



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**III CURSO DE INVERNO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**O USO DE FITOTERÁPICOS NO
TRATAMENTO DO DIABETES E DOENÇAS
INFLAMATÓRIAS**

Organizadores:

Fernanda Giacomine Bueno

Fernando Augusto Vicentini

Rodrigo Mello Gomes

Coordenadora:

Prof. Dra. Maria Raquel Marçal Natali

MARINGÁ
JULHO DE 2013

1. INTRODUÇÃO

Desde seus primórdios a humanidade faz uso de plantas no tratamento de uma grande variedade de doenças. Existe registros do uso de extratos, chás e outras formulações de plantas de cerca de 3 mil anos a.C. E as origens são provenientes de diferentes lugares e costumes, chineses, sumérios, babilônios, egípcios e gregos. Diversas tribos de índios fazem o uso de plantas para fins como: curar doenças ou venenos para ponta de flechas.

Devido sua grande extensão geográfica e sua flora privilegiada o Brasil se destaca no cenário dos países com uma das maiores diversidades de plantas medicinais. No entanto, poucas pesquisas relevantes são desenvolvidas com o intuito de comprovar a eficácia de produtos naturais com real efeito terapêutico.

Em termos conceituais todo medicamento tecnicamente obtido exclusivamente de plantas como matéria-prima é um produto ou medicamento fitoterápico. Qualquer efeito terapêutico de um produto fitoterápico se deve ao princípio ativo presente em tal produto. Princípio ativo é uma substância, quimicamente caracterizada (conhecida), que apresenta uma ação farmacológica e terapêutica. As substâncias químicas, presentes em plantas, que apresentam atividade farmacológica são geralmente provenientes de seu metabolismo secundário. Os três principais grupos de compostos secundários são os *terpenos*, os *fenóis* e os *alcalóides*. Contudo, essa definição não é totalmente rígida.

Os *terpenos*: é o maior grupo de compostos secundários que ocorre nos vegetais $(C_5H_8)_n$. Podem ocorrer de forma livre nos tecidos vegetais, ou sob a forma de glicosídeos, ésteres e ácidos orgânicos e, em alguns casos, associados a proteínas. Alguns terpenos podem funcionar como compostos essenciais para o funcionamento da fotossíntese (fitol das clorofilas a e b), nos carotenóides e nos compostos de transporte eletrônico (plastoquinona) e respiração (ubiquinona). Outra função metabólica básica dos terpenos está relacionada ao transporte de açúcares através de membranas celulares e reguladores do crescimento ou hormônios de plantas, tais como, as giberelinas e o ácido abscísico.

Os *fenóis*: são compostos que apresentam pelo menos um grupo hidroxila ou derivado funcional ligado a um anel aromático (C_6H_5OH) . É talvez o mais importante grupo de compostos do metabolismo secundário das plantas. Arbutina, hidroquinona, ácido gálico, ácido cinâmico, cumarina, lignina, flavononas, flavonas e antocianidinas são alguns dos principais fenóis. Entre as funções biológicas dos fenóis podemos destacar: antibióticos (cumarina), inibidores da germinação de sementes (cumarinas e escopoletina), reguladores de crescimento (ácidos lunárico e abscísico), proteção contra radiação ultravioleta e microrganismos (flavonóides), função estrutural, proteção contra desidratação e

microrganismos (lignina) além destes alguns fenóis são importantes sinais de comunicação entre plantas e microorganismos ou insetos, atraindo ou repelindo.

Os *alcalóides*: são substâncias que contêm nitrogênio, geralmente compondo um anel heterocíclico. Funcionam como produtos de excreção (da mesma forma que a uréia e o ácido úrico ou uréia nos animais), agem como reserva de nitrogênio, são reguladores do crescimento (germinação) e agentes de defesa da planta.

Estudar o uso de plantas medicinais no tratamento de doenças como o diabetes, inflamações agudas ou crônicas e até mesmo alguns tipos de câncer, tem despertado a atenção de alguns pesquisadores. Dessa forma, este mini-curso tem por objetivo, não esgotar o assunto, mas realizar uma pequena discussão sobre o uso de fitoterápicos no tratamento do diabetes tipo 1 e da colite.

2. MODELOS EXPERIMENTAIS

2.1. *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus é uma patologia metabólica de etiologia múltipla, caracterizada pela deficiência relativa ou absoluta da insulina em exercer sua ação sobre órgãos-responsivos-alvo, conseqüentemente a glicose permanece em concentração alta no sangue, com anormalidades observadas no metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos.

Existem duas formas principais de classificar o diabetes: o diabetes Tipo 1 que é caracterizado pela deficiência na produção e/ou secreção da insulina, tendo como causa uma falha das células beta-pancreáticas, esta falha pode ser por doenças autoimune ou por estresse oxidativo devido a elevados níveis glicêmicos. Este tipo de diabetes é também conhecido como insulino dependente, isso porque, a principal forma de tratamento é por injeções de insulina exógena. Diabetes Tipo 2 é também conhecido como não dependente de insulina, já que no tratamento não se faz o uso de insulina exógena.

Existem alguns modelos experimentais que são utilizados em pesquisas sobre o diabetes, como por exemplo, a administração de agentes citotóxicos para as células beta-pancreáticas, como a aloxana e a estreptozotocina que consiste numa maneira eficiente para promover o diabetes tipo I e assim, torna-se possível o estudo de mecanismos fisiopatológicos, atividade hipoglicemiante e anti-diabetogênica de certos compostos.

A estreptozotocina (STZ) é um antibiótico, de natureza glicosamina-nitrosuréia, com propriedades tóxicas, isolada de *Streptomyces achromogenes* e é captada pelas células beta-pancreáticas através de transportadores de glicose GLUT-2. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a ação da estreptozotocina sobre danos às células beta-pancreáticas, Bolzán e Bianchi (2002), relataram que a STZ interfere no metabolismo energético das células beta-pancreáticas, comprometendo a biossíntese de insulina e resultando em apoptose celular.

Em nosso laboratório, para o estabelecimento do modelo animal de diabetes mellitus realizamos uma injeção endovenosa (veia peniana) de STZ dissolvida em tampão citrato 10 mmol/L (pH 4,5), em ratos submetidos a um jejum prévio de quatorze horas, na dosagem de 35 mg/kg de peso corporal. Posteriormente, os animais são mantidos em jejum por duas horas para que não haja competição da STZ com a glicose circulante pelas células beta-pancreáticas. Após quatro dias de indução, o sangue coletado dos animais é usada para mensuração da glicemia com glicosímetro (Accu-Chek Active, Roche Diagnostics, Mannheim, BW, Alemanha), sendo considerados diabéticos todos os ratos que apresentarem glicemia acima de 210 mg/dL. Além disso, mantendo os animais em gaiolas metabólicas

individuais, é possível acompanhar o estabelecimento da doença medindo além da glicose, sintomas típicos do diabetes mellitus, tais como: poliúria (aumento da excreção de urina), polidipsia (aumento da ingestão de água) e polifagia (aumento da ingestão de ração).

Geralmente, os primeiros sinais e sintomas do diabetes começam aparecer nos ratos desde os primeiros dias de indução da doença. Desse modo, o período experimental varia conforme o modelo de diabetes que se queira adotar, ou seja, uma semana caracteriza diabetes agudo e quatro semanas ou mais caracterizam o diabetes crônico.

2.2. *Colite*

O sistema digestório humano é formado por diversas estruturas que são especializadas para realizar basicamente a função de digestão e absorção dos nutrientes ingeridos na alimentação. Existem inúmeras patologias associadas a este sistema, e dentre elas, algumas são agrupadas dentro das Doenças Inflamatórias Intestinais (DIIs), as quais, como o próprio nome retrata, são caracterizadas por inflamações no trato digestivo. Para estudarmos um pouco a respeito destas doenças, necessitamos previamente de uma breve introdução sobre o nosso sistema digestório.

Este sistema é composto por diversos órgãos que formam o tubo do trato gastrointestinal (TGI) e por glândulas associadas, como o fígado e o pâncreas. O TGI pode ser funcionalmente dividido em segmento digestório superior, composto pela cavidade oral, esôfago e estômago, com as funções principais de deglutição e digestão, e em segmento digestório inferior, formado pelo intestino delgado e intestino grosso, responsáveis pela absorção dos nutrientes. Este último segmento é a porção do TGI que é afetada pelas DIIs.

Em cortes histológicos, os diversos segmentos do tubo digestório possuem características estruturais comum, que envolvem a presença de uma parede formada de quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Focaremos nossa discussão na histologia dos órgãos do segmento do tubo digestório inferior. Neste caso, temos que a primeira camada voltada para o lúmen do intestino é a camada mucosa, responsável por prover uma barreira seletivamente permeável entre o conteúdo do tubo e os outros tecidos internos, além de finalizar a digestão e realizar a absorção de moléculas. A camada submucosa, localizada adjacente à membrana mucosa, é formada por uma grande quantidade de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Já a terceira camada, a muscular, é formada por duas subcamadas que se diferenciam pela orientação das fibras musculares, a camada circular interna e a longitudinal externa, sendo que elas são responsáveis pela movimentação do TGI, como exemplo os

movimentos peristálticos. Por fim a camada serosa é formada por uma membrana delgada de tecido conjuntivo, com finalidade de revestir todo o TGI.

Vale ressaltar que estes órgãos são controlados por alguns comandos provenientes do sistema nervoso central, porém a grande parte de seu controle é realizada pelo Sistema Nervoso Entérico (SNE). Este sistema é formado por uma complexa rede intrincada de neurônios, que são organizados em gânglios, que podem estar presente tanto na camada submucosa, sendo nomeado Plexo Submucoso, como também entre as camadas musculares, conhecido por Plexo Mioentérico. Este sistema neuronal ímpar é de extrema importância, visto que sua degeneração pode levar a sérias complicações, como constipação, diarreia, incontinência fecal, entre diversas outras patologias.

Tendo em vista esta incrível organização dos tecidos em nosso sistema digestório, podemos agora avaliar o potencial de inflamações nestes órgãos. Discutindo brevemente sobre inflamações de um modo geral, temos que, os processos inflamatórios, primariamente, são processos “benéficos” para o organismo, constituindo uma importante linha de defesa do corpo. Porém em alguns casos, como nas DIIs, ela pode vir a ter um efeito contrário do desejado, sendo prejudicial à homeostasia. A reação de inflamação é, muito resumidamente, um processo no qual tecidos vascularizados reconhecem algum agente agressor, e iniciam o processo de aumento da permeabilidade vascular, permitindo que células do sistema imune cheguem mais facilmente ao local, e eliminem o agente agressor. Este processo todo é mediado por células do sistema imune, principalmente os leucócitos, responsáveis pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (interleucinas (IL), TNF- α , NF- κ B, entre outros).

Retornando o foco aos órgãos do segmento inferior do trato digestório, trataremos agora das DIIs que acometem esta região. Estas doenças inflamatórias incluem duas formas principais, a colite ulcerativa e a doença de Crohn. Embora ambas sejam patologias distintas, elas apresentam algumas características em comum, como a origem idiopática, os cursos alternados de remissão e ativação da inflamação, e as manifestações clínicas, como dores abdominais, diarreia severa, sangramento retal, febre, perda de peso e possíveis complicações sistêmicas.

A colite ulcerativa é a forma de DII mais branda, porém não menos prejudicial. Ela afeta apenas a mucosa do intestino grosso, podendo se estender até o reto. Está relacionada com uma inflamação mediada por células auxiliares do tipo 2 (Th2), que liberam IL-4, IL-5 e IL-13. Em alguns casos de colite ulcerativa o tratamento pode ser realizado por remoção cirúrgica do colo. Já a doença de Crohn pode atingir desde a porção final do íleo até o intestino grosso. É caracterizada por processos inflamatórios crônicos, com lesões transmuralis,

ou seja, que afetam todas as camadas da parede do órgão. As lesões também são bem demarcadas, e são intercaladas por regiões do segmento sem inflamação. Neste caso pode haver formação de granulomas (acúmulo de linfócitos na parede intestinal), oclusão do lúmen intestinal por fibrose, formação de fístulas (regiões do intestino ligadas a outros órgãos) e perfurações intestinais. As principais células associadas a este tipo de DII são as células auxiliaadoras tipo 1 (Th1), que produzem TNF- α , interferon- γ , IL-12, entre outras citocinas.

Além de prejudicar a morfologia e a fisiologia da parede intestinal, as DIIs também afetam o SNE, alterando a arquitetura padrão dos plexos, gerando trocas nos conteúdos dos neuropeptídeos e levando, por fim, a morte de parcela da população neuronal. Esta morte dos neurônios entéricos está associada aos processos que ocorrem no início da inflamação, uma vez que foi relatada a presença de neutrófilos e eosinófilos adjacentes aos gânglios submucoso e mioentérico.

Existem algumas teorias que tentam explicar a origem destas DIIs, mas particularmente, uma delas é a mais estudada e mais aceita. Esta teoria discorre sobre a relação das bactérias comensais da flora intestinal com o sistema imune da mucosa. Resumidamente, o problema estaria na regulação das células T do sistema imune, o qual, devido a algum defeito, não reconhecem as bactérias naturais da flora, reagindo contra estas, desencadeando reações inflamatórias. Os pesquisadores estão buscando a origem destes defeitos em fatores genéticos, porém esta tarefa é um pouco complexa. Entretanto cientistas descrevem a associação de defeitos no gene *CARD15*, que codifica proteínas relacionadas com a identificação das bactérias comensais, com o desenvolvimento de DII. E ainda não descartam a influência dos fatores ambientais para a quebra desta homeostasia da mucosa intestinal, como os principais fatores desencadeantes os hábitos de fumar, de usar antibióticos e drogas anti-inflamatórias não esteroidais, o estresse e uma alimentação rica em aditivos.

Para o estudo das DIIs foram desenvolvidos numerosos modelos em animais que simulam a inflamação no trato digestório. Destacam-se os modelos que utilizam manipulação genética, como camundongos que possuem deleção de IL-2 e IL-7, além de modelos que induzem a colite com compostos químicos. Os compostos são dos mais variados tipos, como exemplo o ácido acético, iodoacetamina, dextran sulfato de sódio (DSS), e o utilizado em nosso laboratório, a indução com ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS).

O modelo de estudo de colite causada por TNBS se baseia no fato de que, com um aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, ocasionado pelo etanol, utilizado como solvente do ácido, permite-se a entrada do TNBS, um hapteno, o qual se associa com substâncias de alto peso molecular, como as proteínas teciduais da lâmina própria, e então

desencadeia uma resposta inflamatória. Este processo inflamatório gera características semelhantes à doença de Crohn.

O tratamento para essas patologias se baseiam na utilização de drogas anti-inflamatórias e imunossupressores, como corticoides, a azatioprina e seus derivados, e principalmente a mesalazina (5-aminossalicílico). Esta última droga vem sendo utilizada há décadas e, embora seu mecanismo de ação não esteja totalmente esclarecido, resultados mostram que, quando usada topicamente, possui ação anti-inflamatória inibindo a síntese de leucotrienos, a liberação de IL-1 e NF- κ B e a formação radicais livres.

O uso recorrente dessas drogas acaba gerando efeitos colaterais indesejados, e na maioria dos casos, ocorre complicação da doença e o paciente necessita de intervenção cirúrgica. Partindo deste ponto, destacamos a importância do uso de produtos naturais com potencial anti-inflamatório para amenizar os diversos problemas causados pelas DIIs.

Já existem pesquisas que mostram, em modelos animais, o efeito positivo de produtos naturais para o tratamento da colite experimental. Destacam-se entre estes produtos a planta *Zataria multiflora* Bois, própria da região do Paquistão, Iraque e Irã, que demonstrou mesmo índice de efeito na redução da inflamação que uma droga padrão; o resveratrol, um composto fenólico encontrado na casca da uva vermelha e no vinho, o qual reduziu a lesão colônica, suprimiu o dano oxidativo e estimulou a apoptose em macrófagos; o óleo de copaíba, extraído da *Copaifera langsdorfii*, que reduziu os danos teciduais, além de outras plantas.

A casca de catuaba, que é extraída da *Trichilia catigua*, possui propriedades interessantes para o possível tratamento de DIIs. Estudos mostraram que extratos desta planta possuem efeitos anti-inflamatórios, uma vez que foram capazes de inibir a ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂ – responsável pelo início de reações inflamatórias), e também apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antinociceptivas (diminuem a dor). Tendo em vista este potencial presente nesta planta, testes precisos poderiam demonstrar um efeito positivo no tratamento de colite com extratos da casca da catuaba.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Imunohistoquímica – PCNA e Insulina

1) Desparafinização

- i) ESTUFA 56-60°C – 15 MINUTOS
- ii) XILOL 100% I – 15 MINUTOS
- iii) XILOL 100% II – 15 MINUTOS

2) Hidratação

- i) ÁLCOOL 100% I (2 min)
- ii) ÁLCOOL 100% II (2 min)
- iii) ÁLCOOL 90% (2 min)
- iv) ÁLCOOL 80% (2 min)
- v) ÁLCOOL 70% (2 min)
- vi) ÁGUA DESTILADA (2 min)

3) Bloqueio da peroxidase endógena

- i) 15 de bloqueio em solução 3% de peróxido de hidrogênio diluído em metanol 100%.
- ii) [(Usar cuba normal, no escuro, 100ml de solução (3ml H₂O₂ + 97ml metanol)].
- iii) Obs.: Preparar solução na hora do uso.

4) Lavar em PBS (2X de 5 min)

- i) Obs.: Trocar a cuba para lavar bem.

5) Bloqueio de ligações inespecíficas

- i) Soro de cabra 10% em PBS (10 min).

6) Anticorpo primário

- i) 60 min (Temp. Amb.)
- ii) (Diluições: PCNA 1:100; Insulina 1:500, diluir em PBS)

7) Lavar em PBS (2X de 5 min)

8) Anticorpo secundário

i) 10 min, 1 gota do reagente B por corte (Temp. Amb.)

9) Lavar em PBS (2X de 5 min)

10) Conjugado enzimático

i) 10 min, 1 gota do reagente C por corte (Temp. Amb.)

11) Lavar em PBS (2X de 5 min)

12) Cromógeno DAB

i) 15 min, 1 gota da solução por corte (Temp. Amb. **escuro**)

ii) (Solução DAB: 1 gota do reagente D1; 2 gotas do reagente D2; 1 gota do reagente D3; em 1ml de H₂O destilada, em eppendorf envolvido por alumínio – misturar no agitador de tubos).

13) Lavar em H₂O destilada (2X de 1 min)

14) Lavar em H₂O destilada (5 min)

15) Contra-coloração

i) Cobrir o corte com Hematoxilina de Mayer

16) Lavar em H₂O destilada (passar)

17) Lavar em H₂O destilada (5 min)

18) Desidratação

i) ÁLCOOL 95% (passar)

ii) ÁLCOOL 100% I (5 min)

iii) ÁLCOOL 100% II (5 min)

19) Diafanização

i) Xilol-álcool (passar)

ii) Xilol 100% I (5 min)

iii) Xilol 100% II (5 min)

20) Montagem

3.2. Western blotting

Reagentes:

BISACRIL (ACRILAMIDA 30% / BISACRILAMIDA 0,8%):

Acrilamida	30 g
N,N-metileno-bisacrilamida	0,8 g
Água tipo I	100 mL

Solubilizar ambos os sais e filtrar a solução com filtro milipore 0,45 µm e armazenar em frasco âmbar à 4°C.

TRIS – HCl/SDS 0,5 M PH 6,8:

Tris base	6,05 g
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	0,4 g

Solubilizar ambos os sais em 40 mL de água tipo I. Ajustar o pH com HCl e completar o volume de 100 mL com água tipo I. Filtrar a solução com filtro milipore de 0,45 µm e armazenar à 4°C.

TRIS – HCl 0,5 M PH 6,8:

Tris base	6,05 g
-----------	--------

Solubilizar o sal em 40 mL de água tipo I. Ajustar o pH com HCl e completar o volume de 100 mL com água tipo I. Filtrar a solução com filtro milipore de 0,45 µm e armazenar à 4°C.

TRIS – HCl 1,5 M PH 8,8:

Tris base	18,17 g
-----------	---------

Solubilizar o sal em 40 mL de água tipo I. Ajustar o pH com HCl e completar o volume de 100 mL com água tipo I. Filtrar a solução com filtro milipore de 0,45 µm e armazenar à 4°C.

TAMPÃO DE ELETROFORESE (4X CONCENTRADO):

Tris base	12 g
Glicina	57 g
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	4 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

Solubilizar a solução e armazenar em temperatura ambiente (não pode ser armazenado em geladeira devido ao fato de conter SDS).

Para quatro géis, preparar 1200 mL de tampão de eletroforese 1x concentrado, para isso, 300 mL do tampão de eletroforese 4x concentrado + 900 mL de água destilada. O tampão de eletroforese deve ser desprezado após o uso, preparando um novo para cada corrida.

Proveta de 1000 mL: 750 mL de água destilada + 250 mL de tampão eletroforese [4x]

Proveta de 500 mL: 150 mL de água destilada + 50 mL de tampão eletroforese [4x]

TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA:

Tris base	8,7 g	4,35 g	2,175 g
Glicina	43,2 g	21,6 g	10,8 g
Metanol	600 mL	300 mL	150 mL
Água destilada	2.400 mL	1.200 mL	600 mL
q.s.p.			

Solubilizar e armazenar à 4°C.

PREPARO DAS AMOSTRAS

Reagentes

SOLUÇÃO DE KREBS RINGER PH 7,4:

NaCl	1,730 g	3,461 g	6,923 g	13,846 g
KCl	0,088 g	0,176 g	0,353 g	0,707 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,090 g	0,181 g	0,363 g	0,727 g
KH ₂ PO ₄	0,040 g	0,080 g	0,161 g	0,323 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,073 g	0,146 g	0,292 g	0,584 g
NaHCO ₃	0,052 g	0,105 g	0,210 g	0,420 g
Glicose	13,519 g	27,038 g	54,076 g	108,153 g

H ₂ O q.s.p.	250 mL	500 mL	1000 mL	2000 mL
-------------------------	--------	--------	---------	---------

Solubilizar a solução, acertar o pH com HCl e armazenar à 4°C.

TAMPÃO DE HOMOGENEIZAÇÃO:

Tris HCl	50 mM pH 7,2
NaCl	600 mM
EDTA	1 mM

Preparar a solução e armazenar à 4°C.

Preparo do Tampão de Homogeneização:

Solução mãe de Tris HCl a 1 M pH 7,2:

Tris base	12,114 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Diluir o Tris base em uma parte de água, acertando o pH com HCl e por fim completar o volume de 100 mL com a água destilada e autoclavar.

Solução mãe de EDTA (só solubiliza em pH 8,0):

EDTA	37,224 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Diluir o EDTA em uma parte da água (fica esbranquiçado) e acertar o pH 8,0 com NaOH e completar o volume para 100 mL.

Preparo da solução final:

Tris HCl 1 M pH 7,2	5 mL	10 mL
EDTA	0,1 mL	0,2 mL
NaCl	3,5064 g	7,0128 g
Água destilada	94,9 mL	189,8 mL

Homogeneizar todos os reagentes e armazenar à 4°C.

Obs.: para cada 20 mL de solução Tampão para Homogeneização, colocar 40 µL de inibidor de protease (se usar inibidor [10x], colocar 4 µL para cada 20 mL).

Colocar um volume de 5 mL por amostra a ser processada.

TAMPÃO DE AMOSTRA:

Água tipo I	3,8 mL
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	1,0 mL
Glycerol	0,8 mL
Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%	1,6 mL
2-Mercaptoetanol	0,4 mL
Azul bromofenol 1%	0,4 mL

Solubilizar a solução e armazenar à 4°C.

Devido à quantidade de SDS, em baixas temperaturas a solução pode se tornar viscosa, sendo necessário retirar o material da refrigeração cerca de 15 minutos antes de sua utilização.

Processamento das amostras

Coletar e manter o material em placa de Petri sobre o banho de gelo;

Transferir o material para o grau contendo 4 mL solução de homogeneização e homogeneizar com pistilo, tentando quebrar ao máximo o tecido;

Transferir o material para um tubo falcon identificado;

Levar ao mixer e realizar 7 subidas e descidas da amostra;

Centrifugar o material em centrífuga refrigerada por 10 minutos a 10.000 g;

Transferir o sobrenadante para um microtubotubo limpo e descartar o pellet;

Aliquotar o sobrenadante para dosar a concentração de proteínas totais pelo método de Bradford;

Preparar a amostra (600 µL) que será aplicada em SDS-Page: misturar 75 µL da amostra (sobrenadante) com 150 µL do tampão de amostra. Aquecer a 95°C por 4 minutos. Aliquotar em microtubos contendo 50 µL.

Depois de separadas, as amostras devem ser descongeladas imediatamente antes de serem aplicadas aos seus devidos poços no gel, com auxílio de pipeta.

Antes de terminar de encher a cuba com o tampão de eletroforese, completar o volume de cada poço com as amostras aplicadas com pequena quantidade de tampão de eletroforese, tomando o máximo cuidado para que não haja mistura das diferentes amostras, só então, a cuba deve ser totalmente preenchida com o tampão de eletroforese.

Preparo do gel acrilamida

GEL DE SEPARAÇÃO TRIS 0,375M PH 8,8 (VOLUME PARA DOIS GÉIS):

NOTA: Optamos em utilizar o gel de separação descrito no manual fornecido pela Bio-Rad Laboratories com o sistema de célula de eletroforese Mini-Protean® Tetra Cell System.

Para o preparo do gel, misture todos os reagentes na ordem em que estão descritos, exceto o PSA 10% (persulfato de amônia) e o TEMED, que devem ser adicionados após 15 minutos, sendo o PSA primeiro seguido do TEMED.

Concentração	Água	Bisacril	Tris HCl	SDS 10%	PSA 10%	TEMED
Gel	Deionizada	30%	1,5M pH	(µL)	(µL)	(µL)
	(mL)	(mL)	8,8 (mL)			
4%	6,1	1,3	2,5	100	50	5
5%	5,7	1,7	2,5	100	50	5
6%	5,4	2,0	2,5	100	50	5
7%	5,1	2,3	2,5	100	50	5
8%	4,7	2,7	2,5	100	50	5
9%	4,4	3,0	2,5	100	50	5
10%	4,1	3,3	2,5	100	50	5
11%	3,7	3,7	2,5	100	50	5
12%	3,4	4,0	2,5	100	50	5
13%	3,1	4,3	2,5	100	50	5
14%	2,7	4,7	2,5	100	50	5
15%	2,4	5,0	2,5	100	50	5
16%	2,1	5,3	2,5	100	50	5
17%	1,7	5,7	2,5	100	50	5

IMPORTANTE: Armazenar o TEMED à 4°C e o PSA 10% no freezer.

A escolha da concentração do gel deve ser feita levando-se em conta o peso molecular da proteína a ser estudada. Para determinar a concentração do gel ideal, pesquisar o peso molecular da proteína e consultar literatura a concentração ideal relativa ao peso molecular da proteína investigada.

O gel de separação deve ser preparado primeiro. O TEMED é o último reagente a ser incorporado em ambos os géis, uma vez que ele é o catalisador da reação. Estando o gel de separação já colocado entre as placas, uma pequena quantidade de água destilada deve ser

adiciona sobre ele, impedindo o contato do ar com a superfície do gel, afim de se obter a polimerização homogênea do gel, tendo em vista que o oxigênio dificulta este processo.

Aguardar em torno de 30 a 50 minutos para que o gel fique sólido, desprezar a água e secar delicadamente a superfície com auxílio de papel absorvente.

Só então, o gel de empacotamento deve ser preparado e aplicado sobre o gel de separação, posicionando o pente adequado logo em seguida.

GEL DE EMPACOTAMENTO TRIS/SDS PH 6,8 (VOLUME PARA DOIS GÉIS):

NOTA: Optamos em utilizar o gel de empacotamento (stacking) descrito no protocolo do laboratório de Micologia – DAC/UEM devido a melhor funcionalidade.

O gel de empacotamento só deverá ser preparado após a polimerização do gel de separação como descrito na seção anterior.

Para o preparo do gel, misture todos os reagentes na ordem em que estão descritos, exceto o PSA 10% e o TEMED, que devem ser adicionados após 15 minutos, sendo o PSA primeiro seguido do TEMED.

Concentração	Água	Bisacril	Tris	PSA 10%	TEMED
Gel	Deionizada	30%	HCl/SDS	(µL)	(µL)
	(mL)	(mL)	0,5M pH 8,8		
			(mL)		
4%	2,1	0,660	1,26	26	6

Após o preparo, aplicar o gel de empacotamento sobre o gel de separação e seguida posicionar o pente para formação dos poços onde as amostras deveram ser aplicadas.

Aguardar em torno de 30 a 50 minutos para que o gel fique sólido, retirar o pente e secar delicadamente a superfície com auxílio de papel absorvente.

IMPORTANTE: Nunca deixar formar bolhas entre os géis, elas impedem a transferência da corrente elétrica durante a corrida.

Depois de o gel estar solidificado e os poços devidamente secos, acoplar o sistema a cuba.

PREPARO DA ELETROFORESE (CORRIDA)

ACOPLAGEM DO SISTEMA A CUBA DE ELETROFORESE:

Após o preparo do gel no sistema, conforme descrito no item anterior, este deve ser acoplado a cuba de eletroforese seguindo as etapas abaixo:

NOTA: Quando for executada uma corrida com dois géis, utilizar apenas o suporte “Electrode Assembly” (que contém os plugues banana de conexão com a fonte) e não o “Companion Running Module” (que não contém os plugues). Ao executar quatro géis, utilizar tanto o suporte “Electrode Assembly” e o “Companion Running Module”.

Posicionar a trava de aperto na posição aberta sobre uma superfície limpa e plana. Coloque a primeira placa contendo o gel sobre o suporte, com a placa menor voltada para dentro, apoiando-a sobre os pinos existentes na base do suporte, deixando-a acoplada ao suporte. Note que a placa ficara presa nos pinos em um ângulo de repouso de 30°. Certifique-se de que a primeira placa está bem posicionada e tome cuidado para que o suporte permaneça equilibrado e não tombe. Agora posicione a segunda placa no outro lado do suporte, prendendo-a pelos pinos existentes na base do suporte. Neste ponto haverá dois géis em ângulo de repouso no suporte, um de cada lado do suporte.

NOTA: é fundamental que as placas estejam colocadas no suporte com as placas curtas voltadas para dentro. Além disso, o sistema de travamento das placas ao suporte só funciona com duas placas de gel, ou seja, uma em cada lado. Se você deseja correr um número ímpar de géis (1 ou 3), será necessário acoplar outra placa vazia no lado oposto do suporte para que o travamento seja possível. **NUNCA INICIE UMA CORRIDA SEM QUE AS PLACAS NÃO ESTEJAM CORRETAMENTE POSICIONADAS E TRAVADAS NO SUPORTE.**

Com uma mão, empurre cuidadosamente as placas de gel em direção ao centro do suporte, até que estas estejam apoiadas sobre as juntas verdes que estão incorporadas ao suporte.

Mantenha as placas seguras e firmes junto ao suporte como descrito no item anterior, com o auxílio da outra mão, deslize as travas verdes do suporte até a posição de travamento. Alternativamente, você pode acionar as duas travas simultaneamente, tomando muito cuidado para que os géis não saiam do lugar. As travas mantêm as placas de gel ligeiramente pressionadas contra as juntas verdes do suporte, criando um selo a prova de vazamentos, portanto é crucial que as placas estejam bem posicionadas ao suporte para que a corrida aconteça de forma correta. Neste ponto, o suporte já poderá ser levado a cuba e as amostras aplicadas no gel.

NOTA: se você estiver executando mais de dois géis, repita as etapas de a-d com o suporte “Companion Running Module”.

IMPORTANTE: nunca tente travar as placas ao suporte sem que elas estejam perfeitamente alinhadas e estabilizadas no suporte. Para evitar que as placas deslizem sobre o suporte durante o travamento, mantenha-as seguras em sua posição com uma das mãos.

ATENÇÃO: ao executar apenas 1 ou 2 géis, não coloque o suporte “Companion Running Module” na cuba, isso poderá levar a um aumento excessivo da temperatura, levando a uma separação inadequada das proteínas.

Depois que as placas contendo o gel estarem presas ao suporte, o sistema deverá ser acoplado a cuba, colocando previamente, aproximadamente 500mL de tampão de eletroforese, balançando suavemente o sistema afim de eliminar eventuais bolhas abaixo do gel.

APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS:

Aplicar as amostras nos poços com auxílio de uma pipeta de Hamilton, respeitando o volume máximo admitido em cada poço que é de 30µL.

Lavar bem a pipeta com água destilada entre antes de aplicar a amostra seguinte.

Em seguida completar o volume de cada poço com tampão de eletroforese, com muito cuidado, posteriormente, o volume total da cuba deve ser completado e iniciar a corrida.

ELETOFORESE (CORRIDA PROPRIAMENTE DITA):

Antes de aplicar a corrente no sistema, verificar se a tampa, bem como os eletrodos estão devidamente posicionados.

IMPORTANTE: Pólo POSITIVO » Cabo VERMELHO

Pólo NEGATIVO » Cabo PRETO.

Inicialmente deve se aplicar uma voltagem de 110V, até o corante penetrar no gel de empacotamento e formar uma linha.

Esta linha indica que todas as proteínas estão posicionadas no início do gel de separação, prontas para a corrida. Neste momento, a voltagem deve ser ajustada para 80V. A corrida terá terminado quando esta linha sair do gel de empacotamento (cerca de 2 horas de duração).

REMOÇÃO DO GEL:

IMPORTANTE: Lembrar de marcar (cortar) o canto inferior esquerdo do gel, lado este, em que corre o padrão.

Após o término da eletroforese, desligue a fonte e desconecte os cabos do sistema.

NOTA: a partir do término da eletroforese usar luvas sempre, lembrando de lavá-las previamente para remoção de resíduos como talco e umedeça-as em tampão de eletroforese para que o gel não fique aderido a elas.

Retire a tampa da cuba e remova cuidadosamente os sistemas de eletrodos contendo as placas com os géis. Abra as travas do sistema e retire as placas contendo o gel. Desmonte as placa, removendo em seguida o gel delicadamente com o auxílio de uma espátula.

COLORAÇÃO DO GEL COM COMASSIE BLUE

IMPORTANTE: Antes de proceder a transferência para a nitrocelulose, devem ser seguidos estes passos:

- A partir do término da corrida, usar luvas sempre;
- Para pegar o gel que está entre as placas, molhar as luvas com tampão de transferência, evitando que o gel grude nas mãos;
- Desmontar as placas. Com o auxílio de espátula, remover o gel de empacotamento. Dividir em duas partes o gel de separação (uma vai para o Comassie Blue e a outra para a transferência para a nitrocelulose);
- O gel do Comassie Blue deve ser submetido ao corante e em seguida revelado com solução descorante;
- Somente se as bandas ficarem perfeitamente separadas após a análise do gel corado em Comassie Blue, a transferência para a nitrocelulose será realizada.

SOLUÇÃO ESTOQUE DE COOMASSIE BLUE R-250:

Coomassie Blue R-250	0,5 g
Água deionizada	25 mL

Solubilizar o corante e armazenar em frasco âmbar em temperatura ambiente.

SOLUÇÃO COLORAÇÃO (COOMASSIE BLUE R-250 A 0,25% EM 50% DE METANOL E 10% DE ÁCIDO ACÉTICO):

Solução Estoque Coomassie Blue R-250	5 mL
--------------------------------------	------

Ácido Acético Glacial	4 mL
Metanol	20 mL
Água deionizada q.s.p.	40 mL

Homogeneizar os reagentes e utilizar em seguida.

SOLUÇÃO DESCORANTE CONCENTRADA (ÁCIDO ACÉTICO 10% E METANOL 50%):

Ácido Acético Glacial	100 mL
Metanol	500 mL
Água deionizada q.s.p.	1.000 mL

Homogeneizar os reagentes e armazenar em frasco âmbar em temperatura ambiente. Não estamos utilizando esta solução, padronizamos o uso da Solução Descorante Diluída.

SOLUÇÃO DESCORANTE DILUÍDA (ÁCIDO ACÉTICO 7% E METANOL 5%):

Ácido Acético Glacial	70 mL
Metanol	50 mL
Água deionizada q.s.p.	1.000 mL

Homogeneizar os reagentes e armazenar em frasco âmbar em temperatura ambiente. Estamos utilizando esta solução.

- Colocar o gel em uma placa de petri e aplique a solução corante até cobrir completamente o gel;
- Levar a placa de petri ao agitador em velocidade baixa (entre 40-50 rpm) por meia hora;
- Passados 30 minutos de coloração, descartar o corante e iniciar a descoloração com solução descorante;
- A descoloração do gel deve ser realizada no agitador em velocidade baixa (entre 40-50 rpm), trocando a solução descorante à medida em que vai sendo saturada até que seja possível a visualização das bandas no gel.

TRANSFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS PARA A NITROCELULOSE

MÉTODO SEMI-DRY:

IMPORTANTE: Antes de proceder a transferência para a nitrocelulose, certificar-se de que a separação das proteínas ocorreu de modo adequado, corando o gel com Comassie Blue.

Para realização da transferência das proteínas, siga as etapas:

Prepare o tampão de transferência e equilibre o gel de acrilamida por 20 a 60 minutos. Corte a membrana e o papel de filtro do tamanho do gel e umedeça no tampão por 5-10 minutos.

Retire a cobertura de segurança e prepare o “sanduíche” do gel a partir da base do equipamento, como a seguir:

No espaço da base (anodo – pólo negativo) colocar:

Papel de filtro pré-umedecido

Membrana pré-umedecida

Gel equilibrado

Papel de filtro pré-umedecido

NOTA: rolar um tubo de ensaio limpo entre as camadas para as bolhas, pois elas irão impedir a passagem da corrente elétrica e conseqüentemente a transferência das proteínas para a nitrocelulose. Assegure que o sanduíche está tocando o topo (cátodo – pólo positivo) e cubra cuidadosamente. Corra o blot.

O equipamento recomenda:

Gel pequeno: 10V por 30 minutos ou 15V por 15 minutos;

Gel grande: 25V por 30 minutos ou 15V por 60 minutos;

OBS: Condições ótimas são necessárias para proteínas diferentes. Não exceder 25 V e 3mA/cm² para géis grandes e 5,5 mA/cm² para géis pequenos.

Nós estamos fazendo: 14V por 1 hora.

Desligue a fonte de energia, retire os eletrodos e remova o blot.

COLORAÇÃO DA NITROCELULOSE COM PONCEAU S

IMPORTANTE: Antes de realizar o imunoblotting na nitrocelulose, certificar-se de que a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose ocorreu de modo adequado, corando-a Ponceau S.

Para realização da coloração da nitrocelulose, siga as etapas:

Desmonte cuidadosamente o sanduíche – filtro, gel, nitrocelulose, filtro – do transfer;

Coloque a membrana de nitrocelulose em um papel filtro limpo e seco;

Em seguida transfira a membrana para uma placa de petri e cubra-a com a solução corante de Ponceau S por 15 em temperatura ambiente;

Decorrido o tempo de coloração, revelar a membrana removendo o corante em água corrente (torneira);

Ao remover o corante, deve-se tomar cuidado para não lavar em demasia a membrana, o que pode levar a remoção do corante impregnado nas bandas impossibilitando sua visualização.

Caso isso ocorra, repetir o processo de coloração.

Após a visualização das bandas coradas pelo Ponceau S, o imunoblotting pode ser processado.

IMUNOBLOTTING

TAMPÃO TBS:

Tris base	2,42 g	4,84 g	9,68 g
Cloreto de sódio	8 g	16 g	32 g
Água destilada qsp	1.000 mL	2.000 mL	4.000 mL

Solubilizar os sais e ajustar o pH para 7,6. Completar o volume com água e armazenar à 4°C.

SOLUÇÃO TBS-T 0,1%:

TBS	50 mL	100 mL	200 mL
Tween 20	50 µl	100 µL	200 µL

Homogeneizar a solução no agitador. Para o preparo o TBS deve estar em temperatura ambiente.

SOLUÇÃO BSA 5% EM TBS-T 0,1%:

TBS-T 0,1%	10 mL	20 mL	40 mL
BSA (Molico [*])	0,5 g	1,0 g	2,0 g

Homogeneizar a solução no agitador.

*Leite em pó Molico 0% de gordura.

Cortar a membrana contendo a banda do tamanho da estrutura onde será realizado a imuno;
Todo o procedimento do imunoblotting é realizado em agitador, com velocidade de agitação lenta (entre 40-50 rpm).

Bloqueio com BSA 5% em TBS-T (TBS-Tween 0,1%) em temperatura ambiente (colocar quantidade suficiente para cobrir a membrana) por 1 hora;

Realizar lavagens em TBS-T duas vezes de 5 minutos cada;

Incubar em anticorpo primário (1:2.000 em TBS-T) por 12 horas;

Realizar lavagens em TBS-T três vezes de 5 minutos cada;

Incubar em anticorpo secundário (1:2.000 em TBS-T) por 1 hora;

Realizar lavagens em TBS-T três vezes de 5 minutos cada;

Revelação com DAB e H_2O_2 (1 comprimido de DAB + 1 comprimido de H_2O_2 + 1mL de H_2O deionizada) por 15 minutos;

Após a revelação com DAB, bloquear a reação com água deionizada;

Todos os utensílios utilizados para o preparo da solução de revelação de DAB e o recipiente em que o imunoblotting foi realizado, bem como a solução de revelação devem ser deixados de molho em hipoclorito puro por 24 horas em temperatura ambiente para bloqueio do potencial carcinogênico do DAB.

4. REFERÊNCIAS

BOKOV, A; CHAUDHURI, A; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, 125: 811-826, 2004.

BOLZAN, AD; BIANCHI, MS. Genotoxicity of streptozotocin. **Mutat. Res**; 512: 121-134, 2002.

MARIA, C. A. B.; FELIPE, R. A. M. **Bioquímica do Diabetes Melito**; 2004.

CESARETTI, M. L. R., et al. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 50:8, 2006.

CHANDRASEKHARAN, B; SRINIVASAN, S. Diabetes and the enteric nervous system. **Neurogastroenterol Motil**, 19: 951-60, 2007.

CHANG, RW; CHANG, JB; LONGO, WE. Update in management of mesenteric ischemia. **World J Gastroenterol**;; 12: 3243-3247, 2006.

COSTA, M; BROOKES SJH; HENNIG, GW. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**. 47:15–19, 2000.

COWEN, T; JOHNSON, RJ; SOUBEYRE, V; SANTER, RM. Restricted diet rescues rat enteric motor neurons from age related cell death. **Gut**, 47: 653-660, 2000.

DA SILVA, GGP; ZANONI, JN; BUTTOW, NC. Neuroprotective action of Gingko biloba on the enteric nervous systems of diabetics rats. **World J Gastroenterology**, 17: 898-905, 2011.

DE FREITAS, P; NATALI, MR; PEREIRA, RV; MIRANDA NETO, MH, ZANONI, JN. Myenteric neurons and intestinal mucosa of diabetic rats after ascorbic acid supplementation. **World J Gastroenterology**, 14: 6518-24, 2008.

FURNESS, JB. **The Enteric Nervous System**. New York: Churchill Livingstone, 2005.

FURNESS, JB; KUNZE, WA; CLERC, N. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. **Am J Physiol**, 277: 922-8, 1999.

FURNESS, JB; YOUNG, HM; POMPOLO, S; BORNSTEIN, JC; KUNZE, W.A.A., MCCONALOGUE, K. Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. **Gastroenterology**. 108: 554– 563, 1995.

GABELLA, G. Detection of nerve cells by histochemical technique. **Experimentia**, 25:218-219, 1969.

GABELLA, G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. **Journal of Anatomy**, 109:81-94, 1971.

GABELLA, G. Inervation of the gastrointestinal tract. **International Review of Cytology**, 59: 129-193, 1979.

GABELLA, G. Fall in the number of myenteric neurons aging guinea pigs. **Gastroenterology**, 96: 1487-1493, 1989.

GARTNER, LP; HIATT, JL. Tratado de histologia em cores, 2º edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GRUNDY, D; SCHEMANN, M. Enteric nervous system. **Curr Opin Gastroenterol** 21:176-182, 2005.

GREDILLA, R; BARJA, G. Minireview: The role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. **Endocrinology**, 146: 3713-17, 2005.

IMAI, H; NAGAKAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, 34: 145-169, 2003.

JOHNSON, RJR; SCHEMANN, M; SANTER, RM; COWEN, T. The effects of age on the overall population and on sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine. **Journal of Anatomy**, 192: 479-488, 1998.

JUNQUEIRA, LCU; CARNEIRO, JC. **Histologia Básica**, 11° edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

KANASAKI, K; KOYA, D. Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. **J Biomed Biotechnol**, p.1-11, 2011.

KUYVENHOVEN, JP; MEINDERS, AE. Oxidative stress and diabetes mellitus – Pathogenesis of long-term complications. **European Journal of Internal Medicine**. 10: 9-19, 1999.

LINDESTRO, LM; EKBLAD, E. Structural and Neuronal Changes in Rat Ileum After Ischemia with Reperfusion. **Digestive Diseases and Sciences**, 49: 1212–22, 2004.

MARESE, ACM; FREITAS, P; NATALI, MRM. Alterations of the number and the profile of myenteric neurons of Wistar rats promoted by age. **Neurosci Basic Clin** 2007.

MATTSON, MP; DUAN, W; GUO, Z. Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease cellular and molecular mechanisms. **Journal of Neurochemistry**, 84: 417-431, 2003.

MIRANDA-NETO, M.H.; MOLINARI, S.L.; NATALI, M.R.M. et al. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, 59:54-59, 2001.

PERALTA, RM; OLIVEIRA, AL; ELER, GJ; SOARES, AA; BRACHT,A. Functional properties of edible and medicinal mushrooms. **Current Trends in Microbiolog**, 4: 45-60, 2008.

PEREIRA, RV; MIRANDA-NETO, MH; SOUZA, IDS; ZANONI, JN. Vitamin E supplementation in rats with experimental diabetes mellitus: analysis of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neuron from terminal ileum. **J Mol Hist**, 2008.

PEREIRA, RV; TRONCHINI, EA; TASHIMA, CM; ALVES, EP; LIMA, MM; ZANONI, JN. L-glutamine supplementation prevents myenteric neuron loss and has gliatrophic effects in the ileum of diabetic rats. **Dig Dis Sci**, 56: 3507-16, 2011.

PHILLIPS, RJ; KIEFFER, EJ; POWLEY, TL. Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat. **Anat. Embryol**, 209: 19-30, 2004.

REES, DA; ALCOLADO, JC. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Med**, 22: 359-370, 2005.

RIVERA, LN. et al. The reactions of specific neuron types to intestinal ischemia in the guinea pig enteric nervous system. **Acta Neuropathol.**, 118: 261-270, 2009.

RUHL, A; NASSER, Y; SHARKEY, KA. Enteric glia. **Neurogastroenterol Motil**; 16: 44-49, 2004.

SCHOFFEN; JPF; NATALI; MRM. Effect of age on the myosin-V immunoreactive myenteric neurons of rats ileum. **Biocell**; 31: 33-39, 2007.

SCOARIS, CR, et al. Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. **Nutrition**, 26 : 312-20, 2010.

SEHIRLI, AO; SENER, G; ERCAN, F. Protective Effects of Pycnogenol against Ischemia Reperfusion-Induced Oxidative Renal Injury in Rats. **Renal Failure**. 31: 690-697, 2009.

SOHAL, RS; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, 273: 59-63, 1996.

SOUSA, FC; MIRANDA-NETO, MH. Morphometric and quantitative study of the myenteric neurons of the stomach of malnourished aging rats. **Nutritional Neuroscience**, 12(4):167-174, 2009.

TAKIZAWA, Y. et al. Effects of antioxidants on drug absorption in vivo intestinal ischemia/reperfusion. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, 35: 89-95, 2011.

TENDLER, DA. Acute intestinal ischemia and infarction. **Semin Gastrointest Dis**. 14: 66-76, 2003.

THRASIVOULOU, C; SOUBEYRE, V; RIDHA, H; GIULIANI, D; GIARONI, C; MICHAEL, GJ; SAFFREY, MJ; COWEN, T. Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. **Aging Cell**, 5: 247–257, 2006.

VINCENT, AM; RUSSEL, JW; LOW, P; FELDMAN, EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Endocrine Reviews**, 25: 612-628, 2004.

WACHSMAN, JT. The beneficial effects of dietary restriction: reduced oxidative damage and enhanced apoptosis. **Mutation Research**, 350: 25-34, 1996.

WADE, PR; COWEN, T. Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. **Neurogastroenterol. Motil**, 16: 19-23, 2004.

XIANG, FL. et al. NOX2 Deficiency protects against streptozotocin-Induced β -cell destruction and development of diabetes in mice. **Diabetes**, 50: 2603-11, 2010.

ZHANG, Y; HERMAN, B. Ageing and apoptosis. **Mechanisms of Ageing and Development**, 123: 245-260, 2002.