

CYNTHIA PRISCILLA DO NASCIMENTO BONATO PANIZZON

Efeitos da suplementação com L-Glutamina 2% e L-Glutationa 1% sobre
as células da glia e neurônios do plexo mientérico do íleo de ratos
diabéticos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcílio Hubner de Miranda Neto

Co-Orientador: Prof. Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni

Maringá
2013

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

P194e Panizzon, Cynthia Priscilla do Nascimento Bonato.
Efeitos da suplementação com L-Glutamina 2% e L-Glutationa 1% sobre as células da glia e neurônios do plexo mientérico do íleo de ratos diabéticos/
Cynthia Priscilla do Nascimento Bonato Panizzon. - Maringá, 2013.
62 f. : il., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Marcílio Hubner de Miranda Neto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada, 2013.

1. Diabetes Mellitus. 2. Diabetes Mellitus - Morte Neural. 3. Diabetes Mellitus - Célula da glia entérica. 4. L-Glutationa - L-Glutamina- Efeitos. 5. Neuropatia entérica. 6. Neurônio entérico e célula da glia entérica. 7. Rato Wistar. I. Miranda Neto, Marcílio Hubner de, orient. II. Zanoni, Jacqueline Nelisis, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada. IV. Título.

CDD 22. ED. 573.4

JLM-001037

FOLHA DE APROVAÇÃO

CYNTHIA PRISCILLA DO NASCIMENTO BONATO PANIZZON

Efeitos da suplementação com L-Glutamina 2% e L-Glutationa 1% sobre as células da glia e neurônios do plexo mientérico do íleo de ratos diabéticos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Marcílio Hubner de Miranda Neto
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Eleandro Aparecido Tronchini
Universidade Paranaense – UNIPAR

Prof. Dr. Cristiano Massao Tashima
Universidade Estadual do Norte do Paraná

Aprovada em: 19 de fevereiro de 2013.

Local de defesa: MUDI, Bloco O33, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

Agradecimentos

A **Deus**, pelo dom da vida e por estar ao meu lado na realização desse trabalho.

Aos meus pais, **Adilson e Inorina**, pelos exemplos de vida e por sempre confiarem em mim.

Ao meu marido **Jean Carlos**, que sempre me apoio e incentivou.

As minhas irmãs, **Letícia e Karina** que sempre torceram por mim.

A minha co-orientadora, **Jacqueline Nelisis Zanoni**, que me aceitou no laboratório e me socorreu nos momentos que precisei.

Ao meu orientador **Marcílio Hubner de Miranda Neto** que me ajudou na concretização desta etapa.

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

A Capes, pela concessão da bolsa de Mestrado.

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

A todos os colegas do laboratório Plasticidade Neural Entérica que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

A **Aline, Catchia e Camila** que nunca negaram ajuda.

A **Karla** que além de companheira de estrada sempre me ajudou quando precisei.

A **Renata** que não mediu esforços para me ajudar na parte escrita.

A **Aline e Eleandro** que me receberam em casa durante esses dois anos.

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

Efeitos da suplementação com L-Glutamina 2% e L-Glutationa 1% sobre as células da glia e neurônios do plexo mientérico do íleo de ratos diabéticos

RESUMO

O Diabetes Mellitus é um distúrbio metabólico crônico e complexo de etiologia múltipla. O diabetes está associado com distúrbios no trato gastrointestinal, que incluem sintomas como: náuseas, inchaço, dor abdominal, diarreia, constipação e atraso no esvaziamento gástrico. O objetivo desse trabalho foi comparar o efeito protetor da suplementação com L-glutamina 2% e com L-glutationa 1% sobre os neurônios e as células glias entéricas no íleo de ratos diabéticos. Foram utilizados 30 ratos machos Wistar, distribuídos em seis grupos: Normoglicêmico (N), Normoglicêmico suplementado com L-Glutamina 2% (NG), Normoglicêmico suplementado com L-Glutationa 1% (NGO), Diabético (D), Diabético suplementado com L-Glutamina 2% (DG) e Diabético suplementado com L-Glutationa 1% (DGO). Depois de 120 dias o íleo foi processado para as técnicas de imunohistoquímicas HuC/D e S100. Análise quantitativa e morfométrica foram realizadas. Os ratos do grupo D apresentaram uma redução no número de neurônios quando comparados com os animais do grupo N. A L-Glutationa preveniu a morte neuronal nos diabéticos suplementado quando comparado com o grupo D. Além disso, a L-Glutationa causou uma redução no número de neurônios nos animais normoglicêmicos suplementados quando comparado com os N. A densidade glial não alterou com o diabetes, mas houve uma proliferação glial nos ratos diabéticos suplementados com L-Glutationa quando comparado com o grupo D e uma proliferação nos ratos do grupo NG quando comparado com os normoglicêmicos. A área neuronal aumentou nos ratos diabéticos em relação aos normoglicêmicos. Os ratos do grupo DG e DGO apresentaram uma menor área neuronal quando comparado com os diabéticos. A L-Glutamina ocasionou um aumento na área neuronal nos ratos normoglicêmicos suplementados em relação aos normoglicêmicos. A área do corpo celular glial reduziu nos diabéticos quando comparado com os normoglicêmicos. Os ratos do grupo DG e DGO não apresentaram diferença significativa na área do corpo celular glial quando comparado com os ratos do grupo D. Já os animais normoglicêmicos suplementados com L-Glutationa apresentaram uma redução na área do corpo celular glial quando comparado com o grupo normoglicêmico. Concluiu-se que a suplementação com L-Glutationa 1% apresentou um melhor efeito que a L-Glutamina 2% na neuroproteção entérica.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus, neuropatia entérica, neurônio entérico e célula da glia.

Effects of supplementation with 2% L-Glutamine and 1% L-Glutathione on glial cells and neurons of the myenteric plexus of the ileum of diabetic rats

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a chronic metabolic disorder of multiple etiology and complex. Diabetes is associated with disorders of the gastrointestinal tract, which includes symptoms such as: nausea, bloating, abdominal pain, diarrhea, constipation, and delayed gastric emptying. The aim this study was to compare the protective effect of 2% L-Glutamine supplementation and 1 % L-Glutathione on the enteric neurons and enteric glial cell. It was used 30 male Wistar rats, divided in six groups: Normoglycemic (N), Normoglycemic supplemented with 2% L-Glutamine (NG), Normoglycemic supplemented with 1% L-Glutathione (NGO), Diabetics (D), Diabetics supplemented with 2% L-Glutamine (DG) and Diabetics supplemented with 1% L-Glutathione (DGO). After 120 days, the ileum was processed for HuC/D and S100 immunohistochemistry techniques. Quantitative and morphometric analysis was performed. Diabetic rats had a reduction in the number of neurons compared to animals in group N. L-Glutathione prevented the neuronal death in diabetic supplemented when compared to the group D. Furthermore, L-Glutathione caused a reduction in the number of neurons in the normoglycemic animals supplemented when compared to group N. The glial density did not change with diabetes, but there was a glial proliferation in diabetic rats supplemented with L-Glutathione when compared with the group D and a proliferation in the group NG when compared to the normoglycemic. The neuronal area increased in diabetic rats compared to normoglycemic. The rats from the group DG and DGO showed a smaller neuronal area when compared to diabetics. L-Glutamine caused an increase in the neuronal area in the rats from the group NG compared to normoglycemic. The area of the glia cell body decreased in diabetic compared to the normoglycemic. The rats from the DG and DGO groups showed no significant difference in the area of the glia cell body when compared with the rats in group D. The normoglycemic animals supplemented with L-Glutathione showed a reduction in the area of the glia cell body compared to normoglycemic. It was concluded that supplementation with 1% L-Glutathione showed a better effect than 2% L-Glutamine in enteric neuroprotection.

Keywords: Diabetes Mellitus, neuropathy, enteric neuron and enteric glial cell.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo Científico

- Tabela 1.** Parâmetros fisiológicos (PF) dos animais dos grupos: normoglicêmico (N), normoglicêmico suplementado com L-glutamina (NG), diabético (D), diabético suplementado com L-glutamina (DG), normoglicêmico suplementado com glutathione (NGO) e diabético suplementado com glutathione (DGO).....55
- Tabela 2.** Área média em μm^2 dos corpos celulares de neurônios HuC/D-IR e células da glia S100-IR e densidade dos neurônios HuC/D-IR e células da glia S100-IR dos animais dos grupos: normoglicêmico (N), normoglicêmico suplementado com L-Glutamina (NG), diabético (D), diabético suplementado com L-Glutamina (DG), normoglicêmico suplementado com L-Glutathione (NGO) e diabético suplementado com L-Glutathione (DGO)..... 55
- Figura 1:** Distribuição de frequência relativa da área do corpo celular. (A) Neurônio mientéricos HuC/D-imunorreativo e (B) células da glia S-100 imunorreativa. Grupo normoglicêmico (N), diabético (D), normoglicêmico suplementado com L-Glutamina (NG), diabético suplementado com L-Glutamina (DG), normoglicêmico suplementado com L-Glutathione (NGO) e diabético suplementado com L-Glutathione (DGO) n= 5 ratos por grupo.....56
- Figura 2.** Micrografia do plexo mientérico do íleo imunomarcados pela técnica HuC/D (A, B, C, D, E e F) e S-100 (G, H, I, J, K e L) nos grupos: normoglicêmico (A, G e M), diabético (D, J e P), normoglicêmico suplementado com L-Glutamina 2 % (B, H e N), diabético suplementado com L-Glutamina 2% (E, K e Q), normoglicêmico suplementado com L-Glutathione 1% (C, I e O) e diabético suplementado com L-Glutathione 1% (F, L e R). n=5 ratos por grupo. Barra de calibração:25 μm57

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	8
Introdução	9
Revisão Bibliográfica	11
Referências	24
CAPÍTULO 2	34
Suplementação com L-Glutationa é mais eficaz do que L-Glutamina na prevenção da neuropatia entérica de ratos diabéticos	34
Resumo	36
Introdução	37
Materiais e Métodos	38
Procedimentos com animais	38
Coleta e processamento do material	39
Estudo da população total de neurônios mioentéricos imunoreativos à proteína Hu (HuC/D-IR) e células gliais entéricas imunoreativas à proteína S100 (S100-IR)	40
Análise quantitativa dos neurônios HuC/D-IR e células da glia S100-IR por gânglio mioentérico	40
Análise morfométrica dos neurônios HuC/D-IR e células da glia S100-IR.....	40
Análise estatística	41
Resultados	41
Dados fisiológicos	41
Densidade neuronal por gânglio mioentérico.....	41
Densidade glial por gânglio mioentérico	42
Morfometria dos neurônios mioentéricos HuC/D-IR.....	42
Morfometria das células da glia entérica S100-IR.....	42
Discussão	43
Referências	50
ANEXO 1	58

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1. Introdução

O trato gastrointestinal (TGI) fornece para o organismo um suprimento contínuo de água, nutrientes e eletrólitos. Na parede do TGI encontra-se o plexo mientérico e submucoso que juntos formam o Sistema Nervoso Entérico (SNE) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). O SNE é constituído por neurônios e células gliais entéricas (CGEs) (FURNESS, 2006). Os neurônios se localizam na maioria das vezes em gânglios nos plexo mientérico e submucoso, enquanto as CGEs são encontradas em todas as camadas do intestino (RUHL, 2005).

Estudos têm sido feitos com o intuito de analisar o comportamento dos neurônios entéricos e das CGEs em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina (PEREIRA et al., 2011; LOPES et al., 2012).

Estima-se que cerca de 143 milhões de pessoas em todo o mundo sofram de diabetes e acredita-se que esse número possa dobrar até 2030 (KING; AUBERT; HERMAN, 1998). O *diabetes mellitus* (DM) é um dos principais problemas de saúde pública e é a principal causa de neuropatia, retinopatia, nefropatia, ataques cardíacos e derrames. (VINIK, 1999). A neuropatia diabética é um grupo heterogêneo de desordens e apresenta uma gama extensiva de anormalidades (VINIK, 2004) afetando entre 60 e 70 % dos pacientes diabéticos (MOGHTADERI et al., 2006).

No DM, ocorre à redução dos níveis de importantes antioxidantes como a Glutathiona (GSH), o que torna a suplementação com substâncias como a L-Glutamina, um precursor da GSH, uma esperança promissora no tratamento das complicações neurológicas induzidas pela doença. (KUYVENHOVEN; BAKHSHIPOUR; RASHIDI, 1999).

Estudos mostram que os níveis de GSH, apresentam-se reduzidos em ratos com DM induzido pela estreptozotocina (LOVEN et al., 1986). Segundo Bravenboer et al. (1992), seu uso em ratos diabéticos é particularmente efetivo na prevenção da neuropatia diabética

Vários autores já demonstraram que a L-Glutamina aumenta ou mantém os níveis de GSH nas células. Roth et al. (2002), observaram este fato em ratos após a suplementação com o aminoácido. Foi verificado que a suplementação com L-Glutamina reduz a depleção de GSH no músculo esquelético em humanos, após trauma cirúrgico (FLARING et al, 2003). Além disso, Harward et al. (1994),

observaram que a suplementação com o aminoácido em ratos, mantém os níveis de GSH durante isquemia / reperfusão intestinal.

Alves et al. (2010) e Pereira et al. (2011) investigaram os efeitos da suplementação de L-Glutamina nos componentes do SNE, e ambos obtiveram resultados positivos com a suplementação. Ueno et al. (2002), demonstraram que a suplementação com GSH em animais com DM experimental, previne disfunções neuronais e renais.

Assim sendo, o objetivo do trabalho foi comparar o efeito da suplementação com L-Glutamina 2% e L-Glutationa 1% sobre os neurônios entéricos e as CGEs no plexo mioentérico do íleo de ratos induzidos a DM experimental.

2. Revisão Bibliográfica

O sistema nervoso surgiu como uma necessidade dos organismos unicelulares, de se ajustar ao meio ambiente para sobreviver. Com a evolução o sistema nervoso tornou-se fundamental para os organismos pluricelulares no controle do meio interno e o funcionamento coordenado das células, tecidos e sistemas, além de integrar o indivíduo com o meio externo. Sendo assim, o sistema nervoso é responsável por receber informações do meio interno e externo (sensoriais), associar e interpretar essas informações, ordenar ações ou respostas (motora) e no ápice da evolução também é responsável pelas funções intelectuais, como memória, humor e outros (MACHADO, 2006. MIRANDA NETO, 2007).

Em uma classificação anatômica o sistema nervoso é dividido em Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP) (MACHADO, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). O SNC é composto pelo encéfalo e medula espinhal. Os neurônios do SNC associam a informação que ingressa e determinam se uma resposta é necessária. Sinais desencadeando uma resposta apropriada são enviados de volta às células eferentes do corpo através dos neurônios eferentes. O conjunto dos neurônios aferentes e eferentes constitui o SNP (SILVERTHORN, 2003).

O SNP pode ser dividido em Sistema Nervoso Somático, que controla os músculos esqueléticos, e Sistema Nervoso Autônomo, responsável pelo controle de músculo liso e cardíaco, glândulas exócrinas, algumas glândulas endócrinas e alguns tipos de tecido adiposo (SILVERTHORN, 2003). Essas atividades têm a função de manter a constância do meio interno, para isso, este é um sistema involuntário que funciona em nível inconsciente (SPENCE, 1991; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). O sistema nervoso autônomo é também denominado sistema nervoso visceral, porque ele controla a contração e a secreção em vários órgãos internos. Os componentes autônomos são posteriormente divididos em Sistema Nervoso Simpático, Sistema Nervoso Parassimpático e Sistema Nervoso Entérico (SNE) (SILVERTHORN, 2003). O SNE estende-se da faringe ao esfíncter anal (FURNESS; COSTA, 1980), ou seja, por todo o trato gastrointestinal (TGI).

O TGI fornece para o organismo um suprimento contínuo de água, nutrientes e eletrólitos. Para que isso aconteça, vários eventos estão envolvidos, incluindo motilidade e digestão dos alimentos, secreção do suco digestivo, absorção dos produtos da digestão, circulação de sangue pelos órgãos gastrintestinais. O controle

de todas essas funções é realizado pelos sistemas endócrino e nervoso (FURNESS; COSTA, 1980).

A parede do TGI é composta por quatro camadas distintas: túnica mucosa, tela submucosa, túnica muscular e serosa. A túnica muscular é constituída por musculatura lisa disposta em dois estratos: circular interna e longitudinal externa. Nos mamíferos, localiza-se entre estas o plexo mioentérico, componente do SNE que desempenha um importante papel na regulação da atividade peristáltica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O SNE funciona como um “cérebro” localizado no TGI, sendo uma forma eficiente de deslocamento do controle visceral do SNC, eliminando, entre outras coisas, um grande número de vias que percorrem a longa distância de conexão entre o SNC e o trato digestório. Evolutivamente esta é uma forma do SNC poupar espaço mantendo, no entanto, ligação com o intestino para intercâmbio de informações essenciais (STERNINI, 1988).

O SNE apresenta-se organizado em plexos que podem ser ganglionados ou não ganglionados. Os plexos mioentérico e submucoso são plexos do tipo ganglionados (STERNINI, 1988). O plexo mioentérico estende-se por todo TGI, do esôfago ao ânus, e apresenta diferenças morfológicas nos diferentes órgãos e espécies estudadas (FURNESS, 2006). O plexo submucoso localiza-se entre a muscular circular e a tela submucosa.

São descritos três componentes do plexo mioentérico: um plexo primário, um secundário e um terciário (LI, 1940). Os gânglios e as fibras internodais compõem o primeiro plexo, que é a camada principal do plexo mioentérico. Muitas das fibras nervosas não se conectam como o gânglio, mas passam por cima dele, geralmente entre o mesmo e o músculo longitudinal, e continuam na outra vertente internodal. Finos feixes de fibras nervosas constituem o plexo secundário. Esses feixes podem ser uma ramificação das fibras internodais do plexo primário ou originar-se a partir dos gânglios, mas geralmente não estão vinculados a gânglios adjacentes. Os feixes estão em paralelo com as fibras musculares da camada muscular circular e, muitas vezes, ultrapassam as fibras internodais (FURNESS, 2006). Esses feixes estão localizados entre o plexo primário e a muscular circular (SCHABADASCH, 1930; STÖHR, 1952). O terceiro plexo é composto de finíssimos feixes nervosos, que serpenteiam os espaços entre a malha formada pelo plexo primário (RICHARDSON,

1958; LLEWELLYN-SMITH et al., 1993; FURNESS et al., 2000). Feixes de nervos do plexo terciário podem ser traçados a partir de fibras internodais principais, gânglios e feixes de fibras nervosas do plexo secundário (FURNESS, 2006).

Além do plexo miontérico, o outro plexo ganglionado que constitui o SNE é o plexo submucoso. Este plexo é encontrado nos intestinos delgado e grosso e foi descrito pela primeira vez na metade do século XIX por Meissner e Billroth. Embora se encontrem gânglios dispersos na camada submucosa do esôfago e estômago, estes não formam um plexo ganglionar comparável aos dos intestinos (FURNESS, 2006).

Em geral, os feixes de interligação do plexo submucoso são mais finos e os gânglios são menores do que os do plexo mientérico (TIMMERMANS; HENS; ADRIAENSEN, 2001). O plexo é contínuo em torno da circunferência e ao longo do comprimento dos intestinos delgado e grosso. Os arranjos de gânglios no plexo submucoso e os tipos de neurônios funcionais nos gânglios diferem entre as espécies (HOYLE; BURNSTOCK, 1989; TIMMERMANS et al., 1990). Em animais de grande porte, como o porco, formam-se gânglios submucosos distintos, mas interligados a plexos que se encontram em diferentes níveis (SCHABADASCH, 1930). Gânglios em diferentes profundidades contêm populações de neurônios distintas em relação a forma e natureza química dos constituintes dos mesmos (FURNESS, 2006).

Existem duas camadas de plexo submucoso: submucoso interno e submucoso externo (TIMMERMANS et al., 2001). O interno é o que se localiza mais perto do lúmen intestinal, e o externo é o mais próximo da camada muscular circular. Os neurônios do plexo exterior fornecem inervação da muscular circular até à longitudinal (SANDERS; SMITH, 1986; FURNESS et al., 1990; TIMMERMANS et al., 1997; PORTER et al., 1999). O plexo submucoso externo também fornece inervação para a mucosa (PORTER et al., 1999; TIMMERMANS et al., 2001).

O plexo submucoso interior tem poucos neurônios que inervam o músculo, mas muitos inervam a mucosa (PORTER et al., 1999; TIMMERMANS et al., 2001). Em mamíferos de pequeno porte, como o porquinho da Índia, geralmente há uma única camada de gânglio da submucosa e este gânglio contém somente neurônios secretores (FURNESS et al., 2003).

Existem muitas classificações dos neurônios entéricos. Dentre estas destaca-se a classificação morfológica de Dogiel em neurônios Dogiel tipo I, II e III. Os neurônios Dogiel tipo I possuem corpo celular achatado, entre 13 e 35 μ m de comprimento e 9 e 22 μ m de largura, axônio único, longo e irregular, e 4 a 20 dendritos que se projetam para a musculatura (neurônios motores). Neurônios Dogiel tipo II são os neurônios mais proeminentes nos gânglios mioentérico e submucoso do intestino delgado e cólon, mas são muito raros no estômago. Eles têm corpos celulares grandes, redondos ou ovais, e são numerosos. Equivalem geralmente de 10 a 25% da população de neurônios no gânglio mioentérico nos intestinos delgado e grosso. Possuem de 3 a 10 dendritos e um axônio que se projeta para as células ganglionares (neurônios sensitivos). O diâmetro da célula varia entre 13 e 47 μ m. O neurônio Dogiel tipo III apresenta o corpo celular retangular, possui de 2 a 10 dendritos que tornam-se mais finos e ramificados a partir do corpo celular, e é relativamente curto em comparação com os do tipo II. Possui um único axônio que se projeta normalmente para a mucosa (BREHMER; SCHRODL; NEUHUBER, 1999; FURNESS, 2006).

Além da presença dos neurônios, o SNE também é composto pelas Células Gliais Entéricas (CGEs). A maior parte dessas células está disposta em gânglios interconectados, distribuídos entre os plexos mioentérico e submucoso (GABELLA, 1981). No entanto, as CGEs também estão presentes nos plexos não ganglionares, onde representam um único elemento celular (GERSHON; ROTHMAN, 1991). Em estudos anteriores, foi contestado que as CGEs também ocorreriam na mucosa (BJORKLUND; DAHL; SEIGER, 1984). Posteriormente, corpos das CGEs e filamentos foram claramente demonstrados neste local (ENDO; KOBAYASHI, 1987; MESTRES; DIENER; RUMMEL, 1992; WEDEL et al., 1999). Além disso, filamentos da glia fazem contato com a camada de células epiteliais (CORNET et al., 2001). As CGEs também estão presentes no mesentério, acompanhando os nervos extrínsecos ao intestino (BJORKLUND; DAHL; SEIGER, 1984). Assim sendo, a glia entérica forma uma grande rede em todos os níveis do TGI (RUHL, 2005).

As CGEs são pequenas, em forma de estrela e com inúmeros filamentos de vários comprimentos e forma (HANANI; REICHENBACH, 1994). Nos gânglios, as CGEs são tão compactadas em torno dos neurônios que o espaço restante extracelular é constituído por uma estreita abertura de 20nm (KOMURO; BALUK;

BURNSTOCK, 1982), de forma que vasos sanguíneos e tecido conjuntivo estão ausentes do interior do gânglio (RUMESSEN; VANDERWINDEN, 2003).

Morfológica e funcionalmente, as CGEs representam os astrócitos do SNC (CIRILLO et al., 2011). Assim, elas provavelmente compartilham algumas funções comuns, como apoio metabólico, estrutural, trófico e de proteção neuronal (GERSHON; ROTHMAN, 1991; CABARROCAS; SAVIDGE; LIBLAU, 2003; RUHL; NASSER; SHARKEY, 2004). A primeira descrição da glia entérica feita por Dogiel em 1899 foi baseada em preparações coradas de azul de metileno. Hoje, uma série de marcadores imunohistoquímicos estão disponíveis, sendo os mais utilizados a Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), um marcador de subpopulação glial, e a proteína S100, um marcador panglial (PHILLIPS; KIEFFER; POWLEY, 2004; RÜHL, 2005).

As CGEs adultas são ricas em proteínas GFAP e vimentina. Como um membro da família de proteínas do citoesqueleto, acredita-se que a GFAP é importante na modulação da motilidade e na forma da célula, fornecendo estabilidade estrutural. No intestino, a GFAP é considerada como um marcador específico de célula glial, enquanto que a vimentina também é expressa em miofibroblastos (ENG; GHIRNIKAR; LEE, 2000; RÜHL; TROTTER; STREMMEL, 2001). No cérebro, a expressão dos níveis de GFAP é modulada por astrócitos diferenciados, inflamação e injúria (WALZ, 2000). Durante o estado de inflamação intestinal Ho et al. (2003) observaram um aumento na expressão de GFAP. Estas observações indicam que a expressão de GFAP é dinamicamente regulada e reflete o estado funcional das CGEs. As funções precisas da GFAP ainda são obscuras (ENG; GHIRNIKAR; LEE, 2000).

A proteína S100 é pequena, ácida e pertence à família das proteínas ligantes de cálcio (HEIZMANN, 2002). Está localizada no citoplasma e/ou no núcleo de uma grande variedade de tecido nervoso e não-nervoso (ZIMMER et al., 1995). Na glia, a proteína S100 está localizada no citoplasma, onde regula a estrutura e a função do citoesqueleto, bem como a homeostasia de íons de Ca^{2+} (HEIZMANN, 2002). No SNC, a proteína S100 tem atividade neurotrófica (HINKLE et al., 1998; HUTTUNEN et al., 2000), modula o crescimento e a diferenciação celular (HEIZMANN, 2002), e responde a processos neuroinflamatórios e neurodegenerativos (ROTHERMUNDT et al., 2003). Estudos sugerem que a proteína S100 também está envolvida no processo inflamatório intestinal e é uma chave importante na regulação da

homeostasia intestinal (ESPOSITO et al., 2007; CIRILLO et al., 2009). No TGI, a proteína S100 é considerada exclusiva da glia (FERRI et al., 1982).

Muitos estudos têm sido realizados analisando a expressão das proteínas na glia entérica em diferentes modelos experimentais tais como: envelhecimento (PHILLIPS; KIEFFER; POWLEY, 2004), megacolon chagásico (DA SILVEIRA et al., 2009), inflamação intestinal (CIRILLO et al., 2011) e diabetes mellitus (PEREIRA et al., 2011; LOPES et al., 2012).

Durante muito tempo, as CGEs foram vistas como um mero suporte mecânico para neurônios, hoje sabe-se que elas mantêm a estrutura e a integridade funcional dos neurônios entéricos (VON BOYEN; STEINKAMP, 2006), e que também estão envolvidas ativamente na neurotransmissão entérica (BASOTTI et al., 2007).

Em animais geneticamente modificados, a perda de glia entérica resultou na degeneração neuronal (BUSH et al., 1998) e/ou na mudança no código químico dos neurônios entéricos (AUBE et al., 2003). Isto sugere que a glia entérica tem um papel importantíssimo na manutenção neuronal. Teoricamente, a glia entérica mantém a integridade neuronal por (1) prestação de apoio estrutural, (2) liberação de fatores neurotróficos, ou (3) assegurando uma proteção microambiente (RUHL, 2005).

(1) A maior parte do SNE está localizada nas camadas musculares da parede do intestino que são submetidas a severas forças mecânicas. Sendo assim, um suporte estrutural é de extrema importância. Dados morfológicos sugerem que as CGEs estabilizam o SNE, porque elas estão firmemente ancoradas na superfície do gânglio entérico e nas fibras nervosas através dos filamentos da GFAP (GABELLA, 1981; GABELLA, 1990; HANANI; REICHENBACH, 1994). Além disso, a glia entérica responde ativamente a estimulação mecânica com uma maior expressão do gene *c-fos* (SHARKEY; PARR; KEENAN, 1999), acompanhada por um aumento no Ca^{2+} intracelular e intercelular, propargando as ondas de Ca^{2+} (ZHANG et al., 2003). Isto sugere que a glia entérica pode se ajustar continuamente para as deficiências metabólicas e estruturais resultantes de estresse mecânico na parede do intestino (RUHL, 2005).

(2) Não foi demonstrado até então que a expressão de fatores tróficos gliais contribui para a manutenção dos neurônios entéricos. CGEs adultas produzem Fatores Neurotróficos Derivados de Linhagem da Célula da Glia (GDNF) e Neurotrofina-3 (NT-3) (HOEHNER et al., 1996; BAR et al., 1997). Essa é a razão

para o alto nível de GDNF no intestino adulto, indicando o papel do mesmo na sustentação do SNE (BAR et al., 1997).

(3) As CGEs, assim como os astrócitos, podem dar suporte aos neurônios criando uma proteção microambiente no SNE pela remoção dos cátions em excesso. Durante a atividade neuronal, grande quantidade de K^+ é liberada no espaço extracelular, o que pode afetar os canais de íons e a transmissão sináptica. Entretanto, o K^+ é rapidamente removido. No SNC, a recaptação neuronal de K^+ não é suficiente para evitar o acúmulo extracelular, portanto os astrócitos têm sido postulados como um sistema adicional de absorção de K^+ (HERTZ, 1965). Embora os mecanismos ainda não estejam identificados, os canais de K^+ parecem estar envolvidos (JANIGRO et al., 1997; WALZ, 2000). A glia entérica gera uma tensão para dentro e para fora dos canais de K^+ (HANANI et al., 2000), indicando que ela pode ter um papel para evitar o acúmulo extracelular de K^+ no SNE. No entanto, dados sobre a absorção de K^+ pela glia entérica ainda são escassos (RUHL, 2005).

Em relação à neurotransmissão entérica, as CGEs podem ter duas funções: podem participar da síntese de neurotransmissores e/ou inativar a mesma, e, podem responder a sinais moleculares e participar diretamente da transmissão sináptica (RUHL, 2005).

Evidências de que a glia pode participar da síntese e/ou da inativação da neurotransmissão vêm de estudos imunohistoquímicos: no SNE de muitos mamíferos, incluindo o ser humano, a Glutamina Sintetase (GS) é expressa exclusivamente pelas CGEs (JESSEN; MIRSKY, 1983; KATO et al., 1990). Pelo fato da GS catalisar a conversão de glutamato e amônia no aminoácido glutamina, as CGEs podem ter um papel pivô na sinalização glutamatérgica, pela desintoxicação dos resíduos de amônia e glutamato liberados neuronalmente. Além disso, as CGEs podem servir de fonte de glutamina para o glutamato neuronal, bem como para a resíntese do Ácido Gama-Aminobutírico (GABA) (GALLIGAN et al., 2000). Recentes dados imunohistoquímicos fornecem evidências adicionais do papel das CGEs na neurotransmissão GABAérgica: imunoreatividade para o transportador GAT2 ocorre predominantemente nas CGEs (FLETCHER; CLARK; FURNESS, 2002), o que indica que a glia entérica pode estar envolvida na desintoxicação de GABA a partir do espaço extracelular (RUHL, 2005).

Dados recentes indicam que a glia entérica pode estar envolvida na inativação e remoção de transmissores de neuropeptídeos a partir do espaço extracelular. Na parede do intestino, o transportador de oligopeptídeo PEPT2 é

predominantemente expresso em CGEs que, portanto, são capazes de captar os produtos da degradação neuropeptídica (RUHL et al., 2005).

As CGEs ainda podem estar envolvidas na neurotransmissão nitrérgica: imunorreatividade entérica para L-Arginina é exclusivamente encontrada na glia entérica (NAGAHAMA et al., 2001). Como a L-arginina é um precursor essencial para o Óxido Nítrico (NO), a síntese de NO neuronal pode depender da entrega da L-arginina glial (GREEN et al., 2004). Em um modelo animal com as CGEs parcialmente submetidas à ablação, alterações gliais foram acompanhadas por uma diminuição na expressão neuronal de Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) e de NO (AUBE et al., 2003), confirmando ainda mais o papel da glia entérica na neurotransmissão peptidérgica e nitrérgica (RÜHL, 2005).

Finalmente, além da participação nas neurotransmissões glutamatérgica, GABAérgica, peptidérgica e nitrérgica, as CGEs têm ainda um papel importante na sinalização de nucleotídeos. No SNE, o Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolase-2 (NTPDase2) foi exclusivamente localizado para a superfície das CGEs, o que sugere que a glia entérica controla a disponibilidade dos agonistas purinérgicos Adenosina Trifosfato (ATP) e Adenosina Difosfato (ADP). Já a neurotransmissão mediada por nucleotídeos está bem estabelecida para as distintas subpopulações neuronais (GALLIGAN et al., 2000; HU et al., 2003). Vanderwinden; Timmermans; Schiffmann (2003) descobriram que as CGEs também expressam purinoceptores do P_{2x7}, bem como o subtipo P_{2y2} (KIMBALL; MULHOLLAND, 1996), e respondem ao agonista purinérgico ATP e Uridina Trifosfato (UTP) com um aumento de Ca²⁺ citosólico (KIMBALL; MULHOLLAND, 1996; SAROSI et al., 1998).

Em geral, muitos estudos indicam que a glia entérica participa ativamente no processamento da informação no SNE. Sendo assim, estudos sistemáticos, que abordam diretamente o eixo glia-neurônio, estão sendo realizados (LARANJEIRA et al., 2011; DE GIORGIO et al., 2012; GULBRANSEN; SHARKEY, 2012).

Algumas patologias como, por exemplo, o diabetes mellitus (DM), provocam alterações nos componentes do SNE. Vários autores relatam que em ratos com DM experimental, ocorre redução do número de neurônios entéricos, além de alterações no perfil neuronal em diferentes regiões do TGI, incluindo estômago (TAKAHASHI et al., 1997; FREGONESI et al., 2001), duodeno (SURENDRAN; KONDAPAKA, 2005; PEREIRA; BAGATIN; ZANONI, 2006; ZANONI et al., 2011; LOPES et al., 2012), jejuno (DEFANI et al., 2003; DE FREITAS et al., 2008; ALVES et al., 2010; HONERE et al., 2011), íleo (ZANONI et al., 2003; SHOTTON; LINCOLN, 2006; PEREIRA et

al., 2011), ceco (ZANONI et al., 1997; ZANONI et al., 2011), e colo proximal (EL-SALHY, 2001; TASHIMA et al., 2007; ROLDI et al., 2009). Todos estes trabalhos direcionam para a importância de continuar estudando os componentes do SNE em ratos com diabetes experimental.

O DM é um dos principais problemas de saúde pública e é a principal causa de neuropatia, retinopatia, nefropatia, ataques cardíacos e derrames. Esta doença é um distúrbio metabólico crônico e complexo de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da resistência na ação deste hormônio sobre os tecidos alvos. É classificada com base nas necessidades de insulina em dois tipos, DM tipo 1 e DM tipo 2 (ZAGURY; ZAGURY; GUIDACCI, 2000).

No DM tipo 1 ocorre a destruição das células beta do pâncreas e por este motivo caracteriza-se pela ausência total do hormônio insulina. A destruição celular usualmente ocorre por processo auto-imune (forma auto-imune; tipo 1A) ou menos comumente por causa desconhecida (forma idiopática; tipo 1B) (IMAGAWA et al., 2000). Na forma auto-imune há um processo de insulite e estão presentes auto-anticorpos circulantes (anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico, anti-ilhotas e anti-insulina). De uma forma geral, a instalação do quadro de DM tipo 1 auto-imune é relativamente abrupta e muitas vezes o indivíduo pode identificar a data de início dos sintomas. O pico de incidência do DM deste tipo ocorre dos 10 aos 14 anos de idade, havendo a seguir uma diminuição progressiva da incidência até os 35 anos, de tal maneira que casos após esta idade são pouco frequentes. No entanto, indivíduos de qualquer idade podem desenvolver DM tipo 1 (GROSS; TER VEER, 2000).

O DM tipo 2 é mais comum do que o tipo 1, perfazendo cerca de 90% dos casos da doença. É uma entidade heterogênea, caracterizada por distúrbios na ação e secreção da insulina, com predomínio de um ou outro componente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). A etiologia específica deste tipo de DM ainda não está claramente estabelecida como no tipo 1. A destruição auto-imune do pâncreas não está envolvida. Ao contrário do tipo 1, a maioria dos pacientes apresenta obesidade. Além disso, a idade de início do tipo 2 é variável, embora seja mais frequente após os 40 anos de idade, com pico de incidência em torno dos 60 anos (GROSS; TER VEER, 2000).

Dentre as complicações crônicas do DM, as manifestações neurológicas são, provavelmente, as mais comuns, podendo afetar sistema nervoso central, autônomo e periférico, prejudicando a qualidade de vida dos pacientes (VINIK, 1999). A

neuropatia diabética é um grupo heterogêneo de desordens e apresenta uma gama extensiva de anormalidades (VINIK, 2004), afetando entre 60 e 70% dos pacientes diabéticos (MOGHTADERI; BAKHSHIPOUR; RASHIDI, 2006). Esta complicação é caracterizada por uma notável atrofia e diminuição das fibras mielinizadas e não mielinizadas, acompanhadas por degeneração Walleriana, segmental e desmielinização para-nodal, além do enfraquecimento da regeneração da fibra nervosa (AFZAAL; SINGH; SALLEM, 2002).

Vários mecanismos são exacerbados e/ou ativados pela hiperglicemia característica do DM. Entre eles, a via do poliol, glicosilação oxidativa, via glicolítica e ativação da proteína quinase C (PKC), os quais são responsáveis pela geração de altos níveis de radicais livres na doença. Associado a este fato, há um decréscimo no sistema antioxidante endógeno durante o DM (ABUJA; ALBERTINI, 2001). Este desequilíbrio entre a produção de oxidantes e o respectivo sistema de defesa promove o aumento do estresse oxidativo (ABUJA; ALBERTINI, 2001; VINCENT et al., 2004), considerado o principal responsável pelas complicações crônicas do DM, incluindo a neuropatia (VINCENT et al., 2004).

O estresse oxidativo, exacerbado durante o DM, está relacionado com o aumento de radicais livres, espécies altamente reativas, no interior das células (PARTHIBAN et al., 1995; OBROSOVA et al., 2002), que reagem com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, danificando-os e provocando morte celular por necrose ou apoptose (VINCENT et al., 2004). Os radicais superóxido, hidroxila e o peróxido de hidrogênio, podem induzir lesões oxidativas nas membranas celulares, causando também sérios danos às células (HUNT; DEAN; WOLFF, 1988; GATE et al., 1999). Tais comprometimentos podem atingir os componentes neurais simpáticos, parassimpáticos e entéricos, induzindo a uma perda funcional incapacitante em vários sistemas, dentre eles o TGI (KARAKIDA; HOMMA, 1989; HERNANDES et al., 2000). Em consequência, pacientes diabéticos apresentam desordens do TGI que incluem: náuseas, vômitos, distensão abdominal, diarreia e constipação (ZAUPA; ZANONI, 2000). Segundo Hosking; Bennett; Hampton (1978), as neuropatias autonômicas que atingem o TGI são as complicações crônicas mais comuns do DM.

Na tentativa de explicar a relação existente entre a extensão e a severidade da hiperglicemia e o desenvolvimento da neuropatia autonômica diabética, com efeito diferencial no tipo de neurotransmissor acometido, vários mecanismos vêm sendo propostos. Um deles é o aumento da via dos polióis e da atividade da enzima aldose redutase, responsáveis por provocar elevação dos níveis intracelulares de

sorbitol com a conseqüente redução de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida (NADPH), utilizada por enzimas como a glutathione redutase para regenerar a glutathione oxidada em glutathione reduzida. Por sua vez, a diminuição dos níveis de glutathione reduzida, aumenta a susceptibilidade das células endoteliais aos danos provocados pelo estresse oxidativo (GIUGLIANO; CERIELLO; PAOLISSO, 1996; VINIK, 1999; AFZAAL; SINGH; SALEEM, 2002).

Visando prevenir a ocorrência das alterações que atingem os componentes do SNE diante do DM, estudos vêm testando a suplementação com antioxidantes, incluindo ácido ascórbico (ZANONI et al., 2002; ZANONI et al., 2003; ZANONI; FREITAS, 2005; PEREIRA; BAGATIN; ZANONI, 2006), vitamina E (PEREIRA et al., 2008; ROLDI et al., 2009), quercetina (LOPES et al., 2012), extrato de *Ginkgo biloba* (DA SILVA; ZANONI; BUTTOW, 2011) e L- glutamina (TASHIMA et al., 2007; ALVES et al., 2010; PEREIRA et al., 2011; ZANONI et al., 2011).

A L-Glutamina é o aminoácido livre mais abundante no organismo. Sua fonte primária é o músculo esquelético, de onde é liberada para a corrente sanguínea e transportada para vários tecidos. É armazenada principalmente no músculo esquelético (75%), além do fígado (25%), e pode ser virtualmente sintetizada por todos os tecidos do organismo (CURI et al., 2005).

A L-Glutamina exerce papéis essenciais na manutenção da função de vários órgãos e células, tais como: rins, intestinos, fígado, coração, neurônios, linfócitos, macrófagos, células beta-pancreáticas e adipócitos (CURI et al., 2005). Dentre suas muitas funções, inclui-se o transporte primário de nitrogênio entre os tecidos. Além disso, é a principal fonte de energia utilizada na rápida proliferação de células como as do epitélio intestinal, linfócitos ativados e fibroblastos (VAHDAT et al., 2001). Não é considerado um aminoácido essencial, pois pode ser sintetizada pelo organismo. Contudo, em algumas condições, incluindo trauma, septicemia, câncer e, eventualmente, esforço físico extremo, sua concentração intracelular e plasmática pode sofrer redução de até 50%. Assim, quando a demanda é superior à produção, estabelece-se um quadro de deficiência de L-glutamina. Por esta razão, a mesma vem sendo chamada de “condicionalmente essencial” (CURI, 2000).

Vários autores já demonstraram que a L-Glutamina aumenta ou mantém os níveis de glutathione (GSH) nas células. Roth et al. (2002), observaram este fato em ratos após a suplementação com o aminoácido. Foi verificado que a suplementação com L-Glutamina reduz a depleção de glutathione no músculo esquelético em humanos, após trauma cirúrgico (FLARING et al., 2003). Além disso, Harward et al.

(1994) observaram que a suplementação com o aminoácido em ratos, mantém os níveis de glutathione durante isquemia/reperfusão intestinal. A glutamina é o substrato da enzima glutaminase para formação de glutamato (PETRY et al., 2011), o qual é utilizado na síntese de glutathione. A glutathione é sintetizada em duas etapas consecutivas. A γ -glutamylcysteine sintetase usa o glutamato e a cisteína como substrato formando o dipeptídeo γ -glutamylcysteine (γ -GluCys), que se combina com a glicina numa reação catalisada pela glutathione sintetase para a geração de glutathione. A adenosina trifosfato (ATP) é o co-substrato para ambas as enzimas. O nível de glutathione é regulado por *feedback*, sendo a atividade da γ -glutamylcysteine sintetase inibida pelo seu produto final (MISRA; GRIFFITH, 1998).

Estudos mostram que os níveis de glutathione apresentam-se reduzidos em ratos com DM induzido experimentalmente pela estreptozotocina (LOVEN et al., 1986). A glutathione, o tripeptídeo γ -glutamyl-cysteine-glicina, é considerado um dos mais importantes antioxidantes. Este aminoácido atua de maneira importante na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo e na defesa contra xenobióticos. Entre as funções da glutathione, a proteção contra a peroxidação lipídica pode ocorrer em três reações. Primeiro, a glutathione é usada como substrato pela glutathione peroxidase, na eliminação de peróxidos. Segundo, a glutathione reduz a forma oxidada da vitamina C, que assim pode atuar na manutenção da vitamina E na sua forma reduzida e funcional. Finalmente, a glutathione pode através da glutathione-S-transferase, detoxificar aldeídos reativos (como o malondialdeído), que são gerados durante a peroxidação lipídica. Se, de fato, grande parte da ação da glutathione é obtida pela indução de suas enzimas, é necessária a manutenção do nível de glutathione para suportar a ação funcional destas enzimas (JONES, 1995).

Variações nos níveis de glutathione afetam diretamente a síntese de proteínas e de DNA. Oxidação ou depleção de glutathione pode diminuir a síntese proteica. A glutathione pode ser perdida de modo irreversível em situações de estresse oxidativo muito intenso, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzida (UHLIG; WENDEL, 1992).

Vários estudos utilizando a glutathione também já foram realizados. Segundo Bravenboer et al. (1992), seu uso em ratos diabéticos é particularmente efetivo na prevenção da neuropatia diabética, entretanto, seu valor é limitado quando a complicação já está presente. Ueno et al. (2002), demonstraram que o tratamento

dietético com glutathione em animais com DM experimental previne disfunções neuronais e renais.

REFERÊNCIAS

- ABUJA, P. M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clin Chim Acta**, v. 306, n. 1-2, p. 1-17, Apr. 2001.
- AFZAAL, S.; SINGH, M.; SALEEM, I. Aetiopathogenesis and management of diabetic neuropathy. **J Assoc Physicians India**, Bombay, v. 50, p. 707-711, 2002.
- ALVES, E. P. et al. Immunohistochemical study of vasoactive intestinal peptide (VIP) enteric neurons in diabetic rats supplemented with L-glutamine. **Nutr Neurosci**, v. 13, n. 1, p. 43-51, Feb. 2010.
- AUBE, A.C. et al. Neuronal plasticity induced in the enteric nervous system by immune targeting of glia in transgenic mice. **Gastroenterol**, v. 124, n. A74, 2003.
- BAR, K. et al. Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease. **Gastroenterol**, v. 112, n. 4, p. 1381-1385, 1997.
- BASSOTTI, G. et al. Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: introducing the neuro-gliopathies. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 30, p. 4035, 2007.
- BJORKLUND, H.; DAHL, D.; SEIGER, A. Neurofilament and glial fibrillary acid protein-related immunoreactivity in rodent enteric nervous system. **Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 277-87, May. 1984.
- BRAVENBOER, B. et al. Controversies concerning the pathogenesis and treatment of diabetic neuropathies. **Ned Tijdschr Geneesk**, v. 136, n. 17, p. 823-6, Apr. 25, 1992.
- BREHMER, A.; SCHRÖDL, F.; NEUHUBER, W. Morphological classifications of enteric neurons--100 years after Dogiel. **Anat Embryol (Berl)**, v. 200, n. 2, p. 125-135, 1999.
- BUSH, T. G. et al. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 189-201, 1998.
- CABARROCAS, J.; SAVIDGE, T. C.; LIBLAU, R. S. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. **Glia**, v. 41, n. 1, p. 81-93, Jan. 2003.
- CIRILLO, C. et al. Effect of Proinflammatory Stimuli On Cellular Activation and Nitric Oxide Production in Primary Cultures of Human Enteric Glia. **Gastroenterol**, v. 136, n. 5, p. A4-A4, May. 2009.
- CIRILLO, C. et al. S100B protein in the gut: The evidence for enteroglia-sustained intestinal inflammation. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 10, p. 1261-1266, Mar. 14, 2011.
- CORNET, A. et al. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 23, p. 13306-11, Nov. 6, 2001.

CURI, R. et al. Molecular mechanisms of glutamine action. **J Cell Physiol**, v. 204, n. 2, p. 392-401, Aug. 2005.

CURI, R. **L-glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000.

DA SILVA, G. G.; 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, Feb. 21, 2011.

DA SILVEIRA, A. B. M. et al. Glial fibrillary acidic protein and S-100 colocalization in the enteroglial cells in dilated and nondilated portions of colon from chagasic patients. **Hum Pathol**, v. 40, n. 2, p. 244, 2009.

DE FREITAS, P. et al. Myenteric neurons and intestinal mucosa of diabetic rats after ascorbic acid supplementation. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 42, p. 6518-24, Nov. 14, 2008.

DE GIORGIO, R. et al. Enteric glia and neuroprotection: basic and clinical aspects. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 303, n. 8, p. G887-93, Oct. 2012.

DEFANI, M. A. et al. Effect of acetyl-L-carnitine on VIP-ergic neurons in the jejunum submucous plexus of diabetic rats. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 61, n. 4, p. 962-7, Dec. 2003.

EL-SALHY, M. Gastrointestinal transit in nonobese diabetic mouse: an animal model of human diabetes type 1. **J Diabetes Complications**, v. 15, n. 5, p. 277-84, Sep-Oct. 2001.

ENDO, Y.; KOBAYASHI, S. A scanning electron microscope study on the autonomic groundplexus in the lamina propria mucosae of the guinea-pig small intestine. **Arch Histol Jpn**, v. 50, n. 3, p. 243-50, Jul. 1987.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochem Res**, v. 25, n. 9-10, p. 1439-51, Oct. 2000.

ESPOSITO, G. et al. Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease. **Gastroenterology**, v. 133, n. 3, p. 918-25, Sep. 2007.

FERRI, G. L. et al. Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. **Nature**, v. 297, n. 5865, p. 409-10, Jun. 3, 1982.

FLARING, U. B. et al. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. **Clin Sci (Lond)**, v. 104, n. 3, p. 275-82, Mar. 2003.

FLETCHER, E. L.; CLARK, M. J.; FURNESS, J. B. Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus. **Cell Tissue Res**, v. 308, n. 3, p. 339-46, Jun. 2002.

FREGONESI, C. E. et al. Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 59, n. 1, p. 50-3, Mar. 2001.

FURNESS, J. B. et al. Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine. **The Anatom Record Part A: Disc in Mol, Cel, and Evol Biol**, v. 272, n. 2, p. 475-483, 2003.

FURNESS, J. B. et al. Projections of substance P, vasoactive intestinal peptide and tyrosine hydroxylase immunoreactive nerve fibres in the canine intestine, with special reference to the innervation of the circular muscle. **Arch Histol Cytol**, v. 53, n. 2, p. 129-40, May. 1990.

FURNESS, J. B. et al. Shapes and projections of tertiary plexus neurons of the guinea-pig small intestine. **Cell Tissue Res**, v. 300, n. 3, p. 383-7, Jun. 2000.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. Types of nerves in the enteric nervous system. **Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 1980.

FURNESS, J.B. **The Enteric Nervous System**. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2006.

GABELLA, G. On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. **J Auton Nerv Syst**, v. 30 Suppl, p. S59-66, Jul. 1990.

GABELLA, G. Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. **Neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 425-36, 1981.

GALLIGAN, J. J. et al. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. **J Auton Nerv Syst**, v. 81, n. 1-3, p. 97-103, Jul. 3, 2000.

GATE, L. et al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomed Pharmacother**, v. 53, n. 4, p. 169-80, May. 1999.

GERSHON, M. D.; ROTHMAN, T. P. Enteric glia. **Glia**, v. 4, n. 2, p. 195-204, 1991.

GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; PAOLISSO, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care**, v. 19, n. 3, p. 257-67, Mar. 1996.

GREEN, C. L. et al. Dextran sodium sulfate-induced colitis reveals nicotinic modulation of ion transport via iNOS-derived NO. **AJP-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 287, n. 3, p. G706-G714, 2004.

GROSS, T. M.; TER VEER, A. Continuous glucose monitoring in previously unstudied population subgroups. **Diabetes Technol Ther**, v. 2 Suppl 1, p. S27-34, 2000.

GULBRANSEN, B. D.; SHARKEY, K. A. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 11, p. 625-32, Nov. 2012.

- HANANI, M. et al. Patch-clamp study of neurons and glial cells in isolated myenteric ganglia. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 278, n. 4, p. G644-51, Apr. 2000.
- HANANI, M.; REICHENBACH, A. Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. **Cell Tissue Res**, v. 278, n. 1, p. 153-60, Oct. 1994.
- HARWARD, T. R. et al. Glutamine preserves gut glutathione levels during intestinal ischemia/reperfusion. **J Surg Res**, v. 56, n. 4, p. 351-5, Apr. 1994.
- HEIZMANN, C. W. The multifunctional S100 protein family. **Methods Mol Biol**, v. 172, p. 69-80, 2002.
- HERNANDES, L. et al. Streptozotocin-induced diabetes duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 58, n. 4, p. 1035-9, Dec. 2000.
- HERTZ, L. Possible role of neuroglia: a potassium-mediated neuronal--neuroglial--neuronal impulse transmission system. **Nature**, v. 206, n. 989, p. 1091-4, Jun. 12, 1965.
- HINKLE, D. A. et al. Basic fibroblast growth factor-2 and interleukin-1 beta regulate S100 beta expression in cultured astrocytes. **Neuroscience**, v. 82, n. 1, p. 33-41, Jan. 1998.
- HO, W. et al. Enteric glia in a murine model of colitis. **Neurogastroenterol Motil**, v. 15, p. 228, 2003.
- HOEHNER, J. C. et al. Localization of neurotrophins and their high-affinity receptors during human enteric nervous system development. **Gastroenterol**, v. 110, n. 3, p. 756-767, Mar. 1996.
- HONORE, S. M. et al. Neuronal loss and abnormal BMP/Smad signaling in the myenteric plexus of diabetic rats. **Auton Neurosci**, v. 164, n. 1-2, p. 51-61, Oct. 28, 2011.
- HOSKING, D. J.; BENNETT, T.; HAMPTON, J. R. Diabetic autonomic neuropathy. **Diabetes**, v. 27, n. 10, p. 1043-55, Oct. 1978.
- HOYLE, C. H.; BURNSTOCK, G. Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. **J Anat**, v. 166, p. 7-22, Oct. 1989.
- HU, H. et al. Slow excitatory synaptic transmission mediated by P2Y1 receptors in the guinea-pig enteric nervous system. **J Physiol**, v. 550, n. 2, p. 493-504, 2003.
- HUNT, J.; DEAN, R.; WOLFF, S. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. **Biochemical Journal**, v. 256, n. 1, p. 205, 1988.

HUTTUNEN, H. J. et al. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. **J Biol Chem**, v. 275, n. 51, p. 40096-105, Dec. 22, 2000.

IMAGAWA, A. et al. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. **N Engl J Med**, v. 342, n. 5, p. 301-7, Feb. 3 2000.

JANIGRO, D. et al. Reduction of K⁺ uptake in glia prevents long-term depression maintenance and causes epileptiform activity. **J Neurosci**, v. 17, n. 8, p. 2813-2824, Apr. 15, 1997.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. Astrocyte-Like Glia in the Peripheral Nervous-System - an Immunohistochemical Study of Enteric Glia. **J Neurosci**, v. 3, n. 11, p. 2206-2218, 1983.

JONES, D. P. et al. Impact of nutrients on cellular lipid peroxidation and antioxidant defense system. **Fundam Appl Toxicol**, v. 26, n. 1, p. 1-7, Jun. 1995.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11^a edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KARAKIDA, T.; HOMMA, S. Compliance changes of the gastrointestinal tract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Jpn J Physiol**, v. 39, n. 4, p. 559-70, 1989.

KATO, H. et al. Immunocytochemical characterization of supporting cells in the enteric nervous system in Hirschsprung's disease. **J Pediatr Surg**, v. 25, n. 5, p. 514-9, May. 1990.

KIMBALL, B. C.; MULHOLLAND, M. W. Enteric Glia Exhibit P2U Receptors that Increase Cytosolic Calcium by a Phospholipase C-Dependent Mechanism. **J Neurochem**, v. 66, n. 2, p. 604-612, 1996.

KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, v. 21, n. 9, p. 1414-31, Sep. 1998.

KOMURO, T.; BALUK, P.; BURNSTOCK, G. An ultrastructural study of neurons and non-neuronal cells in the myenteric plexus of the rabbit colon. **Neuroscience**, v. 7, n. 7, p. 1797-1806, 1982.

KUYVENHOVEN, J.; MEINDERS, A. Oxidative stress and diabetes mellitus: pathogenesis of long-term complications. **Eur J Intern Med**, v. 10, n. 1, p. 9-19, 1999.

LARANJEIRA, C. et al. Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. **JCI**, v. 121, n. 9, p. 3412-3424, Sep. 2011.

LI, P. L. The intramural nervous system of the small intestine with special reference to the innervation of the inner subdivision of its circular muscle. **J Anat**, v. 74, n. Pt 3, p. 348, 1940.

LLEWELLYN-SMITH, I. J. et al. Structure of the tertiary component of the myenteric plexus in the guinea-pig small intestine. **Cell Tissue Res**, v. 272, n. 3, p. 509-16, Jun. 1993.

LOPES, C. R. et al. Neuroprotective effect of quercetin on the duodenum enteric nervous system of streptozotocin-induced diabetic rats. **Dig Dis Sci**, v. 57, n. 12, p. 3106-15, Dec. 2012.

LOVEN, D. et al. Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozocin-induced diabetes. **Diabetes**, v. 35, n. 5, p. 503-7, May. 1986.

MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. 2ª edição, São Paulo: Atheneu, 2006.

MESTRES, P.; DIENER, M.; RUMMEL, W. Electron microscopy of the mucosal plexus of the rat colon. **Acta Anat (Basel)**, v. 143, n. 4, p. 275-82, 1992.

MIRANDA NETO, M.H. **Anatomia Humana: Aprendizagem Dinâmica**. 2º ed. Maringá P.R: Gráfica e Editora Clichetec, 2007.

MISRA, I.; GRIFFITH, O. W. Expression and purification of human gamma-glutamylcysteine synthetase. **Protein Expr Purif**, v. 13, n. 2, p. 268-76, Jul. 1998.

MOGHTADERI, A.; BAKHSHIPOUR, A.; RASHIDI, H. Validation of Michigan neuropathy screening instrument for diabetic peripheral neuropathy. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 108, n. 5, p. 477-81, Jul. 2006.

NAGAHAMA, M. et al. L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. **Biol Signals Recept**, v. 10, n. 5, p. 336-340, Sep-Oct. 2001.

OBROSOVA, I. G. et al. An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 1, 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 Int**, v. 19, n. 12, p. 987-93, Dec. 1995.

PEREIRA, M. A.; BAGATIN, M. C.; ZANONI, J. N. Effects of the ascorbic acid supplementation on NADH-diaphorase myenteric neurons in the duodenum of diabetic rats. **Biocell**, v. 30, n. 2, p. 295-300, Aug. 2006.

PEREIRA, R. V. et al. Vitamin E supplementation in rats with experimental diabetes mellitus: analysis of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons from terminal ileum. **J Mol Histol**, v. 39, n. 6, p. 595-603, Dec. 2008.

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, n. 12, p. 3507-3516, 2011.

PETRY, É. R. et al. Exercício físico, estresse oxidativo e peroxidação lipídica: mecanismos e efeitos. **Rev Brasil de Ciên e Movim**, v. 18, n. 4, p. 90-99, 2011.

PHILLIPS, R. J.; KIEFFER, E. J.; POWLEY, T. L. Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat. **Anat Embryol (Berl)**, v. 209, n. 1, p. 19-30, Nov. 2004.

PORTER, A. J. et al. Projections of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide-reactive submucosal neurons in the human colon. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 14, n. 12, p. 1180-7, Dec. 1999.

RICHARDSON, K. C. Electronmicroscopic observations on Auerbach's plexus in the rabbit, with special reference to the problem of smooth muscle innervation. **Am J Anat**, v. 103, n. 1, p. 99-135, Jul. 1958.

ROLDI, L. P. et al. Vitamin E (alpha-tocopherol) supplementation in diabetic rats: effects on the proximal colon. **Bmc Gastroenterology**, v. 9, p. 88, 2009.

ROTH, E. et al. Regulative potential of glutamine—relation to glutathione metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 217-221, 2002.

ROTHERMUNDT, M. et al. S100B in brain damage and neurodegeneration. **Microsc Res Tech**, v. 60, n. 6, p. 614-32, Apr. 15, 2003.

RUHL, A. Glial cells in the gut. **Neurogastroenterol Motil**, v. 17, n. 6, p. 777-90, Dec. 2005.

RUHL, A.; NASSER, Y.; SHARKEY, K. A. Enteric glia. **Neurogastroenterol Motil**, v. 16 Suppl 1, p. 44-9, Apr. 2004.

RUHL, A.; TROTTER, J.; STREMMEL, W. Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglia cell lines from the myenteric plexus of adult rat. **Neurogastroenterol Motil**, v. 13, n. 1, p. 95-106, Feb. 2001.

RUMESSEN, J. J.; VANDERWINDEN, J. M. Interstitial cells in the musculature of the gastrointestinal tract: Cajal and beyond. **Int Rev Cytol**, v. 229, p. 115-208, 2003.

SANDERS, K.; SMITH, T. Motoneurons of the submucous plexus regulate electrical activity of the circular muscle of canine proximal colon. **J Physiol**, v. 380, n. 1, p. 293-310, 1986.

SAROSI, G. A. et al. Capacitative Ca²⁺ entry in enteric glia induced by thapsigargin and extracellular ATP. **AJP-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 275, n. 3, p. G550-G555, 1998.

SCHABADASCH, A. Intramuraie nervengeflechte des darmrohrs. **Cell Tissue Res**, v. 10, n. 2, p. 320-385, 1930.

SHARKEY, K. A.; PARR, E. J.; KEENAN, C. M. Immediate-early gene expression in the inferior mesenteric ganglion and colonic myenteric plexus of the guinea pig. **J Neurosci**, v. 19, n. 7, p. 2755-64, Apr. 1, 1999.

SHOTTON, H. R.; LINCOLN, J. Diabetes only affects nitric oxide synthase-containing myenteric neurons that do not contain heme oxygenase 2. **Brain Res**, v. 1068, n. 1, p. 248-56, Jan. 12, 2006.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: uma abordagem integrada**. 1 ed. Barueri: Manole, 2003.

SPENCE, A. P. **Anatomia Humana Básica**. 2ª edição, São Paulo: Manole, 1991.

STERNINI, C. Structural and chemical organization of the myenteric plexus. **Annual Rev Physiol**, v. 50, n. 1, p. 81-93, 1988.

STÖHR, P. **Zusammenfassende Ergebnisse über die mikroskopische Innervation des Magen-Darmkanals**. Springer, 1952.

SURENDRAN, S.; KONDAPAKA, S. B. Altered expression of neuronal nitric oxide synthase in the duodenum longitudinal muscle-myenteric plexus of obesity induced diabetes mouse: implications on enteric neurodegeneration. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 338, n. 2, p. 919-22, Dec. 16, 2005.

TAKAHASHI, T. et al. Impaired expression of nitric oxide synthase in the gastric myenteric plexus of spontaneously diabetic rats. **Gastroenterol**, v. 113, n. 5, p. 1535-44, Nov. 1997.

TASHIMA, C. M. et al. Diabetic rats supplemented with L-glutamine: a study of immunoreactive myosin-V myenteric neurons and the proximal colonic mucosa. **Dig Dis Sci**, v. 52, n. 5, p. 1233-41, May. 2007.

TIMMERMANS, J. P. et al. Distinct distribution of CGRP-, enkephalin-, galanin-, neuromedin U-, neuropeptide Y-, somatostatin-, substance P-, VIP- and serotonin-containing neurons in the two submucosal ganglionic neural networks of the porcine small intestine. **Cell Tissue Res**, v. 260, n. 2, p. 367-379, 1990.

TIMMERMANS, J. P. et al. Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 118, n. 2, p. 331-340, 1997.

TIMMERMANS, J. P.; HENS, J.; ADRIAENSEN, D. Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. **Anat Rec**, v. 262, n. 1, p. 71-8, Jan. 1, 2001.

UENO, Y. et al. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. **J Nutr**, v. 132, n. 5, p. 897-900, May. 2002.

UHLIG, S.; WENDEL, A. The physiological consequences of glutathione variations. **Life Sci**, v. 51, n. 14, p. 1083-94, 1992.

VAHDAT, L. et al. Reduction of paclitaxel-induced peripheral neuropathy with glutamine. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 5, p. 1192-7, May. 2001.

VANDERWINDEN, J. M.; TIMMERMANS, J. P.; SCHIFFMANN, S. N. Glial cells, but not interstitial cells, express P2X7, an ionotropic purinergic receptor, in rat gastrointestinal musculature. **Cell Tissue Res**, v. 312, n. 2, p. 149-154, 2003.

VINCENT, A. M. et al. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Endocr Rev**, v. 25, n. 4, p. 612-28, Aug. 2004.

VINIK, A. I. Advances in diabetes for the millennium: new treatments for diabetic neuropathies. **Med Gen Med**, v. 6, n. 3 Suppl, p. 13, 2004.

VINIK, A. I. Diabetic neuropathy: pathogenesis and therapy. **Am J Med**, v. 107, n. 2B, p. 17S-26S, Aug. 30 1999.

VON BOYEN, G.; STEINKAMP, M. The enteric glia and neurotrophic factors. **Gastroenterol**, v. 44, n. 9, p. 985-90, Sep. 2006.

WALZ, W. Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. **Glia**, v. 31, n. 2, p. 95-103, 2000.

WEDEL, T. et al. Organization of the enteric nervous system in the human colon demonstrated by wholemount immunohistochemistry with special reference to the submucous plexus. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 181, n. 4, p. 327-337, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on noncommunicable diseases 2010. **Geneva: World Health Organization**; 2011.

ZAGURY, L.; ZAGURY, T.; GUIDACCI, J. **Diabetes sem medo**. Rio de Janeiro: Rocco, 2000.

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, Jan-Mar. 2011.

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. **Auton Neurosci**, v. 104, n. 1, p. 32-8, Feb. 28, 2003.

ZANONI, J. N. et al. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin-induced diabetic rats. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 55, n. 4, p. 696-702, Dec. 1997.

ZANONI, J. N. et al. Terminal ileum submucous plexus: Study of the VIP-ergic neurons of diabetic rats treated with ascorbic acid. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 60, n. 1, p. 32-37, Mar. 2002.

ZANONI, J. N.; FREITAS, P. Effects of ascorbic acid on the vasoactive intestinal peptide synthesis in the ileum submucous plexus of normal rats. **Arq Gastroenterol**, v. 42, n. 3, p. 186-90, Jul-Sep. 2005.

ZAUPA, C.; ZANONI, J. N. Diabetes mellitus: aspectos gerais e neuropatia diabética; Diabetes mellitus: general aspects and diabetic neuropathy. **Arq. Ciências Saúde UNIPAR**, v. 4, n. 1, p. 19-25, 2000. ISSN 1415-076X.

ZHANG, W. et al. Intercellular calcium waves in cultured enteric glia from neonatal guinea pig. **Glia**, v. 42, n. 3, p. 252-262, 2003

ZIMMER, D. B. et al. The S100 protein family: history, function, and expression. **Brain research bulletin**, v. 37, n. 4, p. 417-429, 1995.

CAPÍTULO 2

**Efeitos da Suplementação com L-Glutamina 2% e L-Glutationa 1% sobre
as Células da Glia e Neurônios do Plexo Mientérico do Íleo de Ratos
Diabéticos**

Artigo elaborado e formatado conforme as
normas para publicação científica na
Revista Glia.

Efeitos da Suplementação com L-Glutamina 2% e L-Glutationa 1% sobre as Células da Glia e Neurônios do Plexo Mientérico do Íleo de Ratos Diabéticos

Cynthia Priscilla do Nascimento Bonato-Panizzon, Marcílio Hubner de Miranda-Neto¹, Jacqueline Nelisis Zanoni¹

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

O número exato de palavras da introdução: 529

O número exato de palavras em Material e Métodos: 1060

O número exato de palavras dos resultados: 677

O número exato de palavras da discussão: 2580

O número exato de palavras da referencia: 1655

O número exato de palavras das legendas: 240

Número de figuras: 2

Número de tabelas: 2

Número de palavras totais: 6939

Autor correspondente. Telefone: +55 44 32614705; Fax: +55 44 32614340; E-mail:

jnzanoni@uem.br

RESUMO

A neuropatia decorrente do Diabetes Mellitus atinge o sistema nervoso entérico ocasionando disfunções no sistema digestório, como: náusea, diarreia, constipação, vômito, entre outros. O objetivo do trabalho foi comparar os efeitos da suplementação com L-Glutamina 2% e L-Glutationa 1% sobre os neurônios e as células gliais entéricas do íleo de ratos diabéticos. Foram utilizados 30 ratos machos Wistar distribuídos nos grupos: Normoglicêmico (N), Normoglicêmico suplementado com L-Glutamina (NG), Normoglicêmico suplementado com L-Glutationa (NGO), Diabético (D), Diabético suplementado com L-Glutamina (DG) e Diabético suplementado com L-Glutationa (DGO). Após 120 dias, o íleo foi processado para as técnicas imunohistoquímicas HuC/D e S100. Análises quantitativas e morfométricas foram realizadas. Os ratos diabéticos apresentaram uma redução no número de neurônios quando comparados com os animais normoglicêmicos. A L-Glutationa preveniu a morte neuronal nos animais diabéticos quando comparados com o grupo D. A densidade glial não alterou com o diabetes, mas houve uma proliferação glial nos ratos diabéticos suplementados com L-Glutationa quando comparados com o grupo D. A área neuronal aumentou nos ratos diabéticos em relação aos normoglicêmicos. Os ratos diabéticos suplementados com L-Glutamina e L-Glutationa apresentaram uma menor área neuronal quando comparados com o grupo D. A área das células gliais reduziu nos diabéticos quando comparada com os normoglicêmicos. Os ratos diabéticos suplementados com L-Glutamina e L-Glutationa não apresentaram diferença significativa na área do corpo celular glial quando comparado com os ratos diabéticos. Conclui-se que a suplementação com L-Glutationa 1% é mais eficaz que a L-Glutamina 2% na neuroproteção entérica em animais diabéticos.

Palavras-chave: Sistema Nervoso Entérico, Neurônio, Células da Glia, Diabetes e Efeito Antioxidante.

INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus está associado com distúrbios no trato gastrointestinal (TGI), que incluem sintomas como: náuseas, inchaço, dor abdominal, diarreia, constipação e atraso no esvaziamento gástrico (Bytzer et al., 2001). A patogênese das alterações ocasionadas pelo diabetes no TGI ainda está sob investigação e o papel do sistema nervoso entérico (SNE) ganhou importância nos últimos anos (Chandrasekharan and Srinivasan, 2007). O SNE está presente em todo TGI, controlando e coordenando a motilidade, o fluxo sanguíneo e a secreção. É constituído por neurônios e células gliais entéricas (CGEs) (Furness, 2006). Os neurônios se localizam na maioria das vezes em gânglios nos plexo mientérico e submucoso, enquanto as CGEs são encontradas em todas as camadas do intestino (Ruhl, 2005).

Muitas pesquisas têm sido realizadas em modelos de ratos com diabetes induzido experimentalmente com o propósito de avaliar os danos provocados pela doença sobre os constituintes do SNE, em especial, alterações estruturais e funcionais que atingem os neurônios entéricos em diferentes segmentos do TGI como, estômago (Fregonesi et al., 2001), duodeno (Takahara et al., 2001), íleo (Pereira et al., 2008; Shotton and Lincoln, 2006; Zanoni et al., 2003), jejuno (Defani et al., 2003; De Freitas et al., 2008), ceco (Zanoni et al., 1997) e colo proximal (Tashima et al., 2007). Porém, o número de estudos em relação às CGEs sob mesma condição experimental é reduzido, entretanto é de se esperar que tanto neurônios quanto CGEs sejam afetadas pela intensificação do estresse oxidativo provocado pelo diabetes.

Estudos empregando suplementação com diversas substâncias antioxidantes têm revelado efeitos positivos sobre os neurônios entéricos, como por exemplo, vitamina C (Pereira et al., 2006), vitamina E (Roldi et al., 2009) e *Ginkgo biloba* (da Silva et al., 2011). Alves et al. (2010) e Pereira et al. (2011) investigaram os efeitos da suplementação com L-glutamina 2% no SNE de ratos diabéticos, e ambos obtiveram resultados positivos. Ueno et al. (2002) utilizaram L-glutamina 1% para verificar a ação do aminoácido sobre a neuropatia e a nefropatia de ratos diabéticos e também obtiveram resultados satisfatórios nesta concentração.

L- Glutamina e L-Glutamina são aminoácidos (Kuyvenhoven et al., 1999) e ambos têm um importante papel na regulação das principais vias metabólicas (Wu, 2009). A L-Glutamina é um aminoácido essencial condicional em recém-nascidos e em condições de estresse, também conhecido como aminoácido funcional (Wu,

2009). Além disso, a L-Glutamina é um substrato para formação da L-glutationa (Wu et al., 2004), o principal antioxidante endógeno por controlar a homeostase dos radicais livres (Forman et al., 2009; Wu et al., 2004) que também apresenta um papel detoxificante de xenobióticos no organismo (Joseph et al., 1997).

Visando aprofundar estudos realizados por nosso grupo de pesquisa e com base na literatura especializada, decidiu-se comparar o efeito da suplementação com L-Glutamina 2% e L-Glutationa 1% sobre os neurônios entéricos e as CGEs no plexo mioentérico do íleo de ratos induzidos a diabetes experimental, uma vez que ambas as substâncias não haviam sido testadas de maneira comparativa anteriormente. Além disso, optou-se pela L-glutationa além da L-glutamina, pelo fato da L-glutamina ser metabolizada no organismo para originar a L-glutationa, logo seu efeito seria indireto, enquanto que a suplementação com a L-glutationa pela análise direta da ação antioxidante deste aminoácido.

MATERIAIS E MÉTODOS

Procedimentos com animais

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratórios (SBCAL/COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética de em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM), sob parecer nº 2009/2005.

Foram utilizados neste estudo 30 ratos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), variedade *albinus*, provenientes do Biotério Central da UEM. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos, sendo eles: normoglicêmico (N), normoglicêmico suplementado com L-Glutamina 2% (NG), normoglicêmico suplementado com L-Glutationa 1% (NGO), diabético (D), diabético suplementado com L-Glutamina 2% (DG), e diabético suplementado com L-Glutationa 1% (DGO).

Com 90 dias de idade, os animais foram alojados em caixas de polipropileno, receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em condições ambientais controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e iluminação (ciclo 12 horas claro/12 horas escuro). Os animais não suplementados (grupos N e D) receberam ração balanceada padrão Nuvital (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). Para a suplementação experimental dos animais dos grupos NG e DG, a L-Glutamina (DEG, São Paulo, SP, Brasil) foi incorporada à ração padrão na concentração de 2% (20g/kg de

ração) (Alves et al.,2010; Pereira et al., 2012). Os animais dos grupos NGO e DGO receberam ração suplementada com L-Glutationa (DEG) na concentração de 1% (10g/kg de ração) (Ueda et al., 2002). O consumo de ração foi avaliado quinzenalmente (g/dia).

Os animais dos grupos D, DG e DGO foram submetidos a jejum prévio de quatorze horas, antes da indução do Diabetes Mellitus, realizada através da injeção intravenosa de estreptozotocina (35mg/kg de peso corporal; Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos), dissolvida em tampão citrato pH 4,5 (10mM). Para verificar o estabelecimento do modelo experimental, quatro dias após a indução, uma gota de sangue foi obtida da cauda dos animais para mensuração da glicemia através da determinação fotométrica de glicose por meio de glicoso-colorante-oxidorreductase (glicosímetro Accu-Chek Active, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Alemanha). Somente os animais com glicemia superior a 200mg/dl foram utilizados.

Coleta e processamento do material

Aos 210 dias de idade, os animais foram pesados e mortos sob anestesia de tiopental (40mg/kg peso corporal, i.p; Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA). O sangue foi coletado por punção cardíaca para mensuração da glicose sanguínea (método da glicose oxidase). Após a celiotomia, a porção final do íleo foi coletada, lavada com tampão fosfato salino (PBS, 0,1 M, pH 7,4) e cuidadosamente inflada com solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967), preenchendo o espaço anteriormente ocupado pelas fezes de tal modo que o segmento não fosse distendido.

Para a realização das técnicas imunohistoquímicas, o segmento foi fixado por 18 horas na mesma solução fixadora de Zamboni (Stefanini et al., 1967). Ao final deste período, as extremidades do segmento foram abertas para que o conteúdo (fixador) fosse drenado. Então, o segmento foi aberto ao longo da borda mesentérica e sucessivamente lavado em álcool 80% até a remoção completa do fixador. A seguir, foi realizada a desidratação em série ascendente de alcoóis (95% e 100%), a diafanização em xilol e a reidratação em série descendente de alcoóis (100%, 90%, 80%, 50%). O segmento foi na sequência armazenado a 4°C em PBS com adição de azida sódica 0,04%. O íleo foi cortado em pequenas fatias de aproximadamente 1cm² e posteriormente microdissecado para obtenção de preparados totais da túnica muscular (remoção da túnica mucosa e da tela submucosa).

Estudo da população total de neurônios mioentéricos imunoreativos à proteína Hu (HuC/D-IR) e células gliais entéricas imunoreativas à proteína S100 (S100-IR)

Os preparados totais de todos os íleos foram lavados duas vezes por 10 minutos em solução de PBS contendo 0,5% Triton X-100 (Sigma). Em seguida, foram incubados por 1 hora na solução de bloqueio (PBS + 0,5% Triton X-100 + 2% de albumina de soro bovino (BSA; Sigma) + 10% de soro de cabra). Após esse período, os íleos foram incubados por 48 horas em temperatura ambiente em uma solução contendo os anticorpos primários específicos contra HuC/D (produzido em camundongo; 1:500; Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) e S100 (produzido em coelhos; 1:200; Sigma). Os íleos foram lavados três vezes em solução de PBS + 0,5% Triton X-100 por cinco minutos e incubados por 2 horas em temperatura ambiente com os anticorpos secundários: Alexa Fluor 488 (IgG anti-camundongo produzido em burro; 1:250; Molecular Probes), como um marcador de HuC/D, e Alexa Fluor 568 (IgG anti-coelho produzido em burro, 1:500; Molecular Probes), como um marcador da proteína S100. Após esse tempo, os preparados totais foram novamente lavados três vezes por 5 minutos em solução de PBS, e montados em lâminas com meio de montagem Prolong® Gold Antifade com DAPI (Molecular Probes). Para controle negativo, o anticorpo primário foi omitido.

Análise quantitativa dos neurônios HuC/D-IR e células da glia S100-IR por gânglio mioentérico

A quantificação por gânglio foi realizada na região intermediária do íleo (60°-120°, 240°-300°; da circunferência intestinal em cada animal, considerando 0° como a inserção mesentérica) (Miranda-Neto et al., 2001). Foram utilizadas imagens capturadas por câmara de alta resolução AxioCam (Zeiss, Jena, Alemanha) acoplada a microscópio de luz Axioskop (Zeiss), usando objetiva de 20X. As imagens foram digitalizadas em computador usando software AxioVision versão 4.1, e gravadas em pen drive. A quantificação foi realizada através de software de análise de imagens Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). O número de neurônios HuC/D-IR e de células gliais S100-IR presentes por gânglio foram determinados. Cinquenta gânglios foram quantificados por animal, para obtenção da densidade ganglionar.

Análise morfométrica dos neurônios HuC/D-IR e células da glia S100-IR

Foram realizadas análises morfométricas da população total de neurônios HuC/D-IR e da população de células da glia S100-IR do plexo mioentérico do íleo. As áreas em μm^2 de 100 corpos celulares de neurônios e de 100 CGEs foram mensuradas por animal, totalizando 500 células/grupo/técnica. Para a mensuração foi utilizado o software de análise de imagens Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics). As imagens utilizadas foram as mesmas da análise quantitativa.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos às análises estatísticas através dos programas Statistica 7.0 e GraphPad Prism 3.0, sendo expressos como média \pm erro padrão da média. Foi realizado previamente o delineamento em blocos dos dados morfométricos e da densidade ganglionar, seguido de Teste de Tukey. Para os demais resultados, foi realizada análise de variância One-way (ANOVA), seguido de Teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes estatisticamente.

RESULTADOS

Dados fisiológicos

Os animais diabéticos (grupo D) consumiram cerca de 35% mais ração que os animais normoglicêmicos (grupo N, $P < 0,05$). Apesar da hiperfagia apresentada por estes animais, não houve ganho de massa corporal no grupo D após 120 dias de experimento. Dessa forma, o ganho de massa foi menor nos animais diabéticos (grupo D), quando comparados com os animais do grupo N ($P < 0,05$). O grupo D apresentou ainda a hiperglicemia crônica característica do diabetes mellitus, quando comparado com o grupo N ($P < 0,05$). Estes dados confirmam o estabelecimento do modelo experimental proposto através da estreptozotocina (Tabela 1).

A suplementação com L-Glutamina 2% ou L-Glutationa 1% nos animais diabéticos (grupos DG e DGO, respectivamente) não promoveu ganho de massa ao longo do experimento, assim como não influenciou a glicemia nestes animais, em relação aos animais diabéticos não suplementados (grupo D). O consumo de ração foi 26% superior no grupo DGO em relação aos grupos D ($P < 0,05$) e DG ($P < 0,05$) (Tabela 1).

Densidade neuronal por gânglio mioentérico

Os animais do grupo D apresentaram uma redução neuronal de aproximadamente 18% quando comparados com o grupo N ($P < 0,05$). No grupo

NGO a densidade neuronal foi 19% menor, quando comparada com os animais normoglicêmicos não suplementados (grupo N, $P < 0,05$) (Tabela 2).

Quando comparados ao grupo D, verificou-se que a densidade neuronal dos animais diabéticos suplementados com L-Glutationa (grupo DGO) era 26% maior, mantendo um valor similar ao encontrado no grupo normoglicêmico (N). Por outro lado, o grupo suplementado com L-Glutamina (grupo DG) apresentou densidade neuronal 11,8% menor que o grupo D e 27,6% menor que o grupo N. (Tabela 2).

Densidade glial por gânglio mioentérico

O diabetes mellitus não alterou a densidade glial por gânglio mioentérico, quando comparado o grupo D com o grupo N. Os animais diabéticos suplementados com L-Glutationa (grupo DGO) apresentaram um aumento de 52% na densidade glial em relação aos animais diabéticos não suplementados (grupo D, $P < 0,05$) e de 45,9% em relação ao grupo N ($P < 0,05$). Os animais suplementados com L-Glutamina (grupo DG) possuíam densidade glial 6,44% maior que o grupo D ($P > 0,05$) e 2% maior que o grupo N ($P > 0,05$). A suplementação com L-Glutamina nos animais normoglicêmicos (grupo NG) promoveu um aumento de 19% na densidade glial em relação ao grupo N ($P < 0,05$). O mesmo não foi observado quando os animais normoglicêmicos foram suplementados com L-Glutationa (grupo NGO) (Tabela 2).

Morfometria dos neurônios mioentéricos HuC/D-IR

O diabetes promoveu o aumento em 16% na área do corpo celular neuronal nos animais do grupo D, quando comparados com o grupo N ($P < 0,05$). Nos animais do grupo NG houve um aumento de aproximadamente 14% no tamanho dos neurônios, em relação ao grupo N ($P < 0,05$). Nos animais diabéticos suplementados (grupos DG e DGO) houve uma redução de 11% e 17%, respectivamente, na área do corpo celular, quando comparados ao grupo D ($P < 0,05$) (Tabela 2).

A área do corpo celular dos neurônios mioentéricos HuC/D-IR variou entre $82\mu\text{m}^2$ e $869\mu\text{m}^2$ no grupo N, $108\mu\text{m}^2$ e $1083\mu\text{m}^2$ no grupo NG, $53\mu\text{m}^2$ e $789\mu\text{m}^2$ no grupo NGO, $49\mu\text{m}^2$ e $944\mu\text{m}^2$ no grupo D, $107\mu\text{m}^2$ e $956\mu\text{m}^2$ no grupo DG, e $101\mu\text{m}^2$ e $900\mu\text{m}^2$ no grupo DGO. Estes resultados são expressos como distribuições de frequências relativas na Figura 1A.

Morfometria das células da glia S100-IR

A área das células da glia entérica diminuiu em 15% nos animais diabéticos (grupo D), quando comparada ao grupo N ($P < 0,05$). O grupo normoglicêmico suplementado com L-Glutationa (NGO) apresentou uma redução significativa de 10% no tamanho glial, quando comparado com o grupo N ($P < 0,05$), e de 7% quando comparado com o grupo NG ($P < 0,05$) (Tabela 2).

A área das células da glia S100-IR variou entre $13\mu\text{m}^2$ e $125\mu\text{m}^2$ no grupo N, $11\mu\text{m}^2$ e $151\mu\text{m}^2$ no grupo NG, $7\mu\text{m}^2$ e $132\mu\text{m}^2$ no grupo NGO, $9\mu\text{m}^2$ e $93\mu\text{m}^2$ no grupo D, $9\mu\text{m}^2$ e $85\mu\text{m}^2$ no grupo DG, e $11\mu\text{m}^2$ e $96\mu\text{m}^2$ no grupo DGO. Estes resultados são expressos como distribuições de frequências relativas na Figura 1B.

DISCUSSÃO

A suplementação com L-Glutamina 2% e L-Glutationa 1% não alterou a taxa glicêmica dos animais diabéticos (grupos DG e DGO), em relação aos animais que não receberam a suplementação (grupo D). Resultados semelhantes foram encontrados por nosso grupo de pesquisa sob a mesma condição experimental durante suplementação com L-Glutamina 2% (Alves et al., 2010; Pereira et al., 2011). Ueda et al. (2002) obtiveram resultados similares sob suplementação com L-Glutationa na mesma concentração.

Como a suplementação com L-Glutamina 2% e L-Glutationa 1% não interferiu nos valores de glicose no sangue no final do experimento, torna-se claro que, durante todo este período os animais diabéticos estavam com os níveis glicêmicos elevados e que o uso de glicose pelos tecidos dependentes de insulina foi baixo. Com base nisso, é possível inferir que nos diabéticos a suplementação com ambos os aminoácidos não interferiu nas vias metabólicas relacionadas com o ganho de massa, uma vez que os ratos suplementados não ganharam massa, enquanto os ratos normoglicêmicos com ou sem suplementação tiveram um significativo ganho de massa. A similaridade nos valores da glicemia dos ratos diabéticos suplementados ou não demonstra que a suplementação com estas substâncias não interfere nas vias metabólicas relacionadas com a manutenção da glicose plasmática, não exercendo, portanto, efeito hipoglicemiante, o que não representa impedimento para sua atuação como antioxidante.

Para verificar o desenvolvimento da neuropatia diabética periférica no íleo e o efeito da suplementação com L-Glutamina 2% e L-Glutationa 1% nessa condição, foi analisada a população neuronal total nos gânglios do plexo mioentérico. A proteína

neuronal HuC/D foi escolhida para a marcação imunohistoquímica por ser um marcador pan-neuronal (Ganns et al., 2006). (Figura 2).

Estudando a população neuronal total presente por gânglio mioentérico, foi observada uma redução de aproximadamente 18% na densidade neuronal do íleo dos animais diabéticos (grupo D), em relação aos normoglicêmicos (grupo N). Pereira et al. (2011) encontraram resultado semelhante para o mesmo segmento intestinal.

A diminuição na densidade neuronal pode ser provocada por efeito direto dos radicais livres, que causam morte celular (Ferreira and Matsubara, 1997). O estresse oxidativo gerado durante o diabetes está relacionado com o aumento destas espécies altamente reativas no interior das células (Obrosova et al., 2002; Parthiban et al., 1995), que reagem com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, danificando-os e provocando morte por necrose ou apoptose (Vicent et al., 2004). Os radicais superóxido, hidroxila e o peróxido de hidrogênio, podem induzir lesões oxidativas nas membranas celulares, causando sérios danos às células (Gaté et al., 1999; Hunt et al., 1988). Tais comprometimentos podem atingir os componentes neurais simpáticos, parassimpáticos e entéricos, induzindo a uma perda funcional incapacitante em vários sistemas, dentre eles o TGI (Hernandes et al., 2000; Karakida and Homma, 1989).

Além do aumento intracelular de radicais livres, a morte neuronal induzida pelo diabetes está relacionada com a diminuição significativa de antioxidantes endógenos, incluindo glutathione, glutathione peroxidase e as vitaminas A, C e E (Rahimi et al., 2005). Sendo assim, a suplementação com antioxidantes é uma tentativa de minimizar ou prevenir as complicações neurológicas nos pacientes diabéticos (Pereira et al., 2011). Estudos vêm sendo realizados em nosso grupo de pesquisa com o intuito de verificar tal hipótese (Alves et al., 2010; da Silva, 2011; Lopes et al., 2012; Pereira et al., 2006; Pereira et al., 2008; Pereira et al., 2011; Roldi et al., 2009; Tashima et al., 2007; Tronchini et al., 2010; Zanoni et al., 2003; Zanoni and Fernandes Pereira, 2008; Zanoni et al., 2002; Zanoni et al., 2011).

A densidade neuronal ganglionar nos animais diabéticos suplementados com L-Glutathione 1% (grupo DGO) apresentou-se significativamente maior que no grupo D (26%), com valores similares ao encontrado no grupo N. Por outro lado, o grupo suplementado com L-Glutamina 2% (grupo DG) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo D.

A preservação dos neurônios por gânglio nos animais diabéticos que receberam a suplementação com L-Glutationa 1% demonstra que o efeito neuroprotetor quando se suplementa com este antioxidante é melhor do que quando se suplementa com L-Glutamina. Seria de se esperar que a suplementação com L-Glutamina estimulasse a formação de L-Glutationa e, portanto, por via indireta gerasse o mesmo efeito. É, entretanto, necessário pensar nas condições gerais dos diabéticos, cuja depleção proteica constitui num grave problema. Portanto, nos diabéticos há uma carência de aminoácidos para a síntese de proteínas estruturais e funcionais, o que pode “desviar” a L-Glutamina para outra via metabólica, para atender necessidades mais prementes do organismo do que a síntese de glutaciona como, por exemplo, atuar como nutriente energético para as células imunológicas ou para preservação da massa muscular.

É preciso destacar que a L-Glutamina é um dos aminoácidos codificados pelo código genético sendo, portanto, um dos componentes das proteínas dos seres vivos (Reeds et al., 2000). Além disto, é um importante substrato celular não só por ser um aminoácido, mas por também ser fonte de energia, de nitrogênio e de carbono para a síntese de outras moléculas (Bullus et al., 1989). A homeostase da L-Glutamina depende do balanço entre sua produção e sua utilização pelos diferentes tecidos e órgãos do corpo (Mittendorfer et al., 2001). A maioria dos órgãos tem tanto a enzima de degradação quanto a de síntese de L-Glutamina, contudo, a atividade enzimática determinará se o tecido ou órgão é predominantemente consumidor - intestino, baço, pâncreas, rins e células do sistema imune, ou produtor de L-glutamina - músculo, cérebro, coração, pulmões e tecido adiposo (Bullus et al., 1989; van Acker et al., 1999).

Consequentemente, mesmo com a suplementação de L-Glutamina 2%, células mais sensíveis ao estresse oxidativo, como é o caso dos neurônios entéricos, seriam bastante afetadas havendo inclusive morte de parte desta população, enquanto populações celulares menos sensíveis ao estresse oxidativo como as CGEs seriam menos afetadas, e por isso não sofrem redução no seu número, como será discutido neste trabalho.

O efeito neuroprotetor da L-Glutationa 1% pode ser atribuído ao fato da mesma possuir um papel central na defesa celular contra o estresse oxidativo, sendo o principal antioxidante no citoplasma das células (Joseph et al., 1997). A L-Glutationa age na linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio que o organismo concretiza a favor da sua homeostasia. Consiste na neutralização de radicais livres e

redução do peróxido de hidrogênio. Como se não bastasse à forma direta de atuação da L-Glutationa, a mesma também atua em uma segunda linha de defesa contra a oxidação. Ela está a cargo de enzimas glutaciona-dependentes, que atingem principalmente subprodutos nocivos gerados por espécies reativas de oxigênio, evitando em simultâneo a propagação de radicais livres (Thompson and Franklin, 2010).

A suplementação com L-Glutationa se torna ainda mais importante ao se considerar que os níveis da mesma encontram-se reduzidos no diabetes, o que potencializa os efeitos causados pela presença das espécies reativas de oxigênio. Isso pode ocorrer de duas formas: pelo efeito direto da glicose e insulina na síntese de glutaciona, ou pelo consumo de um co-fator essencial na regeneração da mesma através da glutaciona oxidada (GSSG), por meio da via do poliol (Lu, 2009). Esta via pode levar a uma redução de L-Glutationa, uma vez que é dependente de NADPH para conseguir estabelecer a conversão de glicose em sorbitol, catalisada pela aldose redutase. Em condições normais de glicose essa via é pouco usada, no entanto, em caso de hiperglicemia, esta via é ativada provocando uma diminuição nos níveis de NADPH. Desta forma, a conversão de GSSG a glutaciona fica comprometida, uma vez que o NADPH está sendo usado para a conversão de glicose em sorbitol (Vicent et al., 2004). Em condições severas de estresse oxidativo isto leva, portanto, a uma diminuição acentuada de L-Glutationa (Kharb, 2000).

Acredita-se que nas situações de intenso estresse oxidativo, como anteriormente mencionado, a suplementação com L-Glutationa como a realizada para os animais diabéticos deste experimento pode ser fortemente positiva, pois de acordo com Jordão Jr et al. (1998), a L-Glutationa quando ingerida é absorvida intacta pelo intestino e lançada na corrente sanguínea, indo somar-se à L-Glutationa plasmática. Por outro lado, a suplementação com L-Glutationa associou-se a uma redução de 19% na densidade neuronal ganglionar no grupo NGO em relação ao grupo N. A L-Glutationa é produzida pelo fígado a partir de três aminoácidos, glutamato, cisteína e glicina, (Lomaestro and Malone, 1995). Os animais normoglicêmicos são potencialmente produtores de toda a L-Glutationa que necessitam. A suplementação a 1% possivelmente resultou em excesso desta substância, que ao ser degradada libera seus constituintes dentre eles, o glutamato e a cisteína, que em níveis elevados possuem potencial citotóxico (Mates et al., 2002; Townsend et al., 2003).

Neste estudo, além de avaliar a população neuronal total no plexo mioentérico do íleo, também foram analisadas as células da glia imunorreativas à proteína S100, através da dupla marcação imunohistoquímica utilizando anticorpos anti-HuC/D e anti-S100 (Figura 2). A proteína S100 é considerada um marcador pan-glial e no SNE está localizada exclusivamente nas CGEs. Ela regula a estrutura e a função do citoesqueleto e, além disso, promove a homeostase do cálcio no citoplasma destas células (Ferri et al., 1982; Heizmann, 2002). Outros pesquisadores também utilizaram a marcação anti-S100 com o objetivo de identificar as células da glia em várias regiões do TGI e todos obtiveram resultados satisfatórios (Krammer et al., 1994; Lopes et al., 2012; Perreira et al., 2011; Phillips et al., 2004.).

A densidade glial ganglionar no plexo mioentérico dos animais diabéticos (grupo D) foi similar quando comparada com os animais normoglicêmicos (grupo N). Resultado semelhante foi encontrado por Pereira et al. (2011) no mesmo segmento de estudo. Segundo estes autores, a preservação glial nessas condições pode ser atribuída à resistência desta população e também a um mecanismo de defesa da mesma, na tentativa de promover a manutenção dos neurônios com o estabelecimento da neuropatia diabética.

De acordo com Steinkamp et al. (2012), as CGEs são células altamente resistentes a apoptose. Estes mesmos autores realizaram um estudo onde o objetivo era investigar o papel do Fator Neurotrófico derivado da Linhagem de Células Gliais (GDNF) na regulação da apoptose glial. Eles expuseram as CGEs a um ambiente de doença inflamatória utilizando fator de necrose tumoral- α (TNF α) e interferon- γ (INF- γ). Nenhum destes fatores por si só foram capazes de induzir a apoptose em culturas de CGEs de rato, mas a combinação aumentou significativamente a taxa de apoptose nas culturas destas células. Essas descobertas não apenas reforçam a relevância do GDNF na regulação das CGEs, como também enfatizam a função de proteção celular anti-apoptótica até então desconhecida.

A densidade glial apresentou um aumento significativo no grupo DGO, quando comparado com os grupos N, NG, NGO, D e DG. Esse aumento pode ser recorrente da suplementação com L-Glutationa 1%, que estimulou a proliferação das CGEs nos animais diabéticos, com o propósito de proteger os neurônios. Essa hipótese pode ser reforçada observando a proporção de 44% de células da glia para neurônio no grupo DGO em relação ao do grupo D (28%). A proliferação glial pode ter sido estimulada pela L-Glutationa devido a sua ação antioxidante. Esse fenômeno é bastante discutido no sistema nervoso central (Kawano, 2012; Sofroniew, 2009;

Sofroniew and Vinters, 2010;). Porém, estudos sobre a hiperplasia glial no SNE são escassos.

Os ratos normoglicêmicos suplementados com L-Glutamina 2% (grupo NG) apresentaram um aumento de 19% na densidade glial, quando comparado com o grupo N. Esse resultado pode significar uma preservação desta população ou mesmo estímulo na proliferação da mesma, como consequência da suplementação com L-Glutamina na concentração de 2%. Como os animais deste estudo foram mortos com 210 dias de idade, as células dos mesmos nessa idade já se encontravam em processo de envelhecimento. Segundo Phillips and Powley (2007), que estudaram o comportamento do TGI no envelhecimento, a proporção de glia entérica é maior que de neurônios no íleo de ratos em processo de envelhecimento. Isso pode também ser observado nesse estudo, onde apontou uma diferença de 44%. Segundo os mesmo autores, a perda e a desregulação neuronal associada com a idade pode estimular a proliferação de células gliais reativas que compensam e mascaram qualquer processo de perda glial.

Como a L-Glutamina desempenha uma função antioxidante no organismo, ela pode ter ajudado na preservação glial ou estimulado a proliferação desta população. Trabalhos realizados em nosso laboratório com o intuito de investigar o efeito da suplementação com antioxidantes como ácido ascórbico e extrato de *Ginkgo biloba* no processo de envelhecimento sobre o SNE, apresentaram resultados positivos em relação à proteção dos componentes deste sistema no jejuno e no íleo (De Freitas, 2012; Schneider et al., 2007; Veit and Zanoni, 2012; Zanoni and Freitas; 2005).

Na análise morfológica, observou-se um aumento de 16% na área neuronal do grupo D, quando comparado ao grupo N. Resultados semelhantes foram encontrados por Zanoni et al. (2011) com marcação de Giemsa no duodeno e ceco, e por Lopes et al. (2012) com imunomarcação HuC/D no duodeno, ambos os trabalhos em ratos diabéticos induzidos experimentalmente. Esse aumento sugere uma alteração neuronal causada pelo diabetes mellitus tal alteração pode ser decorrente ao aumento na produção de neurotransmissores para compensar a perda neuronal no diabetes (Lopes et al., 2012), ou devido ao aumento na produção de sorbitol, com elevação da osmolaridade do neurônio e consequentemente edema neuronal (Clements and Bell, 1982; Chung et al., 2003; Vicent et al., 2004).

Nos animais dos grupos DG e DGO as áreas neuronais foram menores em relação ao grupo D em 11% e 17%, respectivamente. Estes resultados podem ser atribuídos ao poder antioxidante dos dois aminoácidos utilizados na suplementação,

onde ambos podem ter reduzido parcialmente a ação dos radicais livres, retardando o dano celular e o consequente acúmulo de substâncias no interior das células, ou por ter reduzido a intensidade de um possível edema neuronal.

Os animais normoglicêmicos suplementados com L-Glutamina (grupo NG) sofreram aumento na área neuronal em 14%, quando comparados ao grupo N. Isto também pode ser efeito da suplementação com o aminoácido. O excesso de glutamina plasmática pode ter influenciado no metabolismo celular, provocando uma hipertrofia neural.

No resultado morfométrico obtido para as CGEs, observa-se que houve uma diminuição de 15% na área das mesmas no grupo D, em relação ao grupo N. Pereira et al. (2011) encontraram resultados semelhantes. Segundo estes autores, essa diminuição pode estar relacionada a uma redução na expressão de fatores neurotróficos ou neurotrofinas, responsáveis pela manutenção e sobrevivência dos neurônios. Isto pode ser suportado por um estudo realizado com o objetivo de determinar a ocorrência de alterações na expressão de neurotrofinas no colo de ratos diabéticos, o qual verificou uma diminuição na expressão de GDNF, fator de crescimento neuronal e neurotrofina-3 nesta condição (Liu et al., 2010).

A suplementação com L-Glutationa nos animais normoglicêmicos (grupo NGO) desencadeou uma diminuição de 10% na área celular quando comparado com o grupo N. Isto pode ter ocorrido em vista da formação excessiva de glutamato e cisteína, que devido a sua ação citotóxica (Mates et al., 2002; Townsend et al., 2003) podem ter acelerado o processo de apoptose.

Conclui-se que a suplementação com L-Glutationa 1% na condição de diabetes experimental apresentou um melhor efeito que a L-Glutamina 2% sob a densidade celular, pois a L-Glutationa 1% exerceu uma ação neuroprotetora sobre a população total de neurônios do plexo mioentérico e estimulou a proliferação glial no mesmo plexo. Na análise do perfil neuronal, a suplementação com ambos os aminoácidos mostrou-se eficaz. Porém, a L-Glutationa 1% apresentou um efeito protetor mais relevante, uma vez que a área dos neurônios dos animais diabéticos suplementados com este aminoácido reduziu para valores próximos do normal. Em condições normais, a L-Glutationa 1% apresentou um efeito negativo na densidade neuronal e na morfometria glial. Já a L-glutamina 2% atuou negativamente sob a área neuronal.

REFERÊNCIAS

- Alves EP, Alves AM, Pereira RV, de Miranda Neto MH, Zanoni JN. 2010. Immunohistochemical study of vasoactive intestinal peptide (VIP) enteric neurons in diabetic rats supplemented with L-glutamine. *Nutr Neurosci* 13(1):43-51.
- Bulus N, Cersosimo E, Ghishan F, Abumrad NN. 1989. Physiologic importance of glutamine. *Metabolism, clinical and experimental* 38(8):1-5.
- Bytzer P, Talley NJ, Leemon M, Young LJ, Jones MP, Horowitz M. 2001. Prevalence of gastrointestinal symptoms associated with diabetes mellitus: a population-based survey of 15,000 adults. *Arch Intern Med* 161(16):1989-96.
- Chandrasekharan B, Srinivasan S. 2007. Diabetes and the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 19(12):951-60.
- Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. 2003. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *Journal of the American Society of Nephrology* 14(8 Suppl 3):S233-6.
- Clements RS, Jr., Bell DS. 1982. Diabetic neuropathy: peripheral and autonomic syndromes. *Postgrad Med* 71(6):50-2, 55-7, 60-7.
- Defani MA, Zanoni JN, Natali MRM, Bazotte RB, de Miranda-Neto MH. 2003. Effect of acetyl-L-carnitine on VIP-ERGIC neurons in the jejunum submucous plexus of diabetic rats. *Arq Neuropsiquiatr* 61(4):962-967.
- da Silva GG, Zanoni JN, Buttow NC. 2011. Neuroprotective action of Ginkgo biloba on the enteric nervous system of diabetic rats. *World J Gastroenterol* 17(7):898-905.
- De Freitas P, Natali MR, Pereira RV, Miranda Neto MH, Zanoni JN. 2008. Myenteric neurons and intestinal mucosa of diabetic rats after ascorbic acid supplementation. *World J Gastroenterol* 14(42):6518-24.
- Ferreira A, Matsubara L. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 43(1):61-68.
- Ferri GL, Probert L, Cocchia D, Michetti F, Marangos PJ, Polak JM. 1982. Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature* 297(5865):409-10.
- Forman HJ, Zhang H, Rinna A. 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 30(1-2):1-12.
- Fregonesi CEPT, de Miranda-Neto MH, Molinari SL, Zanoni JN. 2001. Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Arq Neuropsiquiatr* 59(1):50-53.
- Furness JB. 2006. The enteric nervous system. Carlton, Victoria: Blackwell Publishing Asia. 274 p.

Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. 1999. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother* 53(4):169-80.
Heizmann CW. 2002. The multifunctional S100 protein family. *Methods Mol Biol* 172:69-80.

Hernandes L, Bazotte RB, Gama P, Miranda-Neto MH. 2000. Streptozotocin-induced diabetes duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons. *Arq Neuropsiquiatr* 58(4):1035-9.

Hunt J, Dean R, Wolff S. 1988. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochemical journal* 256(1):205.

Jordão Jr A, Chiarello P, Bernardes M, Vannucchi H. 1998. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathione reduzida e da vitamina E. *Medicina* 31:434-449.

Joseph P D, Mannervik B, Ortiz de Montellano P. 1997. *Molecular Toxicology*. New York, NY: Oxford University Press. 589 p.

Karakida T, Homma S. 1989. Compliance changes of the gastrointestinal tract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Jpn J Physiol* 39(4):559-70.

Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Yoshioka N, Li HP, Kawamura K, Li Y, Raisman G. 2012. Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res* 349(1):169-80.

Kharb S. 2000. Low whole blood glutathione levels in pregnancies complicated by preeclampsia and diabetes. *Clin Chim Acta* 294(1-2):179-83.

Krammer HJ, Karahan ST, Sigge W, Kuhnel W. 1994. Immunohistochemistry of markers of the enteric nervous system in whole-mount preparations of the human colon. *Eur J Pediatr Surg* 4(5):274-8.

Kuyvenhoven J, Meinders A. 1999. Oxidative stress and diabetes mellitus: pathogenesis of long-term complications. *Eur J Intern Med* 10(1):9-19.

Liu W, Yue W, Wu R. 2010. Effects of diabetes on expression of glial fibrillary acidic protein and neurotrophins in rat colon. *Auton Neurosci* 154(1-2):79-83.

Lomaestro BM, Malone M. 1995. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Ann Pharmacother* 29(12):1263-73.

Lopes CR, Ferreira PE, Zanoni JN, Alves AM, Alves EP, Buttow NC. 2012. Neuroprotective effect of quercetin on the duodenum enteric nervous system of streptozotocin-induced diabetic rats. *Dig Dis Sci* 57(12):3106-15.

Lu SC. 2009. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30(1-2):42-59.
Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I, Asenjo M, Marquez J. 2002. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int J Biochem Cell Biol* 34(5):439-58.

Miranda-Neto MH, Molinari SL, Natali MRM, Sant'Ana DMG. 2001. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of the neuronal evidentiatio. *Arq Neuropsiquiatr* 59(1):54-59.

Mittendorfer B, Volpi E, Wolfe RR. 2001. Whole body and skeletal muscle glutamine metabolism in healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280(2):E323-33.

Obrosova IG, Van Huysen C, Fathallah L, Cao X, Greene DA, Stevens MJ. 2002. An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. *The FASEB Journal* 16(1):123-125.

Parthiban A, Vijayalingam S, Shanmugasundaram KR, Mohan R. 1995. Oxidative stress and the development of diabetic complications--antioxidants and lipid peroxidation in erythrocytes and cell membrane. *Cell Biol Int* 19(12):987-93.

Pereira MA, Bagatin MC, Zanoni JN. 2006. Effects of the ascorbic acid supplementation on NADH-diaphorase myenteric neurons in the duodenum of diabetic rats. *Biocell* 30(2):295-300.

Pereira RV, de Miranda-Neto MH, da Silva Souza ID, Zanoni JN. 2008. Vitamin E supplementation in rats with experimental diabetes mellitus: analysis of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons from terminal ileum. *J Mol Histol* 39(6):595-603.

Pereira RVF, Tronchini EA, Tashima CM, Alves EPB, Lima MM, Zanoni JN. 2011. L-glutamine supplementation prevents myenteric neuron loss and has gliatrophic effects in the ileum of diabetic rats. *Digestive diseases and sciences* 56(12):3507-3516.

Phillips RJ, Kieffer EJ, Powley TL. 2004. Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat. *Anat Embryol (Berl)* 209(1):19-30.

Phillips RJ, Powley TL. 2007. Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. *Auton Neurosci* 136(1-2):1-19.

Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. 2005. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59(7):365-373.

Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B, Jahoor F. 2000. Intestinal glutamate metabolism. *J Nutr* 130(4S Suppl):978S-82S.

Roldi LP, Pereira RV, Tronchini EA, Rizo GV, Scoaris CR, Zanoni JN, Natali MR. 2009. Vitamin E (alpha-tocopherol) supplementation in diabetic rats: effects on the proximal colon. *Bmc Gastroenterology* 9:88.

Ruhl A. 2005. Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil* 17(6):777-90.

Schneider LC, Perez GG, Banzi SR, Zanoni JN, Natali MR, Buttow NC. 2007. Evaluation of the effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on the myenteric plexus of the small intestine of Wistar rats. *J Gastroenterol* 42(8):624-30.

Stefanini M, De Martino C, Zamboni L. 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 216(5111):173-4.

Steinkamp M, Gundel H, Schulte N, Spaniol U, Pflueger C, Zizer E, von Boyen GB. 2012. GDNF protects enteric glia from apoptosis: evidence for an autocrine loop. *Bmc Gastroenterology* 12:6.

Shotton HR, Lincoln J. 2006. Diabetes only affects nitric oxide synthase-containing myenteric neurons that do not contain heme oxygenase 2. *Brain Res* 1068(1):248-256.

Sofroniew MV. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32(12):638-47.

Sofroniew MV, Vinters HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119(1):7-35.

Takahara H, Fujimura M, Taniguchi S, Hayashi N, Nakamura T, Fujimiya M. 2001. Changes in serotonin levels and 5-HT receptor activity in duodenum of streptozotocin-diabetic rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(3):G798-808.

Tashima CM, Tronchini EA, Pereira RV, Bazotte RB, Zanoni JN. 2007. Diabetic rats supplemented with L-glutamine: a study of immunoreactive myosin-V myenteric neurons and the proximal colonic mucosa. *Dig Dis Sci* 52(5):1233-41.

Thompson JA, Franklin CC. 2010. Enhanced glutathione biosynthetic capacity promotes resistance to As³⁺-induced apoptosis. *Toxicol Lett* 193(1):33-40.

Tronchini EA, de Miranda Neto MH, Zanoni JN. 2010. Vitamin E (alpha-tocopherol) supplementation enhances nitric oxide production in penile tissue of diabetic rats. *BJU Int* 106(11):1788-93.

Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57(3):145-155.

Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T. 2002. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J Nutr* 132(5):897-900.

van Acker BAC, von Meyenfeldt MF, van der Hulst RRWJ, Hulsewé KWE, Wagenmakers AJM, Deutz NEP, de Blaauw I, Dejong CHC, van Kreel BK, Soeters PB. 1999. Glutamine: The pivot of our nitrogen economy? *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 23(5 suppl):S45-S48.

Veit AP, Zanoni JN. 2012. Age-related changes in myosin-V myenteric neurons, CGRP and VIP immunoreactivity in the ileum of rats supplemented with ascorbic acid. *Histol Histopathol* 27(1):123-32.

Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. 2004. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 25(4):612-28.

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134(3):489-92.

Wu G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37(1):1-17.

Zanoni JN, Buttow NC, Bazotte RB, Neto MHM. 2003. 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-Basic & Clinical* 104(1):32-38.

Zanoni JN, de Miranda Neto MH, Bazotte RB, de Souza RR. 1997. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arq Neuropsiquiatr* 55(4):696-702.

Zanoni JN, Fernandes Pereira RV. 2008. Cell proliferation of the ileum intestinal mucosa of diabetic rats treated with ascorbic acid. *Biocell* 32(2):163-8.

Zanoni JN, Freitas P. 2005. Effects of ascorbic acid on the vasoactive intestinal peptide synthesis in the ileum submucous plexus of normal rats. *Arq Gastroenterol* 42(3):186-90.

Zanoni JN, Hernandez L, Bazotte RB, Miranda Neto MH. 2002. Terminal ileum submucous plexus: Study of the VIP-ergic neurons of diabetic rats treated with ascorbic acid. *Arq Neuropsiquiatr* 60(1):32-37.

Zanoni JN, Tronchini EA, Moure SA, Souza ID. 2011. Effects of L-glutamine supplementation on the myenteric neurons from the duodenum and cecum of diabetic rats. *Arq Gastroenterol* 48(1):66-71.

Tabela 1. Parâmetros fisiológicos (PF) dos animais dos grupos: normoglicêmico (N), normoglicêmico suplementado com L-Glutamina (NG), diabético (D), diabético suplementado com L-Glutamina (DG), normoglicêmico suplementado com L-Glutamina (NGO) e diabético suplementado com L-Glutamina (DGO).

PF	% de ganho de massa corporal dos 90 aos 210 dias	Consumo de Ração(g)	Glicemia Final (mg/dL)
N	44,14% ± 4,25 ^a	29,8 ± 0,6 ^a	144,8 ± 3,0 ^a
NG	37,63% ± 4,82 ^a	29,2 ± 1,8 ^a	165,4 ± 6,8 ^a
NGO	34,18% ± 2,39 ^a	34,4 ± 3,0 ^{a,b}	134,8 ± 11,5 ^a
D	-9,04% ± 5,67 ^b	40,2 ± 1,1 ^b	532,6 ± 53,4 ^b
DG	- 5,11% ± 7,73 ^b	40,3 ± 1,5 ^b	612,8 ± 8,7 ^b
DGO	- 11,80% ± 5,60 ^b	51 ± 3,7 ^c	581,4 ± 23,9 ^b

Médias seguidas por diferentes letras sobrescritas na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$) $n = 5$ ratos por grupo.

Tabela 2. Área em μm^2 dos corpos celulares de neurônios HuC/D-IR e células da glia S100-IR, e densidade dos neurônios HuC/D-IR e células da glia S100-IR dos animais dos grupos: normoglicêmico (N), normoglicêmico suplementado com L-Glutamina (NG), diabético (D), diabético suplementado com L-Glutamina (DG), normoglicêmico suplementado com L-Glutamina (NGO) e diabético suplementado com L-Glutamina (DGO).

Grupo	Área dos corpos celulares de neurônios HuC/D-IR	Área dos corpos celular das células da glia S100-IR	Densidade de neurônios HuC/D-IR	Densidade das células da glia S100-IR
N	302,5±6,6 ^a	43,75±0,6 ^a	14,0 ± 0,6 ^a	27,3 ± 1,2 ^a
NG	344,3±7,6 ^b	42,39±1,0 ^a	12,5 ± 0,7 ^{a,b,c,d}	32,6 ± 1,5 ^b
NGO	302,4±6,3 ^a	39,24±0,7 ^b	11,2 ± 0,4 ^{b,c,d}	30,1 ± 1,1 ^{a,b}
D	395,3±9,1 ^c	37,21±0,6 ^{b,c}	11,52 ± 0,4 ^b	26,2 ± 1,0 ^a
DG	350,9±6,9 ^b	35,11±0,7 ^c	10,15 ± 0,5 ^{b,c,d}	27,93 ± 1,1 ^{a,b}
DGO	328,1±8,3 ^{a,b}	37,68±0,7 ^{b,c}	14,52 ± 0,7 ^a	39,8 ± 1,8 ^c

Médias seguidas por diferentes letras sobrescritas na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0,05$) $n = 5$ ratos por grupo.

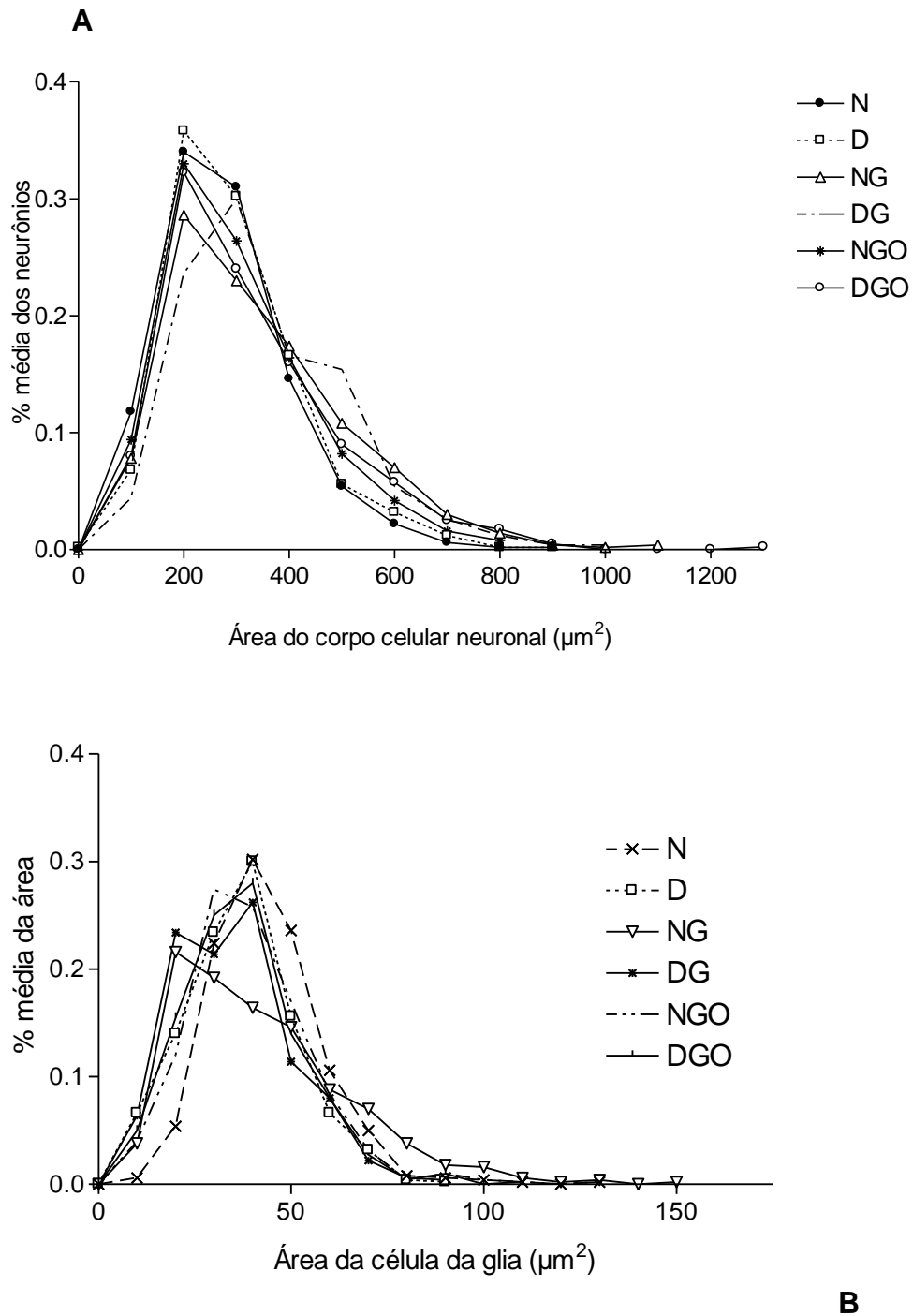


Figura 1: Distribuição de frequências relativas das áreas do corpo celular (A) neurônio miotéricos HuC/D-imunoreativos e (B) células da glia S-100 imunoreativas. Grupo normoglicêmico (N), diabético (D), normoglicêmico suplementado com L-Glutamina (NG), diabético suplementado com L-Glutamina (DG), normoglicêmico suplementado com L-Glutationa (NGO) e diabético suplementado com L-Glutationa (DGO). n= 5 ratos por grupo.

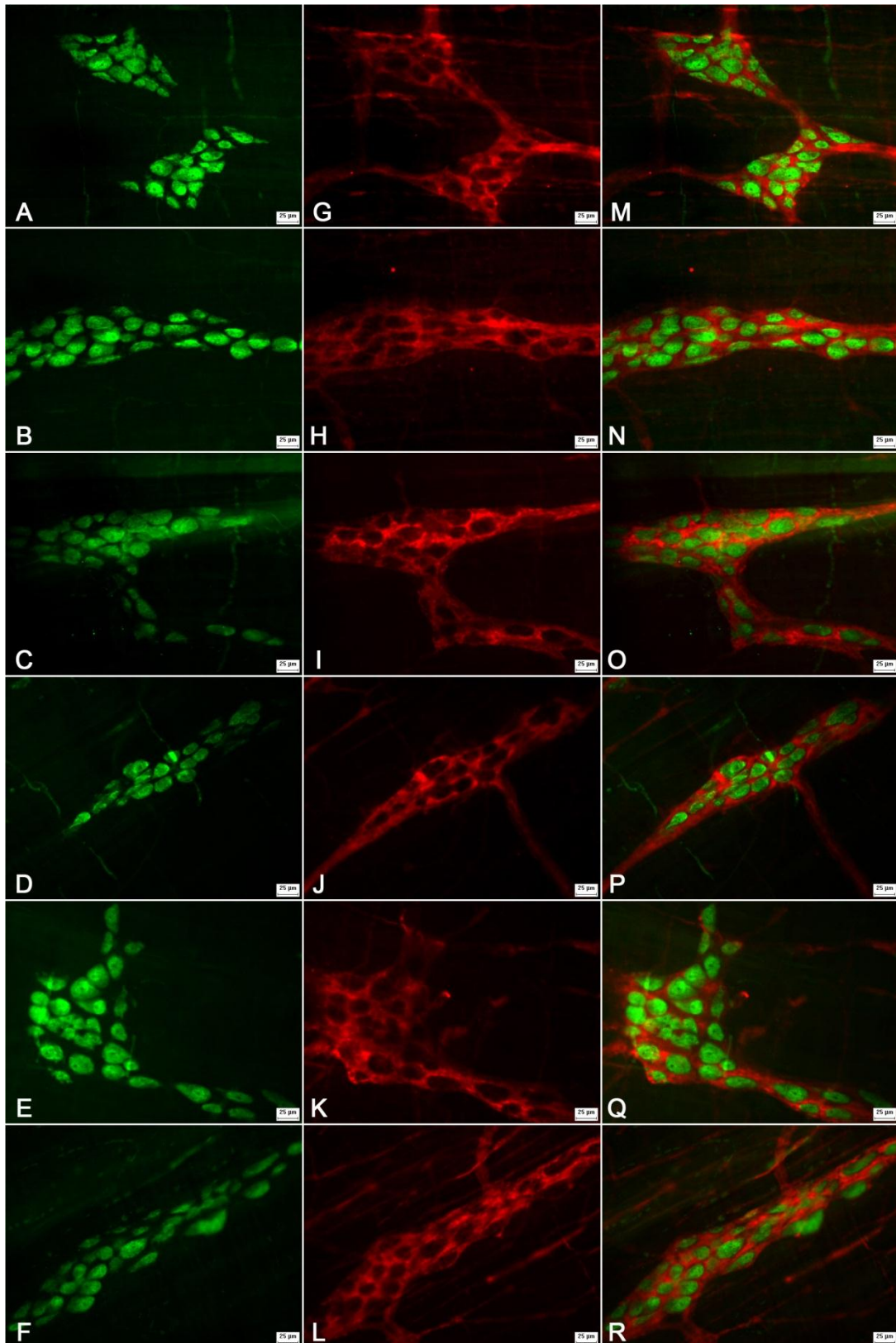


Figura 2. Micrografia do plexo mientérico do íleo imunomarcado pela técnica HuC/D (A, B, C, D, E e F) e S-100 (G, H, I, J, K e L) nos grupos: normoglicêmico (A, G e M), diabético (D, J e P), normoglicêmico suplementado com L-Glutamina 2% (B, H e N), diabético suplementado com L-Glutamina 2% (E, K e Q), normoglicêmico suplementado com L-Glutathione 1% (C, I e O) e diabético suplementado com L-Glutathione 1% (F, L e R). $n = 5$ ratos por grupo. Barra de calibração: 25µm.

ANEXO 1

Normas da revista “Glia”

General Instructions

Authors should submit their manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/glia> .

The manuscript should have a uniform style and be submitted exactly as the author wishes it to appear in print. It should consist of subdivisions in the following sequence.

- 1) Title page
- 2) Abstract
- 3) Text
- 4) Acknowledgments
- 5) References
- 6) Footnotes
- 7) Tables
- 8) Figure legends

Start each subdivision on a new page.

Title Page. The first page of the manuscript should include:

- Title of paper
- Full name of author(s)
- Institutional affiliations and complete mailing address
- A running title not to exceed 45 letters and spaces
- **The exact number of words(by section, including legends and bibliography), figures and tables in the article, plus the total word count.**
- Individual, address, and telephone number to whom correspondence concerning manuscript should be sent.

Key Words. Key words should be included and should not exceed 85 characters and spaces. Do not repeat words used in the title. Try to use key words such as found in the headings of Index Medicus.

Abstract. Submit an abstract of 250 words or less that will serve in lieu of a concluding summary. The abstract must be written in complete sentences and succinctly state the objectives, experimental design of the paper, principal observations, and conclusions; it should be intelligible without reference to the rest of the paper.

Text. The text should be presented in the following order: INTRODUCTION; MATERIALS AND METHODS; RESULTS; DISCUSSION.

References.

Wiley's Journal Styles Are Now in EndNote

EndNote is a software product that we recommend to our journal authors to help simplify and streamline the research process. Using EndNote's bibliographic management tools, you can search bibliographic databases, build and organize your reference collection, and then instantly output your bibliography in any Wiley journal style.

Download Reference Style for this Journal: If you already use EndNote, you can [download the reference style](#) for this journal.

How to Order: To learn more about EndNote, or to purchase your own copy, [click here](#)

Technical Support: If you need assistance using EndNote, contact endnote@isiresearchsoft.com, or visit www.endnote.com/support.

In the text, references to the literature should be made by author's name followed by year of publication arranged by alphabetical order first, then by year of publication:

...studies by Briggs (1975) reveal...

...studies by Briggs and Porter (1975) reveal...

...an earlier report (Briggs, 1975)...

...earlier reports (Anderson and Stevens, 1977; Mahler, 1976;1977),...

When references are made to more than one paper by the same author, published in the same year, they are to be designated in the text as (Gardner-Medwin, 1983a,b) and in the reference list as shown below. References are to be arranged alphabetically in the following style: Author's name (or names), year of publication, complete title, volume, and inclusive pages as follows:

Journal Article

Antanitus DS, Choi BH, Lapham LW. 1976. The demonstration of glial fibrillary acidic protein in the cerebrum of the human fetus by indirect immunofluorescence. *Brain Res* 103:613-616.

Gardner-Medwin AR. 1983a. A study of the mechanisms by which potassium moves through brain tissue in rat. *J Physiol (Lond)* 335:353-374.

Gardner-Medwin AR. 1983b. Analysis of potassium dynamics in mammalian brain tissue. *J Physiol (Lond)* 335:393-426.

Book

Ils Kuffler SW, Nicholls JG, Martin A. 1984. From neuron to brain. Sunderland, MA: Sinauer Associates. 486 p.

Chapter in Book

Nicholson C. 1983. Regulation of the ion microenvironment and neuronal excitability. In: Jasper HH, van Gelder NM, editors. Basic mechanisms of neuronal hyperexcitability. New York: Alan R. Liss. p 185-216.

"Unpublished observations" and "personal communications" should not appear in the references. These should be inserted in parentheses in the text, and letters of permission from all individuals cited in this way should accompany the manuscript.

Footnotes. Number footnotes to the text with consecutive arabic numerals. The corresponding reference numbers must be clearly indicated in the text. Additional references to the identical footnote must be numbered with the next consecutive number, for example.

¹ Material used for this experiment was...

² Provided by..

³ See footnote 2, page...

Type footnotes to a table directly beneath the table and number them 1, 2, 3, etc. They must not be numbered in sequence with text footnotes.

Tables. All tables must be cited in the text and have titles. Number them consecutively with arabic numerals. Table titles should be complete but brief. Information other than that defining the data should be presented as footnotes. Since tabular material is expensive to reproduce, it should be simple and uncomplicated, with as few vertical and horizontal rules as possible.

Illustrations

Illustrations should be numbered in one consecutive series using arabic numerals, and keyed into the text. Authors must submit figures at the size they are to appear in GLIA. Illustrations need to be 1-column width (8.8 cm) or the smallest size that will convey the essential scientific information. For multiple panel figures, 1.5 columns (13 cm) or 2 columns (18 cm) will be allowed if necessary. Vertical dimensions can vary, but must not exceed 20 cm. Figures should be appropriately lettered and labeled with characters that will be 2-6 mm (8-12 points) high in the final reproduction, using a Serif font, preferably "Times Roman". In cases of line drawings that could be reduced, except that some lettering would be illegibly small, the figures may be returned to the authors for re-labeling, thus delaying publication of the manuscript.

Color Figures. Authors are encouraged to submit color illustrations when the color conveys essential scientific information. All color figures will be reproduced in full color in the **online edition** of the journal at no cost to authors. Authors are requested to pay the cost of reproducing color figures in **print** (upon acceptance of the

manuscript, the publisher will provide price quotes). The publisher will subsidize color reproduction, reducing author costs to \$550 for the first page, and \$450 for each of the next three pages.

Cover Illustrations. Authors may submit color figures for consideration as cover illustrations. These Figures must be used in the submitted manuscript.