WANDERLEY LIMA GUIDI

DEDALUS - Acervo - FMVZ

11300025801

**Estudo morfométrico e estereológico do gânglio celíaco em cães
sadios e acometidos pelo *Diabetes mellitus***

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Anatomia dos
Animais Domésticos e Silvestres da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de
mestre em Medicina Veterinária

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi
Maciel Ribeiro

São Paulo
2003

FMVZ - 022902

ID. 2917

N.º CLASSIFICAÇÃO
T. 1337
FMVZ
N.º TOMBO
022902

SAB 272

Sysno: 1364206

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1337
FMVZ

Guidi, Wanderley Lima

Estudo morfométrico e estereológico do gânglio celíaco em cães sadios e acometidos pelo *Diabetes mellitus* / Wanderley Lima Guidi. – São Paulo : W. L. Guidi, 2003.

87 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2003.

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro.

1. Gânglios. 2. Morfometria. 3. Cães. 4. Diabetes. 5. Neurônios.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Morfometria do neurônio ganglionar principal do complexo ganglionar celíaco mesentérico do cão doméstico e imunorreatividade dos neurônios nutrérgicos, vipérgicos em animais normais e acometidos pelo diabetes mellitus", Protocolo nº 193/2002, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sendo aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Morphometry of principal ganglionic neuron of the celiac mesenteric complex of the dog and the immunoreaction of nitrenergic and vipergic neurons in normal and diabetic animals" protocol number 193/2002, under the responsibility of Prof.Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commision of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting.)

São Paulo, 01 de novembro de 2002

Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: GUIDI, Wanderley Lima

Título: **Estudo morfométrico e estereológico do gânglio celíaco em cães sadios e acometidos pelo diabetes mellitus**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Anatomia

Data: 22 / 12 / 2003

Banca Examinadora

Prof. Dr. <u>Carla Fuzgi Elias</u>	Instituição: <u>ICB-USP</u>
Assinatura: <u>[assinatura]</u>	Julgamento: <u>APROVADO</u>
Prof. Dr. <u>Romeu Rodrigues de Souza</u>	Instituição: <u>ICB-USP</u>
Assinatura: <u>[assinatura]</u>	Julgamento: <u>APROVADO</u>
Prof. Dr. <u>Antonio Augusto</u>	Instituição: <u>FMVZ-USP</u>
Assinatura: <u>[assinatura]</u>	Julgamento: <u>APROVADO</u>

Agradeço aos meus pais pelo estudo que tive e pelo longo caminho que percorri para poder chegar a onde estou hoje. Porque só com a paciência e a perseverança deles consegui me realizar profissionalmente e pessoalmente. Dedico a eles e as minhas irmãs e família está tese, pois é mais um degrau conquistado no longo caminho de um futuro feliz e seguro.

A **DEUS** pela força que tem me dado para enfrentar os momentos difíceis que vida nos empoem conseguindo aprender com os erros e fortalecendo com eles. Ao meu orientador **Professor Dr. Antônio Augusto Coppi Maciel Ribeiro** pelo seu grande conhecimento e experiência na arte da orientação fazendo com que eu aprenda as mais novas técnicas de laboratório podendo com isto realizar ótimos trabalhos científicos e ajudar os mestrados e doutorandos em seus trabalhos. E além de um ótimo amigo com quem me identifiquei e aprendi muito devido a sua persistência e busca do conhecimento científico.

À **Professora Dr. Maria Angélica Miglino** por me acolher nesta instituição e dar oportunidade de subir na vida, devido a sua grande visão em relação às pessoas me dando oportunidade de fazer o mestrado e com isto adquirir novos conhecimentos melhorando profissionalmente e com isto me aperfeiçoando nas novas técnicas podendo ajudar cada vez mais os alunos desta instituição.

Ao **Professor Dr. Romeu Rodrigues de Sousa**, pelo acompanhamento e sugestões oferecidas a este trabalho, que foram fundamentais ao desenvolvimento desta tese. A técnica **Maria do Socorro Pereira** do ICB pela sua grande ajuda no ensino da técnica de NADPH. Ao meu grande amigo **Emerson Ticona Fioretto**, o meu eterno agradecimento na ajuda da confecção desta tese pois só nas dificuldades é que vemos quem realmente são os verdadeiros amigos, espero sinceramente que **DEUS** ilumine seu futuro pois é uma pessoa muito sincera e não mede esforço para ajudar as pessoas.

A minha grande amiga **Karina Martinez Gagliardo** pela sua paciência e dedicação em explicar os métodos estereológicos e morfométricos e na coleta do material me ajudando muito também na confecção e compreensão da tese que **DEUS** a ajude nos momentos difíceis de sua vida tanto profissional como ao longo de sua vida.

Aos amigos **Naianne Kelly Clebis**, devido a grande ajuda na literatura, **Carlos Eduardo Bezerra**, na coleta do material. Ao Técnico **Milton** pela sua ajuda avisando e trazendo animais para coleta do material. A **Dra. Márcia Meri** pela liberação dos animais diabéticos para coleta do material .

Ao **Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP**, pelo material cedido para a realização desta tese.

Aos **funcionários da bibliotecas da FMVZ** pela revisão cuidadosa e devidas correções.

A todos os **professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP** que me ajudaram diretamente ou indiretamente através de seus ensinamentos e incentivos. E agradeço através de orações todos os animais que utilizei para minha tese fornecendo o material necessário para a realização desta tese.

E a grande eficiência do pessoal secretária da anatomia principalmente do **Maicon, Patricia e Jaqueline** .

RESUMO

GUIDI, W. L. **Estudo morfométrico e estereológico do gânglio celíaco em cães sadios e acometidos pelo *Diabetes mellitus***. [Morphometric and estereologic study of the celiac ganglion on health dogs and on *Diabetes mellitus*]. 2003. 87 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Nesta pesquisa, os aspectos macroestruturais, microestruturas e histoquímicos do complexo ganglionar celíaco foram investigados em 6 cães domésticos saudáveis e 6 cães domésticos acometidos pela diabetes mellitus, com o objetivo de identificar possíveis diferenças estruturais, morfométricas e quantitativas nos neurônios ganglionares celíacos. desta forma, observamos o gânglio celíaco esquerdo originou-se junto à origem da artéria celíaca esquerda e apresentava um formato irregular, seu aspecto era nodular, caracterizando um complexo ganglionar. Em relação a histoquímica, foram encontrados neurônios NADPH-diaphorase positivos, apresentando reação visível. A positividade da reação permitiu-nos concluir que há neurônios potencialmente nitrérgicos no gânglio celíaco de animais sadios e diabéticos. No entanto, não podemos afirmar se estes neurônios são efetivamente nitrérgicos, porque exige a combinação de outras reações imunohistoquímicas. O tamanho do corpo celular do neurônio do gânglio celíaco, representado pela sua área seccional, aumentou significativamente nos animais do grupo diabético quando comparado aos do grupo controle, tendo um fator de aumento de 1,3x. O aumento na área seccional do núcleo no grupo diabético foi de 1,39x maior que no grupo controle, sendo este aumento significativo. Em termos práticos isto significa que nos animais diabéticos, o núcleo e o corpo celular neuronal aumentam em proporções muito próximas.

Palavras-chave: Gânglios. Morfometria. Cães. Diabetes. Neurônios.

ABSTRACT

GUIDI, W.L. **Morphometric and estereologic study of the celiac ganglion on health dogs and on Diabetes mellitus.**[Estudo morfométrico e estereológico do gânglio celiaco em cães sadios e acometidos pelo *Diabetes mellitus*]. 2003. 87 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

In this research, the macrostructural, microstructural and histochemical aspects were investigated in 6 clinacally health dogs and 6 diabetic dogs aiming to identify the possible alterations on the strucutre, morphometric and qualitative parameteres of neurons of the celiac ganglionar complex. Our observations revealed that the celiac ganglion was originated close to the origin of the celiac artery and showed a irregular aspect, being caracterized as a complex. Histochemically, neurons NADPH-diaphorase reactivities were identified. This positive reaction, on both health and diabetic animals, led us to conclude this neurons were potentially nitrergic, besides, to confirm the nitrergic aspect for this neurons it is necessary to combine immunohistochemical method. Neurons celular body size of the celiac ganglion, represented by its sectional area, increased significantly, at 1.3x rate, on the diabetic animals when compared to the health animals. The increase on the nuclear sectional area of the diabetic animals were significant, at 1.39x rate larger than the other group. These results mean that on the diabetic animals, nuclear and neuronal body celular raise rate increases proportionally.

Key-words: Ganglion. Morphometry. Dogs. Diabetes. Neurons.

Lista de Figuras

Figura 1:	Esquema representativo da situação do gânglio celiaco esquerdo nos animais dos grupos diabéticos e controle.....	51
Figura 2:	Fotomicrografia exibindo o arranjo estrutural do complexo ganglionar celiaco do cão. A figura superior representa animal do grupo controle e a figura inferior representa animal do grupo diabético. Identifica-se: a) septo intraganglionar; b) septo interunidade; 1-3) unidades ganglionares.....	54
Figura 3:	Fotomicrografia exibindo a composição das unidades ganglionares no gânglio celiaco do cão. A figura superior representa animal do grupo controle e a figura inferior representa animal do grupo diabético. Identifica-se: a) neurônio ganglionar; b) capilares intra-unidades; n) núcleo do neurônio ganglionar.	55
Figura 4:	Fotomicrografia exibindo: N: neurônio ganglionar; n: núcleo; nn: nucléolo. A figura superior refere-se ao animal do grupo controle e a figura inferior ao animal do grupo diabético.	56
Figura 5:	Fotomicrografia com os tipos morfológicos de perfis neuronais ganglionares encontrados nos animais do grupo controle e diabético. Identifica-se: A) triangular; B) losângico; C) elipsóide; D) circular	57
Figura 6:	Fotomicrografia demonstrando a reação controle negativa para o β -NADPH-d em A) grupo controle e B) grupo diabético	59
Figura 7:	Fotomicrografia mostrando neurônios NADPH-d positivos nos animais do grupo controle (A-B) onde se observa a coloração azul púrpura intensa nos neurônios reativos.	60
Figura 8:	Fotomicrografia mostrando neurônios NADPH-d positivos nos animais do grupo diabético (C-D) onde se observa coloração azul púrpura mais discreta que no grupo controle (a).	61
Figura 9:	Área seccional do neurônio nos animais do grupo controle e grupo diabético diabético.....	62
Figura 10:	Área seccional do núcleo dos animais no grupo controle e grupo diabético	63
Figura 11:	"Form factor" nos animais do grupo controle e grupo diabético.	64

Lista de Tabelas

- Tabela 1 - Médias das variáveis morfométricas nos três diferentes grupos etários. Fonte: Guidi, W.L. – dissertação de mestrado – São Paulo, SP. 65
- Tabela 2 - Médias das variáveis estereológicas aplicadas para os neurônios NDPH-d positivos nos grupos controle e diabético. Fonte: Guidi, W.L. – dissertação de mestrado – São Paulo, SP. 67

Lista de Abreviaturas e Termos Empregados

NADPH-d
NOS
SGC
SIF cells
WGA-HRP

adenina nicotinamida fosfato diaforase
Nitric oxide synthase
Small granule containing cells
Small intensely fluorescent cells
Wheat germ agglutinin conjugated horseradish peroxidase

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVO.....	16
3	LITERATURA.....	17
3.1	MACROSCOPIA.....	17
3.1.1	LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO.....	17
3.2	DIABETES.....	21
3.3	MICROSCOPIA.....	23
3.3.1	ASPECTOS NORMAIS.....	23
3.3.2	ASPECTOS NO DIABETES.....	29
3.4	RELAÇÃO NADPH-D E NO.....	33
3.4.1	ASPECTOS NORMAIS.....	34
3.4.2	ASPECTOS NO DIABETES.....	36
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1	MATERIAL.....	38
4.2	MÉTODOS.....	40
4.2.1	COLETA DO MATERIAL.....	40
4.2.2	FIXAÇÃO E PROCESSAMENTO DO MATERIAL PARA ESTUDO MORFOMÉTRICO À MICROSCOPIA DE LUZ DE CORTES SEMIFINOS E PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	41
4.2.3	ESTUDO HISTOQUÍMICO (REAÇÃO DO NADPH-DIAPHORASE).....	43
4.2.4	ESTUDO MORFOMÉTRICO.....	45
4.2.5	ESTUDO ESTEREOLÓGICO.....	47
4.2.5.1	DENSIDADE DE PERFIS NEURONAIS (“PACKING DENSITY” OU “PROFILE DENSITY”) (Q _A) PARA NEURÔNIOS NADPH-D POSITIVOS.....	47
4.2.5.2	FRAÇÃO DE ÁREA PARA OS NEURÔNIOS NADPH-D POSITIVOS.....	48
5	RESULTADOS.....	50
5.1	ASPECTOS ANATÔMICOS.....	50
5.1.1	LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO.....	50
5.2	ASPECTOS MICROSCÓPICOS.....	52
5.2.1	ESTRUTURA GERAL.....	52
5.2.2	CARACTERIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS NEURÔNIOS NADPH-D POSITIVOS.....	58
5.2.3	MORFOMETRIA.....	62
5.2.3.1	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
5.2.3.1.1	ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA).....	64
5.2.4	ESTEREOLOGIA.....	66
5.2.4.1	FRAÇÃO DE ÁREA PARA OS NEURÔNIOS NADPH-D POSITIVOS.....	66
5.2.4.2	DENSIDADE DE PERFIS NEURONAIS PARA OS NEURÔNIOS NADPH-D POSITIVOS.....	66
5.2.4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
5.2.4.3.1	ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA).....	67
6	DISCUSSÃO.....	68
6.1	ASPECTOS ANATÔMICOS.....	68
6.1.1	LOCALIZAÇÃO.....	68
6.2	ASPECTOS MICROSCÓPICOS.....	70
6.2.1	ESTRUTURA GERAL NOS ANIMAIS CONTROLE.....	70
6.2.2	ESTRUTURA GERAL NOS ANIMAIS DIABÉTICOS.....	73
6.2.3	RELAÇÃO ENTRE NADPH-DIAPHORESE E DIABETES MELLITUS.....	75
6.3	MORFOMETRIA E ESTEREOLOGIA.....	78
7	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso autônomo, do rato como de outros mamíferos consiste em um extenso arranjo de nervos e gânglios conectados ao sistema nervoso central representado pelo cérebro e medula espinhal por um lado e as vísceras pelo outro lado, e está organizado em grupos de gânglios que são divididos esquematicamente em paravertebrais, pré-vertebrais, paraviscerais e intramurais. Os gânglios autônomos, em sua maioria, são facilmente reconhecidos ao longo da cadeia simpática através de espessamentos e/ou emaranhado de nervos. Os gânglios pré-vertebrais estão em sua maioria dispostos em amplos plexos nervosos, o plexo abdominal inclui o gânglio celíaco e o gânglio mesentérico superior localizados próximos à aorta (GABELLA, 1995).

Em alguns casos os gânglios celíaco e mesentérico superior constituem uma única massa difusa situada na parede dorsal da cavidade abdominal ao nível da primeira vértebra lombar (GHOSHAL, 1986)

Léránth e Ungváry (1980) determinaram o termo de “cérebro abdominal” para o gânglio celíaco devido a sua complexa função e em acordo com os relatos de Baron e Janig (1988) relacionam um acúmulo de neurônios esplênicos no gânglio celíaco do gato através da implantação de neurotraçador. Sendo um componente do complexo ganglionar celíaco mesentérico superior, Miller et al. (1996) definiram que o gânglio mesentérico superior é um centro de integração dos reflexos gastrintestinais, entretanto detalhes de sua estrutura permanecem obscuros devido à escassez de informações.

Um importante papel no mecanismo de regulação atuando como uma ligação entre o sistema nervoso central e periférico e participando na coordenação dos reflexos periféricos é desenvolvido pelo gânglio celíaco (SIMMONS, 1985).

As neuropatias autônomas são encontradas durante a senelidade ou no advento de disfunções metabólicas como na Diabetes. Ainda são relatadas neuropatias imuno-mediadas e doenças neurodegenerativas (SCHMIDT, 1996).

A diabetes mellitus é um distúrbio complexo que resulta da incapacidade das ilhotas pancreáticas em secretar insulina e/ou a ação deficiente de insulina sobre os tecidos. A diabetes mellitus é uma das endocrinopatias mais comum em cães e gatos podendo ser fatal se incorretamente diagnosticada.

A diabetes mellitus é classificada em dois processos etiológicos diferentes podendo ser insulina-dependente ou não-insulina-dependente, sendo que esta última que clinicamente evidente é raro em cães. A etiologia insulina-dependente é indubitavelmente multifatorial e torna-se obrigatória submeter o animal à terapia de insulina em longo prazo (NELSON, 1998).

Muitos trabalhos investigam os efeitos do diabetes espontâneo e induzido sobre o gânglio celíaco ou sobre o complexo ganglionar celíaco-mesentérico superior, uma vez que este é o principal responsável pela inervação extrínseca do pâncreas por meio do plexo pancreático (EVANS, 1993). Ainda, a expressão de NADPH-d e da NOS sobre os neurônios ganglionares celíacos é comumente investigada no advento desta patologia como reportado por Schmidt (1993), Romano, Miranda Neto e Cardoso (1996), Belai (1996) e Schmidt et al. (2000), na tentativa de estabelecer o papel dos neurônios potencialmente nitrérgicos deste gânglio na inervação pancreática.

Apesar de dados importantes a este respeito em animais de laboratório (especialmente no rato e camundongo), muito pouco ainda se sabe a respeito dos efeitos neuropatia diabética sobre o gânglio celíaco em grandes mamíferos como o cão. Neste trabalho, propomos a investigação comparativa em cães clinicamente saudáveis e cães diabéticos (Diabetes mellitus) focando as possíveis alterações microestruturais e morfológicas e ainda, na expressão de NADPH-diaphorase nos neurônios ganglionares celíacos a fim de fornecer subsídios para um entendimento e tratamento mais adequados desta patologia na espécie canina.

2 OBJETIVO

Nesta pesquisa de acordo com os recursos dos métodos empregados, investigamos comparativamente o gânglio celíaco de cães clinicamente saudáveis e diabéticos, sobre os seguintes aspectos:

- Estudo qualitativo:

- Macroestrutura (localização e aspecto macroscópico).
- Microestrutura (descrição da estrutura ganglionar)
- identificação e padrão de distribuição dos neurônios NADPH-d positivos

- Estudo morfométrico:

- Detectar possíveis alterações nas dimensões dos neurônios ganglionares
- Estudo estereológico:
 - Densidade de perfis dos neurônios NADPH-d positivos por unidade de área de seção ganglionar e a área ocupada por estes neurônios por unidade de área da seção ganglionar.

3 LITERATURA

Os dados mais relevantes da literatura que embasam este trabalho foram discorridos abaixo.

3.1 *Macroscopia*

A seguir relatamos os aspectos sobre a macroscopia dos gânglios celíaco e mesentérico superior em cães.

3.1.1 *Localização e Distribuição*

A vascularização do complexo ganglionar celíaco-mesentérico superior e a sua composição foi tema dos estudos desenvolvidos por Hammer e Santer (1981), onde os autores relatam que sua formação é bem complexa. Macroscopicamente foi possível determinar o contingente de ambos antímeros, assim sendo, o antímero esquerdo era composto por três principais componentes, o gânglio supra-renal esquerdo em continuidade o nervo celíaco esquerdo e o tronco esplâncnico esquerdo. O gânglio celíaco esquerdo e o gânglio mesentérico superior esquerdo apresentavam-se fundidos e nas proximidades era possível de se identificar o gânglio aórtico-renal. Quanto ao antímero direito, o complexo ganglionar celíaco-mesentérico superior era formado pelo nervo esplâncnico principal em continuidade com o gânglio supra-renal direito. Contrastando com o contralateral, o antímero

direito não apresentava os gânglios celíaco e mesentérico superior fundidos sendo apenas ligados por poucos e finos feixes nervosos. O complexo situava-se entre as duas glândulas supra-renais, acima da metade do rim esquerdo e no terço médio do rim direito. A relação vascular do complexo celíaco-mesentérico superior é visualizadas através das artérias frênicas inferiores, artérias ovarianas, artérias paravasculares pós-ganglionares e um conjunto de vasos independentes ao longo do tecido adiposo circundante. A drenagem venosa é realizada por uma veia que deixa cada um dos gânglios celíacos e desemboca na veia cava inferior através das veias frênicas inferiores, não obstante, o antímero esquerdo ainda conta com um suporte de drenagem através da veia supra-renal inferior.

Ghoshal (1986) relatou que no cavalo, o plexo celíaco-mesentérico e os gânglios celíaco e mesentérico cranial, que podem estar variavelmente fundidos, eram uma massa difusa situada na parede dorsal da cavidade abdominal, formando uma densa rede fibrosa ao nível da primeira vértebra lombar, circundando as origens das artérias celíaca e mesentérica cranial, sendo contínua com o plexo mesentérico caudal. Relatam ainda que os nervos esplâncnicos maior e menor e às vezes o nervo esplâncnico lombar relacionam-se com o plexo ou com os gânglios individualmente.

O plexo celíaco, em ratos, está situado em torno e entre a artéria celíaca e artéria mesentérica superior e estende dorsalmente entre as glândulas adrenais e a metade cranial dos rins. O gânglio celíaco esquerdo tem o formato de meia lua e está localizado lateralmente a artéria celíaca e a artéria mesentérica superior. O gânglio celíaco direito apresenta forma triangular, menor que o seu contralateral e está localizado no lado oposto as mesmas artérias, dorsalmente a veia cava inferior.

Ambos estende-se caudalmente, sem limites distintos, em direção ao gânglio mesentérico superior (GABELLA, 1995).

Mizeres (1955) referiu que, no cão, o gânglio celíaco e o gânglio mesentérico cranial estão localizados em uma rede de plexos. Apesar de ambos antímeros do gânglio celíaco receberem filamentos nervosos do nervo gástrico, um maior contingente relaciona-se com o antímero direito. O plexo em volta da artéria hepática geralmente é formado pelo gânglio celíaco direito e nervo gástrico e emite feixes nervosos para o pâncreas e estômago em acordo com os relatos de Berthoud e Powley (1996). Com respeito, ainda, ao suprimento de fibras autônomas nesta região, Chen et al. (1996) em seus estudos sobre a inervação do pâncreas e baço, empregando técnica de implantação retrógrada de WGA-HRP no gato, determinou que a estimulação elétrica dos nervos esplâncnicos demonstrou significativo decréscimo do fluxo sanguíneo após hemorragia sendo que estas alterações deviam estar ligadas ao controle simpático pós ganglionar que inervam arteríolas, veias, trabéculas e cápsula do baço. Morfologicamente, o gânglio celíaco apresentou demarcação positiva em ambos antímeros juntamente com o gânglio mesentérico superior, onde os neurônios esplâncnicos marcados distribuíam-se mais amplamente no antímero esquerdo do gânglio celíaco, em contra partida, os neurônios pancreáticos demarcados distribuíam-se homogeneamente em ambos antímeros.

Miller et al. (1996) em seus estudos sobre o gânglio mesentérico superior em camundongos observaram que macroscopicamente, este apresentava-se com um gânglio de aparência oval localizado na adventícia, sob a face ventral da artéria aorta, próximo a origem da artéria renal esquerda. Dois ou mais troncos nervosos esplâncnicos eram observados se interligando a gânglios paravertebrais opostos a

artéria aorta. Muitos troncos nervosos pequenos conectavam a porção rostral do gânglio mesentérico superior ao gânglio celiaco.

Promwikorn et al. (1998) referiu que o complexo ganglionar celiaco tem sido descrito como um par de amplos gânglios simpáticos pré-vertebrais de formato irregular que inclui o gânglio celiaco, gânglio mesentérico superior, gânglio supra-renal, gânglios aórtico-renais e seus plexos nervosos. O bloqueio do gânglio celiaco tem sido aplicado como terapia para o tratamento da dor de vísceras abdominais não-responsivas a terapia rotineira.

3.2 Diabetes

A neuropatia autonômica que ocorre nos animais portadores de diabetes compromete vários sistemas, como o cardiovascular, o digestório, o genito-urinário, entre outros. Tais alterações aumentam a morbidade e mortalidade de seus portadores (SCHMIDT, 2001; SCHMIDT et al., 2000).

A patologia diabética tipo I, pode ser resultado de uma destruição auto-imune das células β das ilhotas pancreáticas (SARAIVA; HOMO-DELARCHE, 2003) ou devido uma agressão ambiental (CRAWFORD et al., 2000). A diabetes tipo I freqüentemente leva a uma diminuição significativa no peso dos animais (SCHMIDT, 2001).

Estudos recentes propõem que a apoptose neuronal tem um papel significativo na patogênese da neuropatia autonômica simpática (SCHMIDT, 2001). Entretanto, estudos falharam em mostrar uma significativa perda neuronal nesta doença (SCHMIDT et al., 1993), embora estes tenham sido realizados utilizando métodos que não são imparciais e métodos que não informam o número total de neurônios (SCHMIDT, 2001).

Schmidt (2001) aplicando o método de quantificação impírico de Coggeshall concluiu que no gânglio cervical superior e no mesentérico superior de ratos não há uma diminuição no número de neurônios em pacientes diabéticos, da mesma forma que não verificou uma diminuição na densidade neuronal por área. Schmidt et al. (1993) também não verificaram uma diminuição na densidade neuronal no gânglio mesentérico superior e o superior cervical de humanos.

As alterações freqüentemente vistas na morfologia do neurônio são a distrofia axonal e distorção do contorno do pericário. Contudo, tais alterações diferem entre os neurônios dos diferentes gânglios simpáticos, como visto a distrofia neuroaxonal no gânglio mesentérico superior e não no cervical superior de humanos (SCHMIDT, 1996; 2001). Ainda, a atrofia neuronal, embora relacionada a diabetes, não se relaciona com todos os neurônios dos gânglios, pois um aumento no tamanho do neurônio é verificado, e não a atrofia (Schmidt et al. 1983; Schmidt; Plurad, 1986).

A deficiência de NGF (nerve growth factor), proposta na patogênese da neuropatia diabética, relaciona-se possivelmente com a perda neuronal (HELLWEG; HARTUNG, 1990), pois é sabido que a privação auto-imune do NGF resulta em 30-40% de perda neuronal e diminuição do tamanho do pericário (GORIN; JOHNSON, 1980). Contudo, a diminuição do NGF não se associa diretamente com a patologia diabética, pois SCHMID et al. (2000) relataram que no gânglio cervical superior e há um aumento do NGF nos gânglios mesentérico superior e celíaco de ratos.

3.3 Microscopia

A seguir serão relatados os aspectos sobre a microscopia dos gânglios autônomos em animais normais e diabéticos.

3.3.1 Aspectos normais

O estudo do complexo ganglionar celíaco mesentérico superior de ratos foi feito através de cortes seriados de parafina por Hammer e Santer (1981) que concluíram que o complexo é formado por dois gânglios supra-renais em continuidade com a maioria dos nervos esplâncnicos que se continuavam em direção a ambos gânglios celíacos, onde o esquerdo continha componentes do mesentérico superior relacionado com a artéria mesentérica superior.

Chau e Lu (1995) relataram que a estrutura dos gânglios simpáticos tem sido exhaustivamente estudada em diferentes espécies animais. Nos gânglios simpáticos de ratos, dois tipos de vasos tem sido classificado: capilares contínuos adjacentes aos neurônios ganglionares e capilares fenestrados localizados próximos às pequenas células contendo grânulos (SGC) em acordo com os relatos de Abe et al. (1983) e Chau et al. (1991). Estudos morfológicos e bioquímicos sugerem que a ultraestrutura e função de células SGC alteram-se em longos períodos de hipóxia conforme Borghini et al. (1991) e Dalmaz et al. (1991) ou em administração de drogas de acordo com Doupe et al. (1985) e Kapeller e Polonyi (1990).

A maioria dos vasos ganglionares adjacentes aos neurônios principais e fibras nervosas no gânglio cervical superior de ratos e do complexo ganglionar celíaco

mesentérico eram do tipo contínuo. Os capilares fenestrados encontravam-se preferencialmente entre os grupos de células SIF enquanto que os capilares junto às células contendo grânulos e neurônios principais eram do tipo contínuo. Neste trabalho as características morfológicas e a permeabilidade dos vasos sanguíneos entre os gânglios simpáticos de ratos foram examinados em nível ultraestrutural. Descreveu-se a presença e distribuição preferencial dos capilares fenestrados e não fenestrados nos gânglios cervical superior e complexo ganglionar celíaco mesentérico. DePace (1981) e Chau et al. (1991) notaram que a maioria dos vasos sanguíneos do gânglio cervical superior de ratos circundavam os neurônios principais e possuíam camada endotelial simples similarmente aos achados nos capilares sanguíneos presentes no sistema nervoso central. Entretanto, poucos estudos foram realizados a respeito da impregnação de neurotraçadores em relação às células contendo grânulos (McDONALD; BLEWETT, 1981; CHAU et al., 1991) sendo que neste estudo duas sondas vasculares foram utilizadas - "lanthanum" e HRP – para estudar a barreira sanguínea-ganglionar com enfoque especial às regiões de células contendo grânulos em gânglios simpáticos de ratos. Demonstrou-se assim que o traçador "lanthanum" precipitou somente do lado luminal dos capilares rodeados por neurônios principais indicando que os capilares eram formados por junção contínua, entretanto, observou-se que o "lanthanum" era passivo de passagem através dos capilares fenestrado associados com agrupamentos de células contendo grânulos. Com base na literatura consultada, Chau e Lu (1995) concluíram que uma barreira seletiva sanguínea-ganglionar existe em áreas circundadas por neurônios principais no complexo ganglionar celíaco mesentérico.

Descreve-se que as células SIF ou SGC estão rotineiramente associadas em muitos gânglios simpáticos ao longo do sistema nervoso autônomo. O gânglio celíaco contém amplo e freqüentes neurônios biunucleados, fibras mielínicas e amielínicas, capilares, fibras de tecido conjuntivo, fibroblastos, células de Schwann e células SGC em grupos ou singularmente dispersas ao longo do gânglio. As células SGC eram distintos e poderiam ser facilmente diferenciados dos neurônios principais devido ao seu menor tamanho e citoplasma granular. O citoplasma contendo grânulos era volumoso onde em análise ultraestrutural de transmissão foi possível identificar as organelas usuais como as mitocôndrias e retículo endoplasmático que permaneciam obscuros devido aos grânulos, mas não obstante elas estavam sempre presentes. As células satélites eram comumente distribuídas ao longo do gânglio e rodeados por neurônios principais e células SGC. Os agrupamentos de células SGC eram claramente evidentes e associavam-se no mínimo a um capilar (MASCORRO; BREAUX; YATES, 1994).

O gânglio mesentérico superior é um gânglio simpático pré-vertebral e um centro integrador dos reflexos gastrointestinais, entretanto devido aos detalhes sobre a sua estrutura ainda ser pouco conhecida, Miller et al. (1996) estudaram a estrutura deste gânglio através de microscopia de luz, eletrônica e confocal. Os autores observaram que a microscopia de luz, o gânglio mesentérico superior apresentava estrutura ovóide, e envolvido por uma fina camada capsular, contendo densos conjuntos de corpos neuronais e células satélites. Os neurônios eram geralmente ovais e facilmente identificados pelos seus núcleos únicos, excêntricos, arredondados contendo um a dois nucléolos. As células satélites eram reconhecidas devido a sua densa coloração e menor tamanho. O neurópilo ganglionar ainda continha muitos vasos, sendo possível também, à observação de mastócitos e

células SGC. A microscopia eletrônica observou-se que a fina cápsula de tecido conjuntivo era formada por uma camada de duas a quatro células. O interior do gânglio apresentou células nervosas, células satélites, fibras colágenas, capilares, fibras nervosas mielínicas e amielínicas, sendo a maioria dos axônios amielínicos dispostos unicamente ou em grupos de dois a vinte. O citoplasma dos neurônios continha numerosas organelas como mitocôndrias, retículos endoplasmáticos liso e rugoso bem desenvolvidos, complexo de Golgi, ribossomos livres e lisossomos. As células satélites apresentava núcleo de forma irregular e continham mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e grânulos de lipofucsina. Concluíram que dois principais tipos celulares eram encontrados ao longo do gânglio, neurônios e células da glia, um terceiro tipo de célula comumente encontrado em outros gânglios simpáticos, células SIF, não foi comumente encontrado neste gânglio. As células SIF são classificadas de duas formas, quando presentes unicamente são consideradas células SIF tipo I, sendo e considerado atuar como inter-neurônios e quando dispostas em grupos, tipo II, considera-se função parócrina, endócrina ou sensorial, entretanto, muito pouco ainda pode-se concluir a respeito da função das células SIF de acordo com os descritos realizados por Mathews (1989). Ainda assim, nos relatos de Miller et al. (1996) demonstrou-se apenas a ocorrência de células SIF do tipo I e esta aparente baixa incidência pode-se relacionar a estas células desenvolverem um papel geral no gânglio mesentérico superior de camundongos, entretanto, os autores ressaltam que mais estudos sobre a quantificação de células SIF ainda se faz necessário neste gânglio para que se possa concluir algo a respeito destas células.

Schmidt (1996) relata que cápsula de colágeno envolvia o gânglio cervical cranial e gânglio mesentérico superior em humanos, sendo que ocasionalmente

emitiam septos para o interior do mesmo conferindo-lhe uma apresentação nodular e mais particularmente sobre o gânglio mesentérico superior e esta cápsula continuava-se com o epineuro dos troncos nervosos pré e pós-ganglionares. No gânglio mesentérico superior, pequenos agrupamentos de neurônios eram separados por amplos feixes de axônios demonstrando a ampla conexão dos gânglios pré-vertebrais e por axônios complementares que atravessavam o gânglio que provavelmente invavam vísceras distantes. A marcante variação na densidade neuronal, especialmente nos gânglios pré-vertebrais, dificulta estudos quantitativos do número de neurônios por gânglio. Os neurônios tinham em média 20-60 micrômetros de diâmetro e continham amplo citoplasma, núcleo simples e nucléolo proeminente. Os neurônios eram individualmente circundados por finas células satélites com lamina basal imunorreativa a colágeno tipo IV. Pigmentos de lipofucsina foram encontrados em corpos celulares e dendritos adjacentes em função do envelhecimento. Aparentemente, 40-50% dos gânglios apresentavam infiltrado perivascular ou em parênquima de linfócitos.

Promwikorn (1998) relatou que recentes estudos demonstraram que capilares contínuos em gânglios pré-vertebrais podem em algumas espécies ser permeável a íons "lanthanum", ou seja, a ausência de fenestrações capilares não impossibilita alta permeabilidade vascular. Investigações histológicas de secções semifina do gânglio celíaco de musaranhos revelaram um órgão amplamente vascularizado. A maioria dos vasos sangüíneos intraganglionares era capilar de curso tortuoso rodeando os neurônios ganglionares e ocasionalmente junto a células SGC, estas as quais, eram ocasionalmente encontradas entre os neurônios principais. Os capilares encontrados junto a neurônios principais apresentavam camada simples e contínua de células e ausência de fenestrações em contrapartida, os capilares observados no

rato e na cobaia apresentam, ambos tipos de capilares fenestrados e não-fenestrados.

3.3.2 Aspectos no diabetes

Os trabalhos desenvolvidos por Duchon (1980) demonstraram a presença de distrofia neuroaxonal em pacientes diabéticos jovens não relacionando com o envelhecimento. Infiltrados de linfócitos, células plasmáticas e macrófagos também foram descritos no interior de gânglios autônomos em pacientes diabéticos, fato que sugeriu uma possível patologia auto-imune da neuropatia autônoma diabética.

Schmidt (1993) relata que pacientes diabéticos parecem desenvolver distrofia neuroaxonal mais cedo e mais ampla do que pacientes não diabéticos na mesma idade. Ambos sexos demonstraram aumento na distrofia neuroaxonal na diabetes induzida quando comparado ao grupo de mesma idade sem diabetes, entretanto havia uma menor expressão no grupo feminino. A análise quantitativa da densidade neuronal em diabéticos demonstrou uma pequena, mas estatisticamente significativa diminuição. O grupo de diabéticos foi então analisado quanto à duração, se insulina dependente ou não dependente, dose de insulina e grau de controle, presença ou ausência de neuropatia somática. Essas análises falharam em demonstrar relação entre estes parâmetros e número de neurônios e a frequência de distrofia neuroaxonal. Um aumento na frequência de distrofia neuroaxonal foi demonstrado em pacientes com sintomas autônomos isolados em comparação com diabéticos com estes sintomas ausentes. Neste trabalho, o autor conclui que tão pouco a diabetes ou o envelhecimento provocam perda substanciais de neurônios nos gânglios simpáticos de humanos e ratos.

Em um estudo continuado, Schmidt (1996) revisando os achados sobre várias neuropatologias em gânglios do sistema simpático autônomo em publicados em vários trabalhos prévios, re-analizou os cortes histológicos de pacientes diabéticos e

controle sugerindo a presença de neurônios vacuolizados em análise microscópica de luz. O exame ultraestrutural revelou que muitos vacúolos apresentavam-se separados do corpo celular e localizados no interior das células satélites. O autor conclui que muitos estudos a respeito de patologias em gânglios simpáticos tem sido complicados devido à dificuldade em se distinguir os efeitos da patologia dos efeitos do envelhecimento.

Exposições crônicas a acrilamida causam axonopatia distal manifestada como neuropatia sensomotora no homem e em muitas espécies animais conforme os trabalhos de Prineas (1969), Schaumburg, Wisniewski e Spencer (1974), Spencer e Schaumburg (1974) e Spencer e Schaumburg (1976). Estudos anteriores como Post e McLeod (1977), Schmidt, Plurad e Clark (1987) e Ralevic, Aberdeen e Burnstock (1991) demonstrando a neuropatia periférica generalizada após intoxicação por acrilamida reportaram a ocorrência de efeitos específicos sobre o sistema nervoso simpático, parassimpático, sensomotor e sensorial. Os nervos mais longos e mais desenvolvidos são os mais susceptíveis, com fibras nervosas sensitivas sendo mais susceptíveis do que as fibras nervosas motoras (Cavanagh, 1982). No sistema nervoso simpático, muitos trabalhos relataram alterações funcionais e estruturais associadas à neuropatia induzida por acrilamida. Reportou-se degeneração axonal e perda de axônios envolvendo axônios pós ganglionares amielínicos simpáticos e parassimpáticos em gatos intoxicados por acrilamida (Post; McLeod, 1977a,b). Nos vasos mesentéricos, as alterações estruturais foram acompanhadas de disfunção do controle simpático de vasculatura mesentérica (Post; McLeod, 1977b). Na bexiga, a retenção urinária é encontrada em humanos e experimentos de intoxicação (Le Quesne, 1980; Sterman, 1984).

A neuropatia periférica induzida pela intoxicação por acrilamida em animais de experimentação tem demonstrado em ser um viável modelo de estudo da neuropatia autônoma. O uso de modelos animais para o estudo da associação de disfunções autônomas com neuropatia periférica tem sido de grande valor, uma vez que os trabalhos desenvolvidos em humanos demonstraram resultados imprecisos. Clinicamente, os distúrbios da função autônoma tem sido amplamente reconhecidos na neuropatia diabética e tem sido reportado em conjunto com neuropatia periférica.

Todos os animais tratados com acrilamida, no trabalho de Belai e Burnstock (1996), desenvolveram abaladora ataxia de deambulação, anormal postura de membros anteriores e distensão de bexiga. Também demonstraram significativa ($P < 0.001$) perda de peso, sendo o peso final do grupo controle de 365.2 ± 47 (n=10) e dos animais diabéticos induzidos por acrilamida 284.2 ± 5.8 (n=8). Não houve diferença nos níveis de glicose sanguínea entre os grupos controle e intoxicados por acrilamida. Os resultados deste estudo revelaram alterações em nervos entéricos contendo catecolaminas e neuropeptídeos similarmente aos achados nos nervos entéricos contendo estreptozotocina de ratos demonstrados por Kishimoto et al. (1983).

Anormal transporte axonal retrógrado sugeriram preceder as alterações neuropáticas observadas não somente nos diabetes experimental, mas também nos animais induzidos por intoxicação por acrilamida. Essa hipótese foi defendida pelo trabalho de Logan e McLean (1988) demonstrando que alterações de três em quatro transportes retrógrados de proteínas eram comuns nos nervos ciáticos de animais diabéticos e induzidos por acrilamida e demonstraram que estes sinais precediam quaisquer sinais de neuropatia.

Os achados de Belai e Burnstock (1996) reforçam a hipótese da existência de mecanismo comum no desenvolvimento de alterações neuropáticas nas diabetes induzidas por acrilamida e estreptozotocina em ratos. Se as alterações nos nervos entéricos estão associadas com transporte axonal anormal não é conhecido neste estágio, entretanto, a diminuição do transporte retrógrado de aplicação exógena de NGF foi relatada em fibras nervosas íleo mesentéricas nas diabetes por estreptozotocina em ratos. Em geral, o uso destes modelos animais permite a determinação de correlação entre os locais de alteração patológica e os distúrbios autônomos nas neuropatias autônomas. Além do mais, os modelos animais serão de grande importância para o estudo dos mecanismos pelo qual as alterações neuropáticas ocorrem.

3.4 Relação NADPH-d e NO

NADPH-d tem sido demonstrado em populações de neurônios em várias regiões do cérebro e medula espinhal como os relatos de Scherer-Singler et al. (1983), Vincent e Kimura (1992). Förstemann et al. (1991), Hope et al. (1991), Vincent e Hope (1992) reportaram que o NADPH-d age como co-fator na síntese de NOS, sendo responsável pela produção de cálcio-calmodulin dependente de NO oriunda da síntese da arginina.

A síntese de óxido nítrico (NO) envolve a participação de três co-substratos, a arginina, O₂ molecular e NADPH. Marletta (1989) demonstrou que a arginina é o único aminoácido capaz de aumentar síntese NO em seu trabalho continuado, Marletta (1993), o autor determina que o nitrogênio presente na fórmula de NO é proveniente da arginina e que os elétrons necessários para a produção de NO são provenientes do NADPH, assim sendo, determina-se que não há produção de NO sem a presença de NADPH como co-substrato em acordo com os relatos de Bredt e Snyder (1992).

Estudos histoquímicos têm ajudado a determinar a ação de NO como um neurotransmissor no sistema nervoso periférico através da identificação de atividade de NADPH-d, além da própria identificação de NOS através de imunohistoquímica.

3.4.1 Aspectos normais

Os gânglios paravertebrais, cervical cranial e estrelado, os gânglios pré-vertebrais, celíaco mesentérico superior e mesentérico inferior e o gânglio pélvico, hipogástrico do rato foram investigados através de histoquímica para determinar a distribuição de NADPH-d por Santer e Symons (1993). Nos gânglios paravertebrais a maioria dos pericários dos neurônios simpáticos continham distribuição suave e homogênea da reação ao NADPH-d, já os neurônios dos gânglios pré-vertebrais demonstraram intensa reação ao NADPH-d. A intensa reação positiva de NADPH-d já havia sido descrita por Aimi et al. (1991) relacionando-a aos neurônios sensoriais da raiz dorsal e gânglio sensitivo vagal, não obstante, Bredt et al. (1990) e Vincent et al. (1989) também relataram a intensa reação em neurônios entéricos sendo possível a sua ação esta envolvida na regulação da integridade da mucosa gástrica conforme os relatos de Whittle et al. (1990) e Peskar et al. (1991).

Santer e Symons (1993) observaram que os neurônios ganglionares do complexo celíaco mesentérico superior eram circundados desde simples fibras positivas ou até por densas aglomerações de fibras com reação NADPH-d positiva, esta reação positiva também pode ser diagnosticada em feixes de fibras nervosas e troncos nervosos que adentravam o gânglio.

Imuohistoquímica e histoquímica com NADPH-diaphorase têm demonstrado que populações de células ganglionares no gânglio celíaco-mesentérico superior do rato e de cobaias são circundados por fibras nervosas contendo NOS – óxido nítrico sintase - (ANDERSON et al., 1993; FURNESS; ANDERSON, 1993; SANTER; SYMONS, 1993).

Furness e Anderson (1993) relataram direta evidencia de neurônios pré ganglionares "NOS-containing" no núcleo intermédio da medula de cobaias que se projetam ao gânglio celíaco. A existência de terminais "NOS-containing" sensoriais tem sido demonstrado devido à presença de neurônios NADPH-d positivos na raiz dorsal que se projeta ao gânglio celíaco de ratos. (AIMI et al., 1991) Um adicional suprimento de terminais "NOS-containing" no gânglio celíaco pode ser oriundo de projeções de neurônios intestino-fugais. (KURAMOTO; FURNESS, 1989; MESSENGER; FURNESS, 1993)

A origem de fibras nervosas contendo síntese de óxido nítrico no gânglio celíaco-mesentérico superior de gatos foi examinado através da implantação de técnicas de neurotraçadores combinado com métodos de imunofluorescência por Domoto et al. (1995).

Os resultados demonstraram que o gânglio celíaco-mesentérico recebe "inputs" de neurônios "NOS-containing" de diversas origens, sendo estas: 1) neurônios pré ganglionares simpáticos do núcleo intermedio-lateral dos níveis de T7 a T13; 2) neurônios sensitivos do gânglio nodoso e das raízes dorsais de T7 a T13, e 3) neurônios intestino-fugais oriundos do intestino grosso.

3.4.2 Aspectos no Diabetes

Corbett e McDaniel (1992) relatam que a diabetes mellitus insulina-dependente é considerada uma doença auto-imune sendo o seu desenvolvimento relacionado com infiltração de linfócitos no pâncreas conseqüentemente resultando na diminuição da secreção de insulina e eventualmente destruição de células beta onde o aumento de NO pode ser o mediador da destruição de células beta conforme Kolb e Kolb-Bachofen (1992). Vladutiu (1995) também relata a participação de NO no desenvolvimento de *Diabetes mellitus* e outras doenças auto-imunes destacando a esclerose múltipla e a Síndrome de Guillain-Barré.

Estudos morfológicos e fisiológicos dos efeitos da diabetes sobre o sistema nervoso autônomo em ratos e em humanos tem demonstrado dano preferencial em terminais nervosos pré-sinápticos ou seja distrofia neuroaxonal em gânglios pré-vertebrais de acordo com os relatos de Schmidt, Plurad e Modert (1983), Schmidt e Plurad (1986), Schmidt, Dorsey e Roth (1992) que caracterizam-na como um distinto tipo de axonopatia determinada pela presença de axônios pré-terminais significativamente dilatados e sinapses contendo variado número de organelas subcelulares atípicas podendo resultar em uma anormal plasticidade sináptica envolvendo os mecanismos de memória e aprendizado.

Bredt e Snyder (1992) referem que a distribuição do dano neuronal sugere que os neurônios produtores de NO podem gerar e aumentar a liberação de NO que seria responsável pela destruição de neurônios adjacentes.

A reação positiva de NADPH-d resultou em intensa demarcação de axônios pré-terminais e delicadas pontuações (< 2 micrômetros) em terminais nervosos

circundando pericários neuronais individuais ou em dispostos em grupos. Os corpos dos neurônios simpáticos principais não apresentaram reação positiva a NADPH-d nos resultados observados por Schmidt et al. (1993) sendo que o número de pericários circundados por reação positiva variou de 10-20% do total de neurônios nos gânglios celiaco e mesentérico superior em cada lâmina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados em detalhes o material utilizado na realização do experimento e o método aplicado.

4.1 Material

No decorrer deste estudo foram utilizados doze gânglios celíacos esquerdos provenientes de cães domésticos (*Canis familiares*) adultos, fêmeas, sem raça definida (SRD). Três dos cães eram diabéticos (*Diabetes melittus*) e três eram clinicamente saudáveis quanto a possíveis neuropatias que foram usados como controle. Os animais foram obtidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET-FMVZ-USP).

Os cães utilizados nesta investigação apresentaram ficha clínica de onde foram retirados dados essenciais tais como: idade, peso e a fase da patologia. Desta forma, os animais diabéticos e controles tinham idades variando entre 8 a 12 anos. O peso dos animais controle variou de 11 a 15 Kg (média de 13,3 Kg) e dos animais diabéticos de 11,4 a 40,7 Kg (média de 19,8 Kg). A diabetes destes animais foi classificada em tipo I (insulina dependente) e em fase crônica.

Os animais foram divididos em dois grupos distintos, o grupo 1 (controle) e o grupo 2 (diabético). Estes grupos foram subdivididos, apresentando os subgrupos 1A e 2A três gânglios celíacos esquerdos (em cada subgrupo) para morfometria a microscopia de luz de cortes semi-finos, e o 1B e 2B com 3 gânglios (em cada

subgrupo) para estudo histoquímico visando identificar os neurônios com atividade NADPH-diaphorase (positivos para NADPH-d).

4.2 Métodos

O método aplicado, para a realização do experimento, ao material coletado é apresentado neste capítulo em detalhes.

4.2.1 Coleta do Material

Para a coleta do gânglio celíaco esquerdo, foi realizada uma celiotomia pré-retro-umbilical na linha alba. A pele e a musculatura foram rebatidas para permitir amplo acesso à cavidade abdominal. Posteriormente, foi feito o deslocamento caudo-ventral das vísceras permitindo a visualização das artérias celíaca e mesentérica cranial, onde o gânglio se encontra sobreposto e lateralmente a estas, e a identificação da glândula adrenal esquerda, a qual referenda a posição do gânglio.

Após a identificação do gânglio celíaco esquerdo, a aorta abdominal foi canalizada caudalmente a emergência da artéria mesentérica cranial, na qual esta foi laqueada assim como foi aplicada uma laqueadura na porção da aorta abdominal cranial a emergência da artéria celíaca e próxima ao músculo diafragma, e foi perfundida com solução de lavagem composta de salina tamponada fosfatada (phosphate buffered saline) (PBS) (0.1M; pH 7.4) (SYNTH[®]) e heparina a 2% (ROCHE[®]).

4.2.2 Fixação e processamento do material para estudo morfométrico à microscopia de luz de cortes semifinos e para microscopia eletrônica de transmissão

Após a lavagem do sistema (conforme descrito anteriormente), uma solução fixadora de Karnovsky modificada composta de glutaraldeído 5% (MERCK®) e formoldeído 1% (SYNTH®) em tampão cacodilato de sódio (EMS®) (0,125M; pH 7.4) foi perfundida pela aorta abdominal, permitindo a fixação do material "in situ" para a posterior retirada do gânglio e continuação da etapa de fixação do material por imersão conforme descrito a seguir.

Depois de retirado, o gânglio foi cortado crânio-caudalmente em pequenos fragmentos (1-2mm) e imerso na mesma solução fixadora por no mínimo 1-2 horas e no máximo por 2-3 dias a 4°C. Posteriormente, os fragmentos foram lavados em solução tampão cacodilato de sódio (EMS®) e pós-fixados em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 2% (EMS®) durante 90 minutos sob agitação moderada e constante e no escuro a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados novamente em tampão cacodilato de sódio (EMS®) e após foram lavados em água destilada e contrastados em bloco com solução aquosa de acetato de uranila (EMS®) durante 90 minutos sob agitação moderada e constante, no escuro e a temperatura ambiente.

A seguir, o material foi lavado em água destilada e desidratado em série crescente de etanol (50%, 70%, 90% por dez minutos cada e 100% por vinte minutos cada) e óxido de propileno (MERCK®) (durante 10 minutos).

Realizada a desidratação, foi feita a embebição do material em solução de óxido de propileno (ALDRICH®) e resina araldite (502 Polyscience Inc®).

Depois, o material foi transferido para resina araldite pura (502 Polyscience Inc[®]), permanecendo por um período de oito horas, sendo posteriormente trocado para uma nova resina pura e permanecendo por mais oito horas, e finalmente o material foi transferido para uma nova resina pura e permaneceu por três dias em estufa a 60°C.

Os blocos foram cortados com o auxílio do ultramicrotomo "Leica ultracut UCT[®]" a uma espessura de um micrometro com navalha de vidro, fornecendo os cortes semifinos. As seções foram coradas com uma solução de azul de toluidina alcoólica e montadas sobre lâmina com uma gota de araldite como meio de montagem e de visualização.

O material assim montado foi observado no microscópio de luz e epi-fluorescência "LEICA DMR[®]" para o estudo morfométrico e posteriormente para a localização da região a ser estudada, e a seguir promover a trimagem do bloco focando assim a região de interesse.

Após a trimagem, os blocos foram cortados com navalha de diamante a uma espessura de 70-90 nm (cortes ultrafinos). Estes foram coletados em "grids" e corados com acetato de uranila (EMS[®]) e com citrato de chumbo (MERCK[®]), para subsequente serem observados no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JFM 1010[®].

4.2.3 Estudo Histoquímico (Reação do NADPH-diaphorase)

Após a lavagem do sistema, foi perfundida uma solução fixadora de formoldeído a 4% em PBS (0.1M; pH 7.4;) (SIGMA®) por meio da aorta abdominal, caudalmente a emergência da artéria mesentérica cranial, e a seguir, o gânglio foi retirado e imerso na mesma solução fixadora por um período mínimo de duas horas e máximo de 2-3 dias a 4°C. Depois, este foi transferido para uma solução salina potássica tamponada fosfatada (KPBS) (0,02M, pH 7,4) (SYNTH®) com sacarose (SYNTH®) a 20%, durante 12 horas a 4°C.

Para a identificação dos neurônios NADPH-diaphorase positivos foi utilizada a técnica de Scherer-Singler et al. (1983) e Atoji et al. (2000), no qual os gânglios foram seccionados com uma espessura de 30 µm no micrótomo de congelação LEICA HISTOSLITE 2000®, sendo o material congelado em gelo seco previamente.

Após o material ser seccionado, este foi colocado em uma solução antifreezer, composta por PBS (Sigma®), sacarose (SYNTH®) e etilenoglicol (Sigma®) e mantido no freezer a -20°C até que todas as amostras fossem coletadas para que as reações fossem feitas ao mesmo tempo (animais diabéticos e animais do grupo controle).

Posteriormente, as secções foram lavadas três vezes em PBS (SIGMA®) durante um período de 30 minutos cada, sendo em seguida incubadas em solução de β -NADPH (1mg/ml) (SIGMA®); nitro blue tetrazolium (NBT) (SIGMA®) (0,25mg/ml) e triton X-100 (SIGMA®) (0,3%) em solução salina tamponada fosfatada (PBS) por 60 minutos a 37°C. As reações controle (reações negativas) (tanto para os animais

do grupo controle como para o do grupo diabético) foram realizadas sem utilização do β -NADPH (SIGMA[®]) durante o período de incubação.

A coloração final encontrada depois de uma hora foi azul escura tendendo a roxo.

4.2.4 Estudo morfométrico

A partir de 33 secções seriadas com dois micrometros de espessura, foram mensurados 47 neurônios por gânglio (141 por grupo) e 36 núcleos neuronais por gânglio (108 por grupo), sendo que os neurônios contidos nas três primeiras e três últimas secções foram excluídos, seguindo o mesmo princípio das linhas de inclusão e exclusão, aplicadas no plano tridimensional (GUNDERSEN, 1977; HOWARD ET AL, 1985).

Uma área foi escolhida aleatoriamente para promover a análise morfométrica. A área teste utilizada era constituída por linhas de inclusão e exclusão, mas estas aplicadas no plano bidimensional. A área teste utilizada neste trabalho foi de $0,04\text{mm}^2$. Os neurônios contidos nesta área teste foram numerados individualmente, cada um recebendo um número no qual se repetia nas diferentes secções quando se tratava do mesmo perfil neuronal, como realizado por Gabella, Trigg e McPhail (1988) e Gabella, Berggren e Uvelius, 1992. Nas secções onde o perfil neuronal foi máximo, mensurou-se a área do corpo celular e os eixos maior e menor. A área do núcleo também foi mensurada na secção de perfil máximo.

Os dados morfométricos foram obtidos com o auxílio do Programa para processamento e análise de imagens KS 400 Zeiss®, devidamente calibrado com uma lâmina de calibragem. As imagens foram capturadas com o auxílio do microscópio Axioscópico Zeiss® (objetiva 20x) e de uma câmara digital TK-128OU JVC®, na qual transferia a imagem para uma tela de computador.

O formato do perfil neuronal foi verificado através do "form factor" (GABELLA; TRIGG; McPHAIL, 1988), também chamado de "roundness coefficient" (MASLIUKOV, 2000), ou "neuronal roundness" ou "nuclear roundness" ou "shape factor" (ELZAGHEID et

al, 2003) onde este foi obtido através da razão entre o eixo menor pelo eixo maior. O valor deste fator ou coeficiente varia de quase zero a um, tendo em um a forma de um círculo perfeito.

4.2.5 Estudo estereológico

As ferramentas estereológicas aplicadas neste trabalho estão relacionadas abaixo.

4.2.5.1 Densidade de perfis neuronais (“packing density” ou “profile density”) (Q_A) para neurônios NADPH-d positivos

Este parâmetro expressa o número de perfis celulares por unidade de área (neste trabalho: neurônios NADPH-d positivos / μm^2). A densidade de perfis neuronais é obtida através da quantificação do número de perfis neuronais existentes dentro de uma área teste conhecida. Neste trabalho foi quantificado a “profile density” em ambos grupo de análise, isto é, no controle e no diabético. Utilizando-se de 10 secções seriadas por gânglio, foram analisadas cinco diferentes regiões em cada secção, totalizando 50 campos de análise por gânglio, correspondendo 150 campos por grupo. A área teste utilizada para a quantificação foi de $0,04\text{mm}^2$.

4.2.5.2 Fração de área para os neurônios NADPH-d positivos

Os mesmos campos analisados para quantificar a densidade de perfis neuronais NADPH-d positivos foram usados para estimar a fração de área nos animais dos grupos controle e diabético. A fração de área corresponde a área ocupada pelos perfis neuronais por unidade de área de cada secção contendo tecido ganglionar. Como descrito por Howard e Reed (1998), esta é determinada através da sobreposição de um sistema teste de pontos sobre uma área de interesse, no nosso caso a secção contendo o tecido ganglionar. Com o sistema teste sobreposto a área de interesse escolhida, são contados o total de pontos que tocam os perfis neuronais (ΣPp) e também o total de pontos que tocam a área de interesse (área da secção) teste (ΣPt). Através da relação entre $\Sigma Pp / \Sigma Pt$ é obtido a fração de área. Este parâmetro varia de zero a um e freqüentemente é expresso em porcentagem.

4.2.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do programa Statistical Analysis System (SAS, 1995). A análise da significância dos resultados morfométricos e estereológicos foi testada usando o procedimento PROC ANOVA para análises de variância e, em caso de detecção de efeitos significativos ($P < 0,05$), utilizou-se o teste de Tukey para a comparação múltipla entre as médias dos diferentes grupos de análise.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos através dos métodos empregados serão relacionados neste capítulo.

5.1 Aspectos Anatômicos

As observações quanto à situação macroscópica do gânglio celiaco esquerdo são relacionados abaixo.

5.1.1 Localização e Distribuição

A localização do gânglio celiaco esquerdo nos animais do grupo controle e nos animais do grupo diabético não sofreu alteração macroscópica. Desta forma, o gânglio celiaco esquerdo foi identificado lateralmente e sobreposto a artéria celiaca (próximo a origem da mesma) e lateralmente e ventralmente à glândula adrenal esquerda. O formato do gânglio era irregular, principalmente nos animais diabéticos.

Figura 1.

Figura 1: Esquema representativo da situação do gânglio celíaco esquerdo nos animais dos grupos diabéticos e controle.

5.2 Aspectos Microscópicos

As observações microscópicas do gânglio celíaco esquerdo são relacionados abaixo.

5.2.1 Estrutura geral

O gânglio celíaco estava envolto por uma cápsula ganglionar que emitia septos de tecido conjuntivo denominados de septos intraganglionares para o interior do mesmo. Estes septos ramificavam-se em septos interunidades, pois determinavam o arranjo espacial dos neurônios ganglionares em agrupamentos ou seja em unidades ganglionares, caracterizando um complexo ganglionar, que dispunham-se em várias direções nos animais do grupo controle e nos animais diabéticos foi constatado intensa proliferação de tecido conjuntivo intra-ganglionar deslocando as unidades ganglionares perifericamente sendo assim elas distribuíam-se mais substancialmente mais afastados nos animais diabéticos. Ao longo dos septos pode-se identificar a presença de capilares (Figura 2).

As unidades ganglionares eram compostas, em ambos grupos controle e diabético, pelos neurônios ganglionares, capilares intra-unidades e inter-unidades, células da glia e células SIF – intensamente fluorescente – que se dispunham isoladamente ou em agrupamentos mais próximas aos capilares. Ainda, nos animais do grupo controle, as unidades ganglionares dispunham-se de maneira mais compacta umas às outras e portanto, os neurônios ganglionares também se apresentavam mais próximos entre si. Já nos diabéticos foi possível observar que

tanto as unidades ganglionares quanto os seus neurônios ganglionares estavam mais dispersas com relação predominante do tecido conjuntivo (Figura 3 e 4).

Os perfis dos neurônios ganglionares puderam ser facilmente identificados devido ao seu padrão morfológico. Quanto a forma, os perfis neuronais elipsóides, circulares, losângicos e triangulares. Observou-se também que o núcleo era único, mononucleados e dispunha-se de maneira periférica nos neurônios ganglionares, porém núcleos centrais também foram visualizados (Figura 5).

Figura 2: Fotomicrografia exibindo o arranjo estrutural do complexo ganglionar celiaco do cão. A figura superior representa animal do grupo controle e a figura inferior representa animal do grupo diabético. Identifica-se: a) septo intraganglionar; b) septo interunidade; 1-3) unidades ganglionares.

Figura 3: Fotomicrografia exibindo a composição das unidades ganglionares no gânglio celiaco do cão. A figura superior representa animal do grupo controle e a figura inferior representa animal do grupo diabético. Identifica-se: a) neurônio ganglionar; b) capilares intra-unidades; n) núcleo do neurônio ganglionar.

Figura 4: Fotomicrografia exibindo: N: neurônio ganglionar; n: núcleo; nn: nucléolo. A figura superior refere-se ao animal do grupo controle e a figura inferior ao animal do grupo diabético.

Figura 5: Fotomicrografia com os tipos morfológicos de perfis neuronais ganglionares encontrados nos animais do grupo controle e diabético. Identifica-se: A) triangular; B) losângico; C) elipsóide; D) circular

5.2.2 Caracterização e Distribuição dos Neurônios NADPH-d positivos

A identificação dos neurônios NADPH-d positivos por meio de reação β -NADPH-diaphorase, em animais do grupo controle e em animais diabéticos revelou neurônios positivos nos dois grupos. Na seção “aspectos esterológicos” serão apresentados dados e diferenças quantitativas entre os dois grupos.

Do ponto de vista qualitativo, observou-se variação na intensidade de coloração (azul escuro) no pericário entre os dois grupos. Considerando-se que o mesmo observador fez a leitura das lâminas em todos os animais estudados para esta reação, a coloração da reação positiva foi mais pronunciada e visível nos animais do grupo controle em relação aos animais diabéticos. (Figura 7 e 8).

Figura 6: Fotomicrografia demonstrando a reação controle negativa para o β -NADPH-d em A) grupo controle e B) grupo diabético

Figura 7: Fotomicrografia mostrando neurônios NADPH-d positivos nos animais do grupo controle (A-B) onde se observa a coloração azul púrpura intensa nos neurônios reativos.

Figura 8: Fotomicrografia mostrando neurônios NADPH-d positivos nos animais do grupo diabético (C-D) onde se observa coloração azul púrpura mais discreta que no grupo controle (a).

5.2.3 Morfometria

Foram mensurados 141 neurônios provenientes dos gânglios celiacos esquerdos de animais controles e diabéticos. No grupo controle, a área seccional variou de $122,52 \mu\text{m}^2$ a $1834,67 \mu\text{m}^2$ (média $781,30 \mu\text{m}^2$; desvio padrão $307,07$), tendo 43,26% dos neurônios uma área seccional entre $500-900 \mu\text{m}^2$. No grupo diabético, a área seccional variou de $254,93 \mu\text{m}^2$ a $1861,1 \mu\text{m}^2$ (média $1034,93 \mu\text{m}^2$; desvio padrão 294), tendo 49,65% dos neurônios uma área seccional entre $900-1300 \mu\text{m}^2$ (Figura 9).

Figura 9: Área seccional do neurônio nos animais do grupo controle e grupo diabético

O tamanho do perfil nuclear foi verificado em 108 neurônios. No grupo controle o tamanho da área seccional do núcleo variou de $12,35 \mu\text{m}^2$ a $231,46 \mu\text{m}^2$, tendo em 54,13% dos núcleos analisados uma área seccional entre 10 a $70 \mu\text{m}^2$ (média $76,65 \mu\text{m}^2$; desvio padrão $49,99$). No grupo controle a área seccional do

núcleo variou de $29,40 \mu\text{m}^2$ a $199,84 \mu\text{m}^2$, tendo em 54,13% dos núcleos analisados uma área seccional entre 70 a $130 \mu\text{m}^2$ (média $106,66 \mu\text{m}^2$; desvio padrão 39,73) (Figura 10).

Figura 10: Área seccional do núcleo dos animais no grupo controle e grupo diabético

Os eixos maiores e menores foram mensurados em 141 neurônios. Através destes, foi obtido o “form factor”, onde foi possível informar a forma dos neurônios (“form factor” igual a um para uma esfera). Os neurônios provenientes do grupo controle apresentaram em 32,62% um “form factor” de 0,7 (média 0,69; desvio padrão 0,11), enquanto que os do grupo diabético apresentaram em 93,62% um “form factor” de 0,6 (média 0,68; desvio padrão 0,02) (Figura 11).

Figura 11: "Form factor" nos animais do grupo controle e grupo diabético.

5.2.3.1 Análise Estatística

No tocante a análise estatística para as variáveis morfométricas (área seccional do neurônio, área seccional do núcleo e "form-factor"), optou-se pelos procedimentos de análise de variância.

5.2.3.1.1 Análise de Variância (ANOVA)

O procedimento ANOVA aplicado nos parâmetros morfométricos teve por objetivo detectar possíveis diferenças entre os grupos (controle e diabético) e ainda constatar significância ou não destas diferenças. Os resultados foram sumarizados na tabela 1.

Os resultados referentes a **área seccional do neurônio** e a **área seccional do núcleo** demonstraram diferenças significativas entre os grupos do estudo ($P < 0,01$). Já os resultados referentes ao **“form-factor”** não demonstraram diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$).

Tabela 1 - Médias das variáveis morfométricas nos três diferentes grupos etários. Fonte: Guidi, W.L. – dissertação de mestrado – São Paulo, SP.

GRUPOS	MÉDIAS		
	Área neuronal seccional (μm^2)	Área nuclear seccional (μm^2)	“Form Factor”
CONTROLE	781,30 a ¹	76,65 a	0,69a
DIABÉTICOS	1034,93 b	106.66 b	0,68a

¹ Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo método de Tukey ($P < 0,01$).

5.2.4 Estereologia

Os dados estereológicos obtidos são descritos abaixo

5.2.4.1 Fração de área para os neurônios NADPH-d positivos

A fração de área, isto é, a área ocupada pelos perfis neuronais NADPH-d positivos por unidade de área, sendo esta de $400 \mu\text{m}^2$, variou de 48% a 71% (média 61,1%; desvio padrão 7,29) no grupo controle, enquanto que no grupo diabético variou de 24% a 61% (média 43,01%, desvio padrão 9,6).

5.2.4.2 Densidade de perfis neuronais para os neurônios NADPH-d positivos

A densidade de perfil neuronal variou de $24,5 \times 10^{-5}$ perfis / μm^2 a 36×10^{-5} perfis / μm^2 (média $27,45 \times 10^{-5}$ perfis/ μm^2 ; desvio padrão $3,29 \times 10^{-5}$) no grupo controle, já no grupo diabético variou de 16×10^{-5} perfis/ μm^2 a 29×10^{-5} perfis/ μm^2 (média $20,3 \times 10^{-5}$ perfis/ μm^2 ; desvio padrão $3,85 \times 10^{-5}$).

5.2.4.3 Análise estatística

A análise estatística para as variáveis morfométricas (área seccional do neurônio, área seccional do núcleo e "form-factor"), optou-se pelos procedimentos de análise de variância.

5.2.4.3.1 Análise de variância (ANOVA)

O teste ANOVA aplicado nos parâmetros estereológicos teve por objetivo detectar possíveis diferenças entre os grupos (controle e diabético) e ainda constatar significância ou não destas diferenças. Os resultados foram sumarizados na tabela 2.

Os resultados referentes à **fração de área para os neurônios NADPH-d positivos e densidade de perfis neuronais para neurônios NADPH-d positivos** demonstraram diferenças significativas entre os grupos do estudo ($P < 0,01$).

Tabela 2 - Médias das variáveis estereológicas aplicadas para os neurônios NADPH-d positivos nos grupos controle e diabético. Fonte: Guidi, W.L. – dissertação de mestrado – São Paulo, SP.

GRUPOS	MÉDIAS	
	fração de área (%)	densidade de perfis neuronais
CONTROLE	61,1 a ¹	27,45 x 10 ⁻⁵ a
DIABÉTICOS	43,01 b	20,30 x 10 ⁻⁵ b

¹ Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo método de Tukey ($P < 0,01$).

6 DISCUSSÃO

A discussão será dividida em tópicos para melhor compreensão.

6.1 Aspectos Anatômicos

Os aspectos anatômicos são percorridos abaixo.

6.1.1 Localização

Hammer e Santer (1981) reportam que macroscopicamente no antímero esquerdo, o gânglio celíaco esquerdo de ratos é formado por três principais componentes, o gânglio supra-renal esquerdo em continuidade com o nervo celíaco esquerdo e com o nervo esplâncnico maior esquerdo. O gânglio celíaco esquerdo e o gânglio mesentérico superior esquerdo, segundo estes autores, apresentavam-se fundidos e nas proximidades era possível identificar o gânglio aórtico-renal.

Já os relatos de Ghoshal (1986) no cavalo, revelam que o plexo celíaco-mesentérico e os gânglios celíaco e mesentérico cranial podem estar variavelmente fundidos em uma massa difusa situada na parede dorsal da cavidade abdominal, circundando as origens das artérias celíaca e mesentérica cranial, sendo contínua com o plexo mesentérico caudal.

Quanto à forma do gânglio celíaco esquerdo de ratos, segundo Gabella (1995), seu aspecto semi-lunar, localizando-se lateralmente a artéria celíaca e a artéria mesentérica superior.

O gânglio celíaco e o gânglio mesentérico cranial estão localizados em uma rede plexiforme no cão de acordo com Mizeres (1955). Apesar de em ambos os antímeros os gânglios celíacos receberem filamentos nervosos do nervo gástrico, um maior contingente relaciona-se com o antímero direito. O plexo em volta da artéria hepática geralmente é formado pelo gânglio celíaco direito e nervo gástrico e emite feixes nervosos para o pâncreas e estômago de acordo com os relatos de Berthoud e Powley (1996).

Ainda a este respeito, Chen et al. (1996) em seus estudos sobre a inervação do pâncreas e baço e Miller et al. (1996) em seus relatos sobre o gânglio mesentérico superior em camundongos referem que macroscopicamente o gânglio apresentava aparência ovalada e localizado próximo à origem da artéria renal esquerda.

Promwikorn et al. (1998) relata que o complexo ganglionar celíaco tem sido descrito como um par de amplos gânglios pré-vertebrais de formato irregular que inclui o gânglio celíaco, gânglio mesentérico superior, gânglio supra-renal, gânglios aórtico-renais e seus plexos nervosos.

Em nossos resultados, concordamos com Ghoshal (1996), Gabella (1995), com pequenas alterações individuais, que a localização do gânglio celíaco esquerdo ocorreu junto à origem da artéria celíaca esquerda. Quanto ao aspecto do gânglio, nossos resultados aproximam-se mais significativamente aos relatos de Promwikorn et al. (1998) ou seja, um formato irregular, principalmente em relação aos animais diabéticos.

Em todos os animais observados, o gânglio celíaco estava isolado do gânglio mesentérico cranial esquerdo, que se localizava junto à origem da artéria homônima e portanto caudalmente ao gânglio celíaco esquerdo. Desta forma a identificação do gânglio celíaco no antímero esquerdo fez-se simples e prontamente.

6.2 Aspectos Microscópicos

Os aspectos microscópicos são discutidos em seguida.

6.2.1 Estrutura geral nos animais controle

Schmidt (1996) relata que uma cápsula colágena envolve o gânglio cervical cranial e o gânglio mesentérico superior em humanos, sendo que ocasionalmente emite septos para o interior do mesmo conferindo-lhe uma apresentação nodular e mais particularmente no gânglio mesentérico superior.

Miller et al. (1996) à microscopia de luz, verificaram que o gânglio mesentérico superior era envolvido por uma fina camada capsular e contendo densos conjuntos de corpos neuronais e células satélites. Os neurônios eram geralmente ovais e facilmente identificados pelos seus núcleos únicos, periéricos, arredondados contendo um a dois nucléolos. As células satélites foram reconhecidas por sua densa coloração e menor tamanho. O neurópilo ganglionar continha muitos vasos, sendo possível também, à observação de mastócitos e células SGC – “small granule containing”.

As células SIF – “small intense fluorescent”, de acordo com Mathews (1989), são classificadas de duas formas. Quando presentes isoladamente são consideradas células SIF tipo I considerando-se que atuam como interneurônios e quando dispostas em grupos, tipo II considerando-se sua função como parócrina, endócrina ou sensorial e estando juntos a vasos.

Ainda assim, nos relatos de Miller et al. (1996) demonstrou-se apenas a ocorrência de células SIF do tipo I no gânglio mesentérico superior de camundongos.

Em nossas observações, dois tipos de células SIF foram identificadas, ou seja, junto aos neurônios ganglionares e ainda, constituindo grupos celulares próximo aos capilares e adotando-se a classificação de Mathews (1989), o primeiro corresponde às células tipo I e os agrupamentos pertencem ao grupo II.

Quanto à vasculatura ganglionar, De Pace (1981), Abe et al. (1983), Chau et al. (1991) e Chau e Lu (1995) relataram que nos gânglios simpáticos de ratos, dois tipos de vasos tem sido considerados: capilares contínuos adjacentes aos neurônios ganglionares e capilares fenestrados localizados próximos às pequenas células contendo grânulos (SGC). Em nossos estudos também foram observados os capilares próximos a neurônios que foram denominados de capilares intra-unidades.

Quanto à cápsula, nossos resultados concordam com os relatos de Schmidt (1996), embora para os gânglios cervical e mesentérico cranial, onde se observou a emissão de septos capsulares para o interior do gânglio celíaco conferindo-lhe aspecto nodular, dividindo o parênquima em grupos de neurônios ou unidades ganglionares, caracterizando um complexo ganglionar sob o ponto de vista microestrutural.

As unidades ganglionares eram compostas por neurônios ganglionares com apenas um núcleo periférico e um nucléolo, células da glia e células SIF.

Os capilares puderam ser observados ao longo de todo o complexo ganglionar celíaco dispostos nos septos intraganglionares – capilares intraganglionares, septos interunidades – capilares interunidades relacionando-se neste caso com

grupamentos de células SIF em acordo com os relatos de De Pace (1981), Abe et al. (1983), Chau et al. (1991); Mascorro, Breaux e Yates (1994); Chau e Lu (1995).

A estrutura geral do gânglio celíaco de cães do grupo controle (animais sadios), tanto em relação aos tipos celulares encontrados quanto a organização do parênquima em unidades ganglionares , coincide com os relatos de Ribeiro et al (2002) na mesma espécie animal.

6.2.2 Estrutura geral nos animais diabéticos

Post e MCLeod (1977a,b), Duchen (1980) e Schmidt (1993) reportaram degeneração axonal e perda de axônios pós ganglionares amielínicos simpáticos e parassimpáticos em animais diabéticos induzidos por acrilamida. Duchen (1980) destaca a presença de infiltrados de linfócitos, células plasmáticas e macrófagos no interior de gânglios autônomos em pacientes diabéticos e Schmidt (1996) sugeriu a presença de neurônios vacuolizados em análise à microscopia de luz em animais diabéticos sendo que o exame ultraestrutural revelou que muitos vacúolos apresentavam-se separados do corpo celular e localizados no interior das células satélites.

Schmidt, Plurad e Modert (1983), Schmidt e Plurad (1986), Schmidt, Dorsey e Roth (1992) demonstraram os efeitos da diabetes sobre o sistema nervoso autônomo em ratos e em humanos são distrofia neuroaxonal em gânglios pré-vertebrais, sendo comprovada pela presença de axônios pré-terminais significativamente dilatados e sinapses contendo variado número de organelas subcelulares atípicas.

Devido ao não emprego da microscopia eletrônica de transmissão não foi possível verificar a morfologia axonal com possível degeneração da mesma. Nesta fase do estudo, concentramos as observações na microestrutura, microscopia de luz, do complexo ganglionar celíaco esquerdo, onde se notou intensa proliferação de tecido conjuntivo intra-ganglionar, deslocando periféricamente os neurônios e as unidades ganglionares conforme reportado por Schmidt (1993).

Infiltrados linfócitos e neurônios vacuolizados não foram observados nos animais do grupo diabético ao contrário dos relatos de Duchon (1980) e Schmidt (1996).

6.2.3 Relação entre NADPH-diaphorase e Diabetes mellitus

Marletta (1989), Förstemann et al. (1991), Hope et al. (1991), Vincent e Hope (1992), Bredt e Snyder (1992) e Marletta (1993) reportaram que a NADPH-diaphorase age como co-enzima na síntese de NO – “nitric oxide” além da participação de outras enzimas como a arginina e a molécula de oxigênio. A participação do NADPH está relacionada em fornecer os átomos de energia para a obtenção do átomo de nitrogênio que origina-se da arginina. Assim sendo, não há produção de NO sem a participação ou presença de NADPH como co-enzima.

Santer e Symons (1993) reportaram que nos gânglios paravertebrais a maioria dos pericários dos neurônios simpáticos apresentavam reação discreta e homogênea do produto da reação da NADPH-d, já os neurônios dos gânglios pré-vertebrais demonstraram intensa reação ao NADPH-d. Os autores também observaram que os neurônios ganglionares do complexo celíaco mesentérico superior eram circundados desde simples fibras positivas ou até por densas aglomerações de fibras com reação NADPH-diaphorase positiva sendo que em nosso trabalho não estudamos o caráter destas fibras.

Estudos histoquímicos e imunohistoquímicos têm ajudado a descrever a ação de NO (nitric oxide) como um neurotransmissor no sistema nervoso periférico e central por meio da identificação da atividade da NADPH-diaphorase, além da própria identificação de NOS (nitric oxide synthase) usando reações imunohistoquímicas. Estes estudos têm demonstrado que populações de células ganglionares no gânglio celíaco-mesentérico superior de rato e de cobaias são

circundados por fibras nervosas contendo NOS (ANDERSON et al., 1993; FURNESS; ANDERSON, 1993; SANTER; SYMONS, 1993).

Furness e Anderson (1993) evidenciaram a presença de neurônios pré ganglionares "NOS-containing" no núcleo intermédio da medula espinhal projetando-se para o gânglio celíaco em cobaias. A existência de terminais "NOS-reativos" tem sido demonstrada devido à presença de neurônios NADPH-diaphorase positivos na raiz dorsal da medula espinhal que se projetam para o gânglio celíaco de ratos (AIMI et al., 1991).

Corbett e McDaniel (1992) e Kolb e Kolb-Bachofen (1992) consideram que o aumento de NO pode ser o causador da destruição de células beta resultando na diminuição da secreção de insulina na diabetes mellitus insulina-dependente, tipo II.

Vladutiu (1995) é outro autor que considera a participação do NO no desenvolvimento de *Diabetes mellitus* e outras doenças auto-imunes, tais como a esclerose múltipla e a Síndrome de Guillain-Barré.

Bredt e Snyder (1992) referem que a maneira como ocorre a distribuição do dano neuronal, no diabetes, sugere que os neurônios produtores de NO podem gerar e aumentar a liberação de NO que seria responsável pela destruição de neurônios adjacentes.

Conforme observado nos relatos de vários autores, a NADPH-diaphorase é uma co-enzima na produção de NO, sendo que se observa que a expressão positiva da NADPH-d nos tecidos nervosos, em especial em gânglios autônomos, pode estar relacionada com a expressão da NOS (nitric oxide synthase) detectada imunohistoquimicamente nos mesmos neurônios. Vários trabalhos fazem uso de várias reações histoquímicas e imunohistoquímicas para fundamentar que a expressão tanto da NADPH-diaphorase quanto da NOS, respectivamente conferem

característica nitrérgica, ou seja, potencial para a produção de óxido nítrico por estes neurônios.

Em nossos resultados, tanto no grupo controle (animais sadios) quanto no grupo diabético foram encontrados neurônios NADPH-diaphorase positivos, apresentando reação visível, intensa e homogênea no grupo controle em relação ao grupo diabético. A positividade da reação permitiu-nos concluir que há neurônios potencialmente nitrérgicos no gânglio celíaco de animais sadios e diabéticos. No entanto, não podemos afirmar se estes neurônios são efetivamente nitrérgicos, porque exige a combinação de outras reações imunohistoquímicas como a NOS e a nitrotirosina , que identificam “nitrosylate proteins” que são representativos da atividade de óxido nítrico nestas células.

6.3 Morfometria e Estereologia

O tamanho do corpo celular do neurônio do gânglio celíaco, representado pela sua área seccional, aumentou significativamente nos animais do grupo diabético quando comparado aos do grupo controle, tendo um fator de aumento de 1,3x. Semelhante aumento no tamanho, mas este verificado através do eixo maior do neurônio, também foi reportado por Schmidt et al (1983) e Schmidt e Plurad (1986) no gânglio mesentérico superior e no gânglio cervical superior de ratos. No entanto, a estimativa do tamanho neuronal baseada na sua área seccional, como feito nesta pesquisa, é mais acurada em relação às dimensões axiais, uma vez que nestes neurônios, três eixos precisam ser considerados e não apenas o seu eixo maior.

Da mesma forma em relação ao aumento no tamanho do corpo celular neuronal no grupo diabético, ocorreu um aumento do seu núcleo. O aumento na área seccional do núcleo no grupo diabético foi de 1,39x maior que no grupo controle, sendo este aumento significativo. Em termos práticos isto significa que nos animais diabéticos, o núcleo e o corpo celular neuronal aumentam em proporções muito próximas.

Quanto a densidade de perfis neuroanais NADPH-d positivos por unidade de área do gânglio celíaco, foi verificado que o grupo controle apresenta uma quantidade significativa maior de neurônios NADPH-d positivos do que o grupo diabético, sendo este aumento de 1,35x. Da mesma forma, foi também verificado que a fração de área ocupada por estes neurônios por unidade de área seccional do gânglio celíaco neuronal foi maior no grupo controle do que no diabético, sendo esta 1,48x maior. A diminuição da densidade de perfis de neurônios NADPH-d

positivos/área no grupo diabético, e também a diminuição na fração de área ocupada pelos mesmos nos animais diabéticos relaciona-se diretamente com a proliferação de tecido conjuntivo que caracteriza a fibrose ganglionar diabética, sendo esta fibrose previamente descrita em gânglios autônomos de humanos por Schmidt et al. (1993).

Faz-se necessário ainda entender o significado funcional da diminuição da densidade/área a da fração de área ocupada pelos neurônios NADPH-d positivos no advento do diabetes. Claro está que o tecido ganglionar não neuronal, neste caso mais precisamente representado pelo tecido conjuntivo intraganglionar esta diretamente relacionado com este achado. Ainda, outros constituintes do tecido não neuronal, como por exemplo, vasos, neuróopilo, etc tem que ser investigados futuramente para um entendimento amplo da fibrose ganglionar diabética. Ainda, se nos assumirmos que estes neurônios NADPH-d positivos sejam potencialmente nitrérgicos, qual seria o efeito de sua diminuição na dinâmica da doença. Isto afetaria indiretamente a inervação extrínseca das ilhotas pancreáticas ou ainda seria esta diminuição um acontecimento coincidente com a fase crônica da doença pois os animais estudados nesta pesquisa eram portadores crônicos do diabetes? Haverá diferenças quantitativas destes neurônios potencialmente nitrérgicos nas diferentes fases da doença, principalmente nas fases crônica e aguda? Qual seria o efeito disto na inervação extrínseca do pâncreas? Estas questões abrem perspectivas para novos estudos que podem levar em conta os dados iniciais qualitativos e quantitativos apresentados nesta pesquisa que aparentam ser muito promissores para o entendimento da neuropatia ganglionar diabética.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os métodos empregados e com os resultados obtidos nesta pesquisa, foi possível concluir que:

- ☞ Macroscopicamente, o gânglio celiaco situa-se junto a origem da artéria celiaca em caes adultos e diabeticos;
- ☞ Microscopicamente, o gânglio celiaco comporta-se como um complexo ganglionar
sendo constituído por aglomerados de unidades ganglionares. No entanto, as unidades estão distribuídas mais esparsamente no gânglio celiaco de animais diabéticos devido a fibrose intraganglionar;
- ☞ Tamanho do corpo celular e do núcleo dos neurônios ganglionares celiacos aumenta significativamente com o advento do diabetes mellitus, caracterizando hipertrofia neuronal diabética;
- ☞ Qualitativamente foram identificados neurônios ganglionares celiacos NADPH-d positivos tanto em animais sadios quanto em diabéticos;
- ☞ Quantitativamente, tanto a densidade dos perfis destes neurônios NADPH-d positivos por unidade de área de seção ganglionar quanto a fração de área ocupada pelos mesmos por unidade de área da seção ganglionar diminuiu significativamente com a ocorrência do diabetes. Isto foi atribuído principalmente a proliferação do tecido não neuronal representado neste caso pelo tecido conjuntivo intraganglionar.

REFERÊNCIAS

- ABE, H.; WATANABE, H.; YAMAMOTO, T.Y. Relationship between granule-containing cells and blood vessels in the rat autonomic ganglia. **Anat. Rec.**, v. 205, p. 65-72, 1983.
- AIMI, Y.; FUJIMURA, M.; VINCENT, S.R.; KIMURA, H. Localization of NADPH-diaphorese-containing neurons in sensory ganglia of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 306, p.382-392, 1991.
- ANDERSON, C. R.; EDWARDS, S. L.; FURNESS, J. B.; BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. The distribution of nitric oxide synthase-containing autonomic preganglionic terminals in the rat. **Brain Res.**, v. 614, p. 78-85, 1993.
- ATOJI, Y.; MIZUTANI, K.; YAMAMOTO, Y.; SUZUKI, Y. Innervation of the pigeon oviduct: correlation of NADPH diaphorese with acetylcholinesterase, tyrosine hydroxylase and neuropeptides. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 84, p. 1-7, 2000.
- BARON, R.; JANIG, W. Sympathetic and afferent neurons projecting in the splenic nerve of the cat. **Neurosci, Lett.**, v. 94, 1988, p. 109-113, 1988.
- BELAI, A.; BURNSTOCK, G. Acrylamide-induced neuropathic changes in rat enteric nerves: Similarities with effects of streptozotocin-diabetes. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 58, p. 56-62, 1996.
- BERTHOUD, H. R.; POWLEY, T. L. Interaction between parasympathetic and sympathetic nerves in prevertebral ganglia: Morphological evidence for vagal efferent innervation of ganglion cells in the rat. **Micros. Res. Tech.**, v. 35, p. 80-86, 1996.
- BORGHINI, N.; DALMAZ, Y.; PEYRIN, L. The responsiveness of SIF cells in the rat superior cervical ganglion to prolonged hypoxia. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 33, p. 150-151, 1991.
- BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**, v. 8, p. 3-11, 1992.
- BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthetase indicating a neuronal role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, p. 768-770, 1990.
- CAVANAGH, J. B. The pathokinetics of acrylamide intoxication: a reassessment of the problem. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 8, p. 315-336, 1982.
- CHAU, Y. P.; LU, K. S. Investigation of the blood-ganglion barrier properties in rat sympathetic ganglia by using lanthanum ion and horseradish peroxidase as tracers. **Acta Anat.**, v. 153, p. 135-144, 1995.

CHAU, Y. P.; CHIEN, C. L.; LU, K. S. The permeability of capillary among the small granule-containing cells in rat superior cervical ganglia: An ultrastructural lanthanum tracer study. **Histol. Histopathol.**, v. 6, p. 261-268, 1991.

CHEN, X. H.; ITOH, M.; SUN, W.; MIKI, T.; TAKEUCHI, Y. Localization of sympathetic and parasympathetic neurons innervating pancreas and spleen in the cat. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 59, p. 12-16, 1996.

CORBETT, J. A.; McDANIEL, M. L. Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of beta-cells? Possible therapeutic interventions in IDDM. **Diabetes**, v. 41, p. 897-903, 1992.

CRAWFORD, J. M.; CONTRAN, R. S. Pancreas In: _____ **Robins Patologia estrutural e funcional**, 6ª ed, 2000, p. 817-832.

DALMAZ, Y.; PEQUIGNOT, J. M.; BORGHINI, N.; COTTET-EMARD, J. M.; PEYRIN, L. Sympathetic ganglia and hypoxia: Biochemical evidence for chemosensitive SIF cells. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 33, p. 142-143, 1991.

DEPACE, D. M. Morphologic study of the blood vessels of the superior cervical ganglion of the albino rat. **Acta Anat.**, v. 109, p. 238-246, 1981.

DOMOTO, T.; TERAMOTO, M.; TANIGAWA, K.; TAMURA, K.; YASUI, Y. Origins of nerve fibres containing nitric oxide synthase in the rat celiac-superior mesenteric ganglion. **Cell Tissue Res.**, v. 281, p. 215-221, 1995.

DOUPE, A. J.; LANDIS, S. C.; PATTERSON, P. H. Enviromental influence in the development of neural crest derivatives: Glucocorticoids, growth factors and chromaffin cell plasticity. **J. Neurosci.**, v. 8, p. 2119-2142, 1985.

DUCHEN, L. W.; ANJORIN, S.; WATKINS, P. J.; MACKAY, J. D. Pathology of autonomic neuropathy in diabetes. **Ann. Intern. Med.**, v. 92, p. 301-303, 1980.

ELZAGHEID ET AL., 2003

EVANS, H. E. **Miller's anatomy of the dog**. 3ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993. p. 776-800.

FÖRSTEMANN, U.; SCHMIDT, H. H. H. W.; POLLOCK, J. S.; SHENG, H.; MITCHELL, J. A.; WARNER, T. D.; NAKANE, M.; MURAD, F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. **Biochem. Pharmacol.**, v. 42, p. 1849-1857, 1991.

FURNESS, J. B.; ANDERSON, C. R. Origins of nerve terminals containing nitric oxide synthase in the guinea-pig celiac ganglion. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 46, p. 47-54, 1993.

GABELLA, G. **The rat autonomic nervous system**. London: Academic Press, 1995, p. 81-93.

GABELLA, G.; BERGGREM, T.; UVELIUS, B. Hypertrophy and reversal hypertrophy in rat pelvic ganglion neurons. **Journal of Neurocytology**, v. 21, p. 649-662, 1992.

- GABELLA, G.; TRIGG, P.; MCPHAIL, H. Quantitative cytology of ganglion neurons and satellite glial cells in the superior cervical ganglion of the sheep. Relationship with ganglion neuron size. **Journal of Neurocytology**, v. 17, p. 753-769, 1988.
- GHOSHAL, N. G. Inervação autônoma abdominal, pélvica e caudal. In: **Sisson e Grossman Anatomia dos Animais Domésticos** Getty, R. Ed. Guanabara Koogan, 5ª ed, 1986, p. 650-654.
- GORIN, P. D.; JOHNSON JR, E. M.; Effects of a long term nerve growth factor deprivation on the nervous system of the adult rat: an experimental autoimmune approach. **Brain Research**, v. 198, p. 27-42, 1980.
- GUNDERSEN, H. J. G. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. **J. Microsc.** v. 111, p. 219-223, 1977.
- HAMMER, D. W.; SANTER, R. M. Anatomy and blood supply of celiac-superior mesenteric ganglion complex of the rat. **Anat. Embryol. (Berl.)**, v. 162, p. 353-362, 1981.
- HELLWEG, R.; HARTUNG, H. D.; Endogenous level of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Journal of Neuroscience Research**, v. 26, p. 90-96, 1990.
- HOPE, B. T.; MICHAEL, G. J.; KNIGEE, K. M.; VINCENT, S. R. Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 2811-2814, 1991.
- HOWARD C. V.; REED, M. G. Unbiased Stereology. Three Dimensional measurement in Microscopy. BIOS Scientific Publishers, 1998.
- HOWARD C.V.; REID, S.; BADDELEY, A.; BOYDE A. Unbiased estimation of particle density in the tandem scanning reflected light microscope. **J. Microsc.** v. 138, p.203-212, 1985
- INTERNATIONAL ANATOMICAL NOMENCLATURE COMMITTEE. - Nomina Anatomica. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1989.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nômina Anatômica Veterinária**. 4.ed. Zurich, 1994 (Together with nomina histological, 2.ed.,1992 and nomina embriologica veterinaria, 1992)
- KAPELLER, K; POLONYI, J. Ultrastructural study of small granule-containing (SGC) cells in the lower mesenteric ganglion in drug treated guinea-pigs. **Z. Mikrosk. Anat. Forsh.**, v. 104, p. 944-954, 1990.
- KISHIMOTO, S.; KURITA, S.; KAMBARO, A.; OKAMOTO, K.; SHIMIZU. S.; YAMAMOTO, M.; KOH, H.; SANO, K.; KAJIYMA, G.; MIYASHI, A.; YANAICHAHA, N. VIP-ergic innervation in the gastrointestinal tract of diabetics rats. **Hiroshima J. Med. Sci.**, v. 32, p. 469-488, 1983.

- KOLB, H.; KOLB-BACHOFEN, V. Type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus and nitric oxide. **Diabetologia**, v. 35, p. 196-197, 1992.
- KURAMOTO, H.; FURNESS, J. B. Distribution of enteric nerve cells that project from small intestine to the celiac ganglion in the guinea-pig. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 27, p. 241-248, 1989.
- LÉRÁNT, C.; UNGVÁRY, G. Axon types of prevertebral ganglia and the peripheral autonomic reflex arc. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 1, p. 265-281, 1980.
- LOGAN, M. J.; and McLEAN, W. G. A comparison of effect of acrylamide and experimental diabetes on the retrograde axonal transport of proteins in the rat sciatic nerve: Analysis by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Neurochem.**, v. 50, p. 183-189, 1988.
- LOW, P. A. and McLEOD, J. G. the autonomic neuropathies. In: _____ **Clinical Autonomic Disorders**. P.A. Low, ed. Little and Brown, Boston, 1993, pp. 395-421.
- MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 268, 12231-12234, 1993.
- MARLETTA, M. A. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, 488-492, 1989.
- MASCORRO, J. A.; BREAUX, T. F.; and YATES, R. D. Morphological observations of small granule containing (chromaffin) cells in the celiac ganglion of the guinea-pig, with emphasis on cell contacts. **Microscop. Res. Tech.**, v. 29, p. 169-176, 1994.
- MASLIUKOV, M. P. Sympathetic neurons of the cat stellate ganglion in postnatal ontogenesis: morphometric analysis. **Autonomic Neuroscience**, v. 89, p. 48-53, 2001.
- MATHEWS, M. R. Small intensely fluorescent and paraneuron concept. **J. Electron. Microsc. Tech.**, v. 12, p. 408-416, 1989.
- MATHIAS, C. J. Sympathetic nervous system disorders in man. **Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 7, p. 465-490, 1993.
- McDONALD, D. M.; BLEWETT, R. W. Location and size of carotid body-like organs (paraganglia) revealed by the permeability of blood vessels to Evans blue dye. **J. Neurocytol.**, v. 10, p. 607-643, 1981.
- McLEOD, J. G. Invited review: Autonomic dysfunction in peripheral nerves disease. **Muscle Nerve**, v. 15, p. 3-13, 1992.
- MESSENGER, J. P. and FURNESS, J. B. Distribution of enteric nerve cells projecting to the superior and inferior mesenteric ganglia of the guinea-pig. **Cell Tissue Res.**, v. 271, p. 333-339, 1993.
- MILLER, S. M.; HANANI, M.; KUNTZ, S. M.; SCHMALZ, P. F.; SZURSZEWSKI, J. H. Light, Electron and Confocal microscopic study of the mouse superior

mesenteric ganglion. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 365, p. 427-444, 1996.

MIZERES, N.J. The anatomy of the autonomic nervous system in the dog. **The American Journal of Anatomy**, v. 96, p. 285-317, 1955.

NELSON, R. W. Diabetes Melito. In: _____ **Birchard, Scherding Manual Saunders**, Ed. Roca, São Paulo, Brasil, 1ª ed, 1998, p. 283-291

PESKAR, P. B.; RESPONDEK, M; MULLER, K. M.; PESKAR, B. A. A role for nitric oxide in capsaicin-induced gastroprotection. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 198, p. 113-114, 1991.

POST, E. J. and McLEOD, J. G. Acrylamide autonomic neuropathy in the cat, Part 1. Neurophysiological and histological studies. **J. Neurol. Sci.**, v. 33, p. 353-374, 1977a.

POST, E. J. and McLEOD, J. G. Acrylamide autonomic neuropathy in the cat, Part 2. Effects on mesenteric vascular control. **J. Neurol. Sci.**, v. 33, p. 375-385, 1977b.

PRINEAS, J. W. The pathogenesis of dying-back polyneuropathies, Part 2 (An ultrastructural study of experimental acrylamide intoxication). **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 28, p. 598-621, 1969.

PROMWIKORN, W.; THONGPILA, S.; PRADIDARCHEEP, W.; MINGSAKUL, T.; CHUNHABUNDIT, P.; SOMANA, R. Angioarchitecture of the celiac sympathetic ganglion complex in the common tree shrew (*Tupaia glis*). **J. Anat.**, v. 193, p. 409-416, 1998.

Le QUESNE, P. M. Acrylamide, In: _____ **Spencer and H.H. Schaumburg (Eds), Experimental and Clinical Neurotoxicology**. Williams and Wilkins. Baltimore, MD, 1980, p. 309-325.

RALEVIC, V.; ABERDEEN, J. A. and BURNSTOCK, G. Acrylamide-induced autonomic neuropathy of rat mesenteric vessels: histological and pharmacological studies. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 34, p. 77-88, 1991.

ROMANO, B. E.; de MIRANDA NETO H. M.; and CARDOSO, S. R. C. preliminary investigation about the effects of the streptozotocin-induced chronic diabetes on the nerve cell number and size of myenteric ganglia in rat colon. **Rev. Cehil. Anat.**, v. 14, v. 2, p. 139-145, 1996.

SARAIVA, F.; HOMO-DELARCHE, F. Is innervation an early target in autoimmune diabetes? **TRENDS in Immunology**, v. 24, n.11, p. 574-579, 2003.

SANTER, R. M.; SYMONS, D. Distribution of NADPH-diaphorase activity in rat paravertebral, prevertebral and pelvic sympathetic ganglia. **Cell Tissue Res.**, v. 271, p. 115-121, 1993.

SCHAUMBURG, H. H.; WISNIEWSKI, H. and SPENCER, P. S. Ultrastructural studies of the dying-back process, Part 1 (Peripheral nerve terminal and axon

- degeneration in systemic acrylamide-intoxication). **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 33, p. 260-284, 1974.
- SCHERER-SINGLER, U.; VINCENT, S. R.; KIMURA, H.; McGEER, E. G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. **J. Neurosci. Method.**, v. 9, p. 229-234, 1983.
- SCHMIDT, R. E. Neuronal preservation in the sympathetic ganglia of rats with chronic streptozotocin-induced diabetes. **Brain Research**, v.921, 2001, p. 256-259.
- SCHMIDT, R. E. The neuropathology of human sympathetic autonomic ganglia. **Microscop. Res. Tech.**, v. 35, p. 107-121, 1996.
- SCHMIDT, R. E. The role of nerve growth factor in the pathogenesis and therapy of diabetic neuropathy. **Diab. Med.**, v. 10, suppl. 2, p. 10s-13s, 1993.
- SCHMIDT, R. E.; DORSEY, D. A. and ROTH, K. A. Immunohistochemical characterization of NPY and substance P containing nerve terminals in aged and diabetic human sympathetic ganglia. **Brain Research**, v.583, p. 320-326, 1992.
- SCHMIDT, R. E.; DORSEY, D. A.; McDANIEL, M. L.; CORBETT, J. A. Characterization of NADPH diaphorase activity in rat sympathetic autonomic ganglia – effect of diabetes and aging. **Brain Research**, v. 617, p. 343-348, 1993.
- SCHMIDT, R. E.; DORSEY, D. A.; ROTH, K. A.; PARVIN, C. A.; HOUNSOM, L.; TOMLINSON, D.R. Effect of streptozotocin-induced diabetes on NGF, P75^{NTR} and TrKA content of prevertebral and paravertebral rat sympathetic ganglia, **Brain Res.**, v. 867, p. 149-156, 2000.
- SCHMIDT, R. E.; PLURAD, S. B. and CLARK, H. B. Acrylamide-induced sympathetic autonomic neuropathy resulting in pineal denervation. **Lab. Invest.**, v. 56, p. 505-517, 1987.
- SCHMIDT, R. E.; PLURAD, S. B. Ultrastructural and biochemical characterization of autonomic neuropathy in rats with chronic streptozotocin diabetes. **J. Neuropathol Exp. Neurol.**, v. 45, p. 525-544, 1986.
- SCHMIDT, R. E.; PLURAD, S. B.; MODERT, C. W. Experimental diabetic autonomic neuropathy – Characterization in streptozotocin-diabetic Sprague-Dawley rats. **Lab. Investigat.**, v. 49, p. 538-552, 1983.
- SCHMIDT, R. E.; PLURAD, S. B.; PARVIN, C. A.; ROTH, K. A. The effects of diabetes and aging on human sympathetic autonomic ganglia. **American Journal Pathol.**, v. 143, p. 143-153, 1993.
- SCHMIDT, R. E.; MODERT, C. W.; YIP, H. K.; JOHNSON JR, E.M. Retrograde axonal transport of intravenously administered I¹²⁵- nerve growth factor in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Diabetes**, v. 32, p. 654-663, 1983.
- SIMMONS, M. A. The complexity and diversity of synaptic transmission in the prevertebral sympathetic ganglia. **Prog. Neurobiol.**, v. 24, p. 43-93, 1985.

- SPENCER, P. S. and SCHAUMBURG, H. H. A review of acrylamide neurotoxicity. 1. Properties, uses and human exposure. **Can. J. Neurol. Sci.**, v. 1, p. 143-151, 1974.
- SPENCER, P. S. and SCHAUMBURG, H. H. Central and peripheral distal axonopathy: The pathology of dying-back polyneuropathies. **Prog. Neuropathol.**, v. 3, p. 235-243, 1976.
- STERMAN, A. B. Acrylamide-induced remodeling of perikarya in rat superior cervical ganglia. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 10, p. 221-234, 1984.
- VINCENT, S. R. and HOPE, B. T. Neurons that say NO. **Trends Neurosci.**, v. 15, p. 108-113, 1992.
- VINCENT, S. R. and KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in rat brain. **Neuroscience**, v. 46, p. 755-784, 1992.
- VINCENT, S. R.; AIMI, Y.; KIMURA, H. The distribution of NADPH-diaphorase in the peripheral nervous system. **Neurosci. Abstr.**, v. 15, p. 176, 1989.
- VLADUTIU, A. O. Role of the nitric oxide in autoimmunity. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 76, p. 1-11, 1995.
- WHITTLE, B. J. R.; LOPEZ-BELMONTE, J. MONCADA, S. Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 99, p. 607-611, 1990.