000; **58**:1035-39.
11. Zanoni JN, Buttow NC, 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. *Autonomic Neuroscience* 2003; **104**: 32-38.
12. Romano EB, Miranda-Neto MH, Cardoso RCS. Preliminary investigation about the effects of streptozotocin-induced chronic diabetes on the nerve cell number and size of myenteric ganglia in rat colon. *Rev Chil Anat* 1996; **14**: 139-145.
13. Zanoni JN, Miranda-Neto MH, Bazotte BB, Souza RR. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin diabetic rats. *Arq Neuropsiquiatr* 1997; **55**: 696-702.
14. Furlan MMDP, Molinari SL, Miranda Neto MH. Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats. *Arq Neuropsiquiatr* 2002; **60**: 576-581.
15. Vincent A, Feldman EL. New insights into the mechanisms of diabetic neuropathy. *Reviews in Endocrine e Metabolic Disorders* 2004; **5**: 227-236.
16. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; **414**: 813-820.
17. Bhor VM, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Biochem Cell* 2004; **36**: 89-97.

18. 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* 2005; **25**: 625-630.
19. Bramley PM, Elmadfa I, Hafatos A. et al. Vitamin E. *J Sci Food Agric* 2000; **80**: 913-938.
20. Debier C, Larondelle Y. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *British Journal of Nutrition* 2005; **93**: 153-174.
21. Reunanen A, Knekt P, Aaran RK, Aromaa A. Serum antioxidants and risk of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Nutr* 1998; **52**: 89-93.
22. Shirpoor A, Ansari MHK, Salami S, Pakdel FG, Rasmi Y. Effect of vitamin E on oxidative stress status in small intestine of diabetic rat. *Word J Gastroenterol* 2007; **13**: 4340-44.
23. 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.
24. Tutuncu NB, Bayraktar M, Varli K. Reversal of the defective nerve conduction with vitamin E supplementation in type 2 diabetes: a preliminary study. *Diabetes Care* 1998; **21**: 1915-18.
25. Van Dam PS, Van Asbeck S, et al. Nerve function and oxidative stress in diabetic and vitamin E-deficient rats. *Free Radical Bio Med* 1998; **24**: 18-
26. Van Dam PS, Bravenboer B, Van Asbeck S, Marx JJM, Gispens WH. High rat food vitamin e content improves nerve function in streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 1999; **376**: 217-222.
27. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969; **48**: 2129-39.
28. Bergmeyer HE, Bernet E. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase, In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, NY, 1974.

29. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A. Correlation of glucose relation and hemoglobin A_{1c} in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1976; **295**: 417-420.
30. Barbosa AJA. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. *Rev. Bras. Pesqui. Méd. Biol.* 1978; **11**: 95-97.
31. Zanoni JN, Freitas P, Pereira RVF, Santos Pereira MA, 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**: 149-153.
32. Miranda-Neto MH, Fregonesi CEPT, Molinary SL, et al. Evaluation of the nitrenergic myenteric neurons in the distal colon of diabetic rats treated with acetyl-l-carnitine. *Braz J Morphol Sci* 2004; **21**: 105-110.
33. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induced DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 1981; **294**: 284-286.
34. 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.
35. Sharma AH, Ponery AS, Lawrence PA, et al. Effect of alfa-tocoferol supplementation on the ultrastructural abnormalities of peripheral nerves in experimental diabetes. *J Peripher Nerv Syst* 2001; **6**: 33-39.
36. Belai A, Lincoln J, Milner P, Burnstock G. Progressive changes in adrenergic, serotonergic, and peptidergic nerves in proximal colon of streptozotocin-diabetic rats. *Gastroenterology* 1988; **95**: 1234-41.
37. Belai A, Lincoln J, Milner P, Burnstock G. Diferential effect of streptozotocin induced on the ileum and distal colon. *Gastroenterology* 1991; **100**: 1024-32.

38. Nakabou Y, Okita C, Takano Y, Hagihira H. Hiperplastic and hypertophic changes of the small intestine in aloxan diabetic rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 1974; **20**: 227-234.
39. Shirpoor A, Ilkhanizadeh B, Saadatian R, et al. Effect of vitamin E on diabetes-induced changes in small intestine and plasma antioxidant capacity in rat. *J Physiol Biochem* 2006; **62**: 171-177.
40. Ettarh RR, Carr KE. A morphological study of the enteric mucosal epithelium the streptozotocin-diabetic mouse. *Life Sci* 1997; **61**: 1851-58.
41. Chung SM, Ho ECM, Lan KSL, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 223-236.
42. 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**: 365-373.
43. Srinivasan S, Stevens M, Wiley JW. Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction, *Diabetes* 2000; **49**: 1932-38.
44. Emerit J, Edeas M, Bricaire F Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 2004; **58**: 39-46.
45. 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**: 32-37.

Tabela 1 Glicemia, hemoglobina glicada, peso corporal final e área do intestino grosso de ratos dos grupos: (N) normoglicêmicos; (NE1) normoglicêmicos suplementados com vitamina E (0,1%); (NE2) normoglicêmicos suplementados com vitamina E (2%); (D) diabéticos; (DE1) diabéticos suplementados com vitamina E (0,1%) e (DE2) diabéticos suplementados com vitamina E (2%). Média \pm erro-padrão (n = 5).

	Glicemia (mg/dl)	Hemoglobina Glicada (%)	Peso Final (g)	Área Intestinal (cm ²)
N	178,2 \pm 17,3 ^a	3,16 \pm 0,13 ^a	450,3 \pm 15,6 ^a	18,75 \pm 1,6a
NE1	147,2 \pm 8,3 ^a	3,64 \pm 0,26 ^a	419,2 \pm 12,6 ^a	20,35 \pm 5,9 a
NE2	128 \pm 6,4 ^a	2,54 \pm 0,05 ^b	406,7 \pm 9,8 ^a	20,42 \pm 3,7 a
D	489,6 \pm 7,2 ^b	6,15 \pm 0,45 ^c	268,2 \pm 14,5 ^b	36,82 \pm 3,8 b
DE1	525,2 \pm 23,2 ^b	6,50 \pm 0,10 ^c	291,3 \pm 21,9 ^b	32,44 \pm 5,2 b
DE2	319,7 \pm 3,6 ^c	4,78 \pm 0,13 ^d	290 \pm 21,7 ^b	29,46 \pm 3,7 b

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

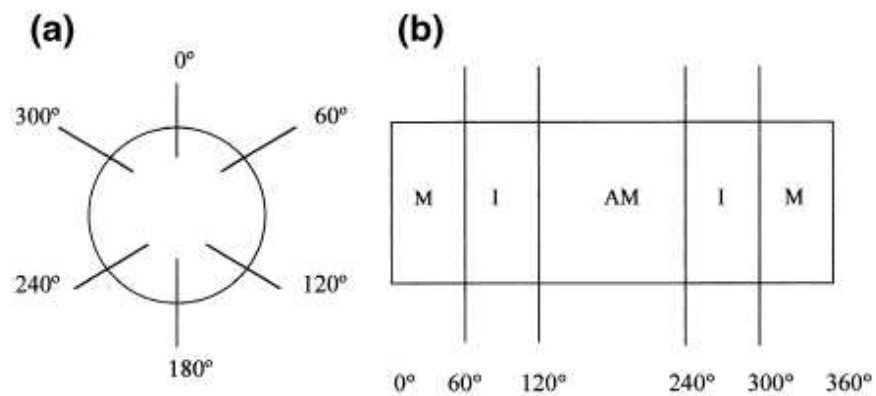


Figura 1. (a) Corte transversal do intestino: 0° representa a inserção do mesocolo, de 0°-60° e 300°-360° região mesocólica, de 60°-120° e 240°-300° regiões intermediárias e de 120°-240° região antimesocólica da circunferência intestinal. (b) Segmento intestinal aberto na borda mesocólica (M, região mesocólica; I, região intermediária; AM, região antimesocólica).³¹

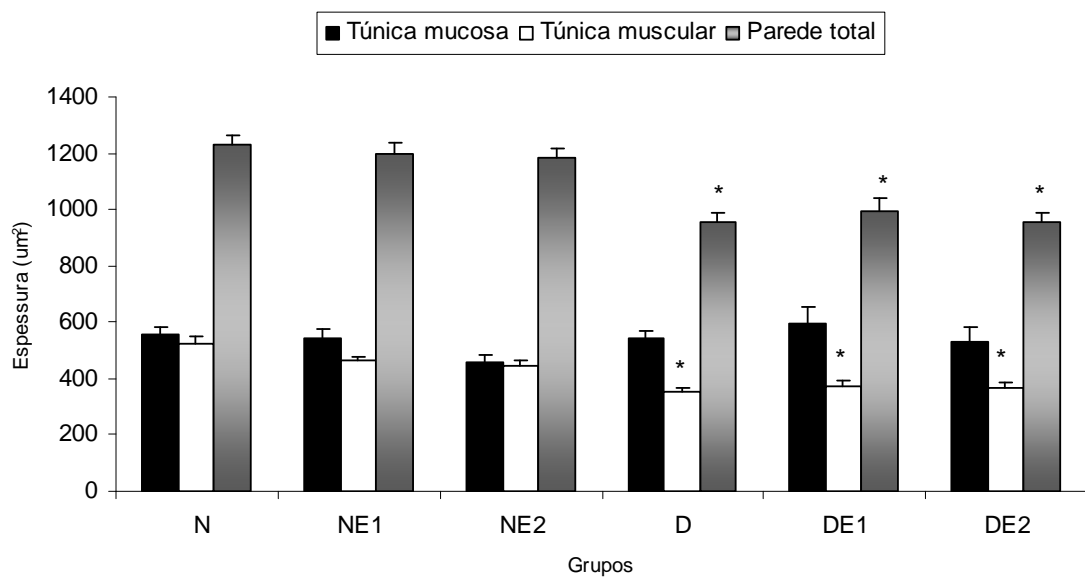


Figura 2 Morfometria da parede intestinal: túnica mucosa, túnica muscular e parede total de ratos dos grupos: (N) normoglicêmicos; (NE1) normoglicêmicos suplementados com vitamina E (0,1%); (NE2) normoglicêmicos suplementados com vitamina E (2%); (D) diabéticos; (DE1) diabéticos suplementados com vitamina E (0,1%) e (DE2) diabéticos suplementados com vitamina E (2%). Média \pm erro-padrão (n = 5). * p < 0,05 quando comparados aos demais grupos.

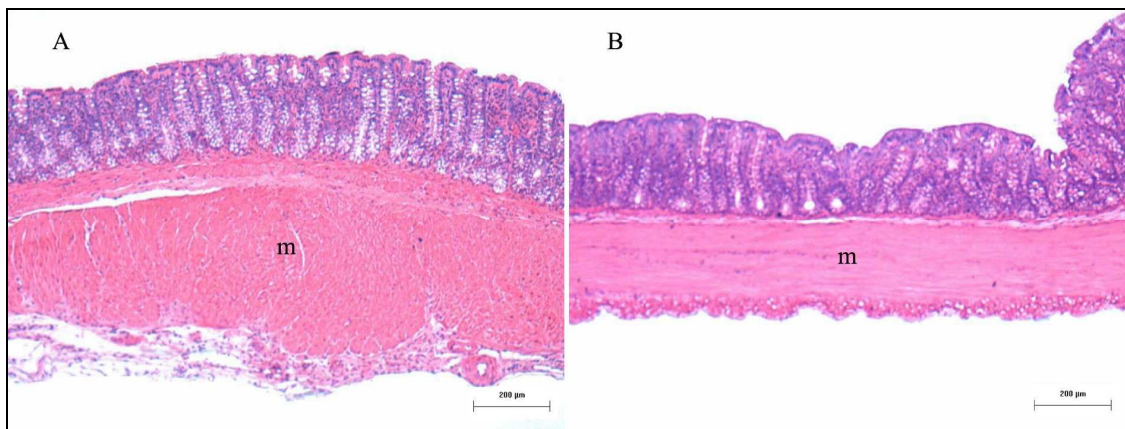


Figura 3 Fotomicrografias da parede do colo proximal de rato normoglicêmico (A) e diabético (B), evidenciando redução na espessura da túnica muscular e da parede intestinal total (B). HE, barra de calibração 200 µm.

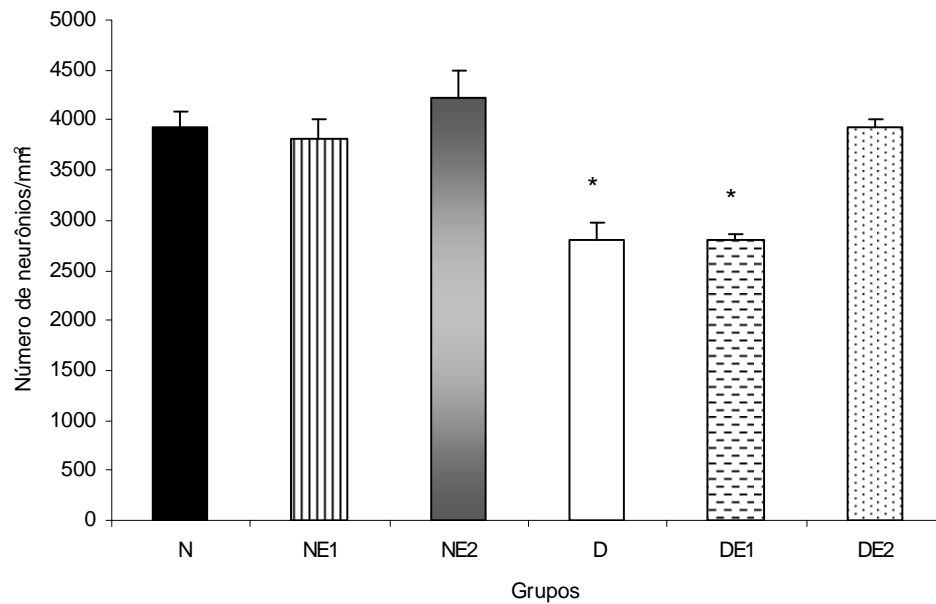


Figura 4 Número de neurônios mioentéricos quantificados em $14,4\text{mm}^2$ no cólo proximal dos animais dos grupos: (N) normoglicêmicos; (NE1) normoglicêmicos suplementados com vitamina E (0,1%); (NE2) normoglicêmicos suplementados com vitamina E (2%); (D) diabéticos; (DE1) diabéticos suplementados com vitamina E (0,1%) e (DE2) diabéticos suplementados com vitamina E (2%). Média \pm erro-padrão (n=5). * $p < 0,05$ quando comparados aos demais grupos.

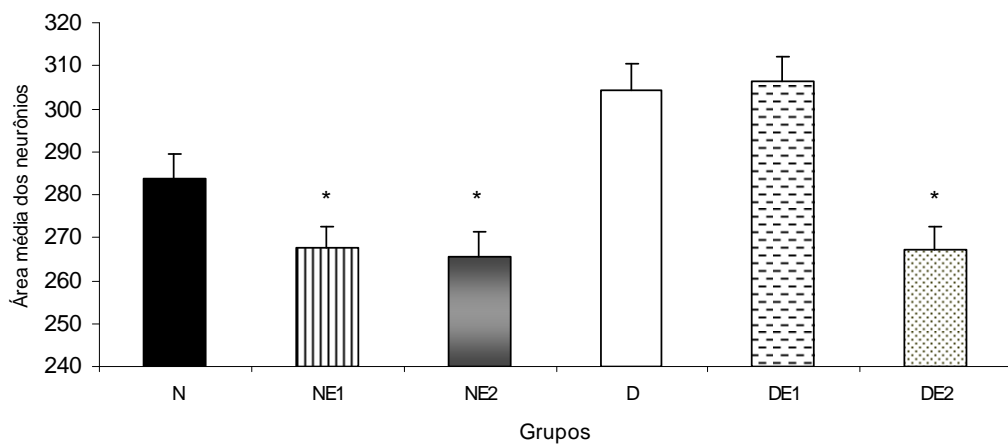


Figura 5 Médias das áreas dos neurônios mioentéricos do colo proximal dos animais dos grupos: (N) normoglicêmicos; (NE1) normoglicêmicos suplementados com vitamina E (0,1%); (NE2) normoglicêmicos suplementados com vitamina E (2%); (D) diabéticos; (DE1) diabéticos suplementados com vitamina E (0,1%) e (DE2) diabéticos suplementados com vitamina E (2%). Média \pm erro-padrão (n=5). * $p < 0,05$ quando comparado aos grupos D e DE1.

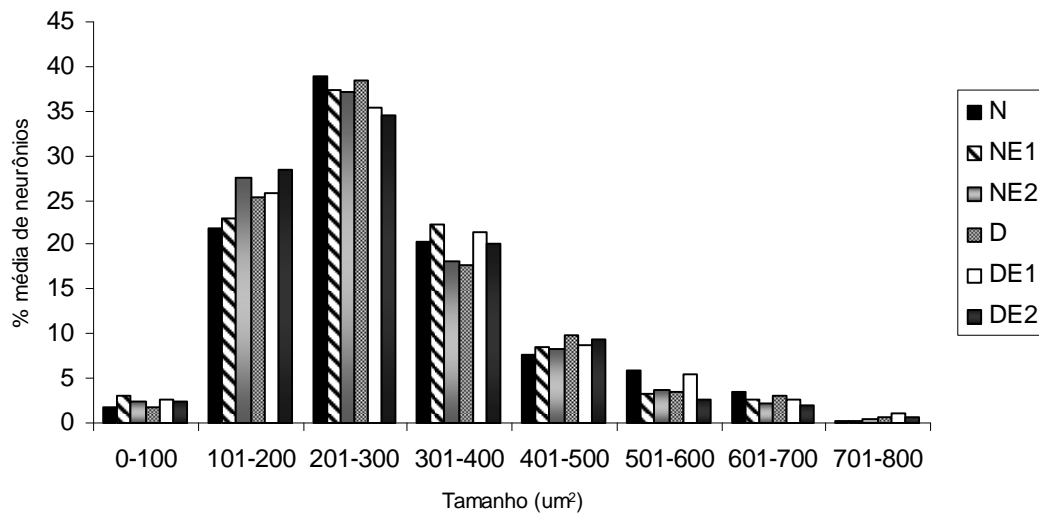


Figura 6 Distribuição de freqüências relativas das áreas dos corpos celulares de neurônios mioentéricos do colo proximal, classificados quanto ao perfil celular em intervalos de $100\mu\text{m}^2$ nos animais dos grupos: (N) normoglicêmicos; (NE1) normoglicêmicos suplementados com vitamina E (0,1%); (NE2) normoglicêmicos suplementados com vitamina E (2%); (D) diabéticos; (DE1) diabéticos suplementados com vitamina E (0,1%) e (DE2) diabéticos suplementados com vitamina E (2%). N=5 ratos por grupo.

**Supplementation with vitamin E (α -tocopherol) in diabetic rats: effects on the proximal
colon**

Summed-up title : Colon of diabetic rats supplemented with vitamin E

Luciana Patrícia Roldi Pizzoli¹, Renata Virginia Fernandes Pereira¹, Eleandro Aparecido Tronchini¹, Maria Raquel Marçal Natali¹

¹Department of Morphophysiological Sciences, Laboratory of Enteric Neurons, State University of Maringá.

Corresponding author:

Professora Maria Raquel Marçal Natali. Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, nº 5790 Bloco H-79 – CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil. Tel: +55 44 32614706;

e-mail: mrmnatali@uem.br

Abstract: The neuropathy is one of the complications caused by diabetes mellitus (DM) which is directly related to the gastrointestinal manifestations of the disease. Antioxidant substances as vitamin E may have an important role in the reduction of the neurological damages caused by DM. The aim of this study was to evaluate if the vitamin E (α -tocopherol) in different concentrations perform any effects over the morphology of the intestinal wall and intrinsic innervation in the proximal colon of diabetic rats. Thirty rats (90-day-old) were distributed into the following groups: N: normoglycemic NE1 and NE2: normoglycemic supplemented with vitamin E (0.1%) and (2%), respectively; D: diabetics; DE1 and DE2: diabetics supplemented with vitamin E (0.1%) and (2%), respectively. Animals received supplementation with vitamin E for 120 days, being killed when they were 210-day-old. Proximal colon of every animal was submitted to histological processing in order to study the intestinal wall and the goblet cells and to whole mount preparations for the morphoquantitative study of the total myenteric population. Supplementation with vitamin E significantly reduced glycemia and the values of the glycosylated hemoglobin and preserved the number of myenteric neurons for animals in group DE2, without effects for the intestine area, thickness of the intestinal wall and muscular tunic. It was concluded that vitamin E (2%) influenced the glycemic parameters evaluated and it had a neuroprotective effect over the total myenteric population, however, morphometric characteristics of the intestinal wall were not affected

Keywords: diabetes mellitus, myenteric neurons, intestinal wall, vitamin E

INTRODUCTION

Due to diabetes mellitus misbalances and pathological changes are observed in several tissues. All sorts of diabetes mellitus are characterized by hyperglycemia and the development of specific microvascular pathologies, in retina (retinopathy), in renal glomeruli (nephropathy) and peripheral nerves (neuropathy), being this last one the most usual in diabetic patients.

The manifestations of the diabetic neuropathy lead to many symptoms in the gastrointestinal tract, such as diabetic gastroparesis, diabetic enteropathy, esophageic motor function, colonic hypomobility and rectum-anal dysfunction. Morphological repercussions such as increase in the total area of the intestinal wall in small intestine, hypertrophy³ and hyperplasia of the intestinal mucosa⁴ and larger number of goblet cells⁵ are also described.

Vinik⁶ evidences that the neuropathy promoted by diabetes in the gastrointestinal tracts is related to alterations in the myenteric neurons in the Enteric Nervous System (ENS), which is presented in the tubular wall of the digest tract⁷. Recent studies show severe alterations on the compounds of the ENS of rats, in diabetes experimental, as reduction in enteric neurons in stomach⁸, duodenum⁹, ileum^{10,11} colon¹², cecum¹³, proximal colon¹⁴ and alterations in the area of the neuronal cellular bodies of ileum^{10,11}, colon¹² and cecum¹³. The characteristic hyperglycemia has been pointed out as the responsible for the development and progress of the neuropathy, once this promotes the lost of the function and decreases the survival of the neurons¹⁵, due to either alteration in blood flow and an increase in vascular permeability and also the decrease of trophic factors to the neuronal cells¹⁶. Among the described mechanism which explain how hyperglycemia damages the nervous system, the accumulation of final products of the glycation (AGEs), hyperactivity in the polyol pathway and the increase of oxidative stress.

Oxidative stress during diabetes generates reactive oxygen species (ROS) and the unbalance among the antioxidants. Bhor et al.¹⁷ report an altered activity in the primary antioxidants enzymes: catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase as well as an increase in the lipid peroxidation and the content of the carbonyl proteins, ensuring the occurrence of the oxidative stress in diabetic rats.

There are several antioxidants enzymatic and non-enzymatic systems in the cell which inactivate free radicals in this way reducing the damage caused by them. These antioxidants include glutathione, enzymatic systems and vitamins A, C and E.¹⁸ The activity of vitamin E over free radicals is mainly important for preventing or delaying of many degenerative diseases as cancer, cardiovascular inflammatory diseases, cellular alteration due to aging process and also neurological diseases.¹⁹

Vitamin E presents eight different natural forms: α -, β -, δ -, γ -tocopherols and α -, β -, δ -, γ -tocotrienols. This form presents a 2-methyl-6-chromanol ring attached to a hydrophobic side chain, in this way, being insoluble in water and soluble in oil and other organic solvents. The α -tocopherol constitute the most active biological form.²⁰

In diabetic patients, Reunanen et al.²¹ verified that vitamin E promoted a reduction in the indicators of oxidative stress and protein glycation. In diabetic rats which were submitted a treatment with vitamin E, it was observed a reduction in the lipid peroxidation and an increase in the activity of the superoxide dismutase²², increase in the velocity of nervous conduction^{23,24} and protection against nervous dysfunction.^{25,26}

Based on this the aim of the present study was to verify if vitamin E (α -tocopherol) in different concentrations performs any effect over the morphology of the intestinal wall and over the myenteric neurons in the proximal colon of diabetic rats.

MATERIAL E METHODS

Animal Procedure

It was used 30 albino rats (*Rattus norvegicus*), Wistar strain, males and adults, from the Central Biotery of the State University of Maringa (UEM). All procedures described in this study were previously approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of UEM. When rats were 90-day-old, the rats were kept in polypropylene boxes for 120 days in the biotery, under controlled conditions of temperature ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) and illumination(light/dark cycles 12/12 hr) with *ad libitum* water and food. Animals from N and D groups received Nuvital® balanced chow pellet (Nuvilab, Colombo, PR, Brazil). For NE1, NE2, DE1 and DE2 groups, vitamin E (α -tocopherol) (Zhejiang NHU, China) was added to the patronized chow in the concentrations of 0.1%²³ and 2%.

Animals were distributed into 6 groups each, with 5 animals each: *N*: normoglycemic supplemented with patronized chow for rodents, *NE1*: normoglycemic supplemented with patronized chow supplemented with vitamin E (0.1%); *NE2*: normoglycemic supplemented with patronized chow supplemented with vitamin E (2%); *D*: diabetic supplemented with standardized chow; *DE1*: diabetic supplemented with vitamin E (0.1%); *DE2*: diabetic supplemented with vitamin E (2%)

In order to induce diabetes, after previous fasting of 14 hours animals from groups D, DE1 and DE2, were injected (penis vein) with streptozotocin (Sigma, St. Louis, MO, EUA) in a concentration of 35mg/kg body weight²⁷, dissolved in a citrate buffer at pH 4.5 (10mM).

Glucose levels after the induction were determined by the glucose oxidase method²⁸ in to confirm the induced disease. Only in animals with higher 250mg/dl glycemia were maintained in D, DE1 and DE2 groups.

Tissue collecting and processing

After 120 days of experiment, animal were killed, being previously weighted and intraperitoneally anesthetized with thiopental (40mg/kg body weigh) (Abbott Laboratories, Chicago, IL, EUA), being the blood collect by heart puncture in order to evaluate the levels of glycemic and glyated hemoglobin.²⁹ After laparotomy, large intestine was collected and its length and circumference measured to obtain the area, and also were collected the segments of the proximal colon. Some samples were designated to the study of the intestinal wall trough histological processing and the PAS (Periodic Acid-Schiff), histochemical technique (to identify the goblet cells) and the other samples were submitted to whole mount preparations stained by the Giemsa method for the morphoquantitative study of the total myenteric population.

Study of the intestinal wall

Samples of the proximal colon were opened along the mesocolic region and distended on an isoprene plate. Following that mucosa was exposed and washed with saline solution to remove the feces. After that, segments were fixed in Bouin for 12 hours with posterior storage in alcohol 70%. Segments were submitted to two mean inclusions, in paraffin to obtain semi-seriated sections of 7µm-thickness each and Hematoxilin and Eosin (HE) staining, and included in historesin (LKB - Technovit 7100) to obtain semi-seriated sections of 7µm-thickness each to

histochemical identification of glycoproteins presented in intestinal goblet cells by the PAS method.

With the obtained sections images were captured using a high-resolution camera (Q Color 3, Olympus America INC) coupled in a light microscope (Olympus BX40). Morphometric and quantitative analyzes were performed with the aid of a system of Computerized-Images Analysis - Image Pro Plus[®] 4.5 (Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, MD, EUA).

Images of the sections stained with HE were used to measure the thickness of the mucous and muscular tunic, and total intestinal wall, in 10 points chosen at random, in 5 sections/animal, making a total of 250 measures per group.

Images of the obtaining section by the PAS histochemical method were used to quantify the goblet cells presented in 50 images/animal (40X objective). The area of each image was 0.01mm². The obtained results were expressed in number of goblet cells per mm².

Quantitative and morphometric study of the myenteric neurons

Proximal colon samples of 5 animals from each group were collected, in order to evaluate the total population of myenteric neurons by the de Giemsa method.³⁰

After collecting the segments, they were washed in saline solution and filled with Giemsa fixing solution, being embebed in this solution for 24 hours. Segments were opened in their mesocolic region and microdissected under a stereomicroscope with transillumination, by the removal of the mucosa and submucosa layers, preserving the muscular tunic and serosa. Sequentially whole mount preparations were stained by the Giemsa method, in Sorensen's Phosphate Buffer 0,1N (pH 6.9), during 24 hours, at room temperature. Following that, they were

dehydrated in increased ethanol series, diaphanized in xylol and mounted on slides using Permount® and cover-slips

Quantitative analysis: Using the Olympus optical microscope under a 40X objective, it was quantified the number of myenteric neurons presented in 40 microscopic fields in the intermediate regions (60° - 120°; 240° - 300°) and 40 microscopic fields in the anti-mesocolic regions (120° - 240°) of the intestinal circumference, considering 0° as the mesocolon insertion (Figura 1).³¹ Each field corresponded to 0.18 mm², making a total of 14.4 mm²/animal

Morphometric analyses: In order to evaluate the area of the cellular body (cellular profile) of the myenteric neurons, 500 cellular bodies of neurons/group were measured. Images were obtained using a high-resolution camera, coupled to an optical microscope and the morphometric analyses performed with the aid of a system of Computerized-Images Analysis - Image Pro Plus® 4.5 (Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, MD, EUA).

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using the GraphPad Prism® 3.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA) software. After the variance analysis (ANOVA) it was used the Tukey's posttest to compare the mean values. It was adopted a significance level of 95% ($p < 0.05$). Results were presented as mean \pm standard error.

RESULTS

Streptozotocin promoted a development of the diabetic syndrome in animals from D, DE1 and DE2 groups, assured by the increase of glycemia and glycated hemoglobin (Table 1). During the experimental period, typical clinic manifestations of the disease were observed, as polyphagia, polydipsia, polyuria, as well as reduction in body weight when compared to the normoglycemic animals.

Supplementation with vitamin E (2%) significantly reduced the glycemic levels and glycated hemoglobin, when compared to animals from the D and DE1 groups ($p < 0.001$). In this concentration it was also possible to notice a reduction in glycated hemoglobin for the normoglycemic supplemented group (NE2). In relation to body weight, animals from DE1 and DE2 groups presented a lower weight loss in relation to non-treated diabetic animals ($p > 0.05$) (Table 1).

Large intestine area was significantly larger in diabetic animals when compared to animals from N group ($p < 0.001$), not being altered by the supplementation with vitamin E independently of the concentration. Data are presented in Table 1.

Morphometric analysis of the intestinal wall

Total intestinal wall and muscular tunic in diabetic animals were significantly reduced when compared to non-diabetic animals ($p < 0.05$) (Figure 2), however maintaining its typical histological organization (Figure 3). Supplementation with vitamin E do not promoted any reversion in this parameter. The thickness of the mucous tunic was maintained among the groups.

Quantitative analysis of the intestinal goblet cells

The number of goblet cells presented in 0,5mm²/animal was not statistically significant when all groups were compared. The average number for each group was: N (8896 ± 400.1), NE1 (7613 ± 344.5), NE2 (8246 ± 543.7), D (8532 ± 255.4), DE1 (7427 ± 392.5) e DE2 (7315 ± 376.3).

Quantitative analysis of the total population of the myenteric neurons

Considering the whole mount preparations stained by the Giemsa method, it was possible to observe the maintenance of the ganglia arrangement which ranged according to number and size, being scarce the presence of isolated neurons, independently of the studied group.

Despite neuronal counting had been performed in the antimesocolic and intermediate regions of the proximal colon, these values are not significantly different and for this reason the data are presented together.

The experimental diabetes condition promoted a reduction in number of myenteric neurons in D (2805 ± 176.9) and DE1 group (2797 ± 70.0), when compared to N (3929 ± 149.7), NE1 (3820 ± 179.0) and NE2 groups (4224 ± 262.8) ($p < 0.05$). It was verified a positive effects of vitamin E (2%), considering that the neuronal population in DE2 group (3923 ± 78.95) presented significant differences when compared to D and DE1 groups ($p < 0.05$) (Figure 4).

Morphometric analysis of the total population of the myenteric neurons

The mean area obtained for the myenteric neurons (μm^2) of the studied groups were as it follows: N ($283,9 \pm 16,3$), NE1 ($267,7 \pm 13,5$), NE2 ($265,6 \pm 30,4$), D ($304,4 \pm 13,7$), DE1 ($306,5 \pm 13,3$) and DE2 ($267,3 \pm 13,4$). The comparison between the N and D groups did not reveal any significant difference ($p > 0,05$) (figure 5). Despite the lack of differences, it is important to highlight that animals from group DE2 presented a reduction in the area of the cellular body when compared to animals of groups D and DE1 ($p < 0,05$). The interval from 201 to $300\mu\text{m}^2$ was the predominant cellular profile for all groups (Figure 6).

DISCUSSION

Streptozotocin is a widely drug used for diabetes inducing, its action is correlated with the employed drug.²⁷ The concentration of 35mg/kg body weight was established for the rats^{9,11,32} and presents a high efficiency in the induction of diabetes. The intracellular action of the streptozotocin results in DNA changes in pancreatic β cells including their fragmentation, leading to the death of these cells.³³ Efficiency in the diabetes experimental model induced by streptozotocin was assured in this experiment considering a significant increase in glycemia and the values of the glycosylated hemoglobin in animals from D, DE1 and DE2 groups.

It was also observed typical characteristics of the diabetic condition when these ones were compared to animals from N, NE1 and NE2 groups, such as polyphagia, polydipsia, polyuria (data not shown). This condition for diabetic rodents is frequent in experiments which induces experimental diabetes with the same drug used previously in our studies.^{14,34}

Diabetic animals which received supplementation with vitamin E (2%), presented a significant reduction in glycemia and glycated hemoglobin when compared to animals from D and DE1 groups, indicating a positive effects of this antioxidant over blood glycemia. Shirpoor et al.²² in a study performed with diabetic rats which received vitamin E (300mg/kg body weight), observed a significant reduction in blood glucose and glycated hemoglobin in treated diabetic animals in relation to the diabetic ones. Another study also performed with diabetic rats supplemented with vitamin E (650mg/kg body weigh) demonstrated that glucose blood levels were reduced in supplemented diabetic animals when compared to the diabetic animals.^{35 35} despite the other named authors had observed a reduction in glycemia with lower concentrations of vitamin E than those used in this study, once the chow at 2% the daily intake rats was, in average, 900mg vitamin E, and the via of administration was also different, vitamin E in water²² and vitamin E trough gavage³⁵ leading us to infer that this via of administration is mainly important when the effects of this antioxidant are evaluated, and that the supplementation in chow demands higher concentrations of vitamin E.²³

The antioxidant mechanism in the reduction of the levels in blood glucose has not been yet established. Antioxidants can increase glucose metabolism in peripheral tissues leading to a decrease in plasmatic glucose levels³⁵, this fact could explain the reduction in glycated hemoglobin promoted by vitamin E in animals from NE2 group. Further studies are required to find the relation between dose and response of vitamin E, and to establish the action of the antioxidant mechanism in the reduction of glucose blood levels in experimental diabetes.

The area of large intestine in diabetic animals was significantly larger. Increasing in dimension in organs of diabetic animals is often reported in literature, either for small intestine^{3,17,36,37} or large intestine.^{13,32} Cecum with larger dimensions was observed by Zanoni et al.¹³, who attributed this augment to the decrease in tonus of the muscular fibers, leading to a

higher dilatation. On the other hand, Miranda Neto et al.³², attributed the larger dimension found in the distal colon of diabetic rats as an effect of the nitrenergic population (inhibitory neurons) leading to a decrease in the muscular tonus. Another factor raised by Nakabou et al.³⁸ what would contribute for the increase of the intestine in diabetic rats, would be the higher alimentary intake of these animals.

In this study it was considered that the augmentation in large intestine must be due to a several united factors which would include the reduction of the intrinsic innervation in this organ, assured by the fewer myenteric neuronal population and thickness of the muscular tunic committing the intestinal motility. The hypothesis of the higher the intake the larger dimensions of these organs³⁸ must also be considered, once polyphagia is a typical sign for the diabetic condition^{14,34} and which was also observed in this experiment.

Supplementation with vitamin E did not presented any effect over the dimensions of the large intestine in the studied groups. Shirpoor et al.³⁹ observed that in small intestine of diabetic rats which received vitamin E (300mg/kg body weight) intestinal length was not altered.

Thickness of the total intestinal wall and the muscular tunic were reduced in diabetic animals. Data in literate reveal that the small intestine of rats responds to the experimental diabetes by increasing the thickness of the total wall as well as the muscular tunic.³ These results cannot be considered contradictories to the presented in this study, once these authors maintained the acute condition of diabetes and our model simulates the chronic one. The decreasing observed in the thickness of the total intestinal wall is a reflex of the reduction in the muscular tunic which is a significant consequence of the innervation, promoted by the loss of myenteric neurons.

The thickness of the mucous tunic did not present any significant alteration for all studied groups. This result is corroborated by the maintenance of crypts in the proximal colon of rats with chronic diabetes³⁴, possibly because a physiological adaptation, once it was not observed an increase in proliferation of intestinal crypts. Another studies report hypertrophy³ and hyperplasia⁷ in mucosa of the small intestine in rats submitted to the acute experimental model of diabetes. Considering the results obtained in relation to the evaluation of the mucous, muscular tunic and total wall it can be inferred that, variations in these parameters are directly related to the period of maintenance of the diabetic state. Another factor that must be considered is the one pointed out by Belai et al.³⁷ which shows that DM affects in differentiated ways the intestines, being the small intestine more susceptible that the large one.

The thickness of the total intestinal wall, mucous and muscular tunic of the proximal colon in diabetic animals was not affected by the supplementation with vitamin E independently of the concentration. Absence of effect of vitamin E was observed by Shirpoor et al.³⁹ for villi height and crypts depth in small intestine for diabetics animals. The supplementation with glutamine, a precursor of an important antioxidant agent, the glutathione, did not also alter crypts depth and cell proliferation in the colonic mucosa of diabetic rats.³⁴

Quantitative analysis of goblet cells, did not show significant differences among groups in a study performed by Mantle et al.⁵ it was revealed that in small intestine of rats with acute diabetes, there is an increase in number of goblet cells in intestinal villi, in response to the hyperphagia and consequent increase of the luminal stimulation of these cells. Increased number of goblet cells in crypts of small intestine of diabetic mice, was reported by Ettarh and Carr⁴⁰, who highlighted that the increase um goblet cells is directly related to an increase in mucous tunic. The results presented in this study in relation to the mucous tunic indicate its

conservation in diabetic animals and which would justify the maintenance of this cellular population, which showed to be morphofunctionally adapted to the chronic diabetes condition.

In order to evaluate the total myenteric population it was used the Giemsa technique in whole mount preparations, based in the affinity of the staining to the acid structures of the cells which has been widely employed.^{9,10,12-14} Neuronal quantification showed a significant reduction in number of myenteric neurons in animals from the diabetic group when compared to the normoglycemic ones. This is an usual results for rats, not only by Giemsa^{9,10,12-14}, but also with histochemical and immunohistochemical techniques in different segments of the gastrointestinal tract.^{11,34,45} The remarkable glycemia caused due to the diabetes condition has been considered the main factor for the development and progression of the neuropathy, once it promotes abnormalities in blood flow and increase in the vascular permeability, besides decreasing trophic factors for the neuronal cells.¹⁶

As causes an increase in oxidative stress⁴¹ all mechanisms which contribute to the diabetic neuropathy are related to it.¹⁵ Reduction in antioxidant systems in diabetes, which include vitamin A, C and E, besides glutathione and glutathione peroxidase also contributes for the development of the neuropathy.⁴²

Administration of vitamin E (2%) presented a neuroprotective effect, once it conserved the number of myenteric neurons in group DE2 when compared to animals from D and DE1 groups. Cotter et al.²³ using the concentration at 0.1% of vitamin E showed that the reduction in the speed of nervous conduction can be decreased in diabetics rats. According to these authors, in experimental diabetes, glycemic levels and the increase of free radicals are excessively superior to those verified in patients in diabetes under control. It may explain the reason why a neuroprotective effect was not observed in group DE1 (0.1%). The fewer neuronal loss presented in group DE2 could be attributed to the fact that vitamin E potentializes the antioxidant system,

once the erythrocytes in diabetic rats it promotes the increasing of glutathione and antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and glutathione peroxidase¹⁸ as well as for being an antioxidant.¹⁹ Besides it, the development of a diabetic neuropathy is associated to a mitochondrial dysfunction consequently generating reactive oxygen species, which are related to the activation of a cascade of events leading to apoptosis..^{43,44} In this way, the supplementation with vitamin E could have minimized these events reducing neuronal death in group DE2.

When the obtained results were evaluated through the average area of the cellular body, it is verified that there was not significant differences when diabetic groups (304.4 ± 5.9) were compared to the normoglycemic ones (283.9 ± 5.7). The increase in area of the neuronal cellular body was observed in diabetic rats^{8,45} whose cause was attributed to the increase in the processes of neuronal synthesis aiming to compensate the activity of the neurons which died, leading the cells to increase in volume.⁴⁵

The results found in this study are similar to those found by Tashima et al.³⁴ in relation to the area of myosin-V neuron in the proximal colon of diabetic rats. The Myosin-V immunohistochemistry technique is referred in literature as a marker for total neuronal population. However, Zanoni et al.⁴⁵ observed an increased area in these VIP-ergics neurons of diabetics rats, possibly due to the higher synthesis of neuropeptides by these cells. According to Tashima et al.³⁴ diabetes mellitus directly affects neuronal subpopulation in the gastrointestinal tract, in this way, techniques which identifies the total neuronal population, as the Myosin-V immunohistochemistry and Giemsa techniques, do not demonstrate these alterations.

It is important to highlight that in group DE2 (267.3 ± 13.4), it was observed a statistically significant decrease in the area of cellular bodies of neuron in relation to D (304.4 ± 5.9) and DE1 groups (306.5 ± 13.3), indicating a positive influence of vitamin E (2%), over this parameter. This asserting is corroborated by observations of Zanoni et al.⁴⁵ in VIP-ergic

neurons in ileum of diabetic rats, where the supplementation with ascorbic acid prevented the increase in neuronal profile. Our results indicate that vitamin E (2%) had a neurotrophic role, once there are of cellular bodies of neurons was maintained in diabetic animals.

The supplementation with vitamin E (2%) for rats with chronic diabetes mellitus positively influenced glycemia and presented a neuroprotective effects over myenteric neurons, do not affecting morphological characteristics of the intestinal wall.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to the laboratorial technicians, Ana Paula de Santi Rampazzo, Maria Euride do Carmo Cancino, Maria dos Anjos Fortunato for the excellent technical support.

REFERENCES

1. Foss MC. Diabetes mellitus e suas complicações crônicas. Rev Bras Neurol 1991; **27**: 3-6.
2. Guo C, Quobatari A, Shangguan Y, Hong S, Wiley JW. Diabetic autonomic neuropathy: evidence for apoptosis *in situ* in the rat. Neurogastroenterol Motil 2004; **16**: 335-345.
3. Zhao J, Yang J, Gregersen H. Biomechanical and morphometric intestinal remodelling during experimental diabetes in rats. Diabetologia 2003; **46**: 1688-97.
4. Lorenz-Meyer H, Thiel F, Menge HG, Riecke EO. Structural and functional on the transformation of the intestinal mucosa in rats with experimental diabetes, Res Exp Med 1977; **170**: 89-99.
5. Mantle M, Thakore E, Atikins E, Mathison R, Davison JS. Effects of streptozotocin-diabetes on rat intestinal mucin and goblet cells. Gastroenterology 1988; **97**: 66-75.
6. Vinik AI. Diabetic neuropathy: pathogenesis and therapy. Am J Med 1999; **107**: 17-26.
7. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. Journal of the Autonomic Nervous System 2000; **81**: 87-96.
8. Fregonesi CEPT, Miranda-Neto MH, Molinari SL, Zanoni JN. Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes, Arq Neuropsiquiatr 2001; **59**: 50-53.
9. Buttow NC, Miranda Neto MH, Bazotte RB. Morphological and quantitative study of myenteric plexus of the duodenum of streptozotocin-induced diabetic rats. Arq Gastroenterol 1997; **34**: 34-42.

10. Hernandez L, Bazotte RB, Gama P, Miranda-Neto MH. Streptozotocin-induced diabetes duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons. *Arq Neuropsiquiatr* 2000; **58**: 1035-39.
11. Zaroni JN, Buttow NC, 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. *Autonomic Neuroscience* 2003; **104**: 32-38.
12. Romano EB, Miranda-Neto MH, Cardoso RCS. Preliminary investigation about the effects of streptozotocin-induced chronic diabetes on the nerve cell number and size of myenteric ganglia in rat colon. *Rev Chil Anat* 1996; **14**: 139-145.
13. Zaroni JN, Miranda-Neto MH, Bazotte BB, Souza RR. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin diabetic rats. *Arq Neuropsiquiatr* 1997; **55**: 696-702.
14. Furlan MMDP, Molinari SL, Miranda Neto MH. Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats. *Arq Neuropsiquiatr* 2002; **60**: 576-581.
15. Vincent A, Feldman EL. New insights into the mechanisms of diabetic neuropathy. *Reviews in Endocrine e Metabolic Disorders* 2004; **5**: 227-236.
16. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; **414**: 813-820.
17. Bhor VM, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Biochem Cell* 2004; **36**: 89-97.

18. 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* 2005; **25**: 625-630.
19. Bramley PM, Elmadfa I, Hafatos A. et al. Vitamin E. *J Sci Food Agric* 2000; **80**: 913-938.
20. Debier C, Larondelle Y. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *British Journal of Nutrition* 2005; **93**: 153-174.
21. Reunanen A, Knekt P, Aaran RK, Aromaa A. Serum antioxidants and risk of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Nutr* 1998; **52**: 89-93.
22. Shirpoor A, Ansari MHK, Salami S, Pakdel FG, Rasmi Y. Effect of vitamin E on oxidative stress status in small intestine of diabetic rat. *Word J Gastroenterol* 2007; **13**: 4340-44.
23. 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.
24. Tutuncu NB, Bayraktar M, Varli K. Reversal of the defective nerve conduction with vitamin E supplementation in type 2 diabetes: a preliminary study. *Diabetes Care* 1998; **21**: 1915-18.
25. Van Dam PS, Van Asbeck S, et al. Nerve function and oxidative stress in diabetic and vitamin E-deficient rats. *Free Radical Bio Med* 1998; **24**: 18-
26. Van Dam PS, Bravenboer B, Van Asbeck S, Marx JJM, Gispens WH. High rat food vitamin e content improves nerve function in streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 1999; **376**: 217-222.
27. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969; **48**: 2129-39.
28. Bergmeyer HE, Bernet E. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase, In. *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, NY, 1974.

29. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A. Correlation of glucose relation and hemoglobin A_{1c} in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1976; **295**: 417-420.
30. Barbosa AJA. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. *Rev. Bras. Pesqui. Méd. Biol.* 1978; **11**: 95-97.
31. Zanoni JN, Freitas P, Pereira RVF, Santos Pereira MA, 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**: 149-153.
32. Miranda-Neto MH, Fregonesi CEPT, Molinary SL, et al. Evaluation of the nitrenergic myenteric neurons in the distal colon of diabetic rats treated with acetyl-l-carnitine. *Braz J Morphol Sci* 2004; **21**: 105-110.
33. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induced DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 1981; **294**: 284-286.
34. 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.
35. Sharma AH, Ponery AS, Lawrence PA, et al. Effect of alfa-tocoferol supplementation on the ultrastructural abnormalities of peripheral nerves in experimental diabetes. *J Peripher Nerv Syst* 2001; **6**: 33-39.
36. Belai A, Lincoln J, Milner P, Burnstock G. Progressive changes in adrenergic, serotonergic, and peptidergic nerves in proximal colon of streptozotocin-diabetic rats. *Gastroenterology* 1988; **95**: 1234-41.
37. Belai A, Lincoln J, Milner P, Burnstock G. Diferential effect of streptozotocin induced on the ileum and distal colon. *Gastroenterology* 1991; **100**: 1024-32.

38. Nakabou Y, Okita C, Takano Y, Hagihira H. Hiperplastic and hypertophic changes of the small intestine in aloxan diabetic rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 1974; **20**: 227-234.
39. Shirpoor A, Ilkhanizadeh B, Saadatian R, et al. Effect of vitamin E on diabetes-induced changes in small intestine and plasma antioxidant capacity in rat. *J Physiol Biochem* 2006; **62**: 171-177.
40. Ettarh RR, Carr KE. A morphological study of the enteric mucosal epithelium the streptozotocin-diabetic mouse. *Life Sci* 1997; **61**: 1851-58.
41. Chung SM, Ho ECM, Lan KSL, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 223-236.
42. 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**: 365-373.
43. Srinivasan S, Stevens M, Wiley JW. Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction, *Diabetes* 2000; **49**: 1932-38.
44. Emerit J, Edeas M, Bricaire F Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 2004; **58**: 39-46.
45. 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**: 32-37.

Table 1. Glycemia, glycated hemoglobin, final body weight and large intestine area of rats from groups: : (N) normoglycemic; (NE1) normoglycemic supplemented with vitamin E (0.1%); (NE2) normoglycemic supplemented with vitamin E (2%); (D) diabetic; (DE1) diabetic supplemented with vitamin E (0.1%) and (DE2) diabetic supplemented with vitamin E (2%). Mean \pm standard error (n = 5)

	Glycemia (mg/dl)	Glycated hemoglobin (%)	Final weight (g)	Intestinal area (cm ²)
N	178.2 \pm 17.3 ^a	3.16 \pm 0.13 ^a	450.3 \pm 15.6 ^a	18.75 \pm 1.6a
NE1	147.2 \pm 8.3 ^a	3.64 \pm 0.26 ^a	419.2 \pm 12.6 ^a	20.35 \pm 59 a
NE2	128 \pm 6.4 ^a	2.54 \pm 0.05 ^b	406.7 \pm 9.8 ^a	20.42 \pm 3.7 a
D	489.6 \pm 7.2 ^b	6.15 \pm 0.45 ^c	268.2 \pm 14.5 ^b	36.82 \pm 3.8 b
DE1	525.2 \pm 23.2 ^b	6.50 \pm 0.10 ^c	291.3 \pm 21.9 ^b	32.44 \pm 5.2 b
DE2	319.7 \pm 3.6 ^c	4.78 \pm 0.13 ^d	290 \pm 21.7 ^b	29.46 \pm 3.7 b

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

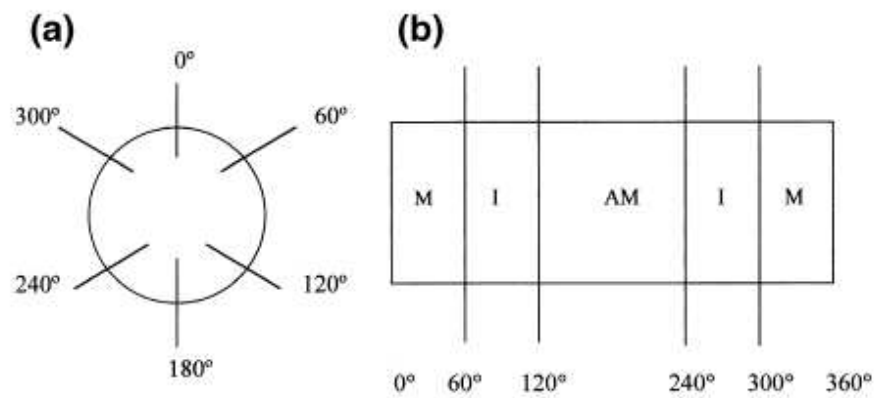


Figure 1 (a) Transverse section of the intestine: 0° represents the mesocolon insertion, 0°-60° and 300°-360° mesocolic regions, 60°-120° and 240°-300° intermediate region and 120°-240° antimesocolic region of the intestinal circumference. (b) intestinal segment opened along the mesocolic edge (M, mesocolic region; I, intermediate region; AM antimesocolic region).³¹

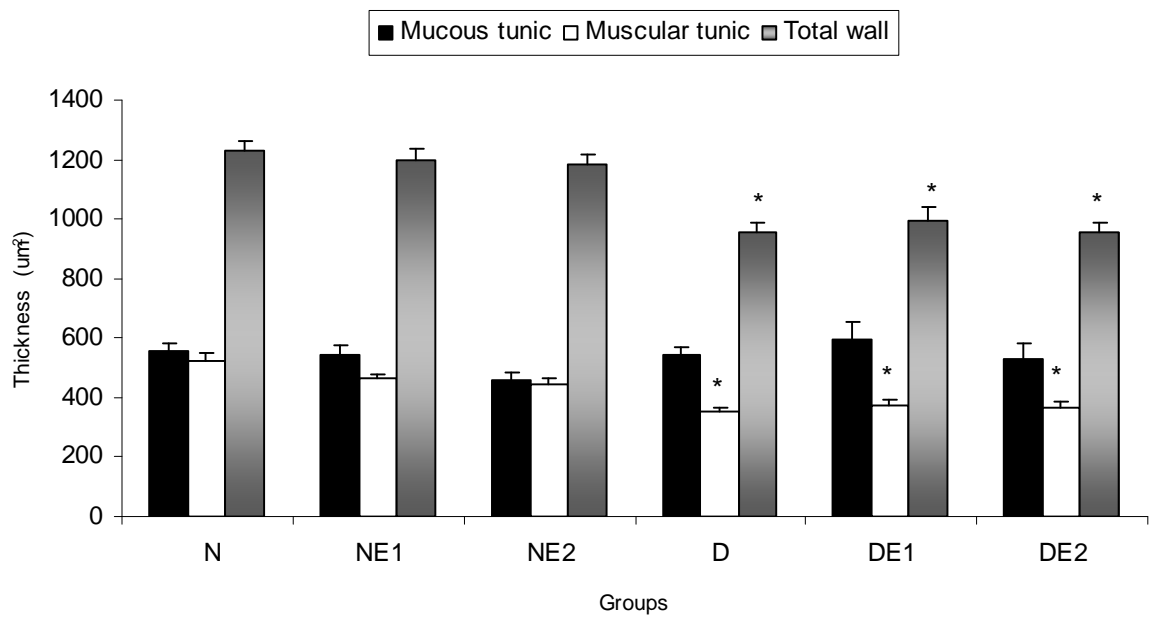


Figure 2 Morphometry of the intestinal wall, mucous tunic, muscular tunic and total wall of rats from groups: (N) normoglycemic; (NE1) normoglycemic supplemented with vitamin E (0.1%); (NE2) normoglycemic supplemented with vitamin E (2%); (D) diabetic; (DE1) diabetic supplemented with vitamin E (0.1%) and (DE2) diabetic supplemented with vitamin E (2%). Mean \pm standard error (n = 5). * p < 0.05 when compared to other groups.

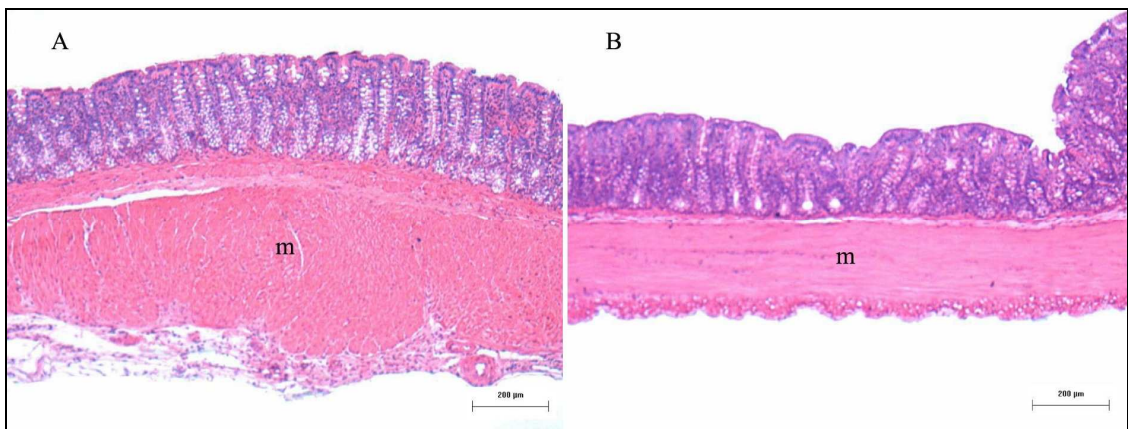


Figure 3 Photomicrography of the proximal colon in normoglycemic rats (A) and diabetic (B), highlighting the decrease in thickness of the muscular tunic and total intestinal wall (B). HE, calibration bar: 200 μm .

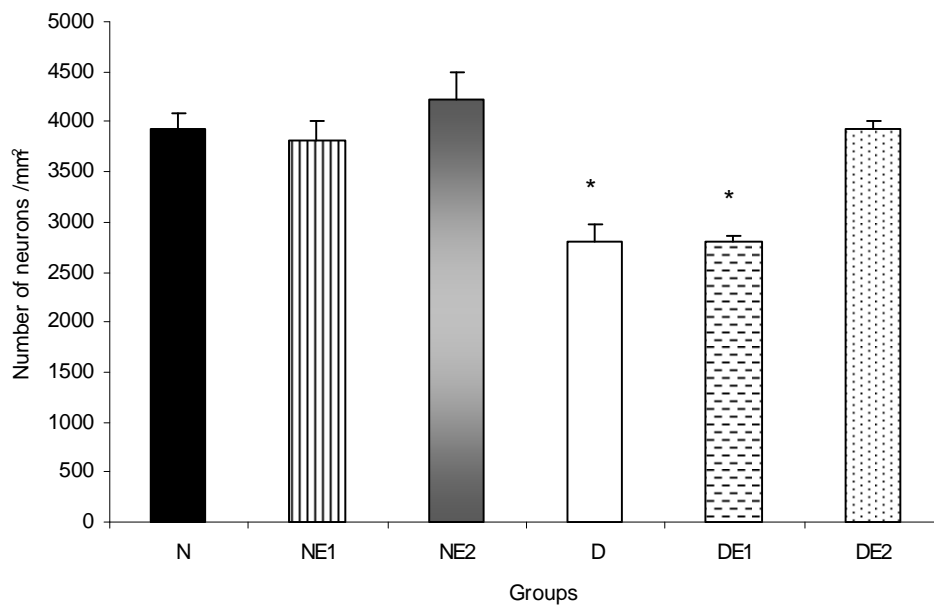


Figure 4 Number of myenteric neurons quantified in 14.4mm^2 in the proximal colon of animals from groups: (N) normoglycemic; (NE1) normoglycemic supplemented with vitamin E (0.1%); (NE2) normoglycemic supplemented with vitamin E (2%); (D) diabetic; (DE1) diabetic supplemented with vitamin E (0.1%) and (DE2) diabetic supplemented with vitamin E (2%). Mean \pm standard error (n = 5). * p < 0.05 when compared to other groups.

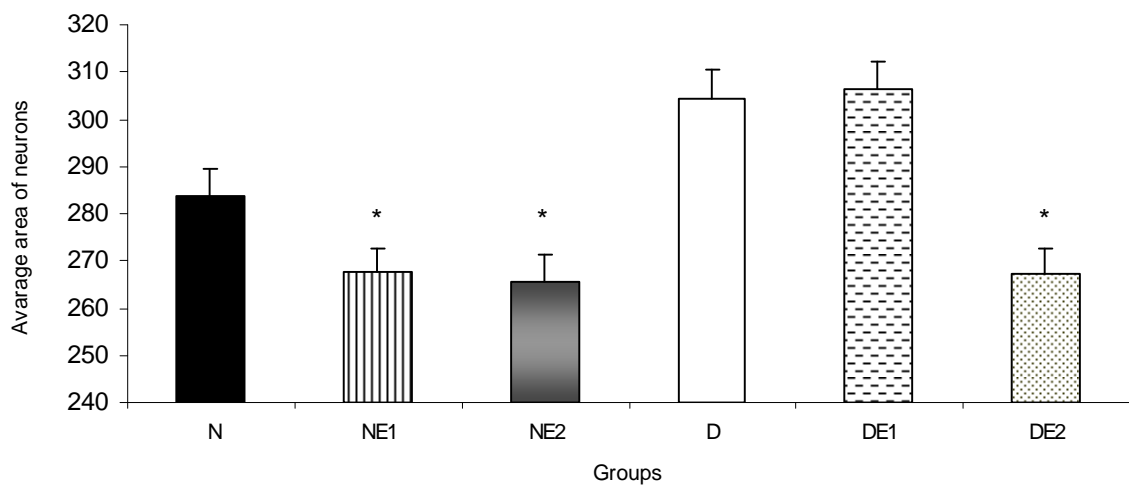


Figure 5 Average areas of myenteric neurons in the proximal colon from groups: (N) normoglycemic; (NE1) normoglycemic supplemented with vitamin E (0.1%); (NE2) normoglycemic supplemented with vitamin E (2%); (D) diabetic; (DE1) diabetic supplemented with vitamin E (0.1%) and (DE2) diabetic supplemented with vitamin E (2%). Mean \pm standard error (n = 5). * p < 0.05 when compared to groups D and DE1.

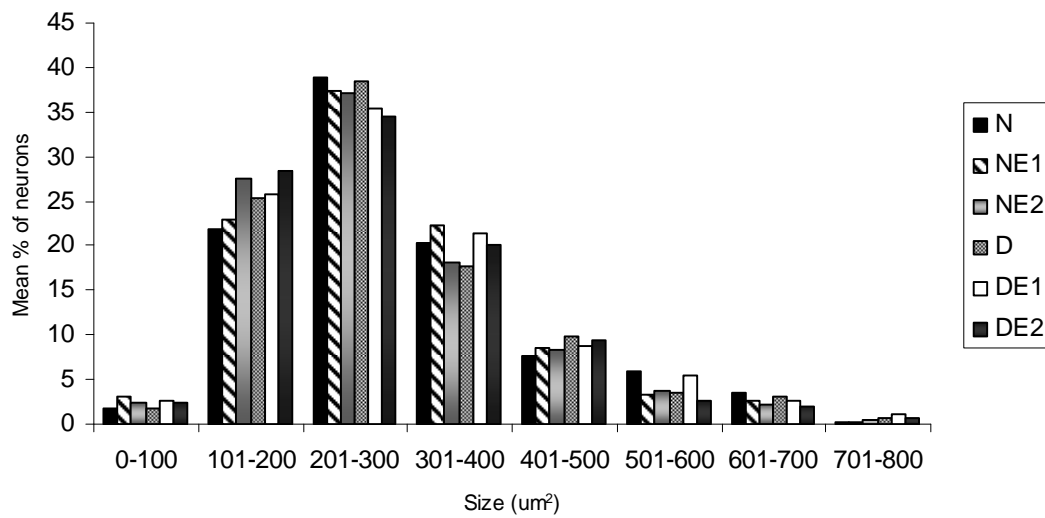


Figure 6 Distribution of relative frequencies of the cellular body areas of myenteric neurons in the proximal colon, classified according to the cellular profile in intervals of $100\mu\text{m}^2$ of animals from groups: (N) normoglycemic; (NE1) normoglycemic supplemented with vitamin E (0.1%); (NE2) normoglycemic supplemented with vitamin E (2%); (D) diabetic; (DE1) diabetic supplemented with vitamin E (0.1%) and (DE2) diabetic supplemented with vitamin E (2%). N=5 rats per group.

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](#)