



Avaliação de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos do íleo de ratos diabéticos suplementados com Acetil-L-Carnitina

Evaluation of positive NADPH-diaforase myenteric neurons in diabetic rats supplemented with Acetyl-L-Carnitine

**Angela Maria Pereira Alves¹, Marli Aparecida Defani¹, Éder Paulo Belato Alves¹,
Stephanie Carvalho Borges², Cristina Elena Prado Teles Fregonesi³, Sandra Regina
Stabille⁴, Marcilio Hubner de Miranda Neto⁵**

¹ Doutores em Ciências Biológicas (Biologia Celular) pela Universidade Estadual de Maringá (UEM). Docente Adjunto da Universidade Estadual de Maringá, Maringá (PR), Brasil; ² Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá (PR), Brasil; ³ Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular) pela Universidade Estadual de Maringá (UEM). Docente Assistente da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Presidente Prudente (SP), Brasil; ⁴ Doutora em Ciências Morfofuncionais pela Universidade de São Paulo (USP/SP). Docente aposentada da Universidade Estadual de Maringá, Maringá (PR), Brasil; ⁵ Doutor em Ciências pela Universidade de São Paulo (USP/SP). Docente Titular da Universidade Estadual de Maringá, Maringá (PR), Brasil.

* **Autor correspondente:** Stephanie Carvalho Borges - E-mail: stephaniecarvalhoborges@hotmail.com

RESUMO

Objetivou-se avaliar a suplementação com acetil-L-carnitina (ALC) sobre os neurônios mioentéricos do íleo de ratos após a indução de diabetes. Foram usados animais diabéticos suplementados com ALC (DC), diabéticos (D), normoglicêmicos suplementados com ALC (CC) e normoglicêmicos (C). Neurônios NADPH-d foram quantificados e mensurados. Observou-se redução na glicemia e na ingestão de água no grupo DC. A densidade neuronal em 12,72mm² de íleo foi semelhante nos quatro grupos ($p > 0,05$): DC ($558,8 \pm 220,2$), D ($513,4 \pm 72,01$), CC ($645,2 \pm 144,9$) e C ($934 \pm 248,5$). A área média do corpo celular dos neurônios (μm^2) nos animais diabéticos, DC ($303,9 \pm 114,2$) e D ($285,4 \pm 111,8$), foram maiores que nos grupos normoglicêmicos, CC ($173,6 \pm 53,78$) e C ($158,4 \pm 53,73$). A área do íleo (mm²) também mostrou-se maior nos animais dos grupos diabéticos, DC (190,96) e D (171,62) quando comparados aos normoglicêmicos: CC (138,04) e C (130,06). Entretanto no grupo DC, ambas as áreas foram maiores que no D ($P < 0,05$). Assim, pode-se inferir discreto incremento na população neuronal. Os dados indicaram que a ALC não interferiu nos mecanismos que promovem aumento na produção de óxido nítrico (NO) pelos neurônios mioentéricos do íleo e que a maior dilatação do íleo no grupo DC poderia ser resultante de efeito colateral da dose de carnitina empregada.

Palavras-chave: Plexo mioentérico. Óxido nítrico. Trato gastrointestinal.

ABSTRACT

The objective was to evaluate supplementation with acetyl-L-carnitine (ALC) on myenteric neurons of the ileum of rats after induction of diabetes. Diabetic animals supplemented with ALC (DC), diabetic (D), normoglycemic animals supplemented with ALC (CC) and normoglycemic (C) were used. NADPH-d neurons were quantified and measured. There was a reduction in blood glucose and water intake in the DC group. The neuronal density in 12.72mm² of ileum was similar in the four groups ($p > 0.05$): DC (558.8 ± 220.2), D (513.4 ± 72.01), CC (645.2 ± 144.9) and C (934 ± 248.5). The mean cell body area of neurons (μm^2) in diabetic

animals, DC (303.9 ± 114.2) and D (285.4 ± 111.8), were greater than in the normoglycemic groups, CC (173.6 ± 53.78) and C (158.4 ± 53.73). The ileum area (mm^2) was larger in animals of the diabetic groups, CD (190.96) and D (171.62) compared to the normoglycemic groups: CC (138.04) and C (130.04). However, in the DC group, both areas were larger than in D ($p < 0.05$). Thus, a slight increase in neuronal population can be inferred. The data indicated that ALC did not interfere with mechanisms that promote an increase in the production of nitric oxide (NO) by myenteric neurons of the ileum and that the greater dilation of the ileum in the DC group could be the result of a side effect of the dose of carnitine used.

Keywords: Gastrointestinal tract. Myenteric plexus. Nitric oxide.

Recebido em Março 30, 2020

Aceito em Dezembro 11, 2020

INTRODUÇÃO

A relação entre hiperglicemia e neuropatia diabética tem sido vastamente documentada na literatura; embora sua etiologia não esteja integralmente elucidada. Aventa-se que as perturbações metabólicas, tais como: hiperatividade da via dos polióis, redução dos níveis de fatores neurotróficos, ativação da proteína cinase C, glicosilação não-enzimática das células de Schwann¹; bem como alterações vasculares² e hipóxia endoneural³; mecanismos imunológicos⁴; estresse oxidativo⁵; e comprometimento do metabolismo dos lipídeos, incluindo as alterações nos níveis de carnitina⁶ seriam os fatores preponderantes para a deflagração da neuropatia⁷.

A carnitina é importante na oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, transportando-os para o interior das mitocôndrias⁸. Estudos clínicos e experimentais enunciam que a

administração de carnitina previne alterações na condução nervosa, contribui para a regeneração de nervos⁹, atuando na neuroproteção¹⁰, além de exibir efeitos analgésicos no sistema nervoso periférico¹¹.

Alterações de motilidade no trato gastrointestinal são sintomas comuns do diabetes mellitus (DM) que se manifestam por episódios de diarreia e constipação, bem como gastroparesia¹². Estas alterações têm sido associadas ao controle precário da glicemia, que por sua vez, está atrelada à neuropatia.

O DM atinge de modo diferencial as subpopulações de neurônios entéricos, causando redução no número desses neurônios¹³ em curto ou em longo prazo, em todos os segmentos do trato gastrointestinal; além de causar alterações nos níveis de diferentes neurotransmissores¹⁴. Deste modo, é factível que a neuropatia decorrente do DM não tenha caráter seletivo¹⁵, pois não

afeta os neurônios mioentéricos com a mesma intensidade e extensão, sendo possível verificar redução de alguns tipos de neurotransmissores em alguns neurônios, mas não em outros¹⁶.

O óxido nítrico (NO) é o principal neurotransmissor inibitório não adrenérgico e não colinérgico do trato gastrointestinal. A atuação do NO como elo entre os fatores neuropatogênicos, metabólicos e vasculares deflagradores da neuropatia diabética têm sido proposta; ponderando que a conversão da glicose à sorbitol pela aldose redutase, a síntese de NO a partir de arginina e o mecanismo da glutatona competem pelo mesmo cofator: o NADPH¹⁷.

Considerando a relevância das neuropatias como umas das complicações crônicas degenerativas do diabetes, bem como a relação entre a redução dos níveis de carnitina sérica e tecidual com a patogênese da neuropatia diabética, realizou-se o presente estudo com o objetivo de avaliar a morfometria e a quantificação da população de neurônios NADPH-diaforase positivos do plexo mioentérico do íleo de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina e suplementados com acetil-L-carnitina (ALC); uma vez que alterações nesta população neuronal leva a disfunções gastrointestinais tais como diarreia e constipação nos indivíduos diabéticos, a ALC poderia servir como agente de

preservação desses neurônios contribuindo para diminuição dos sinais clínicos da patologia.

METODOLOGIA

PROCEDIMENTO COM OS ANIMAIS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, conforme parecer nº. 161/2003. As técnicas utilizadas submeteram-se aos princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Para tal, foram utilizados 20 ratos Wistar machos adultos (Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá). Aos 103 dias de idade, os animais pesando em média 350g, foram transferidos para o biotério do Departamento de Ciências Morfológicas, onde permaneceram em gaiolas individuais, mantidas em condições de temperatura ambiente controlada de (22 ± 2 °C) e claro/escuro ciclo (12/12 horas) e água e alimentos (Nuvilab[®]) *ad libitum*.

Após dois dias de adaptação ao novo ambiente, os ratos foram pesados e passaram a ser monitorados pelo período experimental de 105 dias. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos contendo cinco (5) animais cada, de acordo com os tratamentos a que foram submetidos: diabético

suplementado com ALC (grupo DC); diabético (grupo D); normoglicêmico suplementado com ALC (grupo CC); e normoglicêmico (grupo C). Os ratos dos grupos C e D receberam água torneiral, enquanto os dos grupos CC e DC receberam água mais acetyl-L-carnitina - ALC (Spfarma, São Paulo, Brasil), em dose diária de 200 mg/kg, em garrafa âmbar. O consumo de água foi monitorado diariamente, e a massa corporal a cada 15 dias.

Para indução do diabetes, os ratos dos grupos D e DC foram submetidos à jejum de quatorze horas e receberam injeção intravenosa (veia peniana) de estreptozotocina (Sigma, ST. Louis, MO, EUA) na dose de 35 mg/kg, dissolvida em tampão de citrato 10 mmol/L (pH 4,5). No quarto dia após a indução, a glicemia foi medida (Accu-Chek Active, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Alemanha) para confirmar o estabelecimento de diabetes experimental. Todos os animais nos grupos D e DC apresentaram níveis de glicose superior à 210 mg/dL.

Aos 210 dias de idade, os ratos foram anestesiados com Thiopental® (40mg/kg I.P.; Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA) e na sequência, realizada a punção cardíaca e laparotomia. Esses dois últimos procedimentos resultaram na morte dos animais por hipovolemia. O sangue

coletado por punção cardíaca foi utilizado para medir os níveis de glicose, pelo método da glicose oxidase e da hemoglobina glicada.

HISTOQUÍMICA PARA NADPH-DIAFORASE

O fêo obtido de cada animal foi lavado e preenchido com tampão fosfato (PB 0,01M, pH 7,4) e fixado em paraformaldeído 4% (Merck, Darmstadt, Germany) por 30 minutos. Posteriormente foi imerso em Triton X-100® 0,3% (Sigma, St. Louis, USA) dissolvido em tampão fosfato salinado (PBS, 1 M, pH 7,4) por 10 minutos e lavado dez vezes em PBS (10 minutos cada) em temperatura ambiente. Para evidenciar neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos (NADPH-d), segundo Scherer-Singler *et al.*¹⁸, o fêo foi incubado por 2h30 sob agitação em meio contendo para cada 200 ml de tampão Tris-HCL 0,1 M (GibcoBRL, N.Y., USA) pH 7,6: 100 mg de β -NADPH forma reduzida (Sigma, Steinheim, Germany); 50 mg de nitro blue tetrazolium (Sigma Chemical, USA); e 6 mL de Triton X-100® 0,3%. Depois da incubação o fêo foi aberto nas extremidades, lavado três vezes em PBS 0,01 M por 5 minutos cada e imerso em solução de paraformaldeído à 4%.

Após fixação, o íleo foi aberto ao longo da inserção mesentérica e sua circunferência foi mensurada. Amostra transversal de aproximadamente 1 cm foi isolada e microdissecada ao estereomicroscópio com transiluminação para retirada da túnica mucosa e tela submucosa preservando-se as túnicas muscular e serosa. Cada preparado de membrana foi desidratado em série ascendente de etanol, diafanizado em xilol e, montado entre lâmina e lamínula com resina Permount (FisherChemical, USA).

ANÁLISES QUANTITATIVA E MORFOMÉTRICA

A análise quantitativa foi realizada nas regiões antimesentérica (120° à 240°) e intermediária (60° à 120°; 240° à 300°) considerando como 0° a borda mesentérica¹⁹ em cada preparado de membrana. Os neurônios mioentéricos foram então contados aleatoriamente, em microscópio de luz Olympus CBA, com objetiva de 40X, em 40 campos microscópicos da região antimesentérica e 40 campos da intermediária em cada preparado de membrana. A área de cada campo foi de 12,72mm². Meios-neurônios foram contados em campos alternados.

Para a morfometria foi utilizado o programa computadorizado de análise de imagens Image-Pro-Plus 3.0.1. acoplado ao microscópio Leica DM RX. No preparado de membrana obtido do íleo de cada animal foi mensurado a área do corpo celular (μm^2) de 100 neurônios (50 da região intermediária e 50 da antimesentérica) perfazendo o total de 500 neurônios em cada grupo. Os neurônios foram reunidos em grupos de intervalos de classe de 100 μm^2 e foi obtida a incidência (%) de cada grupo para cada intervalo.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram avaliados por análise de variância One-Way ANOVA e pós-teste de *Tukey*, todos com nível de significância de 5%. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão.

RESULTADOS

Os parâmetros fisiológicos dos ratos dos grupos de animais diabéticos suplementados com ALC (DC) e diabéticos (D) evidenciaram sinais típicos de polidipsia, hiperglicemia e níveis elevados de hemoglobina glicada (Tabela 1).

Tabela 1. Consumo diário de água (CDA), glicemia (Gl) e hemoglobina glicada (HbG) dos animais dos grupos: diabéticos suplementados com ALC (DC), diabéticos (D), normoglicêmicos suplementados com ALC (CC) e normoglicêmicos (C). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (n=5 ratos por grupo)

Parâmetros/Grupos	DC	D	C	CC
CDA/mL	156,6 \pm 4,9 ^b	173,4 \pm 5,2 ^a	51,1 \pm 1,1 ^c	62,13 \pm 0,9 ^c
Gl/ mg.dl ⁻¹	286 \pm 21,1 ^b	362,4 \pm 15,1 ^a	99,8 \pm 5,9 ^c	105,4 \pm 11,2 ^c
HbG/ %	6,7 \pm 0,3 ^a	6,8 \pm 0,2 ^a	3,9 \pm 0,2 ^b	3,9 \pm 0,2 ^b

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Letras iguais não representa diferença significativa.

A suplementação com ALC reduziu ($p < 0,05$) a ingestão de água e a glicemia do grupo DC. Contudo, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) no nível de hemoglobina glicada entre os grupos de ratos diabéticos (Tabela 1).

A densidade neuronal média em 12,72 mm² de íleo e a média da área do corpo celular de 500 neurônios NADPH-d

positivos dos quatro grupos estão contidas na Tabela 2. Não foram observados diferença significativa ($p > 0,05$) na densidade neuronal entre todos os grupos. Foram constatados aumento ($p < 0,05$) na área do corpo celular neuronal dos ratos diabéticos suplementados ou não em relação aos grupos controles.

Tabela 2. Área do íleo, densidade neuronal, área do corpo celular de neurônios mioentéricos NADPH-d positivos de ratos dos grupos: diabéticos suplementados com acetil-L-carnitina (DC), diabéticos (D), normoglicêmicos suplementados com acetil-L-carnitina (CC) e normoglicêmicos (C)

Grupo	Área do íleo (mm ²)	Densidade neuronal	Área do corpo celular (μ m ²)
DC	190,96 ^a	558,8 \pm 220,2 ^a	303,9 \pm 114,2 ^a
D	171,62 ^b	513,4 \pm 72,01 ^a	285,4 \pm 111,8 ^b
CC	138,04 ^c	645,2 \pm 144,9 ^a	173,6 \pm 53,78 ^c
C	130,06 ^c	934 \pm 248,5 ^a	158,4 \pm 53,73 ^d

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Letras iguais não representa diferença significativa.

Nos grupos DC e D predominaram neurônios com área do corpo celular igual ou superior a 200 μ m². Nos grupos C e

CC a incidência foi maior para neurônios com área do corpo celular inferior a 200 μ m² (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição de frequência (F) de neurônios mioentéricos NADPH-d reativos do íleo de ratos dos grupos: diabéticos suplementados com acetil-L-carnitina (DC), diabéticos (D), normoglicêmicos suplementados com acetil-L-carnitina (CC) e normoglicêmicos (C) segundo a área do corpo celular por intervalos de classes de 100 μm^2

Área do corpo celular	DC		D		CC		C	
	F	%	F	%	F	%	F	%
> 100	04	0,8	05	1	30	6	60	12
100 a 200	82	16,4	128	25,6	335	67	348	69,6
200 a 300	195	39,0	174	34,8	120	24	83	16,6
300 a 400	127	25,4	113	22,6	15	3	09	1,8
400 a 500	60	12	58	11,6	-	-	-	
> 500	32	6,4	22	4,4	-	-	-	
TOTAL	500	100	500	100	500	100	500	100

DISCUSSÃO

Os animais diabéticos (grupos DC e D) exibiram quadro clínico típico de diabetes, o qual foi notado ao longo do experimento. Tanto em nosso estudo, como o de Parvanova *et al.*²⁰ não foi constatada diferença na hemoglobina glicada em ratos diabéticos e diabéticos suplementados com ALC em condições variadas de dosagem e tempo; porém a redução na glicemia de jejum em ratos suplementados com ALC observada em nosso trabalho pode ser um indicativo de que a carnitina possa influir na distribuição da glicose plasmática. Este achado corrobora os dados de Muoio *et al.*²¹ ao reportarem que a carnitina melhorou o metabolismo da glicose em humanos resistentes à insulina, em virtude de aumentar a flexibilidade

metabólica; bem como elevou a sensibilidade das células à insulina²².

Por outro lado, se considerarmos que os valores de hemoglobina glicada foram semelhantes para os grupos DC e D, essa redução na glicemia não deve ser considerada relevante em condição de diabetes, visto que o teste da hemoglobina glicada é um parâmetro que reflete a concentração média da glicemia na qual os eritrócitos foram expostos durante sua permanência no sangue²³. Com base nos resultados de hemoglobina glicada, pode-se considerar que o grau de diabetes foi semelhante para os ratos diabéticos com e sem suplementação com ALC. Assim, é possível investigar o impacto desta suplementação sobre a população de neurônios NADPH-diaforase positivos do plexo mioentérico do íleo, na condição de diabetes.

Em relação à população de neurônios mioentéricos NADPH-d do íleo, na presente condição experimental, a ALC não interferiu de modo significativa na densidade de neurônios, quer seja na comparação entre o grupo DC e CC, quer seja na comparação entre os grupos DC e D. Cabe destacar que os animais do grupo D apresentaram densidade neuronal 45,03% menor que os animais do grupo C, enquanto a área total do íleo era 31,95% maior, sugerindo perda neuronal de 13,08%. Nos animais diabéticos suplementados com carnitina, verificou-se densidade neuronal 40,17% menor que no grupo C enquanto o íleo apresentou área 46,82% maior, sugerindo uma preservação neuronal de aproximadamente 6,65%, o que é estatisticamente insignificante. Em estudo realizado por Miranda Neto *et al.*²⁴ comparando o colo de animais diabéticos com e sem suplementação com ALC, foi notada redução da densidade neuronal associada a expressiva dilatação do órgão com concomitante aumento numérico na população dos neurônios mioentéricos NADPH-d de 39,9% para o grupo diabético e 72% para o grupo diabético tratado com ALC.

Em diabetes agudo ou crônico, foi relatada diminuição na densidade da população geral de neurônios mioentéricos^{16,25} e em neurônios evidenciados pelo método histoquímico

da NADH-d²⁶. A marcação neuronal pela histoquímica da NADPH-d, no entanto, evidencia aproximadamente 50% dos neurônios NADH-d no intestino delgado de ratos²⁷, significando que a diminuição no número de neurônios NADH-d não implica, necessariamente, em diminuição equivalente dos neurônios NADPH-d. A densidade de neurônios NADPH-d positivos não alterada, sugere que os neurônios nitrérgicos são mais resistentes às condições fisiopatológicas decorrentes do diabetes e à morte celular²⁴, justificando, deste modo, a densidade neuronal encontrada para os ratos dos grupos DC e D.

Por outro lado, o aumento significativo nas áreas do íleo dos animais dos dois grupos diabéticos, sem o correspondente aumento no número de neurônios nitrérgicos, sugere que este aumento está relacionado à redução do tônus muscular devido à maior atuação dos neurônios nitrérgicos, que são inibitórios. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que a área celular desta categoria neuronal está significativamente aumentada nos diabéticos quando comparados aos controles o que geralmente decorre do incremento na maquinaria de síntese do neurônio. Nos grupos diabéticos suplementados ou não predominaram neurônios com área celular superior a 200 μm^2 , enquanto nos respectivos grupos controles

prevaleceram neurônios com área celular inferior a 200 μm^2 . Ferreira *et al.*²⁸ também observaram aumento na área de corpos celulares de neurônios nitrérgicos do intestino delgado de ratos com diabetes crônico.

A exemplo do que ocorre com o NO, também é possível que outros neurotransmissores inibitórios estejam aumentados e/ou que haja diminuição de neurotransmissores excitatórios interferindo na atividade de neurônios nitrérgicos. De acordo com essas observações, Defani *et al.*²⁹ verificaram aumento na área de corpos celulares de neurônios VIP-érgicos do plexo submucoso do jejuno de ratos após suplementação com ALC (200 mg/kg), tanto em ratos diabéticos quanto em não diabéticos. Miranda Neto *et al.*²⁴ contudo, observaram diminuição na área celular de neurônios mioentéricos no colo de ratos diabéticos suplementados com ALC.

Além disso, Tomlinson *et al.*³⁰ observaram que a redução da inervação extrínseca adrenérgica do estômago, relacionada à neuropatia diabética também poderia levar ao aumento compensatório da atuação da inervação intrínseca, na tentativa de suprir o relaxamento muscular gástrico induzido pela via simpática. Desse modo, tanto a denervação extrínseca, como o estado diabético, poderiam promover aumento na expressão da óxido nítrico sintase

(NOS) gerando grande produção de NO, com consequente aumento na área celular dos neurônios mioentéricos nitrérgicos de ratos diabéticos.

Como as alterações do intestino delgado são mais evidentes e extensas do que aquelas do colo; Belai *et al.*¹⁵ relacionam a menor sensibilidade à diferença de inervação extrínseca e de atividade motora do colo em relação às outras regiões. Este fato poderia justificar as diferenças de resultados encontrados no íleo e no colo. O aumento na área do corpo celular em condição de suplementação com ALC descrito por Defani *et al.*²⁹ e o constatado em neurônios nitrérgicos em nosso experimento não se manifestaria no colo simultaneamente com o íleo.

A suplementação com ALC na dosagem utilizada em nosso experimento, portanto, parece não contribuir para diminuição da produção de NO pelos neurônios mioentéricos do íleo, uma vez que a área do corpo celular dos neurônios NADPH-d foi maior ($p < 0,05$) no grupo suplementado, quando comparado com os demais grupos. O aumento na área do corpo celular também foi observado no grupo CC em relação ao grupo C, o que pode ser relacionado ao possível efeito neurotrófico da ALC que no diabetes, não seria capaz de minimizar a produção de NO. Outro fato constatado com a dosagem empregada de ALC neste

estudo, é que nos animais normoglicêmicos suplementados houve fragilização da parede do íleo durante a microdissecação dos preparados de membrana, sugerindo possível efeito colateral desta substância, uma vez que a sua estocagem é dose-dependente, ou seja, quanto maior for o conteúdo de carnitina proveniente da dieta, maior será o seu conteúdo nos tecidos.

CONCLUSÃO

Em condição de diabetes, a suplementação com ALC diminuiu os níveis glicêmicos de jejum, mas não foi capaz de interferir na densidade de neurônios NADPH-d positivos e nos mecanismos fisiológicos que promovem o aumento na produção de NO pelos neurônios mioentéricos do íleo, ainda que o aumento da área do corpo celular dos neurônios em animais normoglicêmicos suplementados tenha sido sugestivo de ação neurotrófica da ALC. Embora o emprego da carnitina tenha sido encorajado por seus efeitos benéficos em várias outras disfunções orgânicas, ainda se faz necessário a realização de novos estudos a fim de padronizar sua dosagem para evitar os possíveis efeitos prejudiciais que puderam ser constatados com sua administração.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus de Cascavel; à Faculdade Uningá pelo apoio durante as análises microscópicas e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá pelo suporte financeiro e técnico.

REFERÊNCIAS

1. Naruse K. Schwann Cells as Crucial Players in Diabetic Neuropathy. In: Myelin. Springer; 2019. p. 345–56.
2. Wołoszyn-Durkiewicz A, Myśliwiec M. The prognostic value of inflammatory and vascular endothelial dysfunction biomarkers in microvascular and macrovascular complications in type 1 diabetes. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2019;25(1).
3. Fang F, Wang J, Wang YF, Peng YD. Microangiopathy in diabetic polyneuropathy revisited. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(19):6456–62.
4. Kuhn C, Besancon A, Lemoine S, You S, Marquet C, Candon S, et al. Regulatory mechanisms of immune tolerance in type 1 diabetes and their failures. *J Autoimmun.* 2016;71:69–77.
5. Malik A, Morya RK, Bhadada SK, Rana S. Type 1 diabetes mellitus: Complex interplay of oxidative stress, cytokines, gastrointestinal motility and small intestinal

- bacterial overgrowth. *Eur J Clin Invest.* 2018;48(11):e13021.
6. Ramazani M, Qujeq D, Moazezi Z. Assessing the levels of L-carnitine and total antioxidant capacity in adults with newly diagnosed and long-standing type 2 diabetes. *Can J diabetes.* 2019;43(1):46–50.
7. Archvadze A, Kistauri A, Gongadze N, Makharadze T, Chirakadze K. MEDICAL BASIS OF DIABETIC NEUROPATHY FORMATION. *Georgian Med News.* 2018;(283):154–62.
8. Bene J, Hadzsiev K, Melegh B. Role of carnitine and its derivatives in the development and management of type 2 diabetes. *Nutr Diabetes.* 2018;8(1):1–10.
9. Tomassoni D, Mannelli LDC, Bramanti V, Ghelardini C, Amenta F, Pacini A. Treatment with acetyl-L-carnitine exerts a neuroprotective effect in the sciatic nerve following loose ligation: a functional and microanatomical study. *Neural Regen Res.* 2018;13(4):692.
10. Ferreira GC, McKenna MC. L-Carnitine and acetyl-L-carnitine roles and neuroprotection in developing brain. *Neurochem Res.* 2017;42(6):1661–75.
11. Sergi G, Pizzato S, Piovesan F, Trevisan C, Veronese N, Manzato E. Effects of acetyl-L-carnitine in diabetic neuropathy and other geriatric disorders. *Aging Clin Exp Res.* 2018;30(2):133–8.
12. Kurniawan AH, Suwandi BH, Kholili U. Diabetic Gastroenteropathy: A Complication of Diabetes Mellitus. *Acta Med Indones.* 2019;51(3):263–71.
13. Pereira RVF, Linden DR, Miranda-Neto MH, Zanoni JN. Differential effects in CGRPergic, nitrergic, and VIPergic myenteric innervation in diabetic rats supplemented with 2% L-glutamine. *An Acad Bras Cienc.* 2016;88:609–22.
14. Hermes-Uliana C, Panizzon CP do NB, Trevizan AR, Sehaber CC, Ramalho FV, Martins HA, et al. Is L-glutathione more effective than L-glutamine in preventing enteric diabetic neuropathy? *Dig Dis Sci.* 2014;59(5):937–48.
15. Belai A, Lincoln J, Milner P, Burnstock G. Differential effect of streptozotocin-induced diabetes on the innervation of the ileum and distal colon. *Gastroenterology.* 1991;100(4):1024–32.
16. Ferreira PEB, Lopes CRP, Alves AMP, Alves ÉPB, Linden DR, Zanoni JN, et al. Diabetic neuropathy: an evaluation of the use of quercetin in the cecum of rats. *World J Gastroenterol WJG.* 2013;19(38):6416.
17. Stevens MJ. Nitric oxide as a potential bridge between the metabolic and vascular hypotheses of diabetic neuropathy. *Diabet Med.* 1995;12(4):292–5.
18. Scherer-Singler U, Vincent SR, Kimura H, McGeer EG. Demonstration of a unique

- population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J Neurosci Methods*. 1983;9(3):229–34.
19. Miranda-Neto MH, Molinari SL, Natali MRM, Sant’Ana D de MG. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of the neuronal evidentiatio. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001;59(1):54–9.
20. Parvanova A, Trillini M, Podestà MA, Iliev IP, Aparicio C, Perna A, et al. Blood pressure and metabolic effects of acetyl-L-carnitine in type 2 diabetes: DIABASI randomized controlled trial. *J Endocr Soc*. 2018;2(5):420–36.
21. Muoio DM, Noland RC, Kovalik J-P, Seiler SE, Davies MN, DeBalsi KL, et al. Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility. *Cell Metab*. 2012;15(5):764–77.
22. Giancaterini A, De Gaetano A, Mingrone G, Gniuli D, Liverani E, Capristo E, et al. Acetyl-L-carnitine infusion increases glucose disposal in type 2 diabetic patients. *Metab Exp*. 2000;49(6):704–8.
23. Eyth E, Naik R. Hemoglobin A1C. In: *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing; 2019.
24. De Miranda Neto MH, Defani MA, Fregonesi C, Natali MRM, Pereira A. Morphometric and quantitative evaluation of the NADH-diaphorase positive myenteric neurons of the jejunum of streptozotocin-diabetic rats supplemented with acetyl-L-carnitine. *Anat Histol Embryol*. 2005;34(3):154–8.
25. Panizzona CP do NB, de Miranda Netoa MH, Ramalhoa FV, Longhinib R, de Mello JCP, Zanonias JN. Ethyl Acetate Fraction from *Trichilia catigua* Confers Partial Neuroprotection in Components of the Enteric Innervation of the Jejunum in Diabetic Rats. *Cell Physiol Biochem*. 2019;53:76–86.
26. Pereira Alves AM, de Paula AL, Moreira CR, Ferrari F, Coelho Leal JP, Hatoum US, et al. Effects of Quercetin-Supplementation in NADH-Diaphorase Positive Neurons Subpopulations in the Ileum of Rats with Experimental Diabetes Mellitus. *Int J Morphol*. 2017;35(1):236–41.
27. Santer RM. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. *J Auton Nerv Syst*. 1994;49(2):115–21.
28. Ferreira PEB, Beraldi EJ, Borges SC, Natali MRM, Buttow NC. Resveratrol promotes neuroprotection and attenuates oxidative and nitrosative stress in the small intestine in diabetic rats. *Biomed Pharmacother*. 2018;105:724–33.
29. Defani MA, Zanonias JN, Natali MRM, Bazotte RB, Miranda-Neto MH de. Effect of acetyl-L-carnitine on Vip-ergic neurons in jejunum submucous plexus of diabetic rats.

Arq Neuropsiquiatr.
2003;61(4):962-7.

30. Tomlinson KC. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev.* 1992;44:103-50.