

ASPECTOS MORFOQUANTITATIVOS DE NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS NADPH-DIAFORASE POSITIVOS DO ESTÔMAGO DE RATOS DIABÉTICOS

Cristina Elena Prado Teles Fregonesi*
Sônia Lucy Molinari**
Ângela Maria Pereira Alves***
Marli Aparecida Defani**
Marcílio Hubner de Miranda Neto**

FREGONESI, C.E.P.T; MOLINARI, S.L.; ALVES, Â.M.P.; DEFANI, M.A.; MIRANDA NETO, M.H. Aspectos morfoquantitativos de neurônios mioentéricos NADPH-Diaforase positivos do estômago de ratos diabéticos. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, 9(3), set./dez. p.155-159, 2005

RESUMO: O presente estudo teve por objetivo analisar as características morfoquantitativas de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos do estômago de ratos diabéticos. O estômago de cinco ratos normoglicêmicos e de cinco ratos diabéticos foi submetido a preparados de membrana corados pela técnica histoquímica da NADPH-diaforase. Verificou-se, nos animais diabéticos, diminuição do peso corporal, aumento do consumo diário de água, da glicemia em jejum e da hemoglobina glicada. Com os dados obtidos, foi observado aumento significativo na densidade e nas áreas dos perfis celulares neuronais da região pilórica do estômago dos ratos diabéticos.

PALAVRAS-CHAVE: Diabetes mellitus. Sistema nervoso entérico. NADPH-diaforase. Estômago de ratos

MORPHOQUANTITATIVE ASPECTS OF THE NADPH-DIAPHORASE POSITIVE MYENTERIC NEURONS FROM THE STOMACH OF DIABETIC RATS

FREGONESI, C.E.P.T; MOLINARI, S.L.; ALVES, Â.M.P.; DEFANI, M.A.; MIRANDA NETO, M.H. Morphoquantitative aspects of the NADPH-Diaphorase positive myenteric neurons from the stomach of diabetic rats. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, 9(3), set./dez. p.155-159, 2005

ABSTRACT: This study had the aim of analyzing the morphoquantitative features of the NADPH-diaphorase positive myoenteric neurons from the stomach of diabetic rats. The stomach of five normoglycemic rats and of five diabetic rats were prepared as whole-mounts stained by the histochemical technique of NADPH-diaphorase. It was verified, in the diabetic animals, decreased body weight, and increased daily ingestion of water, fasting glycaemia and glycated hemoglobin. With the data obtained it was observed a significant increase on the density and on the areas of the neuronal cell body profiles of the pyloric region of the stomach in the diabetic rats.

KEY WORDS: Diabetes mellitus. Enteric nervous system. NADPH-diaphorase. Stomach of rats

Introdução

O Diabetes *Mellitus* (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios caracterizados por elevação da glicose sanguínea, resultante de uma diminuição da capacidade corpórea em responder à insulina e/ou de uma redução ou até ausência da insulina produzida pelas células β -pancreáticas. Embora seja uma doença de origem endócrina, as principais manifestações são de origem metabólica, com alterações no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas, sendo essas alterações, a longo prazo, responsáveis por complicações crônico-degenerativas, tais como: macroangiopatia, microangiopatia (retinopatia e nefropatia) e neuropatia diabética (ND).

A neuropatia diabética autonômica, descrita primeiramente por Rundles em 1945 (GRENFELL, 1989;

ARAÚJO, 1996), pode levar ao acometimento do sistema urogenital, cardiovascular e gastrointestinal (TSITOURAS & GUPTA, 1990), podendo envolver todas as partes do trato gastrointestinal (DAVIDSON, 2001).

Alterações dos neurônios do sistema nervoso intramural podem estar relacionadas com disfunções gastrointestinais (CAMILLERI, 2002), comuns em indivíduos diabéticos (SPANGÉUS et al., 2000).

Em indivíduos com gastroparesia diabética, o estômago pode estar dilatado e hipotônico, com diminuição no esvaziamento gástrico e sintomas, como saciedade precoce, náusea, vômito, azia, dor abdominal e refluxo gástrico (DE BLOCK et al., 2002).

No diabetes, os neurônios do sistema intramural, entre esses os mioentéricos, sofrem redução em seu número

*Docente do Departamento de Fisioterapia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista - Campus de Presidente Prudente.

**Docente do Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Universidade Estadual de Maringá - Campus Maringá.

***Docente do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus Cascavel.

Endereço para correspondência: Cristina Elena Prado Teles Fregonesi - Universidade Estadual Paulista - Campus de Presidente Prudente - Departamento de Fisioterapia. Rua Roberto Simonsen, 305, 19060-900, Presidente Prudente - São Paulo, Brasil. e-mail: cristina@prudente.unesp.br

(ROMANO et al., 1996; FREGONESI et al., 2001) e alterações em seu tamanho (ZANONI et al., 2003) em vários segmentos intestinais, sendo evidenciadas modificações em neurotransmissores peptidérgicos (BELAI et al., 1985), adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos (LINCOLN et al., 1984) e nitrérgicos (ZOCHODNE et al., 2000).

Os neurônios mioentéricos nitrérgicos liberam óxido nítrico, e esse, por ser um neurotransmissor inibitório do trato gastrointestinal (BULT et al., 1990), quando alterado, pode estar relacionado a sinais normalmente encontrados no trato digestório, como a gastroparesia diabética.

Como a relação entre o comportamento de neurônios nitrérgicos e a condição de diabetes é escassa na literatura e como as alterações em neurotransmissores nitrérgicos, segundo GARSIDE et al. (1997), podem estar envolvidas em processos patológicos gastrintestinais, realizamos este trabalho com o intuito de analisar as características morfoquantitativas de neurônios nitrérgicos da região pilórica do estômago de ratos diabéticos.

Material e Método

Procedimento com os animais

Foram utilizados 10 ratos Wistar machos, com 105 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Desses, 5 animais foram mantidos normoglicêmicos como controle (grupo C), e 5 receberam injeção intravenosa (i.v.) de estreptozotocina (35 mg/Kg, Sigma, USA), dissolvida em tampão citrato 10 mM e pH 4,5, a fim de que se tornassem diabéticos (grupo D). Os animais, mantidos em gaiolas individuais, num ambiente com fotoperíodo (6:00 – 18:00) e temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) controlados, receberam água e alimento Nuvital[®] lab *ad libitum*. Aos animais foram aplicados os Princípios Éticos na Experimentação Animal, elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Aos 210 dias de idade, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de tiopental (40 mg/kg de peso corporal) e submetidos à laparotomia. Foram coletados o sangue por punção cardíaca para mensuração dos níveis de glicose e hemoglobina glicada, e as gorduras retroperitoneal e periepídidimal. Os ratos foram acompanhados durante todo o período experimental, e o consumo de água e o peso corporal foram monitorados.

Análise morfoquantitativa dos neurônios nitrérgicos do plexo mioentérico

O estômago foi removido, lavado, decalcado, pesado e distendido, sendo a lavagem e a distensão realizadas com tampão fosfato salinado (PBS) (0,01M, pH 7,4). Após isso, os estômagos foram fixados com paraformaldeído (Merck, Darmstadt, Germany) a 4%, preparado em PBS (0,1M, pH 7,4), por 30 minutos, posteriormente foram imersos em Triton X-100[®] (Sigma, St. Louis, USA) a 0,3%, dissolvido em PBS (0,01M, pH 7,4), por 10 minutos, depois lavados 10 vezes em PBS (10 minutos cada uma) e, por fim, incubados no meio de reação para a evidênciação neuronal da NADPH-d segundo Scherer-Singler et al. (1983), durante 2 horas e 30 minutos. Esse meio continha, para cada 200 ml, 50 mg de Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (Sigma Chemical, USA), 100

mg de β -NADPH (Sigma, Steinheim, Germany) e 0,6 ml de Triton X-100[®] a 0,3% em tampão Tris-HCl (0,1M, pH 7,6) (GibcoBRL, N.Y., USA). A reação foi interrompida por 3 lavagens consecutivas de 5 minutos cada uma em PBS 0,01 M, com os estômagos abertos nas extremidades oral e aboral, com posterior imersão em solução de paraformaldeído a 4% em PBS (0,1 M).

Após período de fixação, o estômago foi seccionado ao longo das curvaturas gástricas maior e menor, sendo separado em face ventral e dorsal. Na face dorsal, a região glandular foi separada da aglandular (região correspondente ao fundo do estômago), sendo a região glandular dividida em 2 regiões: corpo e piloro. O piloro foi microdissecado, originando um preparado de membrana, que foi desidratado, diafanizado e montado entre lâmina e lamínula com resina sintética Permout (Fisher Chemical, USA). Esse preparado foi dividido em 3 regiões, sendo desprezadas as regiões próximas à curvatura gástrica maior e menor, e quantificados os neurônios da região intermediária (região mediana), para que a contagem fosse mais uniforme.

Para a quantificação neuronal foi utilizado um microscópio óptico Leica DM RX, com objetiva de 50 X, sendo contados 40 campos microscópicos aleatórios. A área de cada campo foi de 0,149 mm², perfazendo um total de 5,96 mm² por animal. Meios-neurônios foram contados em campos alternados.

A mensuração dos perfis dos corpos celulares neuronais, em cada grupo, foi realizada com auxílio de analisador de imagens (Image Pro Plus 3.01), computadorizado, acoplado ao microscópio Leica DM RX. Foram mensurados 50 neurônios de cada segmento, somando um total de 250 por grupo.

Os dados obtidos por meio das mensurações dos neurônios dos animais do grupo-controle serviram de parâmetro para classificar os neurônios em pequenos, médios e grandes. Calcularam a média e o desvio padrão das áreas dos perfis dos corpos celulares de 250 neurônios do grupo normoglicêmico (C). Foram classificados como neurônios médios aqueles que se situavam no intervalo de confiança da média. Os neurônios que se situavam abaixo e acima do intervalo de confiança da média foram classificados como pequenos e grandes respectivamente.

Análise estatística

Os conjuntos de dados obtidos foram avaliados estatisticamente por análise de variância e teste de Tukey, todos com nível de significância de 5 %. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

Resultados

Nos animais que receberam estreptozotocina, a síndrome diabética se instalou, sendo caracterizada por aumento ($p < 0,05$) no consumo diário de água, glicemia e hemoglobina glicada, além de redução ($p < 0,05$) do peso corporal, da gordura retroperitoneal e periepídidimal (Tabela I).

Tabela 1 - Peso corporal inicial (PI), peso corporal final (PF), consumo diário de água (CDA), glicemia (GLI), hemoglobina glicada (HbG), gordura periepídicima (GE) e gordura retroperitoneal (GR) dos animais dos grupos: normoglicêmico (C) e diabético (D). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. n=5 ratos por grupo.

Parâmetros	Grupo C	Grupo D
PI (g)	362 \pm 17,9 ^a	365,8 \pm 2,3 ^a
PF (g)	472 \pm 23,9 ^a	312,2 \pm 7,0 ^b
CDA (ml)	62,1 \pm 0,9 ^a	182,7 \pm 2,3 ^b
GLI (mg.dl ⁻¹)	105,4 \pm 11,2 ^a	362 \pm 15,1 ^b
HbG (%)	3,9 \pm 0,2 ^a	6,8 \pm 0,2 ^b
GE (g)	4,54 \pm 0,17 ^a	0,97 \pm 0,15 ^b
GR (g)	4,83 \pm 0,6 ^a	0,37 \pm 0,1 ^b

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha apresentam diferenças significantes (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Por ocasião da introdução do cateter por meio do piloro, para distensão estomacal com tampão fosfato, observamos menor resistência nos animais do grupo D do que nos do grupo C.

Os parâmetros de peso e área do perfil estomacal foram, respectivamente, de 2,88 \pm 0,3 g e 11,21 \pm 0,45 cm² para o grupo C e 3,0 \pm 0,1 g e 12,42 \pm 0,35 cm² para o D, não sendo observada diferença significativa entre os grupos.

Os dados referentes à quantificação neuronal em 5,96mm² e as médias das áreas dos perfis dos corpos celulares de 250 neurônios NADPH-d positivos, dos dois grupos experimentais, estão apresentados na Tabela 2, na qual verificamos aumento ($p < 0,05$) na densidade e nas áreas neuronais dos ratos diabéticos.

Tabela 2 - Densidade (neurônios/5,96mm²) e área dos perfis celulares (250 neurônios por grupo) de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos da região pilórica dos animais dos grupos: controle (C) e diabéticos (D). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. n=5 ratos por grupo.

	Densidade/neurônios	Área/ μ m ²
C	338,2 \pm 30,1 ^a	257,9 \pm 12,18 ^a
D	449,8 \pm 18,9 ^b	329,4 \pm 14,06 ^b

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significantes (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Os neurônios mioentéricos foram divididos em 3 grupos de acordo com o tamanho. Neurônios considerados pequenos apresentavam valores menores ou iguais a 230,66 μ m², os grandes apresentavam valores maiores ou iguais a 285,14 μ m², e os médios apresentavam valores intermediários aos anteriores (230,67 – 285,13 μ m²). A Tabela 3 mostra a porcentagem de neurônios NADPH-diaforase positivos de acordo com a classificação em pequenos, médios e grandes. Observamos, no grupo C, um predomínio de neurônios pequenos e, no grupo D, de neurônios grandes.

Tabela 3 - Porcentagem, seguida pelos números neuronais absolutos, entre parênteses, de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos de acordo com seus tamanhos em pequenos, médios e grandes (μ m²), dos animais dos grupos: controle (C) e diabéticos (D). n=5 ratos por grupo.

Tamanho/Grupo	C	D
P (\leq 230,66 μ m ²)	49,2% (123)	26,4% (66)
M (230,67– 285,13 μ m ²)	17,2% (43)	17,6% (44)
G (\geq 285,14 μ m ²)	33,6% (84)	56% (140)
Total	100% (250)	100% (250)

Discussão

A estrepto-zotocina é atualmente a ferramenta mais utilizada para induzir diabetes mellitus experimental, sob condições controladas, levando ao aparecimento de sinais característicos do diabetes, como perda de peso, hiperfagia, polidipsia, poliúria e hiperglicemia (FURLAN et al., 2002), bem como de alterações na densidade e na área do perfil do corpo celular de neurônios entéricos (MIRANDA-NETO et al., 2005). Nesse experimento, observamos aumento ($p < 0,05$) da glicemia, hemoglobina glicada e consumo de água, bem como redução ($p < 0,05$) do peso corporal, da gordura retroperitoneal e periepídicima. Como a estrepto-zotocina induz a uma supressão da insulina, e essa, por sua vez, acelera a lipogênese, era de se esperar uma redução na concentração de tecido adiposo nesses animais.

Nos animais diabéticos, durante o preenchimento do estômago com tampão fosfato salinado, observamos menor resistência na introdução do cateter por meio do piloro. Fregonesi et al (2001) sugerem, associado a este achado, uma redução do tônus muscular e uma dilatação pilórica.

Analisando o preparado de membrana total, correspondente à face dorsal da região pilórica, observamos nitidamente uma maior concentração neuronal na região mediana, quando comparada com as regiões das proximidades das curvaturas gástricas. Esse fato nos direcionou para a quantificação neuronal na região mediana do piloro. Outros autores verificaram diferenças na densidade neuronal, nas diversas regiões do estômago (GABELLA, 1979; FREGONESI et al., 2001; MOLINARI et al. 2002; FREGONESI et al., 2004). Essas afirmações confirmam a necessidade de avaliar cada região do trato digestivo individualmente para não se incorrer em erro interpretativo (MIRANDA-NETO et al., 2001).

Em relação à quantificação e a área dos perfis dos corpos celulares neuronais, podemos observar um significativo aumento ($p < 0,05$) tanto na densidade quanto na área de neurônios nitrérgicos dos animais diabéticos em relação aos controles. Outros autores também observaram aumento significativo na área dos perfis dos corpos celulares de neurônios nitrérgicos no corpo do estômago (FREGONESI et al., 2004; FREGONESI et al., 2005), no íleo (ZANONI et al., 2003) e no colo distal (MIRANDA-NETO et al., 2004) de ratos diabéticos, porém esses não verificaram diferenças significantes na densidade deste grupo neuronal. Esse incremento neuronal pode estar relacionado com uma maior resistência dos neurônios nitrérgicos a morte celular, as

condições fisiopatológicas decorrentes do diabetes (BELAI et al., 1995; MIRANDA-NETO et al., 2004) e ao aumento na concentração de sorbitol que levaria a alterações da osmolaridade intracelular, resultando em edema neuronal (TAKAHASHI et al., 1997; MIRANDA-NETO et al., 2005).

Vários autores têm relatado hipotonia gástrica com diminuição no esvaziamento gástrico (CESARINI et al., 1997; CAMILLERI, 2002; DE BLOCK et al., 2002), podendo acometer aproximadamente 50% dos indivíduos diabéticos (ABRAHAMSSON, 1995; DE BLOCK et al., 2002). Sendo o NO um neurotransmissor inibitório, quando aumentado poderia intensificar o relaxamento da musculatura gástrica, com conseqüente diminuição no esvaziamento, favorecendo a gastroparesia.

Acredita-se em que as alterações observadas nos neurônios entéricos, em modelos experimentais com diabetes induzido por estreptozotocina estejam intimamente relacionadas com a diminuição no esvaziamento gástrico (BARBOSA, 1973; DIANE et al., 1979; FELDMAN et al., 1979; DE BLOCK et al., 2002) e a sintomas, como saciedade precoce, náusea, vômito, azia, dor abdominal, refluxo gástrico (DE BLOCK et al., 2002), anorexia, diarreia e constipação (CAMPBELL et al., 1977; HOSKING et al., 1978).

Conclusão

Como o sistema nervoso intramural é necessário à manutenção e integridade dos mecanismos fisiológicos gastrintestinais, um aumento na densidade e na área dos perfis de neurônios inibitórios, como os nitrérgicos, pode desencadear uma diminuição no tônus muscular gástrico, favorecendo a sua dilatação, como observado na gastroparesia.

Referências

ABRAHAMSSON, H. Gastrointestinal motility disorders in patients with diabetes mellitus. **Journal of Internal Medicine**, v. 237, p. 403-409, 1995.

ARAÚJO, L. Neuropatia autonômica. **Rev. Bras. Neurol.** v. 32, n. 6, p. 207-209, 1996.

BARBOSA, A. J. A. Auerbach's plexus of the albino rat: Quantitative study of the ganglia and nerve cells in the caecum and colon. **Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol.** v. 6, p. 253-262, 1973.

BELAI, A. et al. Enteric nerves in diabetic rats: increase in vasoactive intestinal polypeptide but not substance P. **Gastroenterology**, v. 89, p. 967-976, 1985.

BELAI, A.; COOPER, S.; BURNSTOCK, G. Effect of age on NADPH-diaphorase-containing myenteric neurones of rat ileum and proximal colon. **Cell. Tissue Res**, v. 279, p. 379-383, 1995.

BULT, H. et al. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitter. **Nature**, v. 345, p. 346-347, 1990.

CAMILLERI, M. Advances in diabetic gastroparesis. **Reviews in Gastroenterological Disorders**, v. 2, n. 2, p. 47-56, 2002.

CAMPBELL, I. W. et al. Gastric emptying in diabetic autonomic neuropathy. **Gut**, v. 18, p. 462-467, 1977.

CESARINI, P. R.; FERREIRA, S. R. G.; DIB, S. A. Gastroparesia

diabética. **Rev. Assoc. Med. Brás.** v. 43, n. 2, p. 163-168, 1997.

DAVIDSON, M. B. **Diabetes mellitus: diagnóstico e tratamento**. 5. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2001, 389 p.

DE BLOCK, C. E. M. et al. Delayed gastric emptying and gastric autoimmunity in type 1 diabetes. **Diabetes Care**, n. 25, n.5, p. 912-917, 2002.

DIANI, A. R. et al. Radiologic abnormalities and autonomic neuropathology in the digestive tract of the ketonuric diabetic chinese hamster. **Diabetologia**, v. 17, p. 33-40, 1979.

FELDMAN, M. et al. Abnormal gastric function in longstanding insulin-dependent diabetic patients. **Gastroenterology**, v. 77, p. 12-17, 1979.

FREGONESI, C. E. P. T. et al. Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Arq. Neuropsiquiatr.** v. 59, p. 50-53, 2001.

FREGONESI, C. E. P. T.; MOLINARI, S. L.; MIRANDA NETO, M. H. Avaliação da população de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos do corpo do estômago de ratos com diabetes crônico induzido pela estreptozotocina. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 1, p. 107-112, 2004.

FREGONESI, C. E. P. T. et al. Morphoquantitative aspects of nitrergic myoenteric neurons from the stomach of diabetic rats supplemented with acetyl-L-carnitine. **Anat. Histol. Embryol.** v. 34, p. 154-158, 2005.

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

GABELLA, G. Innervation of the gastrointestinal tract. **International Review of Cytology**, v. 59, p. 129-191, 1979.

GARDISE, S.; WOULFE, J.; MAZUREK, M. F. The ontogeny of NADPH-diaforase neurons in serum-free striatal cultures parallels in vivo development. **Neuroscience**, v. 76, n. 4, p. 1221-1230, 1997.

GRENFELL, A. History of diabetic complications. In: MOGENSEN, C. E.; STANDL, E. **Prevention and Treatment of Diabetic Late Complications**. Berlin; New York: De Gruyter, 1989.

HOSKING, D. J.; BENNET, T.; HAMPTON, J. R. Diabetic autonomic neuropathy. **Diabetes**, v. 27, n.10, p. 1043-1054, 1978.

LINCOLN, J. et al. Myenteric plexus in streptozotocin-treated rats - Neurochemical and histochemical evidence for diabetic neuropathy in the gut. **Gastroenterology**, n. 86, p. 654-661, 1984.

MIRANDA NETO, M. H. et al. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 59, n. 1, p. 54-59, 2001.

_____. Evaluation of the nitrergic myenteric neurons in the distal colon of diabetic rats treated with acetyl-L-carnitine. **Braz. J. Morphol. Sci.** v. 21, n. 2, p. 105-110, 2004.

_____. Morphometric and quantitative evaluation of the NADH-diaforase positive myenteric neurons of the jejunum of streptozotocin-diabetic rats supplemented with acetyl-L-carnitine. **Anat. Histol. Embryol.** v. 34, p. 154-158, 2005.

MOLINARI, S. L. et al. NADH-diaforase positive myenteric neurons of the aglandular region of the stomach of rats (*Rattus norvegicus*) subjected to desnutrition. **Rev. Chil. Anat.** v. 20, n. 1, p. 19-23, 2002.

ROMANO, E. B.; MIRANDA NETO, M. H.; CARDOSO, R. C. Preliminary investigation about the effects of streptozotocin-induced chronic diabetes on the nerve cell number and size of myenteric ganglia in rat colon. **Rev. Chil. Anat.** v. 14, p. 139-145, 1996.

SCHERER-SINGLER, U. et al. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaforase histochemistry. **J. Neurosci. Method.** v. 9, p. 229-234, 1983.

SPANGÉUS, A.; SUHR, O.; EL-SALHY, M. Diabetic state affects the

innervation of gut in an animal model of human type 1 diabetes. **Histol Histopathol**, v. 15, p. 739-744, 2000.

TAKAHASHI, T. et al. Impaired expression of nitric oxide synthase in the gastric myenteric plexus of spontaneously diabetic rats. **Gastroenterology**, v. 113, p. 1535-1544, 1997.

TSITOURAS, P. D.; GUPTA, K. L. Diabetic complications: diabetic neuropathy. In: GAMBERT, S. R.; COOPAN, R.; GUPTA, K. L. **Diabetes Mellitus in the Elderly: a practical guide**. New York: Raven Press, 1990. 276 p.

ZANONI, J. N. et al. Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid. **Autonomic Neuroscience**, v. 104, n. 1, p. 32-38, 2003.

ZOCHODNE, D. W. et al. Nitric oxide synthase activity and expression in experimental diabetic neuropathy. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 59, p. 798-807, 2000.

Recebido para publicação em: 04/04/05

Received for publication on: 04/04/05

Aceito para publicação em: 13/02/06

Accepted for publication on: 13/02/06

PÓS-GRADUAÇÃO UNIPAR

2006

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Campus Umuarama

- Especialização em Ciências com Ênfase em Biologia
- Especialização em Farmacologia: Aspectos Racionais da Lógica Terapêutica
- Especialização em Meio Ambiente com Ênfase em Química Ambiental

Campus Toledo

- Especialização em Biotecnologia e Análise da Biodiversidade
- Especialização em Microbiologia Aplicada

Campus Paranavaí

- Especialização em Ecologia e Desenvolvimento Sustentável
- Especialização em Microbiologia Aplicada

Campus Cianorte

- Especialização em Microbiologia e Suas Interfaces na Saúde

Campus Francisco Beltrão

- Especialização em Biotecnologia Aplicada a Qualidade Ambiental
- Especialização em Farmacologia: Aspectos Racionais da Lógica Terapêutica

QUEM PENSA FAZ.



www.unipar.br