

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE OS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS DO ESTÔMAGO DE RATOS DIABÉTICOS

Naianne Kelly Clebis¹
Jaqueline Nelisis Zanoni²
Sandra Regina Stabile²
Marcelo José Santiago Lisboa³
Marília Fabiana Pimentel de Oliveira³
Sônia Luci Molinari²
Marcílio Hübner de Miranda Neto²
Karina Martinez Gagliardo⁴
Romeu Rodrigues de Souza⁵

CLEBIS, N. K.; ZANONI, J. N.; STABILLE, S. R.; LISBOA, M. J. S.; OLIVEIRA, M. F. P. de; MOLINARI, S. L.; MIRANDA NETO, M. H.; GAGLIARDO, K. M.; SOUZA, R. R. de. Efeitos da suplementação com ácido ascórbico sobre os neurônios mioentéricos do estômago de ratos diabéticos. *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR*, Umuarama, v. 17, n. 3, p. 175-181, set./dez. 2013.

RESUMO: Diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica caracterizada pelo aumento nos níveis de glicose no sangue. O DM pode promover alterações degenerativas do sistema nervoso entérico, porque a hiperglicemia aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, aumenta o estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com ácido ascórbico (AA) nos neurônios NADH-diaforase reativos (NADH-dr) do plexo mioentérico do estômago de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. Para tanto, 15 animais foram divididos em três grupos (n = 5): Grupo C (ratos normoglicêmicos), Grupo D (ratos diabéticos) e DS Grupo (ratos diabéticos tratados com ácido ascórbico). A técnica histoquímica da NADH-diaforase foi empregada e, a densidade neuronal (neurônios/mm²) e a área do perfil dos corpos celulares de 500 neurônios NADH-d de todos os grupos foi investigada. A densidade neuronal no grupo DS foi maior do que nos grupos C (P > 0,05) e D (P < 0,05). A área dos neurônios mioentéricos (NADH-dr) foi menor nos grupos C (P < 0,05) e DS (P > 0,05) que o grupo D. Estes resultados sugerem que a suplementação com ascórbico promoveu um efeito neuroprotetor nos NADH-dr neurônios mioentéricos do estômago dos ratos diabéticos.

PALAVRAS-CHAVE: neurônios mioentéricos; estômago; diabetes *mellitus*; ácido ascórbico.

EFFECTS OF ASCORBIC ACID SUPPLEMENTATION ON MYENTERIC NEURONS IN THE STOMACH OF DIABETIC RATS

ABSTRACT: Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by an increase in blood glucose levels. DM can promote degenerative changes in the enteric nervous system due to the hyperglycemia increasing the formation of reactive oxygen species and, consequently increasing the oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the effect of ascorbic acid (AA) supplementation on the NADH-diaforase reactive neurons (NADH-dr) in the myenteric plexus of the stomach of streptozotocin-induced diabetic rats. In order to do this, 15 animals were divided into three groups (n=5): C Group (normoglycemic rats), D Group (diabetic rats) and DS Group (diabetic rats treated with ascorbic acid). The NADH-d histochemistry technique was employed and the neuronal density (neurons/mm²) and the cell body profile area of 500 NADH-d-stained neurons from all groups were investigated. The neuronal density in the DS group was higher than in the C (P>0.05) and D (P<0.05) groups. The area of the (NADH-dr) myenteric neurons was smaller in the C (P<0.05) and DS (P>0.05) groups than in the D group. These results suggest that ascorbic supplementation promotes a neuroprotective effect on the NADH-dmyenteric neurons from the stomach of diabetic rats.

KEYWORDS: Myenteric neurons; Stomach; Diabetes mellitus; Ascorbic acid.

Introdução

O diabetes mellitus (DM) é uma doença endócrino metabólica (TRONCHINI et al 2013) que leva, de maneira geral, a hiperglicemia (LEPARD; CELLINI, 2013) e intolerância a glicose (HARRIS, 2004).

De acordo com Rolo et al. (2006) a hiperglicemia pode ativar as vias dos polióis levando ao aumento dos compostos reativos do oxigênio e, conseqüentemente, do estresse oxidativo (KASHYAP; FARRUGIA, 2011). Sabe-se que o aumento do estresse oxidativo pode provocar lesões em diversos órgãos, inclusive danos neurodegenerativas e, estas

últimas decorrentes do DM são conhecidas como *neuropatias diabéticas*, as quais atingem inclusive o sistema nervoso entérico (SNE) (RIVERA et al., 2011). Entre os componentes do SNE estão os plexos mioentéricos e submucoso, o primeiro sendo responsável pelo controle do peristaltismo (ZANONI et al., 2011). Desta forma, é possível observar em portadores do DM sintomas de motilidade gastrointestinal, entre eles gastroparesia (CHOI et al., 2008). Para minimizar os efeitos do DM no sistema nervoso entérico, muitos estudos têm sido realizados com o uso de substâncias antioxidantes que visam diminuir o estresse oxidativo, como por exemplo, o Ginkgo biloba (PEREZ DA SILVA, et al.,

¹Professora do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN.

²Professor (a) do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá – UEM.

³Pós-graduandos do Programa “Biologia Estrutural e Funcional” do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – BioEF/DMOR /UFNR.

⁴Professora da Universidade Monte Serrat – UNIMONTE.

⁵Professor do Curso de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina e Zootecnia da Universidade de São – FMVZ/USP.

Endereço para correspondência: Profa. Dra. Naianne Kelly Clebis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte /Centro de Biociências, Departamento de Morfologia – Laboratório de Microscopia Celular e Tecidual – MICROCELT, BR 101, s/n - Campus Universitário Lagoa Nova, Bairro: Lagoa Nova – Natal/RN – Brasil, CEP 59078-970, E-mail: nklebis@hotmail.com, Fone: (084) 3215-3431 (Institucional) ou (084) 9126-9459 (Celular)

2011), a vitamina E (ROLDI et al., 2009; TRONCHINI et al., 2010; TRONCHINI et al., 2012), a L-glutamina (PEREIRA et al., 2011; ZANONI et al., 2011), a Quercetina (LOPES et al., 2012; FERREIRA et al., 2013), a L-glutathione (TRONCHINI et al., 2013; HERMES-ULIANA et al., 2014), além do próprio ácido ascórbico (ZANONI et al., 2003; ZANONI et al., 2005) e, conseqüentemente os danos que acometem o SNE. Porém, a maioria desses estudos utilizou o intestino delgado e o intestino grosso. Segundo Gabella (1994) tanto o número quanto o perfil do corpo celular dos neurônios podem variar e acordo com o segmento do trato gastrointestinal estudado, por esta razão, este trabalho teve por objetivo analisar a densidade e a morfometria dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase reativos da porção glandular do estômago de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina e, suplementados com ácido ascórbico.

Material e Método

Foram utilizados os estômagos de 15 ratos adultos machos, 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 da Comissão de Bioética nº 214/2002).

Aos 90 dias de idade, os animais foram disponibilizados para o período experimental que teve duração de 120 dias. Para tanto, foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de cinco animais, 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.

Foi fornecida ração comercial referência para ratos (Nuvital[®]) e água *ad libitum* para os animais dos três grupos.

Para a indução do diabetes mellitus, após jejum de 14 horas, os animais dos grupos D e DS receberam dose única de estreptozotocina (35 mg/kg de peso corporal, Sigma[®], USA) dissolvida em tampão citrato 10 mM, pH 4,5, por meio de injeção endovenosa, para indução do diabetes. Já 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 (Sigma[®], USA) na dosagem de 1g/L/dia (YOUNG et al., 1992).

Ao final do experimento, com 210 dias de idade, os animais foram pesados, anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental (40mg/kg de peso corpóreo, Sigma, USA) e laparotomizados e os estômagos foram retirados.

Os estômagos dos animais dos três grupos foram utilizados para evidenciar a população de neurônios mioentéricos NADH-diaforase reativos segundo Gabella (1969). O referido método utilizou solução de Krebs (pH 7,3) consistiu de 1,3 g de NaHCO₃ (Sinth[®], BRA), 0,24 g de MgCl₂.6H₂O (Sinth[®], BRA), 0,44 g de KCl (Sinth[®], BRA), 0,165 g de NaH₂PO₂ (Sinth[®], BRA), 7,05 g de NaCl (Sinth[®], BRA) e 0,27 g de CaCl₂ (Sinth[®], BRA) em 1 litro de água destilada. Foi utilizado também um meio de reação (pH 7,3), composto de 25 ml de solução estoque de Nitro Blue Tetrazolium

(NBT, solução estoque na concentração de 0,5 mg/ml, Sigma[®], USA), 25 ml de tampão fosfato de sódio (Sinth[®], BRA), 0,1 M, 50 ml de água destilada e 0,05g de β-NADH (Sigma[®], USA).

Cada estômago coletado foi lavado com solução de Krebs e o seguinte protocolo foi utilizado: duas lavagens de 10 minutos em solução de Krebs; permeabilização em Krebs contendo Triton X-100 (Sigma[®], USA) a 0,3% por cinco minutos; duas lavagens de 10 minutos em solução de Krebs; incubação por 45 minutos em meio de reação; fixação em solução de formol a 10% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3.

Preparados totais de membrana foram obtidos da região glandular do estômago, e estes foram desidratados em série crescente de álcoois (90%, 95% e absoluto) e diafanizados por três imersões consecutivas em xilol (Synth[®], BRA). Cada preparado de membrana foi então colocado entre lâmina e lamínula de vidro e montado com resina Permunt (Synth[®], BRA).

A porção glandular do estômago foi dividida em duas regiões, uma próxima à curvatura gástrica menor (região A) e outra localizada próxima a curvatura gástrica maior (região B) (Figura 1).



Figura 1: Fotografia da região externa do estômago. 1) Região Aglandular; 2) Região Glandular; A) Região próxima a curvatura gástrica menor e B) Região próxima a curvatura gástrica maior. Esôfago (seta). Barra = 10mm.

A análise quantitativa dos neurônios NADH-diaforase reativos foi realizada no microscópio Olympus BX40, objetiva de 40x em 40 campos microscópicos por região, ou seja, 40 campos da Região Glandular A e 40 da Região Glandular B (área total analisada foi de 8,96 mm²) (Tabela 1).

A análise morfométrica da área dos perfis dos corpos celulares dos neurônios NADH-diaforase reativos (μm²) foi realizada em 100 neurônios por preparado de membrana, ou seja, 50 da Região Glandular A e 50 da Região Glandular B, por meio do software ImagePro Plus, versão 6.0 (Tabela 2).

Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis e os morfométricos pelo teste de Tukey e Shapiro-Wilks (o último para a análise de normalidade). O nível de significância para todas as análises foi p<0,05 e os resultados foram expressos como média±erro

padrão.

Resultados

De com os dados quantitativos obtidos da Região Glandular do Estômago (Tabela 1) podemos observar que a densidade neuronal (neurônios/mm²) foi na porção A menor nos animais do grupo D em relação aos grupos C e DS (P<0,05) e, na porção B esta também foi menor em relação ao grupo DS (P<0,05) e C, embora nesta última relação a diferença não tenha sido significativa (P>0,05). Identificou-se também que em ambas as regiões a densidade dos neurônios NADH-diaforase positivos nos animais do grupo DS foi maior que os do grupo C, embora tal diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

Tabela 1: Densidade dos neurônios NADH-diaforase reativos (neurônios/mm²) das porções A e B da Região Glandular do Estômago de Ratos, dos grupos C, D e DS (média ± erro padrão).

Grupos	Glandular A	Glandular B
C	82,9±6,16a	44,77±0,8a
D	64,5±9,11ab	36,76±4,13ab
DS	108,52±11,39ac	60,95±6,93ac

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

A análise dos dados obtidas na mensuração dos perfis celulares dos neurônios pelo teste Shapiro-Wilks demonstrou que os valores do PCC dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase reativos apresentaram distribuição normal.

Tabela 3: Frequência (%) dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase reativos (μm²) das porções A e B da Região Glandular do Estômago de Ratos, dos grupos C, D e DS segundo a área do perfil do corpo celular (PCC), em intervalos de 100 μm².

Área (μm ²)	Frequência (%) de neurônios/grupo em relação à área do perfil celular					
	Porção A			Porção B		
	C	D	DS	C	D	DS
<100	46,4	4,4	4	40,4	3,6	4,5
101 200	38,8	39,6	51	41,6	22	70
201 300	10,4	31,6	30	11,6	30,4	14,5
301 400	4	9,6	10,5	4,4	18,4	7
401 500	0,4	7,6	2	2	11,2	2,5
501 600	---	4	1,5	---	8	1,5
>600	---	3,2	1	---	6,4	---
TOTAL	100	100	100	100	100	100

Discussão

Na neuropatia autonômica é relatada gastroparesia com alteração da motilidade gástrica que pode levar a estase, atonia e dilatação gástrica com aumento ou diminuição no peristaltismo (CAMPBELL, 1977; FELDMAN, 1983; MA et al., 2009; KLOETZER et al., 2010; CELLINI, et al. 2011; LEE et al, 2012; RAVELLA et al. 2012). Em hamster

Em relação aos dados morfométricos podemos observar que a área do perfil celular dos neurônios NADH-diaforase reativos foi tanto na porção A quanto na porção B estatisticamente menor nos animais do grupo C se comparados com os demais grupos (P<0,05). Verificamos que os animais do grupo DS apresentou área menor que os do grupo D, embora tais diferenças não tenham sido significativas estatisticamente em ambas as porções da região glandular do estômago de ratos (P>0,05) (Tabela 2).

Tabela 2: Área do perfil do corpo celular (PCC) dos neurônios NADH-diaforase reativos (μm²) das porções A e B da Região Glandular do Estômago de Ratos, dos grupos C, D e DS (média ± erro padrão).

Grupos	Glandular A	Glandular B
C	123 ± 7,45a	137,8 ± 15,05a
D	255,6 ± 37,87b	320,9 ± 31,57b
DS	212,5 ± 9,38bc	252,8 ± 6,47bc

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa pelo teste de Kruskal-Tukey (P<0,05).

Em relação à frequência (%) de neurônios mioentéricos NADH-reativos em relação à área do perfil do corpo celular (Tabela 3) podemos observar que nos animais do grupo C houve incidência maior de neurônios com PCC inferior a 200 μm² nas porções A (85,2%) e B (82%). No grupo D ocorreu maior frequência de neurônios com PCC entre 101 e 300 μm² tanto na porção A (56%) quanto na B (74,4%). No grupo DS foi maior o número de neurônios com PCC entre 101 e 200 μm² nas porções A (55%) e B (74,5%).

chineses espontaneamente diabéticos observa-se distensão e atonia do estômago e do intestino quando comparados a ratos não diabéticos (DIANI et al., 1979). Para verificarmos possíveis alterações do tônus muscular, mensuramos o perfil do estômago dos animais dos três grupos.

Na região glandular A, na curvatura menor do estômago, não ocorreram diferenças significativas (P>0,05) quanto ao número de neurônios mioentéricos NADH-diafo-

rase reativos entre os grupos C ($82,9\pm 6,16$) e D ($64,5\pm 9,11$) e entre C e DS ($108,52\pm 11,39$). Contudo, ao compararmos os grupos D e DS, verificamos aumento significativo de neurônios no grupo DS ($P<0,05$). Constatamos aumento de 40,5% no número de neurônios nos animais suplementados com ácido ascórbico em relação aos diabéticos não suplementados e aumento de 23,6% em relação aos normoglicêmicos, embora este último não tenha sido significativo ($P>0,05$).

Na região glandular B, na curvatura maior do estômago, situação similar foi detectada, ou seja, ocorreu aumento significativo ($P<0,05$) de 39,7% no número de neurônios no grupo DS ($60,95\pm 6,93 \text{ mm}^2$) quando comparado ao grupo D ($36,76\pm 4,13 \text{ mm}^2$). Em relação ao grupo C ($44,77\pm 0,8 \text{ mm}^2$) verificou-se a presença de 26,5% neurônios a mais no grupo DS, porém como observado na região glandular A, este último aumento não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$).

Fregonesi et al. (2001) avaliaram quantitativamente neurônios NADH-diaforase no corpo do estômago de ratos de 75 dias de idade, diabéticos induzidos por estreptozotocina, e mantidos diabéticos pelo período de dois meses. Neste estudo, os autores verificaram diminuição de neurônios junto à curvatura menor do estômago e não na curvatura maior. O fato de não termos encontrado diminuição no número de neurônios, diferenciando, assim, nossos resultados daqueles relatados por Fregonesi et al. (2001), pode ser justificado pelo tempo de manutenção do diabetes. Em nosso experimento os ratos permaneceram diabéticos por quatro meses, tempo este possivelmente suficiente para que os neurônios que iniciaram processos degenerativos em função dos efeitos tóxicos da estreptozotocina pudessem completar o processo de regeneração como também ressaltado por Zanoni et al. (1997) ao comparar a densidade neuronal no ceco de ratos com tempo de diabetes de dois e de oito meses.

As diferenças entre os resultados obtidos por nós e por Fregonesi et al. (2001) também podem ser explicadas pela distensão da região pilórica do estômago mencionada nos animais utilizados por aqueles pesquisadores. Esta distensão, embora não mensurada por eles, poderia também estar presente em outras regiões do estômago favorecendo maior dispersão dos neurônios e contribuindo para a diminuição da densidade neuronal por área, fato este não constatado em nosso experimento.

Outro fator a ser considerado é a idade do animal quando da indução do diabetes, pois os nervos de ratos mais jovens são mais suscetíveis a alterações morfológicas e fisiológicas. O mesmo poderia estar ocorrendo com os neurônios do plexo mioentérico. Fregonesi et al. (2001) induziram o diabetes em ratos que apresentavam 75 dias de idade, portanto mais jovens. Já, como em nosso experimento, Zanoni et al. (1997) utilizaram ratos de 90 dias de idade.

Apesar de não termos encontrado diminuição estatisticamente significativa no número de neurônios nos animais do grupo D em todas as regiões analisadas, ao contrário do esperado, não podemos, contudo, afirmar que não ocorreu perda de neurônios mioentéricos em função do diabetes, uma vez que o método empregado por nós para detecção de neurônios (histoquímica da NADH-diaforase) não evidencia toda a população neuronal. De acordo com Young et al. (1993) o método da NADH-diaforase permite evidenciar 80% da população total de neurônios no plexo mioentérico.

Portanto outros neurônios não reativos a NADH-

-diaforase podem ter sido alterados ou perdidos. Esses resultados são reforçados pelo fato da neuropatia autonômica, apesar de não ser seletiva (BELAI et al., 1991), não acometer simultaneamente todos os tipos neurônios com a mesma intensidade e extensão (VISON et al., 1989).

Ballmann e Conlon (1985), por exemplo, constataram aumento de reatividade ao VIP e à substância P no estômago de ratos mantidos diabéticos por dez semanas e diminuição no intestino. Wrzos et al. (1997), por sua vez, relataram diminuição de neurônios nitrérgicos no antro do estômago de ratos diabéticos, mas não em outros segmentos. Karakida, Ito e Homma (1989) verificaram aumento de substância P no "extrafundo" do estômago e Takahashi et al. (1997) constataram diminuição no número de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase reativos no corpo do estômago de ratos mantidos diabéticos por seis meses. Ressalta-se que os métodos utilizados pelos referidos autores também não evidenciam toda a população neuronal, mas sim sub-populações.

Análises quantitativas da população total de neurônios mioentéricos são possíveis com a utilização, por exemplo, da coloração por azul de metileno (BARBOSA, 1978) e também detectando os neurônios reativos a miosina-V (DRENGK et al., 2000).

Inúmeras pesquisas utilizaram o azul de metileno ou a miosina-V juntamente com a histoquímica da NADH-d para quantificar neurônios do plexo mioentérico em diferentes segmentos do trato gastrointestinal de ratos diabéticos. Nesses estudos, alterações na densidade neuronal na população neuronal total, mas não nos neurônios NADH-dr foram detectadas no ceco (ZANONI et al., 1997), no colo proximal (FURLAN; MOLINARI; MIRANDA-NETO, 2002) e no colo como um todo (ROMANO; MIRANDA-NETO; CARDOSO, 1996).

Nossos resultados são sugestivos de que a suplementação com ácido ascórbico para ratos diabéticos apresentou um efeito neuroprotetor para neurônios mioentéricos NADH-dr, minimizando a perda neuronal no grupo DS, ao menos na região glandular A e B, embora a suplementação com ácido ascórbico não tenha impedido a perda de neurônios reativos a miosina-V e nem alterado o número de neurônios NADH-dr no íleo de ratos (ZANONI et al., 2003). Nossa afirmação é justificável pelo maior número de neurônios encontrados na região glandular A e B do estômago dos ratos do grupo DS do que no grupo D.

Sabe-se que o envelhecimento leva a diminuição no número de neurônios do plexo mioentérico (SANTER; BAKER, 1988; GABELLA, 1989; SOUZA et al., 1993). Os ratos foram mantidos diabéticos durante o período de 90 a 210 dias de idade. Este fato poderia explicar os resultados obtidos na contagem dos neurônios, o ácido ascórbico provavelmente por sua ação antioxidante, minimizou os efeitos do envelhecimento aos quais os animais dos três grupos estavam submetidos, atuando como neuroprotetor no grupo suplementado, explicando a maior densidade neuronal neste grupo quando comparada ao grupo D.

Os processos degenerativos que levam a perda de neurônios o fazem de maneira diferenciada conforme a sub-população considerada. Diminuição na população de neurônios no intestino de ratos e cobaia (SANTER; BAKER, 1988) e no intestino delgado e grosso de seres humanos (SOUZA

et al., 1993; GOMES; SOUZA; LIBERTI, 1997) tem sido atribuída ao envelhecimento, independentemente das condições fisiopatológicas. Em nosso experimento, somaram-se aos efeitos do envelhecimento a condição de diabetes que por si já é debilitante.

Em relação a média do PCC dos neurônios mioentéricos NADH-dr na região glandular A e B, podemos observar que no grupo DS ela foi 16,8% e 21,23% menores, respectivamente, do que os presentes nas regiões correspondentes do grupo D. Porém estas diminuições não foram estatisticamente significativas ($P > 0,05$). Aumento na média do PCC de neurônios nitrérgicos do corpo do estômago de ratos diabéticos por estreptozotocina foi observado também por Fregonesi (2003).

Nas regiões glandulares A e B observamos aumento na frequência de neurônios com PCC inferior a $200 \mu\text{m}^2$ no grupo DS (55% e 74,5%) quando comparado com o grupo D (44% e 25,6%). Nesta região do estômago, o grupo controle apresentou 85,2% e 82% do número total de neurônios com dimensões inferiores a $200 \mu\text{m}^2$. Com o aumento de neurônios com perfil inferior a $200 \mu\text{m}^2$ no grupo DS, acabou-se por verificar diminuição de neurônios com dimensões superiores a $200 \mu\text{m}^2$ para o referido grupo (45% e 25,5%) e aumento destes no grupo D (56% e 74,4%).

Esses resultados são indicativos de que, embora não tenha alterado o número de neurônios NADH-dr no grupo D quando comparado com o controle, ocorreu no grupo D incidência maior ($P < 0,05$) de neurônios com dimensões superiores a $200 \mu\text{m}^2$ principalmente na região glandular. Já, para o grupo DS ocorreu diminuição ($P < 0,05$) de neurônios grandes e médios e aumento de neurônios pequenos se aproximando mais dos resultados observados para o grupo C, sugerindo, mais uma vez, um efeito neuroprotetor do ácido ascórbico nos neurônios NADH-dr desta região do estômago.

Em ratos diabéticos tratados com a mesma dosagem de ácido ascórbico utilizada por nós, Zanoni et al. (2003) verificaram que o PCC de neurônios nitrérgicos dos ratos diabéticos suplementados era menor do que a dos ratos diabéticos não tratados. O aumento do tamanho dos neurônios mioentéricos em ratos diabéticos é uma constatação frequente (BÜTTOW; MIRANDA-NETO; BAZOTTE, 1997; ZANONI et al., 1997; ZANONI et al. 2003).

Frequência aumentada de neurônios grandes foi relatado por Büttow, Miranda-Neto e Bazotte (1997) no duodeno de ratos diabéticos. Os referidos pesquisadores atribuíram o fato à degeneração neuronal e também ao acúmulo de lipofucsina decorrente do envelhecimento. Este fato poderia também ser a justificativa para a incidência maior de neurônios com PCC superior a $200 \mu\text{m}^2$ na região glandular A e B, ambas do grupo D. Durante o envelhecimento e sob condições de diabetes o número de neurônios médios e grandes é aumentado e são os primeiramente perdidos (ROMANO; MIRANDA-NETO; CARDOSO, 1996).

Schmeichel, Schmelzer e Low (2003) comentam que, no DM, a progressiva disfunção celular oriunda da confluência dos distúrbios metabólicos e vasculares levam ao comprometimento da função neural e a perda de suportes neurotróficos, que, a longo prazo, pode resultar em apoptose de neurônios, células de Schwann e de elementos gliais no sistema nervoso periférico.

Brownlee (2001) postula que tanto a inibição do

acúmulo de superóxido verificado no DM como a euglicemia podem restaurar o equilíbrio metabólico e vascular e bloquear o início e a progressão das complicações presentes no diabetes.

A suplementação com ácido ascórbico preveniu o aumento do PCC de neurônios mioentéricos NADPH-dr do íleo de ratos diabéticos (ZANONI et al., 2003), assim como preveniu o aumento do PCC de neurônios imunoreativos para o peptídeo intestinal vasoativo no plexo submucoso do íleo (ZANONI et al., 2001). Ao contrário do observado por nós no estômago dos animais do grupo D, em todas as regiões do estômago analisadas nos grupos DS e C predominaram neurônios com PCC inferior a $200 \mu\text{m}^2$. A diferença foi mais ressaltada ainda na região glandular B onde o grupo DS apresentou 65,7% neurônios a mais com PCC inferior a $200 \mu\text{m}^2$ do que o grupo D.

Feldman (2003) comenta que atualmente não há tratamento para as neuropatias além daqueles que tratam a condição diabética em si, e que cada vez mais se deve buscar o desenvolvimento de novas terapias. Segundo o autor, bloqueando a ação de componentes das inúmeras vias envolvidas na patogênese do DM, bloquear-se-ia as múltiplas causas do estresse oxidativo, prevenindo, assim, danos ao sistema nervoso.

Conclusão

Portanto, de modo geral, a partir dos resultados expostos anteriormente podemos inferir que a suplementação com ácido ascórbico protegeu os neurônios mioentéricos NADH-diaforase reativos da região glandular do estômago minimizando os efeitos deletérios do diabetes. 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

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo) por fomentar esta pesquisa (Processo nº 02/07056-7) e ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ/USP.

Referências

- BALLMANN, M.; CONLON, J. M. Changes in the somatostatin, substance P and vasoactive intestinal polypeptide content of the gastrointestinal tract following streptozotocin-induced diabetes in the rat. **Diabetologia**, v. 28, p. 335-358, 1985.
- BARBOSA, A. J. A. Técnica histológica para gânglios intramurais em preparados espessos. **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.** v.11, p. 95-97, 1978.
- BELAI, A. et al. Differential effect of streptozotocin induced diabetes on the ileum and distal colon. **Gastroenterol.** v. 100, p.1024-1032, 1991.

- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetes complications. **Nature**, v. 415, p. 813-820, 2001.
- BÜTTOW, N. C. et al. 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.
- CAMPBELL, I. W. et al. Gastric emptying in diabetic autonomic neuropathy. **Gut**, v. 18, p. 462-467, 1977.
- CELLINI, J. et al. Regional differences in neostigmine-induced contraction and relaxation of stomach from diabetic guinea pig. **Auton. Neurosci.** v. 160, n. 1-2, p. 69-81, 2011.
- CHOI, K. M. et al. Heme oxygenase-1 protects interstitial cells of Cajal from oxidative stress and reverses diabetic gastroparesis. **Gastroenterology**, v. 135, p. 2055-2064, sup. 64 e1-2, 2008.
- DIANI, A. R. et al. Radiologic abnormalities and autonomic neuropathology in the digestive tract of the ketonuric diabetic chinese hamster. **Diabetologia**, v. 17, p. 33-40, 1979.
- DRENGK, A. C. et al. Immunolocalization of myosin-V in the enteric nervous system of the rat. **J. Auton. Nerv. Syst.** v. 78, p. 109-112, 2000.
- FELDMAN, E. L. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. **J. Clin. Invest.** v. 111, p. 431-433, 2003.
- FELDMAN, M.; SCHILLER, L. R. Disorders of gastrointestinal motility associated with diabetes mellitus. **Ann. Internal Med.** v. 98, p. 378-384, 1983.
- FERREIRA, P. E. B. et al. Diabetic neuropathy: an evaluation of the use of quercetin in the cecum of rats. **World J. Gastroenterol.** v. 19, n. 38, p. 6416-6426, 2012.
- FREGONESI, C. E. P. T. et al. Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Arq. Neuropsiquiatr.** 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-A, p. 576-581, 2002.
- GABELLA, G. Detection of nerve by a histochemical technique. **Experientia**, v. 25, p. 218-219, 1969.
- _____. Fall in the number of myenteric neurons in agian guinea-pigs. **Gastroenterology**, v. 96, p. 1487-1493, 1989.
- _____. Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract. In: JONHNSON, L. D. **Physiology of the gastrointestinal tract**. 3. ed. New Yourk: Raven Press, 1994. p. 381-422.
- GOMES, O. A.; SOUZA, R. R.; LIBERTI, E. A. A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. **Gerontology**, v. 43, p. 210-217, 1997.
- HARRIS, M. I. Definition and classification of diabetes mellitus and the criteria for diagnosis. In: LEROITH, D.; OLESKY, J. M. TAYLOR, S. I. **Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 457-461 p.
- HERMES-ULIANA, C. et al. Is L-Glutathione more effective than L-Glutamine in preventing enteric diabetic neuropathy? **Dig. Dis. Sci.** v. 59, p. 937-948, 2014.
- KARAKIDA, T.; ITO, S.; HOMMA, S. In vitro motor activity of intestinal segments of streptozotocin diabetes rats. **J. Auton. Nerv. Syst.** v. 26, p. 43-50, 1989.
- KASHYA, P.; FARRUGIA, G. Oxidative stress: key player in gastrointestinal complications of diabetes. **Neurogastroenterol. Motil.** v. 23, p. 111-114, 2011.
- KLOETZER, L. et al. Motility of the antroduodenum in healthy and gastroparetics characterized by wireless motility capsule. **Neurogastroenterol. Motil.** v. 22, p. 527-533, 2010.
- LEE, J. et al. Glucose sensing by gut endocrine cells and activation of the vagal afferent pathway is impaired in a rodent model of type 2 diabetes mellitus. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 302, n. 6, p. R657-R666, 2012.
- LePARD, K. J.; CELLINI, J. Age-dependent slowing of enteric axonal transport in insulin-resistant mice. **World J. Gastroenterol.** v. 19, n. 4, p. 482-491, 2013.
- LOPES, C. R. P. et al. Neuroprotective effect of quercetin on the duodenum enteric nervous system of streptozotocin-induced diabetic rats. **Dig. Dis. Sci.** v. 57, p. 3106-3115, 2012.
- MA, J. et al. Diabetic gastroparesis: diagnosis and management. **Drugs**, v. 69, p. 971-986, 2009.
- PEREIRA, R. V. F. et al. L-Glutamine supplementation prevents myenteric neuron loss and has gliatrophic effects in the ileum of diabetic rats. **Dig. Dis. Sci.** v. 56, p. 3507-3516, 2011.
- PEREZ, G. G. da S.; ZANONI, J. N.; BUTTOW, N. C. Neuroprotective action of Ginkgo biloba on the enteric nervous system of diabetic rats. **World J. Gastroenterol.** v. 17, n. 7, p. 898-905, 2011.
- RAVELLA, K.; YANG, H.; GANGULA, P. R. R. Impairment of gastric nitrergic and NRF2 system in

- apolipoprotein e knockout mice. **Dig. Dis. Sci.** v. 57, n. 6, p. 1504-1509, 2012.
- RIVERA, L. R. et al. The involvement of nitric oxide synthase neurons in enteric neuropathies. **Neurogastroenterol.Motil.** v. 23, p. 980-988, 2011.
- ROLDI, L. P. et al. Vitamin E (α -tocopherol) supplementation in diabetic rats: effects on the proximal colon. **BMC Gastroenterology**, v. 9, n. 88, p. 1-8, 2009.
- ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **ToxicolApplPharmacol.** v. 212, p. 167-178, 2006.
- 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.
- SANTER, R. M.; BAKER, D. M. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. **J. Auton. Nerv. Syst.** v. 25, p. 25-57, 1988.
- SCHMEICHEL, A. M.; SCHMELZER, J. D.; LOW, P. A. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. **Diabetes**, v. 52, p.165-171, 2003.
- SOUZA, R. R.; MORATELLI, H. B.; BORGES, N.; LIBERTI, E. A. Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. **Int. J. Exp. Clin. Gerontol.** v. 39, p.183-188, 1993.
- TAKAHASHI, T. et al. Impaired expression of nitric oxide synthase in the gastric myenteric plexus of spontaneously diabetic rats. **Gastroenterology**, v. 113, p. 1535-1544, 1997.
- TRONCHINI, E. A. et al. Effect of L-glutamine on myenteric neuron and of the mucous of the ileum of diabetic rats. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 85, n. 3, p. 1165-1176, 2013.
- TRONCHINI, E. A. et al. Supplementation with 0.1% and 2% vitamin E in diabetic rats: analysis of myenteric neurons immunostained for myosin-V and nNOS in the jejunum. **Arq. Gastroenterol.** v. 49, n. 4, p. 284-290, 2012.
- TRONCHINI, E. A. et al. Vitamin E (α -tocopherol) supplementation enhances nitric oxide production in penile tissue of diabetic rats. **B. J. International.** v. 10, n. 6, p. 1788-1793, 2010.
- VINSON, J. A. et al. In vitro and in vivo reduction of erythrocyte sorbitol by ascorbic acid. **Diabetes**, v. 38, p. 1036-1041, 1989.
- WRZOS, H. F. et al. Nitric oxide synthase (NOS) expression in the myenteric plexus of streptozotocin-diabetic rats. **Dis. Sci.** v. 42, p. 2106-2110, 1997.
- 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. 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.** v. 34, p. 149-153, 2005.
- 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. **Aut. Neurosc.: Basic and Clinical**, v. 104 p. 32-38, 2003.
- ZANONI, J. N. et al. Effects of L-glutamine supplementation on the myenteric neurons from the duodenum and cecum of diabetic rats. **Arq. Gastroenterol.**, v. 48, n. 1, p. 66-71, 2011.
- ZANONI, J. N. et al. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus YOUNG, H.M.; FURNESS, J.B.; SEWELL, P.; BURCHER, E.F.; KANDIAH, C.J. Total numbers of neurons in myenteric ganglia of guinea-pig small intestine. **Cell Tissue Res.** v. 272, p. 197-200, 1993.