



**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**

**ESTUDO DO SISTEMA NERVOSO  
ENTÉRICO EM DIFERENTES MODELOS  
EXPERIMENTAIS**

**MARINGÁ, JULHO DE 2013**

## 1. TRATO GASTRINTESTINAL E SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO (SNE)

O sistema digestório consiste em cavidade oral, esôfago, estômago, intestinos delgado e grosso, e glândulas associadas: salivares, fígado e pâncreas, além da vesícula biliar. Este sistema tem a função de obter dos nutrientes ingeridos as moléculas necessárias para manutenção, crescimento e demais necessidades energéticas dos organismos (Junqueira e Carneiro, 2011). O tubo digestório tem cerca de 9 metros de comprimento e está subdividido em regiões morfológicamente distintas: esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (ceco, cólon, reto e canal anal) (Gartner e Hiatt, 2003).

Existem quatro camadas histológicas que constituem o tubo digestório: mucosa, submucosa, muscular externa e serosa (ou adventícia), sendo estas inervadas por nervos parassimpáticos e simpáticos, assim como por fibras sensitivas (Gartner e Hiatt, 2003). Tais camadas ou túnicas são semelhantes em toda extensão do trato gastrointestinal, entretanto apresentam algumas modificações e especializações regionais:

- a) Mucosa: Composta por um revestimento epitelial, abaixo do qual há um tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos e linfáticos, denominado lâmina própria e uma camada muscular que a envolve, denominada muscular da mucosa (Gartner e Hiatt, 2003; Junqueira e Carneiro, 2011);
- b) Submucosa: Camada de tecido conjuntivo denso não modelado sem a presença de glândulas (exceto no esôfago e duodeno), apresentando vasos sanguíneos e linfáticos bem como o plexo nervoso submucoso ou de Meissner (Gartner e Hiatt, 2003);
- c) Muscular externa: Corresponde a uma espessa camada de músculo liso (exceto na porção inicial do esôfago) responsável pela atividade peristáltica (Gartner e Hiatt, 2003), subdividida em duas subcamadas: uma mais interna onde a orientação das fibras musculares é geralmente circular, sendo denominada circular interna e outra mais externa de orientação longitudinal, denominada longitudinal externa. Entre estas duas camadas, observa-se o plexo nervoso mioentérico ou de Auerbach (Junqueira e Carneiro, 2011).
- d) Serosa ou adventícia: Camada que envolve a muscular externa, composta de tecido conjuntivo que pode (serosa) ou não (adventícia) estar circundada pelo epitélio pavimentoso simples (mesotélio) do peritônio visceral (Gartner e Hiatt, 2003);

A inervação deste tubo alimentar é atribuída extrinsecamente aos componentes simpático e parassimpático, e intrinsecamente ao SNE, presente desde o esôfago ao ânus o qual atua de forma independente, sendo que suas funções são moduladas pelo Sistema Nervoso Autônomo (Gartner e Hiatt, 2003).

O SNE possui aproximadamente  $10^8$  neurônios sensoriais, motores e interneurônios, distribuídos nos dois plexos ganglionados principais: o mioentérico e o submucoso (fig. 1). Embora espacialmente separados a conexão entre os dois sugere que eles compreendem uma unidade integradora (Furness, 2005). Tais neurônios controlam a motilidade intestinal e a secreção, iniciando reflexos em resposta ao conteúdo luminal e a tensão do músculo liso (Furness et al., 1999). Normalmente, estes neurônios organizam-se em grupos de neurônios denominados “gânglios”, podendo ocorrer neurônios isolados, como em roedores (Gabella, 1989). Ao assumir a organização ganglionar, esses neurônios são revestidos externamente por tecido conjuntivo, ricamente vascularizado, separando-os do tecido muscular circundante (Gabella, 1979)

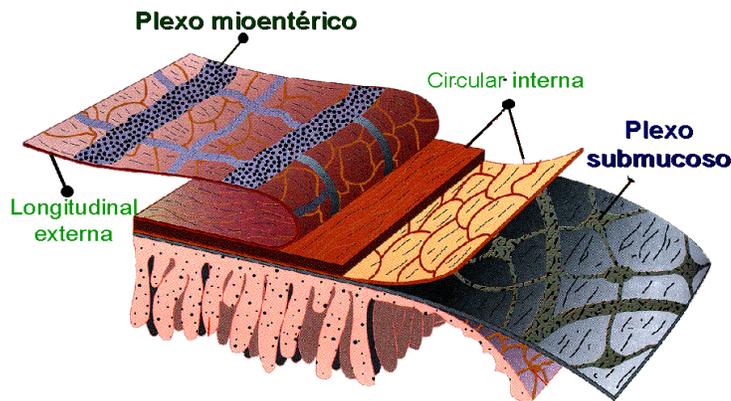


Fig. 1: Principais plexos nervosos do sistema nervoso entérico. Fonte: Furness, 2005 (adaptado).

Os neurônios ganglionares e os seus feixes de fibras nervosas no SNE são providos por numerosas células gliais (Furness, 2005). Tem sido bem estabelecido que estas células desempenham um papel relevante na fisiologia e fisiopatologia do trato gastrointestinal (Ruhl et al., 2004). Este papel está relacionado com sua atuação na homeostase do intestino, bem como serve de elo entre sistema nervoso e imunológico (Ruhl et al. 2004) e ainda, atua no controle do fenótipo neuroquímico (Aubé et al., 2006).

Além disso, semelhante aos neurônios do sistema nervoso central, os neurônios do SNE são bastante diversificados fenotipicamente sendo que mais de 16 populações neuronais distintas já foram identificadas e classificadas pela sua morfologia, conteúdo de neurotransmissor, propriedades eletrofisiológicas de neurônios sensoriais, interneurônios ascendentes e descendentes e neurônios motores excitatórios e inibitórios (Grundy e Schemann, 2005).

Os neurônios sensoriais, atualmente denominados como neurônios intrínsecos primários aferentes (IPANs), traduzem e codificam informações sobre o ambiente químico e estado físico do tecido que eles inervam (Costa, 2000). Os neurônios motores, por sua vez, podem ser divididos em dois grupos, os excitatórios e os inibitórios. Os principais neuromediadores encontrados nos neurônios excitatórios são a acetilcolina e as taquicininas. Já os neurônios inibitórios possuem vários neuromediadores, como NO (óxido nítrico), VIP (peptídeo intestinal vaso ativo) e adenosina trifosfato (Furness et al., 1995). Finalmente, os interneurônios são identificados em todas as camadas do trato gastrointestinal, sendo que sua constituição neuroquímica varia muito, dependendo do órgão em questão (Furness et al., 1995).

## 2. MODELOS EXPERIMENTAIS

### 2.1. *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus é uma síndrome 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 (Xiang et al., 2010).

Existem duas formas principais de diabetes: dependentes de insulina ou tipo I e não dependentes de insulina ou tipo II (Voet et al., 2002). O tipo I ocorre quando há falta de insulina na corrente sanguínea, ocasionado pela destruição das suas células produtoras. O tipo II ocorre quando há escassez ou mal funcionamento de receptores de insulina nas células normalmente responsivas ao hormônio, também conhecidas como células resistentes à insulina (Voet et al., 2002).

Modelos animais têm sido extensivamente utilizados em pesquisas sobre o diabetes, como por exemplo, a administração de agentes químicos  $\beta$ -citotóxicos como a aloxana e a estreptozotocina (Reis e Alcolado, 2005) 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 (Xiang et al., 2010). 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 através da determinação fotométrica da glicose por meio de glicoso-colorante-oxidoreductase (glicosímetro) e/ou também

pode ser realizado o método da glicose oxidase (Bergmeyer e Bernet, 1974), 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. Restrição alimentar*

Estudos têm mostrado que uma moderada redução no consumo calórico pode retardar o envelhecimento, reduzindo doenças crônicas relacionadas à idade (diabetes, câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas) e estendendo o tempo de vida de várias espécies de fungos, parasitas, moscas e mamíferos (Sohal e Weindruch, 1996; Mattson et al., 2003; Bordone e Guarente, 2005).

Por este motivo, a restrição calórica têm se tornado objeto de estudo de vários pesquisadores nos últimos anos, uma vez que esta prática tem se mostrado capaz de reduzir a taxa de formação de tumores, aumentar a eficiência do sistema imune (Wachsman, 1996), reduzir o metabolismo celular e a apoptose (Zhang e Herman, 2002), melhorar a sinalização neurotrófica (Thrasivoulou et al., 2006), aumentar a plasticidade neuronal (Mattson et al., 2002, 2003), a longevidade e a sobrevivência de neurônios (Johnson et al., 1998; Cowen et al., 2000) e principalmente contribuir para amenizar os efeitos do estresse oxidativo gerado durante o processo de respiração celular, reduzindo o nível de radicais livres (Barja, 2002, 2004; Bokov et al., 2004; Gredilla e Barja, 2005).

Em células com elevado consumo de oxigênio, como os neurônios, os radicais livres são responsáveis por danos celulares cumulativos e irreversíveis, podendo provocar perda da função celular até morte por necrose ou apoptose (Imai e Nagakawa, 2003). Estes danos podem causar alterações estruturais e funcionais do trato gastrointestinal (TGI) durante o processo de envelhecimento. Desta forma, animais

submetidos à restrição calórica podem se tornar modelos experimentais para estudos sobre o envelhecimento.

A restrição calórica é definida como a dieta em que a quantidade diária de alimento ingerido é menor do que a que o animal seria capaz de ingerir até ficar completamente saciado. A restrição pode ser feita tanto controlando a quantidade de alimento fornecido, quanto através da manipulação dos componentes da dieta. As pesquisas conduzidas com restrição calórica têm utilizado diminuição da quantidade de alimento sem manipulação da quantidade e qualidade calórica das dietas. Entretanto, a restrição dietária não deve vir acompanhada de nenhum grau de desnutrição (Masoro et al., 1992), assim como, se a dieta for manipulada deve manter os componentes nutricionais necessários para manutenção do animal (Weihe, 1987).

### *2.3. Dietas hipercalóricas e obesidade*

Para melhor compreensão do papel de cada um dos elementos envolvidos na fisiopatologia do desenvolvimento da obesidade, pesquisadores utilizam-se de diversos modelos experimentais, que podem fornecer subsídios para intervenções e tratamentos destes quadros (Kanasaki et al., 2011). Alguns tipos de obesidade experimental são classificados de acordo com sua etiologia.

Entre os modelos desenvolvidos os que mais se aproximam da obesidade e síndrome metabólica em humanos, são os de obesidade exógena, onde os animais são alimentados com dietas que apresentam valores calóricos mais elevados que a dieta padrão para roedores, podendo ser rica em gorduras ou em carboidratos, ou ainda ser altamente palatável, o que induz a uma hiperfagia persistente (Cesaretti et al., 2006). Destas dietas, a dieta de cafeteria é a que mais se aproxima da realidade humana. Neste modelo experimental é ofertado ao animal, juntamente com a ração padrão, alimentos altamente calóricos e palatáveis, tais como bacon, castanhas, leite condensado, refrigerantes, chocolate, amendoim, pão branco, biscoitos, entre outros produtos industrializados, que tendem a provocar um incremento da ingestão calórica desses animais bem como, aumento do peso corporal e da adiposidade, além de desencadear um quadro de síndrome metabólica. Além disso, disfunções endoteliais, alterações hepáticas e alterações no trato gastrointestinal também foram observadas mediante consumo da dieta de cafeteria na fase adulta (Cesaretti et al., 2006; Scoaris et al., 2010).

#### 2.4. *Isquemia/Reperfusão Mesentérica*

A isquemia ocorre quando um órgão não é suprido em quantidade suficiente de sangue, como resultado de choque, doença vascular ou transplante de órgãos. Os danos causados pelo processo de isquemia e reperfusão (I/R) ocorrem inicialmente pela falta de circulação adequada para suprir as necessidades metabólicas dos órgãos envolvidos (Cerqueira et al., 2005; Chang et al., 2006). A isquemia mesentérica pode ser subdividida em crônica, quando os sintomas isquêmicos são provenientes de doença arteriosclerótica de longa data, e aguda, que é baseada na etiologia da oclusão, embólicas, trombóticas ou não oclusivas (Chang et al., 2006).

A isquemia mesentérica aguda é resultado de um decréscimo repentino no fluxo sanguíneo intestinal decorrente de uma oclusão vascular mesentérica, oclusão da artéria ou veia mesentérica superior, que gera uma hipoperfusão no intestino delgado podendo levar ao infarto, apresentando taxa de mortalidade de aproximadamente 70% (Tendler, 2003).

Em nível celular a isquemia causa danos funcionais nas mitocôndrias, redução de regulação da transferência iônica e acidez intracelular. Além disso, alterações na permeabilidade da membrana e liberação de enzimas degradativas e radicais livres que podem levar à apoptose e necrose tecidual (Chang et al., 2006).

Se a isquemia mesentérica é detectada precocemente, uma intervenção terapêutica é possível, caso contrário, técnicas cirúrgicas são necessárias, assim como na suspeita de infarto intestinal (Berland e Oldenburg, 2008). Estas medidas devem ser tomadas para reestabelecer os fluxos sanguíneos e evitar necrose tecidual e distúrbios metabólicos que podem culminar com disfunção do órgão e morte.

Entretanto, danos teciduais causados pela alteração do fluxo sanguíneo intestinal estão relacionados também com a reperfusão (Bulkley, 2009) em condições clínicas como transplantes, cirurgias e diversos estados patológicos (Rivera et al., 2009). Curtos períodos de isquemia mesentérica resultam em aumento da permeabilidade microvascular, enquanto uma isquemia prolongada pode resultar em ruptura da barreira mucosa intestinal através principalmente de metabólitos de oxigênio reativo (Berland e Oldenburg, 2008) como radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila e neutrófilos polinucleares (Berland e Oldenburg, 2008; Sehirli et al., 2009).

O superóxido pode então formar peróxido de hidrogênio, e, secundariamente, o radical hidroxila pela reação de Harber-Weiss. As espécies reativas de oxigênio (ROS)

geradas a partir da I/R induzem a peroxidação lipídica nas membranas celulares e mitocondriais que é uma das causas de lesão na mucosa (Takizawa et al., 2011).

Em estudos de lesão mesentérica por I/R foram detectadas alterações na forma neural, no arranjo dos neurônios, na intensidade de coloração do plexo mioentérico (Bolekova et al., 2011), alteração de suas propriedades e até mesmo causa sua morte (Sehirli et al., 2009; Lindstro e Elblad, 2004). As alterações funcionais dos neurônios entéricos levam, então, à alterações na motilidade intestinal (Calcina et al., 2005; Lindstro e Elblad, 2004).



## 2.5. Envelhecimento

O processo de envelhecimento é uma característica única do ciclo de vida de todos os organismos multicelulares, no qual a capacidade funcional de uma variedade de sistemas fisiológicos sofrem prejuízos progressivos durante a fase pós-maturacional, atenuando a habilidade de manutenção da homeostase, resultando em morte (Sohal et al., 2002). Promove alterações morfoquantitativas na população neuronal e glial entérica (Phillips et al., 2004; Marese et al., 2007), na expressão de neurotransmissores (Phillips et al., 2003) e organização dos plexos, podendo levar a sintomas como redução do tempo de esvaziamento gástrico e dos movimentos peristálticos, atividades moduladas pela inervação intrínseca do trato gastrointestinal (Wade & Cowen, 2004).

Apesar da redução quantitativa dos neurônios mioentéricos, pesquisas demonstram um aumento significativo da área do corpo celular, relacionado ao envelhecimento (Marese et al., 2007; Schoffen e Natali, 2007) que pode ser atribuído à reorganização dos neurônios remanescentes, demonstrando a capacidade plástica neuronal no tecido nervoso completamente diferenciado. Estas alterações estão relacionadas principalmente à produção de radicais livres e redução dos antioxidantes intracelulares provocando danos neuronais cumulativos e irreversíveis causando a morte celular por necrose ou apoptose (Imai e Nagakawa, 2003).

Para o estudo destas alterações, modelos de envelhecimento são utilizados em nosso laboratório. Os ratos são mantidos em biotério pelo tempo determinado para o experimento, com condições de temperatura e ciclo dia/noite de 12 horas controlados. Marese et al., 2007, utilizaram animais com 21, 60, 90, 210, 345 e 428 dias. Em outro estudo (Santi-Rampazzo, AP), foram utilizados animais com 7, 12 e 23 meses de idade. Frequentemente, os modelos de envelhecimento são associados a outros que visam amenizar os prejuízos causados pela idade, como por exemplo, a suplementação dos animais com compostos antioxidantes ou restrição alimentar.

### 2.3. *Antioxidantes*

Neurônios são considerados particularmente vulneráveis aos danos causados pelo acúmulo de radicais livres devido ao seu grande tamanho, alto nível de atividade metabólica e relativamente pobre defesa antioxidante (Sohal e Weindruch, 1996). Várias espécies de radicais livres, denominadas espécies reativas ao oxigênio (ROS), são normalmente produzidas no corpo para realizar funções específicas. São geradas principalmente nas mitocôndrias durante o processo de respiração celular, apresentam elétrons desemparelhados, o que as torna altamente reativas para reagir com as demais substâncias biológicas do organismo (Kuyvenhoven e Meinders, 1999). O superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o óxido nítrico (NO) são três espécies reativas ao oxigênio que são essenciais para a fisiologia normal, mas que acredita-se que possam acelerar o processo de envelhecimento e mediar a degeneração celular em estados patológicos (Vincent et al., 2004).

O estresse oxidativo ocorre em um sistema celular quando a produção de moléculas de radicais livres excede sua capacidade antioxidante. Não ocorrendo a remoção, os radicais livres atacam e danificam proteínas, lipídios e ácidos nucleicos diminuindo sua atividade levando à perda de metabolismo energético, sinalização

celular, transporte e outras funções principais (Vincent et al., 2004). As substâncias antioxidantes, que permitem a manutenção do equilíbrio interno do organismo, impedindo a formação dos radicais livres ou neutralizando as espécies já formadas, sofrem redução durante o processo de envelhecimento ou patologias, favorecendo ainda mais a ocorrência do estresse oxidativo (Kuyvenhoven e Meinders, 1999).

Embora humanos e outros organismos possuam defesas antioxidantes e sistemas de reparos contra danos oxidativos, estes sistemas não são capazes de evitar todos os danos produzidos. No caso de um desbalanço dos mecanismos de proteção antioxidante, pode ocorrer uma deterioração das funções fisiológicas, resultando em doenças e aceleração do envelhecimento. Por esta razão, os antioxidantes em dietas e ou suplementos são de grande interesse como possíveis agentes protetores contra danos oxidativos (Peralta et al., 2008).

Pesquisas com antioxidantes têm sido freqüentes, e uma gama de compostos são utilizados para tal finalidade. Podemos citar como exemplo em nosso laboratório: *Ginkgo biloba* (Da Silva et al., 2011), Vitaminas C (Freitas et al., 2008) e Vitamina E (Pereira et al., 2008), L-Glutamina (Pereira et al., 2011), extrato aquoso do cogumelo-do-sol, *Agaricus brasiliensis* (Antigo *A. blazei*) (Santi-Rampazzo et al.) e resveratrol (Borges et al.). Vale ressaltar que os modelos utilizados possuem particularidades em relação à tratamento e forma de administração do antioxidante estudado.

### **3. MÉTODOS DE EVIDENCIAÇÃO NEURONAL**

#### *3.1. Método de Giemsa*

Os ribossomos são as organelas mais características do citoplasma neuronal, podendo estar ligados às cisternas do retículo endoplasmático rugoso ou arranjados em rosetas e espirais. A coloração neuronal pelo método de Giemsa adaptado por Barbosa (1978) explora a afinidade do corante de Giemsa, feito a base de azul de metileno, por estruturas ácidas como os ribossomos e retículo endoplasmático rugoso tão abundantes no citoplasma neuronal. Como o corante tem afinidade pela maquinaria de síntese proteica do neurônio, pode-se usar essa técnica para se fazer inferências indiretas sobre o estado da síntese de proteínas nos neurônios. As células em maior atividade de síntese proteica tenderão a apresentar maior afinidade pelo corante em relação àquelas com menor atividade de síntese proteica.

### 3.2. Métodos Histoquímicos

#### *NADH-DIAFORASE*

Esta técnica baseia-se na atividade de enzimas mitocondriais capazes de transferir elétrons do NADH para aceptores de elétrons. Durante o funcionamento normal das mitocôndrias o transporte de elétrons é acoplado às reações da fosforilação oxidativa para a síntese de ATP. Entretanto, para a marcação neuronal, segmentos do trato gastrointestinal são incubados em um meio contendo um doador de elétrons NADH e um aceptor artificial de elétrons conhecido como nitro blue tetrazolium (NBT) que quando reduzido se converte em um precipitado de cor púrpura chamado de formazana. Quando o tempo de incubação dos segmentos é limitado, por exemplo 45 minutos para todas as amostras, a quantidade de formazana produzida será proporcional a ação das enzimas mitocondriais transferidoras de elétrons dos neurônios das respectivas amostras. Assim, a técnica explora o funcionamento do metabolismo energético dos neurônios. Usando o mesmo tempo de incubação, aqueles neurônios com maior quantidade e/ou maior atividade das enzimas mitocondriais deverão exibir maior marcação em relação a neurônios com menor quantidade e/ou menor atividade das enzimas mitocondriais.

#### *NADPH-DIAFORASE*

Esta técnica baseia-se na atividade da enzima óxido nítrico sintetase neuronal, uma enzima que produz o neurotransmissor óxido nítrico à partir do aminoácido arginina. O óxido nítrico é um importante neurotransmissor inibitório no sistema nervoso entérico. Essa técnica permite o estudo da subpopulação de neurônios nitrérgicos entéricos. Para a marcação neuronal segmentos do trato gastrointestinal são incubados em um meio contendo um aceptor artificial de elétrons conhecido como nitro blue tetrazolium (NBT) e NADPH um doador de elétrons, então a enzima óxido nítrico sintetase neuronal se encarrega de transferir elétrons do NADPH para o NBT que quando reduzido se converte em um precipitado de cor púrpura chamado de formazana marcando de azul púrpura os neurônios.

### 3.3. Métodos Imunohistoquímicos

Métodos de coloração imunohistoquímica são amplamente utilizados atualmente. O reagente pivô, comum a todas as técnicas imunohistoquímicas é o **anticorpo**. Soluções contendo anticorpos (antisoros) específicos para um grande número de antígenos teciduais têm expandido a quantidade e qualidade do repertório imunohistológico.

Para a melhor compreensão dos métodos imunohistoquímicos, é necessário um conhecimento básico de alguns princípios de imunologia.

### **1. Antígenos**

Apresentam duas propriedades fundamentais: a primeira é a **imunogenicidade**, que é a capacidade de induzir a formação de anticorpos, e a segunda é a **reatividade específica**, o que significa que o antígeno é capaz de reagir com o anticorpo que por ele foi induzido. A reação entre um antígeno e seu anticorpo é uma das mais específicas em toda a biologia, e é a razão pela qual as reações imunohistoquímicas são mais precisas do que as técnicas de histoquímica de rotina.

*Um antígeno é, então, uma substância estranha ao hospedeiro, que estimula a formação de um anticorpo específico e que reagirá com este anticorpo produzido.* Esta reação envolve a formação de complexos imunes compostos por diversas moléculas de antígenos e anticorpos. Estes complexos podem se tornar muito grandes e formar precipitados que podem ser caracterizados por diversas técnicas.

### **2. Anticorpos**

Um anticorpo é formado em resposta à exposição a um antígeno e reage especificamente com este antígeno, formando imunocomplexos, quer no próprio organismo, ou em condições laboratoriais. Pertencem a um grupo de proteínas chamadas imunoglobulinas (Ig). Compreendem cinco maiores classes, listadas em ordem decrescente de quantidade encontrada no plasma ou soro: imunoglobulina G (IgG), IgA, IgM, IgD e IgE. Cada imunoglobulina é composta de duas **cadeias pesadas** (H) idênticas e duas **cadeias leves** (L) também idênticas. Soluções de anticorpos utilizadas em colorações imunohistoquímicas contém principalmente anticorpos da classe IgG, com menores quantidades das demais classes

### **3. Tipos de soluções contendo anticorpos**

Existem diversos preparados contendo anticorpos, adequados para a utilização nas técnicas de imunohistoquímica.

### SORO TOTAL:

- Produção mais simples, e por isso o mais comum e mais barato. O soro de um animal contendo um anticorpo é centrifugado com o objetivo de separar as células do soro, e qualquer anticorpo contaminante é retirado mediante absorção.
- Contém anticorpos específicos contra o antígeno com o qual o animal foi imunizado, mas também contém anticorpos que são o produto do funcionamento normal do sistema imune do animal. Estes não deverão interferir com os procedimentos de coloração. A maioria das frações do soro total é constituída de componentes séricos como enzimas, eletrólitos e proteínas.

### FRAÇÃO COM ANTICORPOS:

- Esta solução contém principalmente anticorpos, quer sejam específicos contra o antígeno desejado, mas também os de ocorrência natural, além de uma quantidade muito pequena de proteína sérica residual. Neste tipo de preparação, purifica-se apenas a fração de imunoglobulina. A remoção da grande maioria das proteínas reduzirá a chance de reações inespecíficas em várias técnicas.

### PREPARADO ANTIGENO-ANTICORPO ESPECÍFICO:

- É uma solução contendo somente anticorpos dirigidos contra um antígeno específico. Não é obtido comumente e apresenta especificidade superior à necessária para a maioria dos procedimentos.

### PREPARADO COM ANTICORPO CONJUGADO:

- Neste caso, a solução contém o anticorpo específico, ligado quimicamente a um determinado tipo de marcador. Este marcador pode ser fluorescente (fluoresceína e rodamina) ou uma enzima (fosfatase alcalina e peroxidase). Infelizmente, no processo químico da conjugação, pequenas quantidades de anticorpos e de marcadores podem ser destruídos. Isto pode reduzir a especificidade destes reagentes. Uma alternativa então, é a utilização de **imunocomplexos** que constituem a combinação de um antígeno e seu anticorpo específico, utilizando-se a afinidade natural que estas moléculas tem entre si. Estes complexos são especialmente preparados de forma a se manterem solúveis

e não formarem precipitados nas soluções (ex: complexo peroxidase-antiperoxidase – PAP, que consiste da enzima peroxidase (antígeno) e um anticorpo específico para a antiperoxidase).

#### **4. ANTICORPOS MONOCLONAIS E POLICLONAIS**

**Epitopo ou Determinante antigênico**= é a parte estrutural de um antígeno que reage com um anticorpo.

**Monoclonais:** São anticorpos produzidos por uma linhagem específicos de células B (clone), portanto imuno e quimicamente idênticos, e que agem sobre um epitopo em especial, localizado sobre o antígeno contra o qual eles são dirigidos.

**Policlonais:** São produzidos por diferentes células B e, em consequência, são imuno e quimicamente distintos. Eles reagem com vários epitopos de um antígenos contra o qual são dirigidos.

#### **5. REAÇÃO CRUZADA DOS ANTICORPOS**

A reação cruzada de um anticorpo geralmente denota sua interação específica com um epitopo idêntico, encontrado em duas ou mais moléculas diferentes de antígenos.

#### **6. DILUIÇÕES E INCUBAÇÃO**

Usualmente, o fabricante oferece produtos pré-diluídos para o uso, ou recomenda diluições que sejam compatíveis com outras variáveis, tais como o método, tempo de incubação e temperatura. Diluições corretas irão contribuir para a qualidade da coloração, se elas forem preparadas cuidadosamente e consistentemente. São melhores determinadas, selecionando-se primeiro, um tempo de incubação fixo, e depois realizando uma série de diluições experimentais, com pequenos volumes.

A coloração alcançada pelo uso de diferentes diluições será freqüentemente idêntica ou semelhante. Neste caso, o custo do reagente pode vir a ser um fator importante na escolha da diluição ideal.

#### **Incubações:**

**Tempo de incubação:** a maior concentração de anticorpos específicos (e maior afinidade) permite um menor tempo de incubação.

O tempo de incubação para o anticorpo primário pode variar de 1,5 minutos a 48 horas, sendo de 20-30 minutos, o tempo mais usado. Incubações do anticorpo primário por 48 horas permitem, mais do que qualquer coisa, uma grande economia, porque diluições muito altas de antisoro podem ser usadas. O equilíbrio normalmente não é alcançado antes de 20 minutos. Tempos de incubação inconsistentes podem causar variações na intensidade e qualidade total da coloração.

**Temperatura de incubação:** o equilíbrio nas reações antígeno-anticorpo é alcançado mais rapidamente a 37°C, em comparação com a temperatura ambiente. Por isso muitos pesquisadores preferem incubar em temperatura maior. Um aumento na temperatura de incubação permite uma maior diluição do anticorpo. Se a diluição não é aumentada, o tempo de incubação pode ser menor.

### **Metodos de Coloração**

Existem muitos métodos imunoenzimáticos que pode ser usados para localizar antígenos. A escolha é baseada nas necessidades individuais de cada laboratório, tais como o tipo de espécimen a ser investigada, o grau de sensibilidade necessária, o tempo de processamento e o custo.

#### **Método Direto**

Nesta técnica, um anticorpo primário é quimicamente ligado a uma enzima (anticorpo conjugado). O anticorpo conjugado é a seguir incubado com a amostra de tecido e reagirá com o antígeno. A subsequente aplicação de um substrato cromogênico implicará na produção de um produto final colorido que se precipitará no local, revelando desta forma, a presença do antígeno.

#### **Método Indireto (dois passos)**

Neste método um anticorpo primário não conjugado se liga ao antígeno. Um anticorpo secundário, marcado com uma enzima, é aplicado contra o anticorpo primário (agora considerado o antígeno), seguido pela solução do substrato cromógeno.

Este método é mais versátil do que o método direto porque uma variedade de anticorpos primários a partir da mesma espécie, podem ser usados com o mesmo anticorpo secundário marcado. O procedimento é também algumas vezes mais sensível que o método direto, porque alguns anticorpos secundários parecem reagir com

diferentes epitopos localizados no anticorpo primário. Como consequência disto, mais moléculas de enzima se ligam no sítio do antígeno, o que resulta na maior sensibilidade.

### **Método Indireto (três passos)**

Neste método, um segundo anticorpo conjugado com enzima é adicionado ao previamente descrito. O anticorpo primário e o anticorpo secundário conjugado são aplicados sequencialmente, seguidos por um **terceiro anticorpo** conjugado com enzima, específico para o anticorpo secundário.

A terceira camada de anticorpo tem a função de amplificar o sinal. A enzima adicional colocada no sítio do antígeno produz uma maior intensidade de coloração. A amplificação do sinal é particularmente importante quando os antígenos tem um número limitado de epitopos.

### **Coloração Inespecífica de Fundo**

É a coloração positiva, em determinada amostra, que não resulte de interação antígeno-anticorpo.

A causa mais comum é a ligação de proteínas aos elementos de tecido conjuntivo e colágeno com fortes cargas elétricas. Os anticorpos são proteínas. Caso a primeira solução de proteínas aplicadas ao tecido seja o anticorpo primário, este pode ser inespecificamente absorvido nestes locais com intensas cargas elétricas. O anticorpo secundário vindo a seguir liga-se ao primário, e desta forma, ocorrerá a reação de coloração. A coloração positiva destes locais deve-se não à existência de antígeno nos tecidos, mas à ligação inespecífica de anticorpos ao colágeno no tecido conjuntivo.

**Como evitar:** através da adição de uma solução de proteína inóqua à amostra, antes da aplicação do anticorpo primário. Esta proteína preencherá estes componentes teciduais ricos em cargas elétricas, não deixando espaço para a absorção inespecífica do anticorpo primário. A fonte mais comum de solução protéica utilizada para esta finalidade é o **soro não-imune** da mesma espécie animal que produziu o anticorpo secundário. Este cuidado permite a prevenção da coloração falso-positiva devido à ligação do anticorpo secundário com componentes na solução protéica.

A adição de **albumina do soro bovino (BSA)** 2-5% aumentará a concentração de proteínas e reduzirá ainda mais a coloração inespecífica. O soro não imune é aplicado à amostra tecidual por 10 a 20 minutos. Esta etapa não é seguida por uma

lavagem, mas o soro em excesso é apenas escoado, permanecendo uma delgada camada envolvendo o tecido quando da aplicação do anticorpo primário. É necessário que permaneça uma quantidade pequena do soro, caso contrário o anticorpo primário será significativamente diluído, resultando em redução da intensidade de coloração do antígeno em pesquisa.

#### **4. PROTOCOLOS**

##### *Imunohistoquímica*

##### **Coleta de Material:**

Retirar o segmento de interesse

Lavagem do segmento – PBS

Fixação: Paraformaldeído - 3 hs

Lavagem do material com PBS – (2x 10 min)

Manter o material no PBS com azida sódica para posterior dissecação.

##### **Dissecação**

Após a dissecação, manter as membranas em PBS com azida. Realizar a primeira lavagem (2x 500 uL por 5 min) em PBS + Triton

##### **Bloqueio**

Preparar a solução de bloqueio e manter as membranas por uma hora.

Solução: PBS + azida + triton + soro de cabra + BSA

##### **Anticorpo Primário:**

Incubar em anticorpo primário por 48hs.

Solução: PBS + azida + triton + soro de cabra + BSA + anticorpo 1°

##### **Anticorpo Secundário:**

Realizar a segunda lavagem – (3x 500 uL por 5 min) em PBS + triton

Adicionar a solução contendo o anticorpo secundário. Incubar por 2hs.

Solução: PBS + azida + triton + soro de cabra + BSA + anticorpo 2°

##### **Montagem das lâminas:**

Após a terceira lavagem – ( 3x 500 uL por 5 min)

## 5. ESTUDO MORFOQUANTITATIVO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a realização do experimento, que envolve as etapas de tratamento, eutanásia e realização das técnicas descritas acima, faz-se necessário determinar as melhores estratégias de obtenção dos dados e análises dos mesmos. Duas categorias de análise são extensivamente utilizadas: *Análise quantitativa*, que fornece informações de densidade ou número de células/gânglio e *análise morfométrica*, que se refere à medida do perfil neuronal ou glial, ou seja, a área média do corpo celular.

Em primeiro lugar, é interessante determinar a região do segmento que está sendo estudado. Para isso, é realizada uma divisão didática considerando a circunferência intestinal (Figura 1.A). Após seccionado na região mesentérica, o preparado de membrana apresenta duas regiões mesentéricas (M - mais externas), uma região antimesentérica (AM – mais central) e duas regiões intermediárias (I), que se intercalam entre M e AM (Figura 1.B). Estas regiões podem ser determinadas nas lâminas com auxílio de uma régua e canetas para retroprojetor.

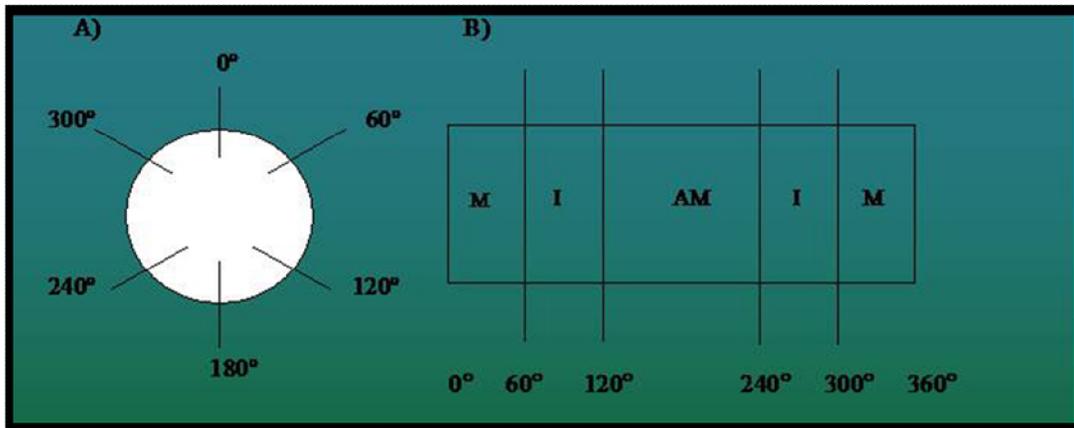


Figura 1. Divisão didática da circunferência intestinal.

A quantificação neuronal por densidade se baseia na contagem ou captura de imagens em campos aleatórios dentro da região (ou regiões) escolhida para estudo. Quando a objetiva utilizada para análise é de 20X, utiliza-se 32 campos microscópicos, geralmente em capturas de imagens nas lâminas de imunofluorescência. Para a contagem direta no microscópio utiliza-se objetiva de 40X e 80 campos microscópicos (este número pode variar dependendo da pesquisa que está sendo realizada). Pode-se

realizar a análise em apenas uma região (I ou AM), ou dividir a quantidade de imagens abrangendo ambas regiões, o importante é seguir um padrão para todos os animais. A região mesentérica (M) é pouco utilizada por sofrer injúrias durante o processamento, tornando a visualização celular mais complexa. Após a captura das imagens realiza-se a contagem de todos os neurônios, obtendo-se uma soma que, juntamente com a soma da área analisada, será convertida em neurônios/cm<sup>2</sup>, neurônios/mm<sup>2</sup> ou neurônios/área total analisada.

Para a quantificação por gânglio, realiza-se a captura e contagem de 50 gânglios aleatórios/animal e os valores são expressos como neurônios/gânglio e/ou glias/gânglio. No caso de dupla-imunomarcção para neurônios e células da glia, os resultados podem ainda ser expressos como relação glia/neurônio.

Para a análise morfométrica são mensuradas áreas ( $\mu\text{m}^2$ ) dos corpos celulares de 100 neurônios ou células glias/animal por meio do programa Image-Pro Plus versão 4.5-Media Cybernetics.

### **Análises estatísticas**

Os dados devem ser analisados quanto à sua distribuição (normalidade) através do teste Kolmogorov-Smirnov (KS). Dados paramétricos são submetidos à Análise de Variância (*one-way* ANOVA) e o pós teste de Tukey com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Dados não-paramétricos são analisados por delineamento em blocos com o programa Statistica (StatSoft). O nível de significância adotado é de 5% e os resultados podem ser expressos como média  $\pm$  desvio padrão ou média  $\pm$  erro padrão.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AUBÉ, AC; CABARROCAS, J; BAUER, J. Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. **Gut**; 55: 630-637, 2006.

BARBOSA, AJA. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. Rev. **Bras. de Pesquisas Méd. e Biol.** 11:95-97, 1978.

BARJA, G. Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction. **Ageing Research Reviews**; 1: 397-411, 2002.

BARJA, G. Free radicals and aging. **Trends in Neurosciences**; 27: 595-600, 2004.

BENNET, JW. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. **Mycopathologia**, 100:3-5, 1987.

BERGMEYER, HU; BERNET, E. Determination of glucose-oxidase and peroxidase. In: **Methods of enzymatic analysis**. New York, NY: Verlag Chemie-Academic Press, 1974.

BERLAND, T; OLDENBURG, WA. Acute mesenteric ischemia. **Curr Gastroenterol Rep. USA**; 10: 341-346, 2008.

BEZUIDENHOUT, SC; GELDERBLOM, WCA.; GORST-ALLMAN, CP. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society**, 743-745, 1988.

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

BOLEKOVA, A. et al. NADPH-diaphorase expression in the rat jejunum after intestinal ischemia/reperfusion. **Eur. J. Histochem**; 55: 23, 2011.

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

BORDONE, L; GUARENTE, L. Calorie restriction, sirt 1 and metabolism: understanding longevity. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**; 6: 298-305, 2005.

BULKLEY, GB. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. **Br J Cancer Suppl**; 8: 66-73, 1987.

CALCINA, F., et al. Effect of N-methyl-D-aspartate receptor blockade on neuronal plasticity and gastrointestinal transit delay induced by ischemia/reperfusion in rats. **Neuroscience**;134: 39-49, 2005.

CERQUEIRA, NF; HUSSNI, CA; YOSHIDA, WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. **Acta Cir Bras. Brazil**, 20: 336-43, 2005.

CESARETTI, MLR, 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, 11º 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.

SOUZA, 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.

VOET, D; VOET, J; PRATT, CW. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2002.

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  $\beta$ -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.