

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E MORFOMÉTRICA DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS DA REGIÃO AGLANDULAR DO ESTÔMAGO DE RATOS COM DIABETES *MELLITUS* INDUZIDO POR ESTREPTOZOOTOCINA E SUPLEMENTADOS COM ÁCIDO ASCÓRBICO

Naianne Kelly Clebis*
Sandra Regina Stabile***
Carlos Eduardo Seyfert*
Karina Martinez Gagliardo*
Renata de Britto Mari*
Juliana Plácido Guimarães*
Sônia Lucy Molinari***
Marcílio Hübner de Miranda Neto***
Jaqueline Nelisis Zanoni****
Robson Marcelo Rossi****
Vanderley Janeiro****
Romeu Rodrigues de Souza.**

CLEBIS, N.K.; STABILLE, S.R.; SEYFERT, C.E.; GAGLIARDO, K.M.; MARI, R.B.; GUIMARÃES, J.P.; MOLINARI, S.L.; MIRANDA NETO, M.H.; ZANONI, J.N.; ROSSI, R.M.; JANEIRO, V.; SOUZA, R.R. Avaliação quantitativa e morfométrica dos neurônios mioentéricos da região aglandular do estômago de ratos com diabetes *mellitus* induzido por estreptozotocina e suplementados com ácido ascórbico. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, 8(2), mai./ago. p.87-93, 2004.

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivos investigar possíveis alterações no número e a área do corpo celular dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase reativos (NADH-dr) da região aglandular do estômago de ratos diabéticos e o efeito da suplementação com AA (1g/L de água) nos referidos parâmetros. Para tanto, 15 ratos (*Rattus norvegicus*) foram separados em três grupos (n = 5): controle (C); diabético (D); e diabético suplementado com AA (DS). O DM foi induzido por estreptozotocina (35 mg/kg de peso corporal). Após 120 dias de experimento, os animais foram anestesiados para obtenção do estômago. Os neurônios mioentéricos foram evidenciados pelo método da NADH-diaforase. Por meio de microscópio de luz foram contados os neurônios NADH-dr e, pelo programa computadorizado para análise de imagens, foi mensurado o perfil do corpo celular (PCC) desses neurônios. O número de neurônios NADH-dr não variou significativamente entre os três grupos estudados (P>0,05). A média dos PCCs foi maior (P<0,05) para os neurônios dos grupos D e DS do que para o grupo C. Ocorreu aumento na incidência de neurônios com PCC superior a 200 μm^2 no grupo D quando comparada aos grupos DS e C. Os resultados sugerem que a suplementação com AA teve efeito neuroprotetor sobre os neurônios mioentéricos NADH-dr representado pela diminuição da frequência de neurônios grandes na região aglandular A e B do grupo DS.

PALAVRAS-CHAVE: Neurônios mioentéricos. Região aglandular do estômago. Diabetes mellitus. Ácido ascórbico.

QUANTITATIVE AND MORPHOMETRIC EVALUATION OF MYENTERIC NEURONS OF THE FORESTOMACH OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS SUPPLEMENTED WITH ASCORBIC ACID

CLEBIS, N.K.; STABILLE, S.R.; SEYFERT, C.E.; GAGLIARDO, K.M.; MARI, R.B.; GUIMARÃES, J.P.; MOLINARI, S.L.; MIRANDA NETO, M.H.; ZANONI, J.N.; ROSSI, R.M.; JANEIRO, V.; SOUZA, R.R. Quantitative and morphometric evaluation of myenteric neurons of the forestomach of streptozotocin-induced diabetic rats supplemented with ascorbic acid. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, 8(2), mai./ago. p.87-93, 2004.

ABSTRACT: The aims of the present study were to investigate the possible alterations in the number and size of NADH-dr stained myenteric neurons of the forestomach of diabetic rats and the effect of the AA-supplementation (1g/l of water). For that, 15 rats (*Rattus norvegicus*) were divided into three groups (n = 5): controls (c); diabetic (d); and diabetic supplemented

* Pós-graduandos do curso de Ciências área de concentração Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

** Professor do Instituto de Ciências Biomédicas III e Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (orientador).

*** Professores do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá.

**** Professores do Departamento de Estatística da Universidade Estadual de Maringá.

with AA (ds). DM was induced by streptozotocin (35 mg/kg of body weight). 120 days later, the animals were anesthetized for obtaining their stomachs. The myenteric neurons were stained employing the NADH-dr method. We counted the NADH-dr neurons employing the light microscope and we measured the cellular body profile (CBP) using an image analysis software. The number of NADH-dr neurons didn't vary significantly among the three groups studied ($p < 0.05$). The average of CBPs was larger ($p < 0.05$) for neurons of groups D and DS than for group C. There was an increase in the incidence of neurons with CBPs over $200 \mu\text{m}^2$ in group D when compared to groups DS and C. The results suggest that the AA supplementation had a neuroprotector effect on the NADH-dr myenteric neurons represented by the decrease of big neurons in the A and B forestomach areas of group DS.

KEY-WORDS: Myenteric neurons. Forestomach. Diabetes mellitus. Ascorbic acid.

Introdução

O diabetes *mellitus* (DM) é caracterizado por anormalidades endócrino-metabólicas que levam entre outros fatores, a hiperglicemia.

Entre as alterações provocados pelo DM está a neuropatia diabética autonômica que em nível gastrointestinal promove distúrbios motores, sensoriais e na função reflexa dos neurônios, manifestados como lentidão do trânsito gastrointestinal (YANG et al, 1984; IBER et al., 1993), estase e dilatação gástrica com diminuição ou aumento de contrações peristálticas, bem como quadros gástricos mais graves como a gastroparesia (KATZ & SPIRO, 1966).

No rato existem duas regiões gástricas distintas, uma região glandular e outra aglandular. A região aglandular possui epitélio de revestimento do tipo escamoso estratificado queratinizado, semelhante ao epitélio esofágico (BANKS, 1992; LUCIANO & REALE, 1992). Porém, a sua importância funcional não está totalmente elucidada, sendo-lhe atribuídas as funções de maceração inicial dos alimentos, de armazenamento e de absorção de íons por meio de uma atividade mecânica (BROWNING et al, 1983; MARTENS et al, 1991).

Acredita-se que a neuropatia diabética autonômica se manifesta em função de lesões de fibras nervosas periféricas por alterações na microcirculação dos nervos e no metabolismo dos neurônios (CLEMENTS JR., 1979; ARAÚJO, 1996; STEVENS et al, 1995) e por os neurônios do plexo mioentérico, localizados entre os estratos longitudinal e circular da túnica muscular, apresentarem variações quantitativas, morfométricas, funcionais e neuroquímicas nos diferentes segmentos do trato gastrointestinal e em diversas espécies animais (FURNESS & COSTA, 1987; STERNINI, 1988; ROMANO et al, 1996; HERNANDES et al., 2000; FREGONESI et al., 2001) decorrentes do diabetes mellitus.

Com o DM ocorre o aumento da concentração de sorbitol e, conseqüentemente, alterações da osmolaridade intracelular, resultando em edema e lesão neuronal, com interrupção da condução de impulsos nervosos (COTRAN et al., 1996; HOSKING; BENNETT & HAMPTON, 1978; LINDSAY et al., 1998). O estresse oxidativo é intensificado pela redução da concentração de enzimas que atuam no sistema antioxidante (PARTHIBAN et al., 1995; OBROSOVA et al., 2002) e também pela redução nos níveis de substâncias antioxidantes como o ácido ascórbico (YOUNG; TORNEY & TRIMBLE, 1992).

Por este motivo, este trabalho teve por objetivo

verificar qual a influência da suplementação com ácido ascórbico no número e na área do perfil celular dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase reativos da região aglandular do estômago de ratos portadores de diabetes crônico induzido por estreptozotocina.

Material e métodos

Foram utilizados os estômagos de 15 ratos adultos machos com 90 dias de idade, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo n° 214/2002).

O período experimental que teve duração de 120 dias, e os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de cinco repetições cada, segundo os tratamentos a que foram submetidos como segue: grupo C - animais normoglicêmicos; grupo D - animais diabéticos induzidos pela estreptozotocina e; grupo DS - animais diabéticos induzidos pela estreptozotocina e suplementados com ácido ascórbico.

Os animais foram pesados aos 90 dias de idade e no final do experimento com 210 dias de idade.

O consumo de água e de ração, bem como o volume urinário, foram mensurados sete dias consecutivos por mês.

Após jejum prévio de 14 horas, os animais dos grupos D e DS receberam dose única de estreptozotocina (35 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato 10 mM, pH 4,5, por meio de injeção endovenosa, para indução do diabetes e, os animais do grupo C receberam a mesma dosagem de veículo (tampão citrato 10 mM).

A partir do primeiro dia do experimento, após a injeção de estreptozotocina, os animais do grupo DS passaram a receber diariamente água suplementada com ácido ascórbico na dosagem de 1g/L/dia (YOUNG et al, 1993).

Ao final do experimento, com 210 dias de idade, os animais foram sacrificados com injeção intraperitoneal de tiopental (40mg/kg de peso corpóreo) e laparotomizados.

De cada animal foi coletado sangue, por punção cardíaca, destinado às dosagens de glicose pelo método da glicose oxidase, de hemoglobina glicada para confirmar a condição de diabetes e de ácido ascórbico (HENRY et al., 1980).

Imediatamente após o sacrifício dos animais, os estômagos foram retirados e lavados com solução de Krebs.

Cada estômago foi ligado por fio de sutura em uma de suas extremidades e levemente preenchido com solução de Krebs. O método da NADH-diaforase foi utilizado para evidenciar os neurônios mioentéricos e gânglios nos preparados de membrana. Para tanto, os estômagos foram permeabilizados em solução de Krebs contendo Triton X-100 por cinco minutos, lavados por duas vezes em solução de Krebs por período superior a 10 minutos e transferidos para um meio de incubação contendo nitro-blue tetrazolium.

O meio de reação (pH 7,3) foi composto de 25 ml de solução estoque de Nitro Blue Tetrazolium (NBT, solução estoque na concentração de 0,5 mg/ml), 25 ml de tampão fosfato de sódio, 0,1 M, 50 ml de água destilada e 0,05g de β -NADH.

Cada estômago foi microdissecado para a remoção da camada queratinizada e da tela submucosa e preservação das túnicas muscular e serosa.

Os preparados de membrana obtidos foram desidratados em série crescente de álcoois e diafanizados por três imersões consecutivas em xilol. Cada preparado de membrana foi então colocado entre lâmina e lamínula de vidro e montado com resina Permount.

A porção aglandular do estômago foi dividida em duas regiões, uma na região central próximo à prega limitante (região A) e outra localizada na curvatura maior do estômago (região B).

A quantificação dos neurônios foi feita por

amostragem em 80 campos por preparado de membrana, sendo 40 da região A e 40 da região B. Foi estabelecido o número de neurônios por mm^2 de cada região analisada do estômago.

As imagens dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase reativos evidenciadas nos preparados de membrana foram capturadas por câmara de alta resolução acoplada ao microscópio Olympus BX40, e transmitidas para microcomputador, e por meio do programa computadorizado de análise de imagens ImagePro Plus, versão 3.0.1, foi mensurado o perfil do corpo celular em μm^2 (PCC) de 100 neurônios obtidos ao acaso, por preparado de membrana, sendo 50 da região A e 50 da região B.

Após a obtenção da média e do erro padrão das mensurações os neurônios foram agrupados em intervalos de $100 \mu\text{m}^2$.

Para a análise estatística foram utilizados os testes de Tukey, Kruskal-Wallis e χ^2 -Quadrado e o nível de significância para todas as análises foi $P < 0,05$ e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão.

Resultados

Os resultados referentes às dosagens sanguíneas de glicose, hemoglobina glicada e ácido ascórbico estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Média¹ das dosagens sanguíneas de glicose, hemoglobina glicada e ácido ascórbico dos animais dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado com ácido ascórbico (DS) – São Paulo, 2004.

Parâmetros	C	D	DS
Glicose (mg.dl^{-1})	129 \pm 3,92 ^a	466,4 \pm 24,59 ^b	493 \pm 10,02 ^{bc}
Hemoglobina glicada (%)	4,1 \pm 0,3 ^a	8,1 \pm 0,2 ^b	7,9 \pm 0,5 ^{bc}
Ácido ascórbico ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	24,58 \pm 5,53 ^a	12,6 \pm 1,85 ^b	33,05 \pm 2,49 ^c

¹Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

As dosagens sanguíneas de glicose e de hemoglobina glicada foram maiores ($P < 0,05$) nos grupos D e DS e a dosagem de ácido ascórbico menor ($P < 0,05$) no grupo D.

Também foram analisados os dados referentes ao

peso inicial e final dos animais dos três tratamentos, bem como, os dados relacionados ao consumo de água, ao volume urinário e ao consumo de ração (Tabela 2).

Tabela 2. Média¹ do peso corporal inicial e final (g), do consumo de água (ml), do volume urinário (ml) e do consumo de alimento (g) dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado com ácido ascórbico (DS) – São Paulo, 2004.

Parâmetros	C	D	DS
Peso inicial (g)	339,4 \pm 12,36 ^a	329,6 \pm 8,48 ^a	339 \pm 12,45 ^a
Peso final (g)	456,2 \pm 14,57 ^a	318,6 \pm 8,22 ^b	304,5 \pm 20,29 ^{bc}
Água (ml)	64,86 \pm 5,92 ^a	158,6 \pm 8,38 ^b	133,6 \pm 5,41 ^c
Volume urinário (ml)	3,3 \pm 0,4 ^a	59,3 \pm 7,1 ^b	72,4 \pm 4,0 ^{bc}
Ração (g)	30,7 \pm 1,06 ^a	49,84 \pm 1,68 ^b	43,4 \pm 3,78 ^c

¹Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

O ganho de peso foi menor ($P < 0,05$), enquanto que o consumo de ração foi maior ($P < 0,05$) para os animais dos grupos D e DS. O consumo de água diferiu ($P < 0,05$) entre os três grupos sendo maior para o grupo D e menor para o grupo

C. E o volume médio de urina eliminada foi maior ($P < 0,05$) nos grupos D e DS.

Em todos os grupos, ao microscópio de luz, os neurônios mioentéricos NADH-diaforase reativos foram

evidenciados reunidos em gânglios interligados à semelhança de uma rede (Figura 1).



Figura 1. Fotomicrografia de preparado de membrana do estômago de rato evidenciando a rede ganglionar de neurônios mioentéricos NADH-d reativos (objetiva 20x, barra=200µm).

Os resultados da quantificação e da morfometria dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase reativos das regiões aglandular (A e B) do estômago dos animais dos grupos C, D e DS estão apresentados na Tabela 3.

Não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os três grupos na quantidade de neurônios por mm^2 presentes na região aglandular A e aglandular B.

Em todas as regiões analisadas, a média do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase reativos foi maior ($P < 0,05$) para os grupos D e DS do que para o grupo C.

Na região aglandular A, a distribuição dos neurônios em relação à área do perfil celular em intervalos de $100\mu\text{m}^2$ demonstrou diferença significativa ($P < 0,05$) na comparação do grupo C, onde 44,8% dos neurônios tinham entre 0 e $100\mu\text{m}^2$, com os grupos D e DS, onde 41,2% e 42,67% dos neurônios tinham área entre 100 e $200\mu\text{m}^2$, respectivamente. Na região aglandular B, não foram constatadas diferenças significativas ($P > 0,05$) na distribuição dos neurônios dos grupos C, com 56,8% com área entre 0 e $100\mu\text{m}^2$, D com 33,2% com área entre 200 e $300\mu\text{m}^2$ e DS com 50% com área entre 100 e $200\mu\text{m}^2$ (Figura 2 e 3).

Discussão

As alterações funcionais descritas com o DM têm sido atribuídas a mudanças do sistema nervoso autônomo, com comprometimento do sistema nervoso entérico. Verificou-se que a dosagem sanguínea de glicose (em mg.dl^{-1}) foi maior ($P < 0,05$) nos animais dos grupos D ($466,4 \pm 24,59$) e DS ($493 \pm 10,02$) do que nos do grupo C ($129 \pm 3,92$),

Tabela 3. Número médio¹ de neurônios mioentéricos NADH-diaforase reativos das regiões aglandular (A e B) e média² do perfil do corpo celular (PCC) dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase reativos da região aglandular (A e B) do estômago dos animais dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS) – São Paulo, 2004.

Grupos	Densidade Neuronal ¹		Perfil do Corpo Celular ²	
	Região A	Região B	Região A	Região B
C (n=5)	57,5±4,1 ^a	22,8±2,1 ^a	123,7 ± 19,11 ^a	121,2 ± 12,82 ^a
D (n=5)	41,4±4,9 ^a	22,8±2,6 ^a	213,6 ± 18,27 ^b	207,1 ± 17,87 ^b
DS (n=5)	55,3±4,3 ^a	19,6±0,8 ^a	199,6 ± 7,7 ^{bc}	218 ± 22,77 ^{bc}

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Kruskal-Wallis¹ e pelo teste de Tukey² ($P < 0,05$).

Figura 2. Gráfico demonstrando a frequência dos neurônios mioentéricos NADH-d reativos da região aglandular A (AA) do estômago de ratos dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS) segundo os valores do perfil do corpo celular (PCC) em intervalos de $100\mu\text{m}^2$.

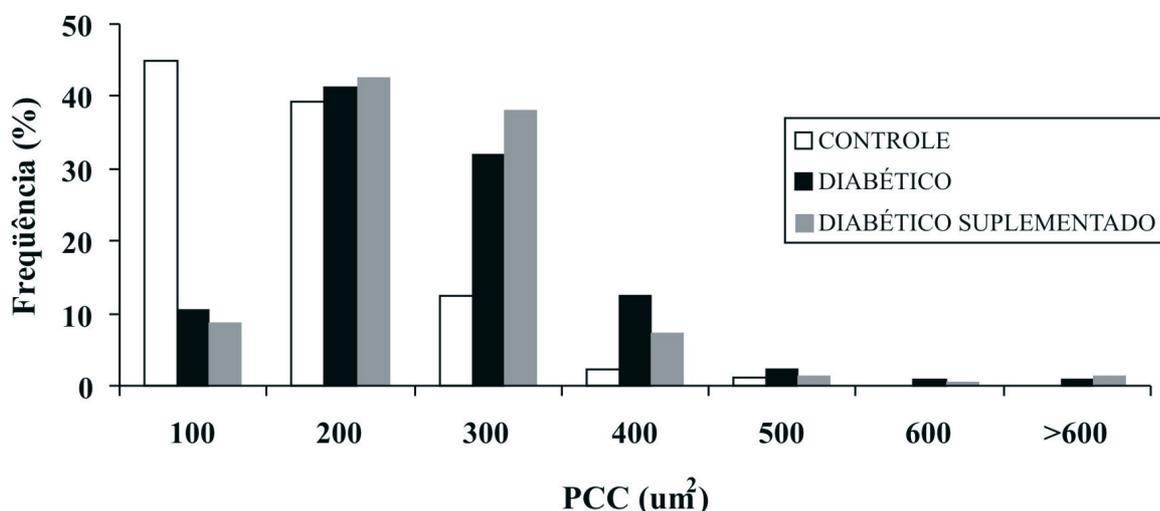
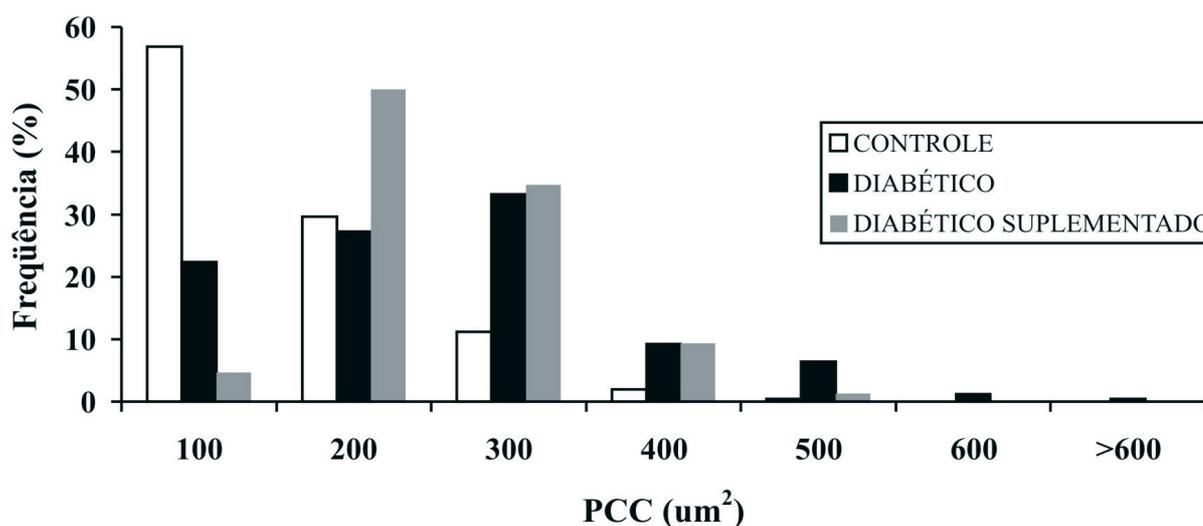


Figura 3. Gráfico demonstrando a frequência dos neurônios mioentéricos NADH-d reativos da região aglandular B (AB) do estômago de ratos dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS) segundo os valores do perfil do corpo celular (PCC) em intervalos de 100 μm^2 .



confirmando, portanto, a presença de hiperglicemia quando da eutanásia dos animais.

A hiperglicemia é resultante da diminuição dos níveis de insulina provocada por danos e necrose das células beta pancreáticas quando administrada a estreptozotocina em animais em jejum. Uma vez no interior dessas células, essa substância destrói o DNA e reduz o NAD^+ , provocando morte celular (SAINI et al.; 1996; YANG & WRIGHT JR, 2002).

As concentrações de hemoglobina glicada nos animais do grupo D ($8,1 \pm 0,2\%$) e do grupo DS ($7,8 \pm 0,5\%$) foram significativamente maiores ($P < 0,05$) do que a encontrada para o grupo C ($4,1 \pm 0,3\%$). Esses resultados estão em conformidade com os relatos de LINDSAY et al (1998) que também verificaram maior concentração de hemoglobina glicada em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina ($11,9 \pm 1,4\%$) do que em ratos normoglicêmicos ($2,8 \pm 0,2\%$). Porém, não houve diferença ($P > 0,05$) na concentração de hemoglobina glicada entre os grupos D e DS, o que nos permite afirmar que os animais de ambos os grupos foram submetidos à mesma severidade de diabetes.

Além da hiperglicemia, no estado diabético podem ser observadas perda de peso, polidipsia, polifagia e poliúria (COTRAN et al., 1996).

No início de nosso experimento, não havia diferença significativa ($P > 0,05$) no peso corpóreo (em gramas) dos animais entre os grupos C, D e DS. Contudo, ao final do experimento constatamos que, ao longo dos 120 dias, ocorreu perda de peso nos animais dos grupos D ($318 \pm 8,22$) e DS ($304,5 \pm 20,29$) quando comparados com o grupo C ($456,2 \pm 14,57$) e estes achados estão de acordo com a literatura, onde animais diabéticos têm apresentado menor peso corporal (LINDSAY et al., 1998; FURLAN et al, 2002).

No DM, devido à glicosúria, há perda de água e

de eletrólitos, levando à diminuição extra e intracelular desses componentes. Nessas condições, os centros da sede localizados no encéfalo deflagram mecanismos neurais que levam à polidipsia, ou seja, maior vontade de ingestão de água (COTRAN et al., 1996).

A quantidade média de água ingerida (em ml) pelos animais de nosso estudo foi maior ($P < 0,05$) nos grupos D ($158 \pm 8,38$) e DS ($133,6 \pm 5,41$) quando comparada com o grupo C ($64,86 \pm 9,2$), comprovando o estabelecimento da polidipsia diabética. Quando comparados os grupos D e DS, o consumo foi menor ($P < 0,05$) para o grupo DS e estes resultados estão podem indicar um efeito da suplementação com AA sobre os neurônios do centro da sede, pois o aumento na quantidade de água ingerida é observado no DM (SOUZA & FURLAN, 2001; FURLAN et al, 2002).

No presente estudo, constatou-se aumento significativo ($P < 0,05$) do consumo de alimento (em gramas) para os animais do grupo D ($49,84 \pm 6,8$) e DS ($43,4 \pm 3,78$) quando comparados com o consumo do grupo C ($30,7 \pm 1,06$). A polifagia pode ocorrer como uma resposta à falta de glicose nas células dependentes de insulina para o transporte de glicose, já que no DM ocorre diminuição da insulina circulante, dificultando, assim, a captação da glicose pelas células (CARLTON & MCGAVIN, 1998). Contudo, o acréscimo do consumo de alimento não é revertido em ganho de peso para o animal, pois se verifica diminuição na conversão alimentar (FURLAN et al, 2002).

Elevado nível de glicemia acarreta, entre outros fatores, a poliúria, ou seja, aumento do débito urinário com a finalidade de eliminar o excesso de glicose circulante (JUNOD et al., 1967; SOUZA & FURLAN, 2001).

Neste estudo, foi possível observar aumento significativo ($P < 0,05$) no volume urinário (em ml) eliminado pelos animais dos grupos D ($59,3 \pm 7,1$) e DS ($72,4 \pm 4$) quando comparado com o grupo C ($3,3 \pm 0,4$), explicitando a poliúria

característica do DM.

Em longo prazo, os distúrbios metabólicos verificados no DM são responsáveis por complicações crônico-degenerativas que levam ao comprometimento vascular e nervoso (COTRAN et al., 1996).

As alterações provocadas pelo DM no sistema nervoso entérico estão incluídas na neuropatia diabética autonômica (ARAÚJO, 1996). Contudo, a etiologia deste tipo de neuropatia não está totalmente esclarecida. Inúmeros fatores são propostos, incluindo alterações microvasculares e metabólicas que acabam tendo efeito deletério sobre sistema nervoso (CLEMENTS JR., 1979; LINDSAY et al., 1998). Além disso, a intensificação do estresse oxidativo no DM tem sido relatada como uma das causas das lesões neuronais (KSIAZEK & WISNIWSKA, 2001; DAVISON et al., 2002).

A utilização de substâncias antioxidantes e de substâncias inibidoras da enzima aldose-redutase – imprescindível para a via do poliol – tem sido amplamente investigada com o intuito de encontrar formas de minimizar ou evitar os efeitos deletérios resultantes do DM. Dessa forma, foi proposta a utilização do ácido ascórbico que tem ação antioxidante (LEVINE, 1986) e também inibidora da aldose-redutase (WILL & BYERS, 1996) para averiguar seus efeitos no referido plexo sob condições de diabetes.

A dosagem sanguínea de ácido ascórbico (em $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) foi maior ($P < 0,05$) nos grupos C ($24,58 \pm 5,53$) e DS ($33,05 \pm 2,49$) quando comparadas com o grupo D ($12,6 \pm 1,85$). Menor concentração de ácido ascórbico em diabéticos é também relatada em ratos (McLENNAN et al., 1988; YOUNG et al., 1993) e em humanos (LYSY & ZIMMERMAN, 1992), pois a hiperglicemia dificulta a captação do ácido ascórbico pelos tecidos (MOSER & WEBER, 1984). Além disso, ela também inibe a reabsorção deste ácido nos rins, aumentando sua excreção na urina (CUNNINGHAM, 1998).

No presente trabalho, contudo, a suplementação com ácido ascórbico não reduziu a glicemia e nem a hemoglobina glicada nos animais do grupo DS para os níveis normais comprovando que a administração de ácido ascórbico não influenciou esses parâmetros.

Para estudar os efeitos do DM e da suplementação com AA sobre os neurônios mioentéricos foi utilizada neste trabalho a técnica histoquímica da NADH-diaforase (GABELLA, 1969) que detecta a atividade da enzima NADH-diaforase, e este método evidencia a população neuronal com maior atividade metabólica (SANT'ANA et al., 1997).

Dessa forma, foi realizada a quantificação dos neurônios mioentéricos NADH-dr por mm^2 de cada região do estômago, bem como a mensuração do perfil do corpo celular (PCC) de 100 neurônios mioentéricos NADH-dr por preparado de membrana.

Na região aglandular A, o número de neurônios mioentéricos NADH-dr por mm^2 foi menor no grupo D ($41,4 \pm 4,3$). Contudo, quando comparado aos grupos C ($57,5 \pm 4,1$) e DS ($55,3 \pm 4,9$) não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$). O mesmo ocorreu na região aglandular B (AB), próximo à curvatura maior do estômago, na qual o número de neurônios por mm^2 do grupo D ($22,8 \pm 2,6$), do grupo DS ($19,6 \pm 0,8$) e do grupo C ($22,8 \pm 2,1$) foram estatisticamente equivalentes ($P > 0,05$).

Embora não tenham sido observadas alterações estatisticamente significativas no número de neurônios por mm^2 na região aglandular do estômago, verificamos que na região aglandular A, a suplementação aumenta o número de neurônios no grupo DS em relação ao grupo D. Porém, o mesmo não foi observado para a região aglandular B (AB). Outras pesquisas também encontraram diminuição do número de neurônios em diferentes segmentos intestinais em animais diabéticos confirmando nossos achados (HERNANDES et al., 2000; FREGONESI et al., 2001; FURLAN et al., 2002; ZANONI et al., 2003).

Em relação à média do PCC dos neurônios mioentéricos NADH-dr, observou-se que esta foi significativamente maior nos grupos D ($213,6 \pm 9,11$) e DS ($199,6 \pm 7,7$) em relação ao grupo C ($123,7 \pm 19,1$) na região aglandular A. Embora não tenha ocorrido diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos D e DS, verificou-se que a área do PCC dos neurônios mioentéricos NADH-dr do segundo grupo foi menor que a do primeiro. Já na região aglandular B, não foi verificada diminuição na área do PCC dos neurônios do grupo DS ($218 \pm 22,7$) em relação ao grupo D ($207,1 \pm 17,8$). Porém, em ambos os grupos a área do PCC dos neurônios mioentéricos NADH-dr foi maior ($P < 0,05$) que aquelas do grupo C ($121,2 \pm 12,8$).

Quanto à distribuição de frequência, foram evidenciadas diferenças significativas ($P < 0,05$) na comparação dos grupos C com D e DS, mas na região aglandular B não foram encontradas diferenças significantes entre os três grupos analisados. Para ambas as regiões, predominaram neurônios com maior PCC nos grupos D e DS em relação ao grupo C.

Frequência aumentada de neurônios grandes foi relatada em estudos com ratos diabéticos decorrentes da degeneração neuronal e também ao acúmulo de lipofucsina decorrente do envelhecimento (BÜTTOW et al., 1997).

Todavia, a suplementação com ácido ascórbico preveniu o aumento do PCC de neurônios mioentéricos NADH-dr do íleo de ratos diabéticos e dos neurônios imunoreativos para o peptídeo intestinal vasoativo no plexo submucoso do íleo (ZANONI et al., 2003), o mesmo ocorrendo na região aglandular A do presente estudo.

No entanto, apesar da função antioxidante e inibidora da aldose redutase, o ácido ascórbico não restaurou para níveis normais as concentrações sanguíneas de glicose e de hemoglobina glicada, não impedindo, assim, a instauração de poliúria e da polidipsia no grupo DS. Também não proporcionou ganho de peso aos animais diabéticos suplementados.

Contudo, acreditamos que o tratamento com ácido ascórbico associado a outras substâncias antioxidantes ou inibidoras de etapas das vias metabólicas que se encontram alteradas no diabetes deva ser investigada, pois poderia culminar em uma ação sinérgica eficaz.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste projeto. À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e à Universidade Estadual de

Maringá pelo apoio na realização desta pesquisa.

Referências

- ARAÚJO, L. Neuropatia autonômica. *Rev. Bras. Neurol.* v. 32, p. 207-209, 1996.
- BANKS, W. J. *Histologia veterinária aplicada*. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992.
- BROWNING, J.; GANNON, B. J.; O'BRIEN, P. The microvascular and gastric luminal pH of the forestomach of the rat: a comparison with the glandular stomach. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* v. 2, p. 109-118, 1983.
- BÜTTOW, N. C.; MIRANDA NETO, M. H.; BAZOTTE, R. B. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the duodenum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arq. Gastroenterol.* v. 34, n.1, p. 35-42, 1997.
- CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. *Patologia veterinária especial de Thomson*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998.
- CLEMENTS JUNIOR, R. S. Diabetic neuropathy: new concepts of its etiology. *Diabetes*, v. 28, p. 604-611, 1979.
- COTRAN, R. S. et al. *Robbins patologia estrutural e funcional*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- CUNNINGHAM, J. J. The glucose/insulin system and vitamin C: implications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Nutr.* v. 17, n. 2, p. 105-108, 1998.
- DAVISON, G. W. et al. T. Exercise, free radicals, and lipid peroxidation in type I diabetes mellitus. *Free Radical Biology*, v. 33, p.1543-1551, 2002.
- FREGONESI, C. E. P. T. et al. Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Arq. Neuropsiquiatria*, v. 59, n.1, p. 50-53, 2001.
- FURLAN, M. M. D. P.; MOLINARI, S. L.; MIRANDA NETO, M. H. Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 60, n. 3, p. 576-581, 2002.
- FURNESS, J. B.; COSTA, M. *The Enteric Nervous System*. New York: Churchill Livingstone, 1987.
- GABELLA, G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. *Experientia*, v. 25, p. 218-219, 1969.
- HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WINKILMAN, J. W. *Química clínica bases e técnicas*. [S.l.]: JIMS, 1980.
- HERNANDES, L. et al. Streptozotocin-induced diabetes duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons. *Arq. Neuropsiquiatria*, v. 58, n. 4, p. 1035-1039, 2000.
- HOSKING, D. J.; BENNETT, T.; HAMPTON, D. M. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes*, v. 27, p. 1043-1055, 1978.
- IBER, F. L. et al. Relation of symptoms to impaired stomach, small bowel, and colon motility in long-standing diabetes. *Digest. Dis. Sci.* v. 38, n. 1, p. 45-50, 1993.
- JUNOD, A. et al. E. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *P.S.E.B.M.* v. 126, p. 201-205, 1967.
- KATZ, L. A.; SPIRO, H. M. Gastrointestinal manifestations of diabetes. *N. Engl. J. Med.* v. 275, n. 24, p. 1350-1361, 1966.
- KSIAZEK, K.; WISNIEWSKA, J. The role of glucose and reactive oxygen species in the development of vascular complications of diabetes mellitus. *Przegl Lek.* v. 58, p. 915-918, 2001.
- LEVINE, M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N. Engl. J. Med.* v. 314, p. 892-902, 1986.
- LINDSAY, R. M. et al. Tissue ascorbic acid and polyol pathway metabolism in experimental diabetes. *Diabetologia*, v. 41, p. 516-523, 1998.
- LUCIANO, L.; REALE, E. The "limiting ridge" of the rat stomach. *Arch. Histol. Cytol.* v. 55, p.131-138, 1992.
- LYSY, J.; ZIMMERMAN, J. Ascorbic acid status in diabetes mellitus. *Nutrition Research*, v.12, p. 713-720, 1992.
- MARTENS, H.; GÄBEL, G.; STROZYK, B. Mechanism of electrically silent Na and Cl transport across the rumen epithelium of sheep. *Exp. Physiol.* v. 76, p. 103-114, 1991.
- McLENNAN, S. et al. Deficiency of ascorbic acid in experimental diabetes. *Diabetes*, v. 37, p. 359-361, 1988.
- MOSER, U.; WEBER, F. Uptake of ascorbic acid by human granulocytes. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* v. 54, p. 47-53, 1984.
- OBROSOVA I. G. et al. Na aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. *FASEB J.* v. 16, p. 123-125, 2002.
- PARTHIBAN, A. et al. Oxidative stress and the development of diabetic complications-antioxidants and lipid peroxidation in erythrocytes and cell membrane. *Cell Biol. Intern.* v. 19, p. 987-993, 1995.
- ROMANO, B. E.; MIRANDA NETO, M.; CARDOSO, R. C. S. Preliminary investigation about the effects of streptozotocin-induced chronic diabetes on the nerve cell number and size of myenteric ganglia in rat colon. *Rev. Chil. Anat.* v. 14, n. 2, p. 139-145, 1996.
- SAINI, K. S. et al. Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in murine pancreatic B cell line, INS-1. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v. 39, n. 6, p.1229-1236, 1996.
- SANT'ANA, D. M. G. et al. Neurons number in the myenteric plexus of the ascending colon of rats. A comparative study using two staining techniques. *Arq. Neuropsiquiatria*, v. 55, n. 3, p. 460-465, 1997.
- SOUZA, J. A.; FURLAN, M. M. D. P. avaliação morfológica de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos normais e com diabetes experimental. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, v. 5, n. 2, p. 141-147, 2001.
- STERNINI, C. Structural and chemical organization of the myenteric plexus. *Ann. Rev. Physiol.* v. 50, p. 81-93, 1988.
- STEVENS, M. J.; FELDMAN, E. L.; GREENE, D. A. The aetiology of diabetic neuropathy: the combined roles of metabolic and vascular defects. *Diabetic Medicine*, v. 12, p. 566-579, 1995.
- WILL, J. C.; BYERS, T. Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C? *Nutrition Review*, v. 54, p. 193-202, 1996.
- YANG, H.; WRIGHT JUNIOR, J. R. Human β cells are exceedingly resistant to streptozotocin in vivo. *Endocrinology*, v.143, n. 7, p. 2497-2495, 2002.
- YANG, R.; AREM, R.; CHAN, L. Gastrointestinal tract complications of diabetes mellitus: pathophysiology and management. *Arch. Inter. Med.* v. 144, p. 1251-1256, 1984.
- YOUNG, H. M. et al. Total numbers of neurons in myenteric ganglia of guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* v. 272, p. 197-200, 1993.
- YOUNG, I. S.; TORNEY, J. J.; TRIMBLE, E. R. The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Radic. Biol. Med.* v. 13, p. 41-46, 1992.
- ZANONI J. N. et al. Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid. *Autonomic Neuroscience*, v. 104, p. 32-38, 2003.

Recebido para publicação em: 08/01/2004
 Received for publication on: 08/01/2004
 Aceito para publicação em: 13/02/2005
 Accepted for publication on: 13/02/2005

UNIVERSIDADE PARANAENSE

PÓS-GRADUAÇÃO

STRICTO SENSU

CIDADE
UNIVERSITÁRIA



design

Mestrado em Ciência Animal

Recomendado pela CAPES

Público Alvo:

Destina-se aos portadores de diploma de graduação reconhecidos pelo MEC, em Medicina Veterinária, Ciências Biológicas, Farmácia, e áreas afins.

Área de Concentração:

Saúde Animal

Linhas de Pesquisa:

Cirurgia, Anestesiologia e Terapêutica Experimental
Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal
Morfofisiologia do Sistema Digestório

Objetivos:

Consolidar atividades científicas em Ciência Animal, formando profissionais com capacidade para produzir, divulgar e utilizar conhecimentos relevantes à saúde animal, destinados ao ensino, pesquisa e atuação no setor produtivo.

Informações

www.unipar.br

Secretaria de Pós-Graduação Stricto Sensu
Tel: 44 3621-2885 e/ou 44 3621-2828, ramais 1285 e 1350
e-mail: mtdcienanimal@unipar.br

