

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM
CÂMPUS DE TRÊS LAGOAS

MARIA LUISA PEREIRA MARONESI

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA PAREDE INTESTINAL DE RATOS DIABÉTICOS
TRATADOS COM ASSOCIAÇÃO DE ANTIOXIDANTES**

TRÊS LAGOAS/ MS

2023

MARIA LUISA PEREIRA MARONESI

**ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA PAREDE INTESTINAL DE RATOS DIABÉTICOS
TRATADOS COM ASSOCIAÇÃO DE ANTIOXIDANTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Enfermagem da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Câmpus de Três Lagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Enfermagem.

Orientadora: Prof^a Dr^a Catchia Hermes-Uliana.

TRÊS LAGOAS

2023

MARONESI, Maria Luisa Pereira. **Análise morfométrica da parede intestinal de ratos diabéticos tratados com associação de antioxidantes.** Trabalho de Conclusão de Curso bacharelado em Enfermagem, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, 2023.

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio endócrino que em condições crônicas acarreta danos celulares e neurais responsáveis pelas alterações morfométricas nos tecidos intestinais, alterações na absorção gastrointestinal e sintomatologia característica. A hiperglicemia desempenha um grande papel no aumento do estresse oxidativo responsável pelo dano celular. Compostos ricos em antioxidantes vem sendo utilizados como prevenção ou tratamento do DM como uma estratégia empregada para combater o estresse oxidativo. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento combinado de L-glutamina, α -tocoferol e quercetina na parede intestinal de ratos diabéticos. Foram utilizados ratos adultos distribuídos em quatro grupos: normoglicêmico (N), normoglicêmico tratado (NT), diabético (D) e diabético tratado (DT). O DM foi induzido através da estreptozotocina e o tratamento utilizado foi a combinação de glutamina 200 mg/dia, α -tocoferol 1g/Kg e quercetina microencapsulada 100 mg/Kg administrados por gavagem. Ao final de 60 dias os animais foram mortos e o cólon submetido às técnicas histológicas para análise morfométrica e quantitativa de parâmetros intestinais. Verificou-se diminuição da parede total nos grupos NT e DT. A túnica submucosa demonstrou um aumento no grupo D e uma diminuição no grupo DT em relação aos animais N. Quanto à túnica mucosa, ficou evidenciado aumento nos grupos D e DT em relação a N e na camada muscular da mucosa houve atrofia nos grupos NT, D e DT em relação a N. Os animais D e DT demonstraram maior profundidade das criptas em relação aos animais N. Notou-se aumento da túnica muscular nos grupos NT e DT e diminuição no grupo D. Os animais D apresentaram uma área ganglionar menor em relação aos animais N, e os animais DT obtiveram maior área ganglionar em comparação com os animais D. Os animais DT e NT tiveram redução na proporção de linfócitos intra-epiteliais. A quantidade de células calciformes aumentou nos animais D e DT. Conclui-se que a indução do DM pela STZ promoveu alterações nos extratos intestinais colônicos e hiperplasia de células calciformes. Por outro lado, o tratamento combinado dos antioxidantes não protegeu o cólon dos danos provocados pelo DM, evidenciando a necessidade de maior investigação das doses combinadas utilizadas no presente estudo.

PALAVRAS- CHAVE: Antioxidantes; Diabetes Mellitus; Intestino; Estresse Oxidativo.

MARONESI, Maria Luisa Pereira. **Morphometric analysis of the intestinal wall of diabetic rats treated with a combination of antioxidants.** Completion work for Bachelor's degree in Nursing, Federal University of Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, 2023.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is an endocrine disorder that, in chronic conditions, causes cellular and neural damage responsible for morphometric changes in intestinal tissues, changes in gastrointestinal absorption and characteristic symptoms. Hyperglycemia plays a large role in increasing oxidative stress responsible for cellular damage. Compounds rich in antioxidants have been used to prevent or treat DM as a strategy used to combat oxidative stress. The objective of this work was to evaluate the effects of combined treatment with L-glutamine, α -tocopherol and quercetin on the intestinal wall of diabetic rats. Adult rats divided into four groups were used: normoglycemic (N), treated normoglycemic (NT), diabetic (D) and treated diabetic (DT). DM was induced through streptozotocin and the treatment used was a combination of glutamine 200 mg/day, α -tocopherol 1g/kg and microencapsulated quercetin 100 mg/kg administered by gavage. At the end of 60 days, the animals were killed and the colon was subjected to histological techniques for morphometric and quantitative analysis of intestinal parameters. There was a decrease in the total wall in the NT and DT groups. The submucosa showed an increase in the D group and a decrease in the DT group in relation to the N animals. As for the mucous membrane, an increase was evident in the D and DT groups in relation to N and in the muscular layer of the mucosa there was atrophy in the NT groups, D and DT in relation to N. Animals D and DT demonstrated greater depth of the crypts in relation to animals N. An increase in the muscular tunica was noted in groups NT and DT and a decrease in group D. Animals D presented a smaller ganglionic area compared to N animals, and DT animals had a larger lymph node area compared to D animals. DT and NT animals had a reduction in the proportion of intraepithelial lymphocytes. The number of goblet cells increased in D and DT animals. It is concluded that the induction of DM by STZ promoted changes in colonic intestinal extracts and goblet cell hyperplasia. On the other hand, the combined treatment of antioxidants did not protect the colon from damage caused by DM, highlighting the need for further investigation of the combined doses used in the present study.

KEYWORDS: Antioxidants; Diabetes Mellitus; Intestine; Oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

AB pH 1	Alcian Blue pH 1,0
AB pH 2,5	Alcian Blue pH 2,5
AGEs	Produtos Finais da Glicação Avançada
CC	Células Caliciformes
D	Animais Diabéticos
DM	Diabetes Mellitus
DT	Animais Diabéticos Tratados
HE	Hematoxilina e Eosina
LIEs	Linfócitos Intraepiteliais
N	Animais Normoglicêmicos
NT	Animais Normoglicêmicos Tratados
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PKC	Proteína Quinase C
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
STZ	Estreptozotocina
TGI	Trato Gastrointestinal

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
METODOLOGIA	8
RESULTADOS	11
DISCUSSÃO	17
CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS	22

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) compreende um grupo de doenças heterogêneas, que têm em comum o aumento das concentrações de glicose no sangue (Harreiter; Roden, 2023). Constitui um distúrbio endócrino metabólico de grande prevalência na população, representando um problema de saúde pública. No ano de 2021, números alarmantes foram demonstrados, a Federação Internacional de Diabetes mostrou que cerca de 537 milhões de adultos (20-79 anos) vivem com o DM no mundo e 15,7 milhões de adultos (20-79 anos) são brasileiros (Federação Internacional de Diabetes, 2021).

É uma condição complexa e crônica que requer cuidados contínuos com estratégias multifatoriais de redução de risco além do controle da glicose (Elsayed *et al.*, 2023). A falta de controle glicêmico aumenta os riscos de desenvolvimento de comorbidades que afetam sistemas orgânicos responsáveis por funções críticas, sendo que alterações das funções gastrointestinais são comumente encontradas nos pacientes crônicos, inferindo diretamente na deterioração da qualidade de vida dos diabéticos. A neuropatia autonômica no diabetes demonstra que a participação do sistema nervoso entérico e mecanismos adjacentes como o estresse oxidativo estão relacionados com a fisiopatologia do DM e com as complicações gastrointestinais (Galvão-Alves; Souza, 2023).

A hiperglicemia causada pelo DM propicia a inflamação mediada pelo estresse oxidativo, causando aumento das citocinas pro-inflamatórias levando a danos em diversos órgãos, tendo um papel central nessa doença (Reis *et al.*, 2008). Sendo o estresse oxidativo o principal fator relacionado com a neuropatia diabética, os radicais livres decorrentes das vias moleculares causam prejuízo nas funções sensorial, motora e hormonal do trato gastrointestinal (TGI), gerando complicações como dor abdominal, pirose, diarreia, constipação, incontinência fecal, náusea, êmese e disfagia, associados a desordens da motilidade (Rodrigues; Motta, 2012).

Visto que há diferentes vias e mecanismos que provocam danos às células do TGI, diversas são as consequências nocivas para o sistema digestório. Não somente há alterações estruturais e funcionais dos tecidos do TGI, mas também alterações na inervação entérica, hiperplasia e hipertrofia da mucosa intestinal e aumento de células calciformes nas vilosidades constituindo uma forma de adaptação morfofuncional para proteção do intestino contra os efeitos crônicos do DM (Barreto *et al.*, 2023; Da Rosa *et al.*, 2015; Uranga-Ocio *et al.*, 2015; Chen; Zhao; Gregersen, 2012).

Atualmente, vem destacando-se a utilização de compostos antioxidantes para a compensação do mecanismo antioxidante endógeno atuando no tratamento das alterações

morfológicas e neuronais do intestino no DM (Barreto *et al.*, 2023). Diversos antioxidantes são relatados frequentemente, ganhando notoriedade a L-glutamina (Hermes-Uliana *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2016; Zanoni *et al.*, 2011), a vitamina E (Tronchini *et al.*, 2012) e a quercetina (Sehaber-Sierakowski *et al.*, 2021; Martins-Perles *et al.*, 2019) demonstrando eficácia na prevenção dos danos celulares causados pelo estresse oxidativo decorrente da hiperglicemia crônica. Essas substâncias demonstraram resultados promissores quando usadas de forma isolada, no entanto não existem estudos com a associação dos antioxidantes para avaliar a possibilidade de um efeito sinérgico no intestino. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento combinado de L-glutamina, α -tocoferol e quercetina microencapsulada na parede do cólon de ratos diabéticos.

METODOLOGIA

Obtenção dos Grupos de Estudo

Neste estudo, foram utilizados 22 ratos adultos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), variedade *albinus*, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEAE) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), sob parecer sob o parecer CEUA nº 073/2014.

Aos 86 dias de idade, os animais foram transferidos para o Biotério Setorial para adaptação ao novo ambiente, onde permaneceram alojados em caixas de polipropileno com dimensões 40x33x17 cm (comprimento, largura e altura) providas de bebedouro e comedouro, e mantidos em condições ambientais controladas de temperatura (22°C) e iluminação (ciclo 12 h claro/12 h escuro).

Após, os ratos com 90 dias de idade foram disponibilizados para o período experimental que teve duração de 60 dias. Para tal fim, os animais foram distribuídos em quatro grupos (n= 5 para N, NT e D; n=7 para DT), segundo os tratamentos a que foram submetidos: animais normoglicêmicos (N) e animais diabéticos induzidos pela estreptozotocina (D), os quais receberam ração balanceada padrão; animais normoglicêmicos tratados (NT) e animais diabéticos tratados (DT) que receberam tratamento de três antioxidantes: glutamina (200 mg/dia), α -tocoferol (1g/Kg) e quercetina microencapsulada (100 mg/Kg), com sete animais.

Indução do Diabetes Mellitus por Estreptozotocina

Os animais dos grupos D e DT foram submetidos a jejum prévio de quatorze horas, antes de serem submetidos à indução do DM tipo 1 através de injeção de estreptozotocina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) por via endovenosa (veia peniana), na dose de 35 mg/kg de peso corporal para indução de DM tipo 1. Após dois dias, foi confirmada a condição de DM com teste rápido por meio de fitas reagentes (Accu-Chek Active glucosímetro, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Alemanha). Após um período de 72 h de indução do DM, os ratos diabéticos com glicemia > 250 mg / dL foram utilizados para este estudo (Pereira *et al.*, 2011).

Tratamento dos Animais

Todos os animais receberam ração balanceada padrão Nuvital (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil) e água sem restrição. Nos animais dos grupos NT e DT o tratamento ocorreu através da administração de gavagem oral de L-glutamina na dose de 200 mg/dia, dissolvida em água, α -tocoferol na dose de 1g/Kg, dissolvido em óleo mineral e quercetina microencapsulada na dose de 100 mg/Kg, dissolvido em água, administrados isoladamente com diferença de uma hora entre cada antioxidante, na seguinte ordem: gavagem com quercetina, gavagem com L-glutamina e gavagem com α -tocoferol. As doses foram escolhidas a partir de estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa e por estudos da literatura. Os animais dos grupos N e D receberam apenas veículo sem os antioxidantes.

Para a preparação de microcápsulas sem quercetina, dispersões aquosas de caseína (USP, CP Kelco, Limeira, Brasil) e pectina (Kauffman & Co., Kehl, Alemanha) (8,34%, p/v) foram realizadas sob agitação mecânica constante. As microcápsulas inertes e carregadas com quercetina foram obtidas a partir de dispersão aquosa de pectina/caseína e depois, foram secas utilizando um secador por pulverização (LabPlant, SD-05) (Freitas *et al.*, 2007). As microcápsulas de pectina e caseína foram consideradas inertes quando avaliadas *in vivo* por meio da sua distribuição no trato gastrointestinal (Guazelli *et al.*, 2013).

Eutanásia e coleta de amostras

Ao final do experimento experimental, os animais foram pesados e na sequência anestesiados com tiopental (40 mg/kg) (Laboratório Abbot, Chicago, IL, EUA) por via intraperitoneal. O sangue coletado por punção cardíaca para a realização da dosagem de glicose sanguínea (método-glicose oxidase, kit reagente Laborclin). Posteriormente, os animais foram mortos por deslocamento cervical e sob o aproveitamento da anestesia. Na

necropsia, o segmento ascendente do cólon foi removido, lavado e processado histologicamente.

Processamento Histológico

O material coletado foi segmentado em anéis de dois centímetros do cólon ascendente, abertos pela borda mesocólica, fixados em isopor com auxílio de espinhos e colocados em fixador Bouin por 6 horas. Para obtenção do material, os segmentos intestinais emblocados em parafina foram sujeitos a cortes transversais semi-seriados de 4 μ m, realizados em micrótomo (KEDEE, semi-automático, KD-3358, China) e dispostos em lâminas de vidro. Os cortes passaram por baterias de desparafinização e hidratação e em seguida corados com: Hematoxilina e Eosina (HE) para morfometria da parede intestinal e quantificação dos linfócitos intraepiteliais, Ácido Periódico de Schiff (PAS) para quantificação de células caliciformes secretoras de mucinas neutras e morfometria da área ganglionar mientérica, Alcian Blue pH 1 (AB pH 1) para quantificação de células caliciformes (CC) secretoras de sulfomucinas e Alcian Blue pH 2,5 (AB pH 2,5) para sialomucinas.

Análise de parede intestinal

Para a análise da parede intestinal foram utilizados os cortes transversais semi-seriados corados em HE, a partir de imagens capturadas por intermédio de uma câmera digital (USB 2.0 motic) acoplada a um microscópio óptico Zeiss Prima Star na objetiva de 20x. Foram realizadas medidas da parede total, da túnica submucosa, da túnica muscular, da túnica da mucosa, da muscular da mucosa e da profundidade e largura das criptas. Por meio do software de análise de imagens Motic Images Plus versão 2.0 foram obtidas 50 medidas por animal, para cada parâmetro, distribuídas uniformemente em toda circunferência intestinal de cada rato.

Análise da área do gânglio

Imagens histológicas das lâminas coradas com PAS de 15 plexos neurais por animal foram realizadas em microscópio (Zeiss Prima Star) em aumento de 40x. As capturas dirigiam-se para a camada muscular, mais especificamente entre a circular interna e a longitudinal externa, onde foram localizados os gânglios mientéricos. Utilizando o software Motic Images Plus versão 2.0, a área dos gânglios foi delimitada e os resultados foram expressos como a área média dos perfis ganglionares do plexo mientérico em μm^2

Quantificação de células caliciformes (CC) e linfócitos intra-epiteliais (LIE)

A contagem de CC nas técnicas PAS, AB pH 1 e AB pH 2 e LIE na técnica HE consecutivamente com 2500 enterócitos diretamente no microscópio (Leica DM500) na objetiva de 20x. Este procedimento permitiu o cálculo do número de células caliciformes/ 100 células epiteliais e LIEs/100 células epiteliais (Hernandes; Pereira; Alvares, 2003; Chott *et al.*, 1997).

Tratamento estatístico

Os dados foram submetidos ao teste D'Agostino-Pearson ou de Shapiro-Wilk para verificar o tipo de distribuição. Dados com distribuição normal foram apresentados como média \pm desvio padrão. Neste caso, para comparar os grupos, foi utilizado a análise de variância (ANOVA): seguida pelo teste de Tukey. Dados com distribuição livre foram comparados pelo teste de kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Em todos os testes estatísticos, valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.01.

RESULTADOS

Dados fisiológicos

Ao final do experimento os animais diabéticos (grupos D e DT) apresentaram diminuição da massa corporal em relação aos animais normoglicêmicos ($p < 0,05$). Os animais diabéticos e diabéticos tratados obtiveram glicemia final aumentada quando comparados com os animais normoglicêmicos ($p < 0,05$), com médias de $433,80 \pm 32,47$ e $457,40 \pm 11,14$, respectivamente. Houve aumento no consumo de ração e água nos grupos NT, D e DT em relação aos animais normoglicêmicos ($p < 0,05$), e maior nos animais diabéticos tratados em relação aos animais diabéticos ($p < 0,05$; Figura 1).

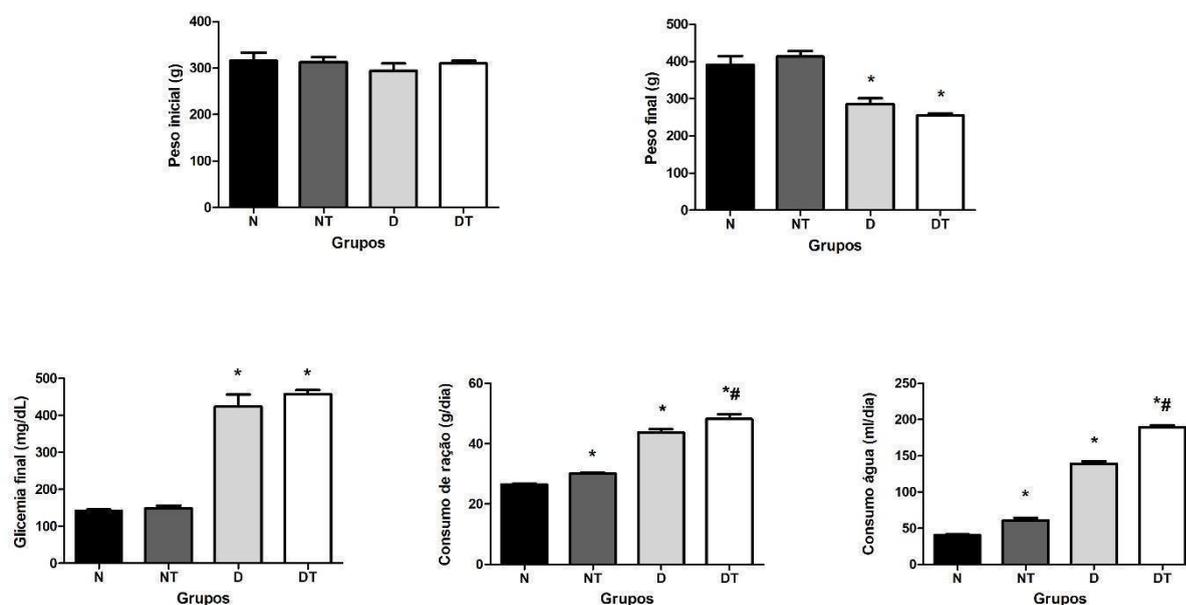


Figura 1- Parâmetros fisiológicos do peso inicial (g), peso final (g), glicemia final (GF/mg/dL), consumo de ração (g/dia) e consumo de água (mL/dia) de ratos dos grupos normoglicêmico (N), normoglicêmico tratado com glutamina, α -tocoferol e quercetina (NT), diabético induzido pela estreptozotocina (D) e diabético induzido pela estreptozotocina e tratado com glutamina, α -tocoferol e quercetina (DT). Os valores médios seguidos por *comparado ao grupo N e # comparado ao grupo D são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. $n = 5$ ratos para os grupos N, NT e D; $n = 7$ para o grupo DT.

Análise da parede intestinal

Verificou-se que a espessura da parede intestinal total dos grupos tratados NT e DT foram menores em comparação com o grupo N, e os animais DT apresentaram uma medida menor de parede total quando comparados com os animais D ($p < 0,05$). Na túnica submucosa, observou-se aumento do grupo D em relação a N e diminuição do grupo DT em relação aos animais D ($p < 0,05$). Quanto à túnica mucosa, ficou evidenciado aumento nos grupos D e DT em relação a N ($p < 0,05$) e na camada muscular da mucosa houve diferenças significativas nos grupos NT, D e DT em relação a N ($p < 0,05$). No que tange as criptas da mucosa intestinal, os animais D demonstraram maior profundidade das criptas em relação aos animais N, os animais DT maior profundidade que os animais D e os animais NT obtiveram menor largura das criptas em relação ao N ($p < 0,05$; Figuras 2 e 3).

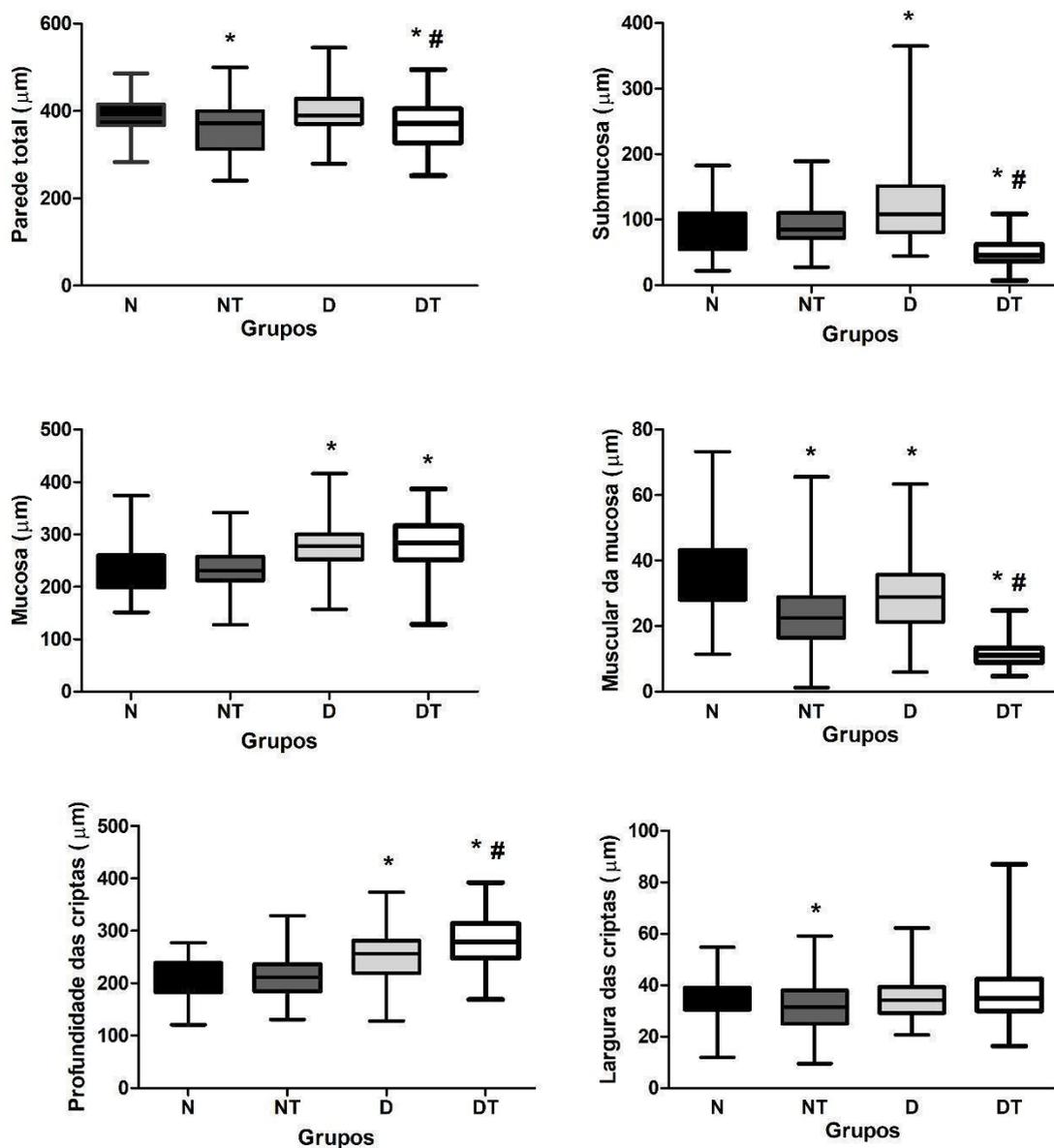


Figura 2 – Medidas (μm) da parede total, tela submucosa, muscular da mucosa, túnica mucosa, profundidade e largura das criptas do cólon ascendente de ratos dos grupos normoglicêmico (N), normoglicêmico tratado com glutamina, α -tocoferol e quercetina (NT), diabético induzido pela estreptozotocina (D) e diabético induzido pela estreptozotocina e tratado com glutamina, α -tocoferol e quercetina (DT). * $p < 0,001$ comparado ao grupo N e # $p < 0,001$ comparado ao grupo D. Os grupos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Os dados são apresentados em gráficos com valores mínimos e máximos, mediana e intervalo interquartil. $n = 5$ ratos para os grupos N, NT e D; $n = 7$ para o grupo DT.

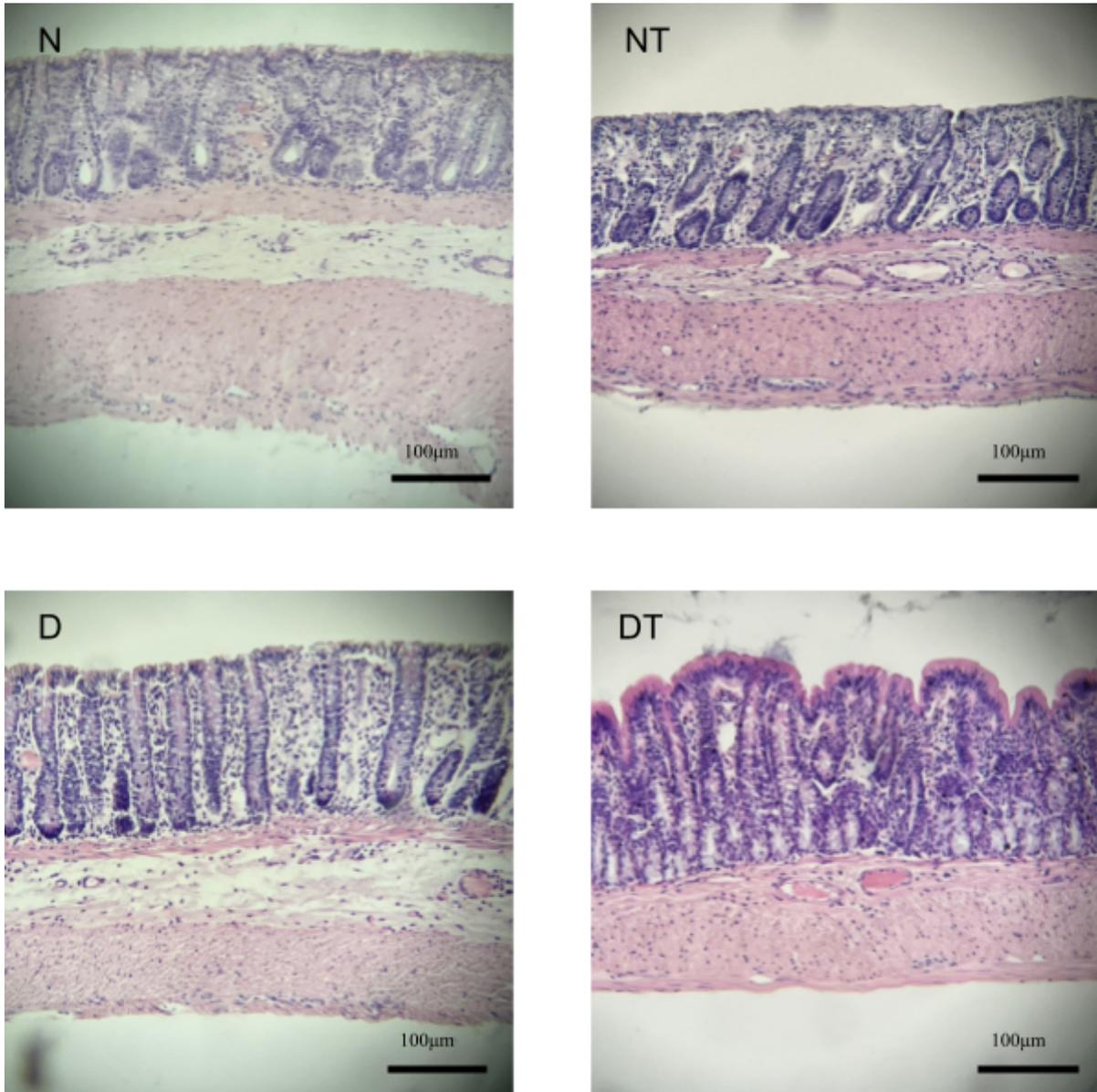


Figura 3- Fotomicrografia de cortes transversais o cólon ascendente de ratos dos grupos normoglicêmico (N), normoglicêmico tratado com glutamina, α -tocoferol e quercetina (NT), diabético induzido pela estreptozotocina (D) e diabético induzido pela estreptozotocina e tratado com glutamina, α -tocoferol e quercetina (DT) corados por HE. Barra: 100µm.

Análise da túnica muscular e gânglio mientérico

Acerca da túnica muscular notou-se aumento da espessura nos grupos NT e DT e diminuição no grupo D quando comparado com os animais normoglicêmicos, houve um aumento significativo dos animais DT em relação aos animais D ($p < 0,05$). Os animais D apresentaram uma área ganglionar menor em relação aos animais N, e os animais DT obtiveram maior área ganglionar em comparação com os animais D, com médias de áreas ganglionares de 976.0 e 702.2, respectivamente ($p < 0,05$; Figura 4).

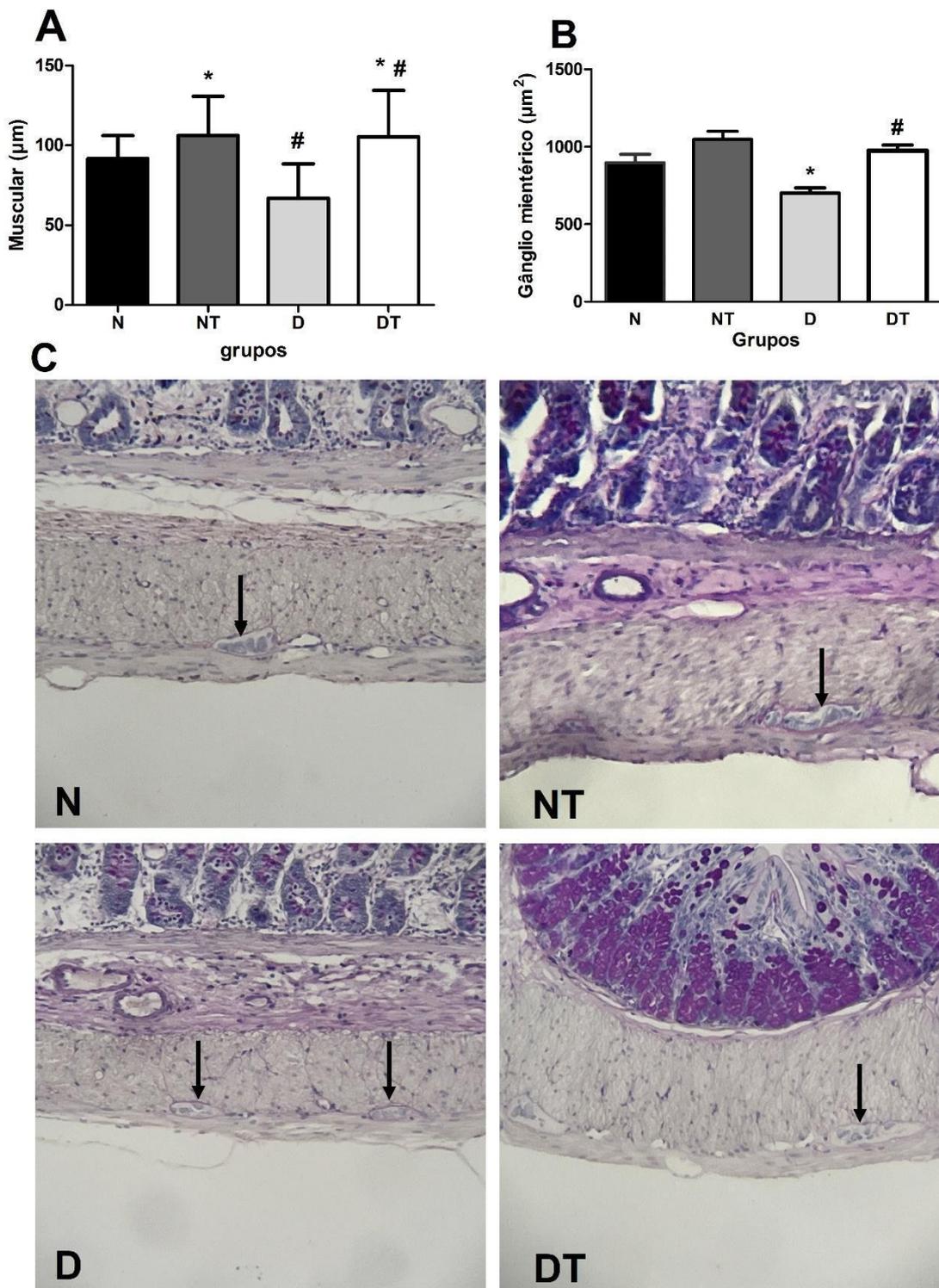


Figura 4 – Medidas da túnica muscular (μm) (A) e da área de gânglios mientéricos (μm^2) (B) do cólon ascendente de ratos dos grupos normoglicêmico (N), normoglicêmico tratado com glutamina, α -tocoferol e quercetina (NT), diabético induzido pela estreptozotocina (D) e diabético induzido pela estreptozotocina e tratado com glutamina, α -tocoferol e quercetina (DT). # $p < 0,05$ comparado ao grupo D. Os grupos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Os dados são apresentados em gráficos com valores máximos e intervalo interquartil. $n = 5$ ratos para os grupos N, NT e D; $n = 7$ para o grupo DT.

(C) Fotomicrografia de cortes transversais do cólon ascendente corados por PAS. Setas indicam gânglios mientéricos.

Quantificação de linfócitos intra-epiteliais e células caliciformes

Na quantificação dos linfócitos intraepiteliais o grupo D não demonstrou alteração significativa e os grupos NT e DT tiveram menores quantidades de linfócitos intra-epiteliais comparados ao grupo N ($p < 0,05$). Quanto às células caliciformes, as secretoras de mucinas neutras (PAS) apresentaram maior proporção nos grupos D e DT em relação ao grupo N ($p < 0,05$), as secretoras de sulfomucinas (AB pH 1,0) apresentaram aumento significativo nos animais D em relação a N e diminuição na quantidade de CC nos animais DT quando comparados aos D ($p < 0,05$) e as secretoras de sialomucinas tiveram um aumento significativo no grupo DT em relação ao grupo N ($p < 0,05$; Figura 5).

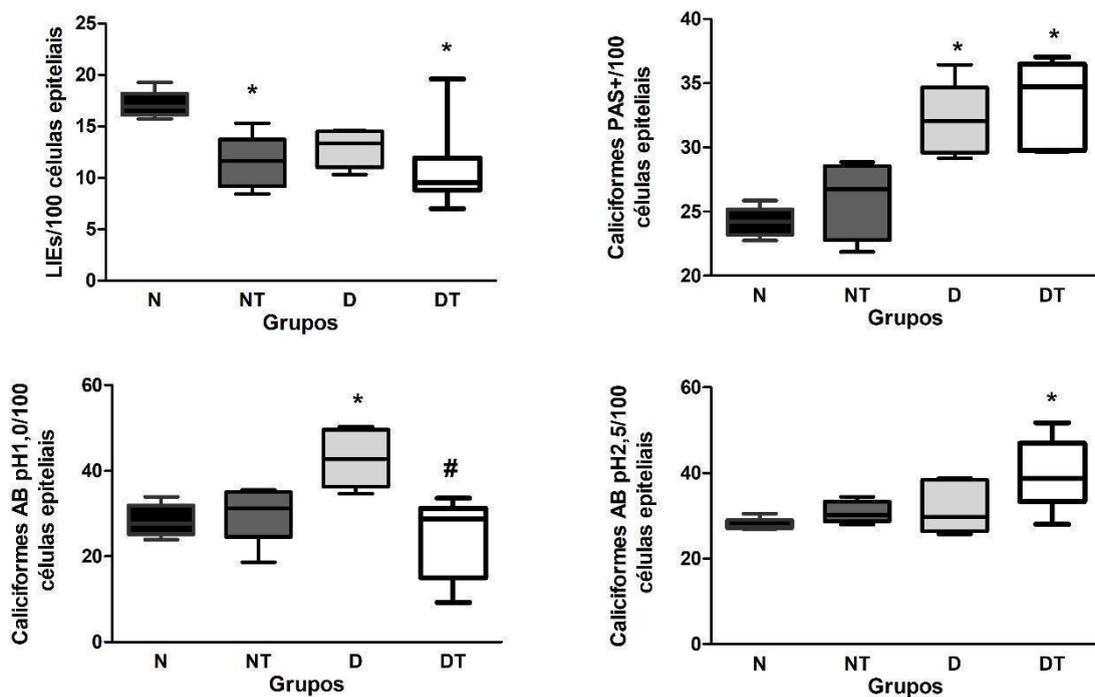


Figura 5 – Proporção de linfócitos intra-epiteliais(LIEs)/100 células epiteliais e células caliciformes/100 células epiteliais marcadas por Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Alcian Blue (AB) pH 1,0 e pH 2,5 do cólon ascendente de ratos dos grupos normoglicêmico (N), normoglicêmico tratado com glutamina, α -tocoferol e quercetina (NT), diabético induzido pela estreptozotocina (D) e diabético induzido pela estreptozotocina e tratado com glutamina, α -tocoferol e quercetina (DT). Os valores médios seguidos por *comparado ao grupo N e # comparado ao grupo D são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey $p < 0,05$. $n = 5$ ratos para os grupos N, NT e D; $n = 7$ para o grupo DT.

DISCUSSÃO

O modelo experimental de indução de DM pela estreptozotocina (SZT) é bem caracterizado em roedores, mimetiza os efeitos periféricos relacionados ao DM do tipo 1 (Shehata *et al.*, 2017). A SZT destrói as células beta pancreáticas, causando prejuízo no metabolismo da glicose e diminuição ou extinção da secreção de insulina no animal (Rodrigues *et al.*, 2019). Dessa forma, os animais dos grupos diabéticos (D e DT) tiveram níveis glicêmicos superiores a 250 mg/dL, confirmando o estabelecimento do modelo experimental (Pereira *et al.*, 2011). Além disso, ao longo do experimento os animais diabéticos apresentaram manifestações clínicas comumente encontradas no DM como poliúria, polidipsia e perda de peso apesar da polifagia (Gross *et al.*, 2002). Isto ocorre devido às alterações osmóticas plasmáticas causadas pela hiperglicemia que aumentam a excreção de água, estimula a restauração do equilíbrio osmótico provocando sede excessiva (polidipsia), ademais a deficiência de insulina altera o metabolismo dos lipídios e proteínas gerando um desequilíbrio energético que aumenta o apetite (polifagia) concomitante com a perda de peso devido à proteólise e lipólise considerável (Zanoni *et al.*, 2011).

Vale ressaltar que o tratamento combinado com L-glutamina, α -tocoferol e quercetina não interferiu na concentração de glicemia nos grupos tratados, mantendo o quadro de diabetes no grupo DT, no entanto, promoveu aumento no consumo de ração, água e redução na massa corporal. Resultados semelhantes aos descritos foram encontrados na literatura com a utilização dos antioxidantes quercetina (Gomes *et al.*, 2014), glutamina (Da Rosa *et al.*, 2015) e vitamina E (Roldi *et al.*, 2009) isolados, como também quando utilizados de forma associada (Da Purificação *et al.*, 2022). A influência dos antioxidantes no aumento do consumo de ração e água nos animais hípidos observada no grupo NT ainda é desconhecido.

Apesar da manutenção na espessura da parede total, os estratos que compõem a parede colônica foram alterados pela indução do DM pela STZ. A hipertrofia da mucosa intestinal e de seus componentes evidenciada nos animais diabéticos está em consonância com outros modelos experimentais (Chen; Zhao; Gregersen, 2012; Da Rosa *et al.*, 2015), relacionando-se com a diminuição absorptiva intestinal na condição de hiperglicemia (D'Addio *et al.*, 2015) e a dificuldade de captação de glicose na ausência da insulina, atribuindo uma atividade compensatória a obtenção de nutrientes ao aumento da túnica mucosa (Mayhew; Carson, 1989). Além disso, o aumento no tamanho das criptas, pode estar relacionado ao maior consumo de ração e água (Santi-Rampazzo *et al.*, 2015) e a necessidade de aminoácidos para a síntese proteica utilizada na proliferação celular nas criptas intestinais pode explicar a diminuição da muscular da mucosa (Barreto *et al.* 2023).

Por outro lado, o DM provocou atrofia na túnica muscular, sendo que a diminuição dessa túnica é consequência da perda da densidade neuronal (Roldi *et al.*, 2009) principalmente de neurônios nitrérgicos relacionados a diminuição do tônus muscular associados a motilidade intestinal e a maior dimensão do cólon (Miranda Neto *et al.*, 2017). Outro fator associado à diminuição da túnica muscular é a inibição da síntese proteica ocasionada pela ausência de insulina, esse processo aumenta a biodisponibilidade de aminoácidos que são utilizados como fonte energética (Barreto *et al.*, 2023). Divergindo do presente estudo, alguns trabalhos revelam que os animais ao serem submetidos ao modelo de diabetes desenvolvem hipertrofia da túnica muscular (Zanoni *et al.*, 1997; Zhao; Yang; Gregersen, 2003).

A atrofia da túnica muscular foi acompanhada por diminuição da área ganglionar nos animais diabéticos, sugerindo alterações neuronais provocadas pela exposição aos altos níveis glicêmicos e pela remodelação após aos danos teciduais, indicando degeneração da inervação mientérica responsável pelos distúrbios da motilidade gastrointestinal (Furlan; Molinari; Miranda Neto, 2002). Aspectos como a desidratação celular em função da desregulação osmótica e o dano celular causado pela hiperglicemia (Stevens; Feldman; Greene, 1995), alteram o metabolismo do tecido nervoso e estão associados a redução da área ganglionar no diabetes (Souza; Furlan, 2011). A hiperglicemia crônica desencadeia aumento nos produtos finais de glicação avançada e ativação das vias do poli-ol, da hexosamina e proteína quinase C responsáveis pela exacerbação de mediadores inflamatórios, e consequentemente, alteração do estado oxidativo gerando dano celular (Vicente *et al.*, 2004; Brownlee, 2005; Sehaber-Sierakowski *et al.*, 2021).

Os linfócitos intraepiteliais, importantes componentes na regulação homeostática de defesa intestinal, normalmente mostram-se aumentados em processos infecciosos e inflamatórios regulando a resposta imune no intestino (Sheridan; Lefrançois, 2010). Não foi evidenciado linfocitose intraepitelial nos animais diabéticos, corroborando com esse achado Cabral *et al.* (2009) não encontrou diferença na densidade de linfócitos duodenais entre pacientes diabéticos tipo 1 e controles.

Outro achado observado pela indução do DM foi a alteração no perfil secretório de mucinas neutras e ácidas, avaliados pela hiperplasia de células caliciformes PAS e AB, respectivamente. Entende-se que o aumento na população das células caliciformes também é uma adaptação morfofuncional para proteção da mucosa contra o DM (Uranga-Ocio *et al.*, 2015). A camada de muco que recobre o epitélio é um componente importante em mecanismos de defesa do órgão por desempenhar proteção mecânica, química e biológica, e

manter a homeostase do órgão. O muco configura uma importante interface entre o conteúdo luminal e o tecido do hospedeiro, que fornece um habitat para a microbiota intestinal e protege o epitélio intestinal (Etienne-Mesmin *et al.*, 2019; Paone; Cani, 2020). Estudos revelam que o aumento da produção de mucinas pela mucosa intestinal é um importante fator desencadeador do quadro de diarreia do DM (Remedio *et al.*, 2012).

A associação dos antioxidantes L-glutamina, α -tocoferol (vitamina E) e quercetina não promoveu proteção na parede do cólon contra os efeitos do DM, ainda a parede colônica foi atrofiada com o tratamento combinado. A quantidade de antioxidantes administrados pode ter alterado as necessidades endógenas do sistema antioxidante (Cerqueira; Medeiros; Augusto, 2007) e a suplementação de L-glutamina ocasiona aumento da atividade enzimática da glutaminase, a maior biodisponibilidade de L-glutamato promove efeito neurotóxicos desregulando a proliferação celular no intestino que pode ter contribuído para a hipertrofia da mucosa e da profundidade das criptas (Sengul *et al.*, 2011; Da Rosa *et al.*, 2015) como mecanismo compensatório para atrofia evidenciada na submucosa.

A submucosa do cólon apresenta grande importância, já que é responsável pela estruturação do intestino grosso, portanto alterações morfológicas nesta região podem prejudicar a funcionalidade deste órgão como um todo (Remedio *et al.*, 2012). A atrofia da túnica submucosa nos animais DT pode estar relacionada ao aumento da glicemia e a disfunção da distensão intestinal. Os altos níveis de glicemia propiciam a glicação de proteínas desencadeando a perda de fibras colágenas (Sadowska-Bartosz; Bartosz, 2015; Da Rosa *et al.*, 2015). Possivelmente a combinação e/ou a quantidade de antioxidantes aumentou a lipoperoxidação apresentando efeitos pró-oxidantes (Iwanaga *et al.*, 2018). Corroborando com esses achados, Purificação *et al.* (2022) evidenciou aumento de estresse oxidativo sistêmico com a combinação de quercetina, glutamina e alfa-tocoferol em animais diabéticos tratados.

O aumento no consumo de ração nos animais DT pode ter influenciado na hipertrofia da túnica mucosa. Além disso, alterações na túnica submucosa e em sua inervação causam prejuízos na regulação da proliferação celular contribuindo para o aumento da mucosa intestinal (Zanoni; Pereira, 2008). Apesar dos relatos da literatura demonstrarem aumento da muscular da mucosa frente a utilização de bioextratos antioxidantes (Barreto *et al.*, 2023), o presente estudo demonstrou que o tratamento combinado promoveu atrofia. Mecanismos podem ser propostos para elucidar a diminuição da muscular da mucosa, relacionando-se a vitamina E que além de desempenhar ação de prevenção da oxidação de colesterol pode atuar em funções não antioxidantes promovendo a inibição da proliferação de células musculares

lisas (Cerqueira; Medeiros; Augusto, 2007), como demonstrado nas células da parede arterial em modelos animais (Munteanu; Zingg; Azzi, 2004; Azzi, 2004).

Efeitos neuroprotetores dos antioxidantes quercetina (Sehaber-Sierakowski *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2017), L-glutamina (Hermes-Uliana *et al.*, 2014; Zanoni *et al.*, 2011) e vitamina E (Roldi *et al.*, 2009) têm sido demonstrados, apresentando aumento da área dos corpos celulares nos animais diabéticos e efeitos neuroprotetores através do restabelecimento da área neuronal (Sehaber-Sierakowski *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2017; Hermes-Uliana *et al.*, 2014; Zanoni *et al.*, 2011; Roldi *et al.*, 2009). Entretanto, no presente estudo a área ganglionar dos animais diabéticos tratados com a associação de antioxidantes foi restabelecida aproximando-se da área dos animais normoglicêmicos, possivelmente a diminuição da área ganglionar nos animais diabéticos está relacionada com a diminuição dos corpos celulares e/ou ao dano celular (Souza; Furlan, 2011). Sugere-se que o tratamento promoveu efeito neurotrófico nos animais DT, evidenciando a necessidade de maior investigação para a comprovação de efeito neuroprotetor.

Em conformidade com a área ganglionar, os animais DT obtiveram aumento da túnica muscular. Tal fato pode estar atrelado a depleção proteica característica do DM e a deficiência de aminoácidos, que com a suplementação de L-glutamina favorece a síntese de proteína muscular (Romano; Borges, 2007) sendo utilizado em altas taxas para o aceleração da divisão celular (Garcia Junior; Pithon-Curi; Curi, 2000; Iorio; Avellaneda, 2016).

Além disso, a hiperplasia de células calciformes observados nos animais DT, podem alterar a lubrificação intestinal com a presença de mais muco, comprometendo a função celular pelas alterações na absorção de água e eletrólitos, agravando a condição clínica de diarreia característica do DM (Remedio *et al.*, 2012). O aumento de mucinas neutras (PAS+) em detrimento da redução de mucinas ácidas (AB) promove maior proteção intestinal, pois o muco neutro apresenta-se mais denso que o muco ácido, num meio aquoso, atribuindo-se ao primeiro uma maior capacidade de proteção e lubrificação (Shiraishi *et al.*, 2009).

O aumento do estresse oxidativo e a insuficiência na capacidade do sistema antioxidante no diabetes implicam nas complicações típicas do DM (Ferreira; Belém; Oda, 2015). As principais fontes de moléculas reativas ao oxigênio incluem as vias moleculares: via de produtos finais de glicação avançada (AGEs), via de ativação de PKC (Proteína Quinase C), via do polioliol e via da hexosamina. Comumente, a via de oxidação da glicose (glicólise) no DM possui uma produção aumentada de ROS, sendo responsável pela ativação das demais vias moleculares (Reis *et al.*, 2008; Ighodaro, 2018). A citotoxicidade das espécies reativas de oxigênio e dano celular causado induzem respostas imunes mediadas por células

epiteliais, macrófagos e células dendríticas. A capacidade antioxidante reduz o estresse oxidativo, intervindo nos mecanismos de sinalização celular reduzindo a resposta inflamatória (Ferreira; Belém; Oda, 2015), relacionando-se a diminuição dos linfócitos intraepiteliais nos animais DT e NT. Nutrientes e bioativos como compostos fenólicos, carotenóides, vitamina C, vitamina E e ácidos graxos demonstram grande poder modulatório no processo inflamatório (Valente *et al.*, 2014). Nesse sentido, Purificação *et al.* (2022) evidenciou que o uso combinado de quercetina, glutamina e alfa-tocoferol em animais diabéticos provocou aumento na dosagem da IL-10, uma citocina anti-inflamatória que inibe a ação de outras citocinas pró-inflamatórias.

Ressalta-se que a administração de antioxidantes depende da necessidade endógena do organismo, no caso dos animais NT o tratamento combinado de antioxidantes promoveu danos celulares resultando em atrofia da parede total, da muscular da mucosa, diminuição da largura das criptas e hipertrofia da muscular. Estudos experimentais revelam que o desequilíbrio entre os fatores oxidantes e antioxidantes resulta em oxidação de biomoléculas e um desequilíbrio homeostático causando dano contra células e tecidos (Halliwell; Whiteman, 2004). No caso do α -tocoferol, em ambientes com baixos níveis de radicais livres, pode ocorrer a interação com ácidos graxos regenerando o α -tocoferol gerando um radical lipídico (L*) que reage com moléculas de oxigênio formando radicais peróxil lipídicos (LOO*) que interagem novamente com α -tocoferol originando hidroperóxidos lipídicos (LOOH) reiniciando o ciclo de formação de radicais livres aumentando o estresse oxidativo, promovendo um efeito pró-oxidante (Upston; Terentis; Stocker, 1999; Martins *et al.*, 2004). Além disso, a quercetina pode reagir com ferro e tornar-se uma biomolécula pró-oxidante (Gaspar *et al.*, 1993; Cerqueira; Medeiros; Augusto, 2007).

CONCLUSÃO

Conclui-se que a indução do DM pela STZ promoveu hipertrofia da túnica mucosa e da tela submucosa e atrofia da túnica muscular, no entanto mesmo com estas alterações nos extratos colônicos a espessura da parede total do cólon foi mantida. Ainda, houve hiperplasia de células caliciformes PAS e AB pH 1,0 o que pode desencadear maiores produções de mucinas provendo maior proteção e lubrificação intestinal o que pode agravar o quadro de diarreia do DM, o desenvolvimento de novas pesquisas como bioquímica e biologia molecular são importantes para confirmar esta relação. Por outro lado, apesar da associação de L-glutamina, α -tocoferol e quercetina promover proteção da área ganglionar mientérica, provocou atrofia da espessura da parede total e da submucosa e hipertrofia da túnica mucosa

e muscular, além de redução dos LIE e alterações quantitativas de células caliciformes, evidenciando a necessidade de maior investigação das doses combinadas, a fim de reduzir o estresse oxidativo sem que haja sobrecarga do sistema antioxidante endógeno desencadeando efeitos pró-oxidantes.

REFERÊNCIAS

AZZI, A. The role of alpha-tocopherol in preventing disease. **European journal of nutrition**, vol. 43 n.1, p. I/18–I/25, 2004.

BARRETO, I. I. *et al.* Avaliação morfológica do cólon proximal de ratos diabéticos suplementados com extrato de agaricus blazei murrill. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 27, n. 7, p. 3604–3623, 2023.

CABRAL, V. L. R. *et al.* Intraepithelial lymphocytes in duodenum from Brazilian adolescents with type 1 diabetes. Influence of Helicobacter pylori. **Pediatric Diabetes**, v. 10, n. 5, p. 316-320, 2009.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. de; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, vol. 30, n. 2, pgs. 441-449, 2007.

CHOTT, A. *et al.* Intraepithelial lymphocytes in normal human intestine do not express proteins associated with cytolytic function. **American Journal of Pathology**, v. 151, n. 2, p. 435-442, 1997.

D'ADDIO, F. *et al.* Circulating IGF-I and IGFBP3 levels control human colonic stem cell function and are disrupted in diabetic enteropathy. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 4, p. 486-498, 2015.

DA PURIFICAÇÃO, N. R. C. *et al.* Combined use of systemic quercetin, glutamine and alpha-tocopherol attenuates myocardial fibrosis in diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 151, p. 113131, 2022.

DA ROSA, C. V. *et al.* Supplementation with L-Glutamine and L-Alanyl-L-Glutamine Changes Biochemical Parameters and Jejunum Morphophysiology in Type 1 Diabetic Wistar Rats. **PloS one**, v.10, n. 12, e0143005, 2015.

ELSAIED, N. A. *et al.* Introduction and methodology: standards of care in diabetes—2023. **Diabetes care**, v. 46, n. Supplement_1, p. S1-S4, 2023.

ETIENNE-MESMIN, L. *et al.* Experimental models to study intestinal microbes–mucus interactions in health and disease. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 5, p. 457–489, 2019.

FERREIRA, P. E. B.; BELÉM, M. D. O.; ODA, J. Y. O efeito do uso de antioxidantes na prevenção e tratamento da neuropatia diabética no sistema nervoso entérico. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 19, n. 2, 2015.

FREITAS, O. *et al.*, 2007. **Processo de preparação de complexos biodegradáveis, complexos biodegradáveis assim obtidos e método para avaliação da eficiência mastigatória.** 2007. **Brazil Patent, PI**, p. 0700557-1.

FURLAN, M. M. D. P., MOLINARI, S. L., MIRANDA NETO, M. H. Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 60, p. 576-581, 2002.

GALVÃO-ALVES, J.; SOUZA, B. C. DE. Manejo das complicações gastroenterológicas no paciente diabético. **Medicina, Ciência e Arte**, v. 2, n. 1, p. 16–41, 31 jul. 2023.

GARCIA JUNIOR, J. R.; PITHON-CURI, T. C.; CURI, R. Consequências do exercício para o metabolismo da glutamina e função imune. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 6, n. 3, p. 99-107, 2000.

GASPAR, J. *et al.* Quercetin and the mutagenicity of wines. **Mutagenesis, Oxford**, v.8, n.1, p.51-55, 1993.

GOMES, I. B. S. *et al.* Renoprotective, anti-oxidative and anti-apoptotic effects of oral low-dose quercetin in the C57BL/6J model of diabetic nephropathy. **Lipids in health and disease**, v. 13, p. 1-10, 2014.

GROSS, J. L. *et al.* Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 16–26, 2002.

GUAZELLI, C. F. S. *et al.* Quercetin-loaded microcapsules ameliorate experimental colitis in mice by anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. **Journal of natural products**, v. 76, n. 2, p. 200–208, fev. 2013.

HARREITER, J.; RODEN, M. Diabetes mellitus–Definition, Klassifikation, Diagnose, Screening und Prävention (Update 2023). **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 135, n. Suppl 1, p. 7-17, 2023.

HERMES-ULIANA, C. *et al.* Is L-glutathione more effective than L-glutamine in preventing enteric diabetic neuropathy? **Digestive Diseases and Sciences**, v. 59, p. 937–948, 2014.

HERNANDES, L.; PEREIRA, L. C.; ALVARES, E. P. Goblet cell number in the ileum of rats denervated during suckling and weaning. **Biocell**. v.27, n. 3, p. 347-351, 2003.

IGHODARO, O. M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 656-662, 2018.

IORIO, M. C.; AVELANEDA, E. F. Glutamina como aminoácido condicionalmente essencial para aumento do sistema imune. **Unoesc & Ciência - ACBS Joaçaba**, v. 7, n. 2, p. 175-180, 2016.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas 10th edition**, 2021.

IWANAGA, C. C. *et al.* In vitro antioxidant potential and in vivo effects of Schinus terebinthifolia Raddi leaf extract in diabetic rats and determination of chemical composition by HPLC-ESI-MS/MS. **Natural product research**, v. 33, n. 11, p. 1655–1658, 2018.

MARTINS, C. M. *et al.* O paradoxo do papel da vitamina E na iniciação e progressão da aterosclerose e sua correlação com os radicais livres. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 14, n. 2, p. 113–116, 2004.

MARTINS-PERLES, J. V. C. *et al.* Quercetin increases bioavailability of nitric oxide in the jejunum of euglycemic and diabetic rats and induces neuronal plasticity in the myenteric plexus. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 227, n. 102675, 2020.

MIRANDA NETO, M. H. *et al.* Evaluation of the nitrergic myenteric neurons in the distal colon of diabetic rats treated with acetyl-L-carnitine. **Journal of Morphological Sciences**, v. 21, n. 2, p. 0-0, 2017.

MUNTEANU, A., ZINGG, J. M., AZZI, A. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E--myth or reality?. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 8, n. 1, p. 59–76, 2004.

PAONE, P.; CANI, P. D. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? **Gut**, v. 69, n. 12, p. 2232–2243, 1 dez. 2020.

PEREIRA, R.V. F. *et al.* L-glutamine supplementation prevents myenteric neuron loss and has gliatrophic effects in the ileum of diabetic rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 12, p. 3507–3516, 2011.

PEREIRA, R. V. F. *et al.* Differential effects in CGRPergic, nitrergic, and VIPergic myenteric innervation in diabetic rats supplemented with 2% L-glutamine. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 88, n. 1, p. 609–622, 2016.

REIS, J. S. *et al.* Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 7, p. 1096-1105, 2008.

REMEDIO, R. N. *et al.* Morphological analysis of colon goblet cells and submucosa in type I diabetic rats submitted to physical training. **Microscopy Research and Technique**, v.75, n. 6, p.821-828, 2012.

RODRIGUES, M. L. C.; MOTTA, M. E. F. A. Mecanismos e fatores associados aos sintomas gastrointestinais em pacientes com diabetes melito. **Jornal de Pediatria (Rio J)**, v. 88, n. 1, p. 17-24, 2012.

RODRIGUES, L. *et al.* Streptozotocin causes acute responses on hippocampal S100B and BDNF proteins linked to glucose metabolism alterations. **Neurochemistry International**, v. 128, p. 85-93, 2019.

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

ROMANO, L.; BORGES, I. P. A suplementação de glutamina não reverte a imunossupressão induzida pelo exercício. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, v. 1, n. 1, p. 65-78, 2007.

SADOWSKA-BARTOSZ, I., BARTOSZ, G. Prevention of protein glycation by natural compounds. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 3309-3334, 2015.

SANT'ANA, D. M. *et al.* Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 93, n. 4, p. 279-286, 2012.

SEHABER-SIERAKOWSKI, C. C. *et al.* Protective effects of quercetin-loaded microcapsules on the enteric nervous system of diabetic rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 230, e102759, 2021.

SENGUL, G. *et al.* Neuroprotective effect of ACE inhibitors in glutamate-induced neurotoxicity: rat neuron culture study. **Turkish neurosurgery**, vol. 21, n. 3, p. 367-371, 2011.

SHERIDAN, B. S.; LEFRANÇOIS, L. Intraepithelial Lymphocytes: To Serve and Protect. **Current Gastroenterology Reports**, vol. 12, n. 6, p. 513-521, 2010.

SHERATA, A. S. *et al.* The ability of hesperidin compared to that of insulin for preventing osteoporosis induced by type I diabetes in young male albino rats: A histological and biochemical study. **Experimental and Toxicologic Pathology**, vol. 69, n. 4, p. 203-212, 2017.

SHIRAIISHI, C. S. *et al.* Análise morfométrica da parede intestinal e dinâmica de mucinas secretadas no íleo de frangos infectados por *Toxoplasma gondii*. **Ciência Rural**, v. 39, p. 2146-2153, 2009.

SOUZA, J. A. de; FURLAN, M. M. D. P. Avaliação morfométrica de neurônios mientéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos normais e com diabetes experimental. **Arquivos Ciências da Saúde Unipar**, vol. 5, n. 2, p. 141-147, 2001.

STEVENS, M. J.; FELDMAN, E. L.; GREENE, D. A. The etiology of diabetic neuropathy: the combined roles of metabolic and vascular defects. **Diabetic Med**, v. 12, p. 566-579, 1995.

TRONCHINI, E. A. *et al.* Supplementation with 0.1% and 2% vitamin E in diabetic rats: analysis of myenteric neurons immunostained for myosin-V and nNOS in the jejunum. **Arquivos Gastroenterologia**, v. 49, n. 4, p. 284-90, 2012.

URANGA-OCIO, J. A. *et al.* Enteric neuropathy associated to diabetes mellitus. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, Madrid, v. 107, n. 6, p. 366-373, 2015.

UPSTON, J. M.; TARENTIS, A. C.; STOCKER, R. Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. **FASEB Journal**, vol. 13, n. 9, p.977-994, 1999.

VALENTE, M. A. S. *et al.* Nutrigenômica/nutrigenética na elucidação das doenças crônicas. **HU Revista**, v. 40, n. 3 e 4, p. 239-248, 2014.

VILLANACCI, V. *et al.* Coeliac disease: the histology report. **Società italiana di gastroenterologia**, Roma, v. 43, Suppl 4, p. S385-S395, 2011.

VINCENT, A. M. *et al.* Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. **Endocrine Reviews**, vol. 25, n. 4, p. 612–628, 2004.

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

ZANONI, J. N. *et al.* Effects of L-glutamine supplementation on the myenteric neurons from the duodenum and cecum of diabetic rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 48, n. 1, p. 66-71, 2011.

ZANONI, J. N.; PEREIRA, R. V. F. Cell proliferation of the ileum intestinal mucosa of diabetic rats treated with ascorbic acid. **Biocell**, v. 32, n. 2, p. 163-168, 2008.

ZHAO, J.; YANG, J.; GREGERSEN, H. Remodelação intestinal biomecânica e morfométrica durante diabetes experimental em ratos. **Diabetologia**, v. 46, p. 1688-1697, 2003.