Naianne Kelly Clebis

**Avaliação quantitativa e morfométrica dos neurônios
mioentéricos nadh-diaforase reativos do estômago de
ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e
suplementados com ácido ascórbico**

São Paulo, Brasil

2003

Naianne Kelly Clebis

**Avaliação quantitativa e morfométrica dos neurônios
mioentéricos nadh-diaforase reativos do estômago de
ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e
suplementados com ácido ascórbico**

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 Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza

São Paulo, Brasil

2003

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1297
FMVZ

Clebis, Naianne Kelly

Avaliação quantitativa e morfométrica dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos do estômago de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e suplementados com ácido ascórbico / Naianne Kelly Clebis. -- São Paulo : N. K. Clebis, 2003.
122 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. Romeu Rodrigues de Souza.

• 1. Neurônios. 2. Estômago. 3. *Diabetes mellitus*. 4. Ácidos ascórbicos. 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 "Efeito da suplementação com ácido ascórbico sobre neurônios mioentéricos do estômago de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina" Protocolo nº 214/2002, utilizando 20 ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza, 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 e foi aprovado em reunião de 11/12/2002.

(We certify that the Research "The effects of the supplementation with the ascorbic acid over mioenterics neurons of the stomach of diabetics rats induced by streptozotocin" protocol number 214/2002, utilizing 20 rats, under the responsibility of Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 12/11/2002 meeting.)

São Paulo, 12 de dezembro de 2002

Profª Drª Júlia Maria Mateta
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: CLEBIS, Naianne Kelly

Título: Avaliação quantitativa e morfométrica dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos do estômago de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e suplementados com ácido ascórbico.

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 Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Deus

*Que mão misteriosa me conduz?
Seja na terra, seja no ar.
No trabalho, no sofrer e no amar.
Quem és tu, esse ser de luz?*

*Tu és isso uma bondade imensa.
Uma luz cândida e tão intensa.
Que a todos os seus filhos ilumina.
Fonte inesgotável que nunca termina.*

(Luiz Darci Clebis - Que mão misteriosa me conduz?)

A minha mãe **Iracema Clebis** e ao meu irmão **Wilkerson Williams Clebis** agradeço pela compreensão, paciência e amor em todos esses anos. E que mesmo longe, acreditaram em mim e me apoiaram. E a todos os meus, que me ajudaram nas boas e duras etapas da vida.

Aos mestres **Romeu Rodrigues de Souza** e **Sandra Regina Stabile**, que sempre estiveram dispostos a me ajudar, a me aconselhar...

Pois ser mestre não é apenas lecionar, mas sim ser humano e amigo, guia e companheiro, exemplo de dedicação e doação, de dignidade pessoal e, sobretudo de amor.

Muito obrigada pela orientação e principalmente pela amizade.

Aos professores e amigos **Sônia Luci Molinari**, **Marcílio Hübner de Miranda Neto** e **Maria Raquel Marçal Natali** que durante essa minha jornada, não mediram esforços para me auxiliar tanto na vida acadêmica quanto na vida e pessoal.

Aos meus amigos **Carlos Eduardo Seyfert, Karina Martinez Gagliardo, Patrícia Orlandini Gonzalez, Marcelo Domingues de Faria, Lilian Kamikawa, Patrícia Marega, Jaqueline de Carvalho, Juliano Oda e Kleber Fernando Pereira** que no decorrer desses anos estiveram comigo, compartilhando as alegrias e as tristezas, mas acima de tudo, me apoiando em todos os momentos e me fazendo ver a importância da verdadeira amizade.

Ao meu saudoso pai **Luiz Darci Clebis**

Um dia você se foi, deixando para trás um imenso vazio onde antes, contávamos com uma presença marcante, firme e segura. As saudades ainda grandes marcam a falta física de um sorriso, um afago, uma palavra. Foi, contudo, no meio dessa ausência que compreendemos a dimensão do ser eterno, da porção que fica e que, apesar de invisível, é sensível e vive dentro de nós. Por isso, mesmo que hoje algumas lágrimas se vertam ante a falta de seu abraço, essas não serão suficientes para apagar a certeza de estarmos juntos a dividir toda a emoção deste momento.

Hoje, neste dia tão importante, te sinto presente, dentro de mim, feliz por nossa vitória. Sempre vou te amar...

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo** pela oportunidade de desenvolver uma pesquisa científica na melhor e maior Universidade do Brasil.

À **FAPESP** pelo apoio concedido para a realização deste trabalho.

A **Profa. Dra. Maria Angélica Miglino** pela atenção, carinho e apoio na realização desta dissertação de mestrado.

Ao **Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato** pelos ensinamentos, amizade e acompanhamento neste curso de pós-graduação.

A **Profa. Dra. Jussara Rocha Ferreira** pela amizade e ensinamentos anatômicos e de vida.

As **Profas. Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni** e **Maria Montserrat Diaz Pedrosa Furlan** pelas explicações sobre diabetes, ácido ascórbico e metabolismo neuronal.

A **Profa. Isaura Maria Mesquita Prado** pela amizade e apoio.

Aos **Profs. Robson Marcelo Rossi** e **Vanderly Janeiro** pela ajuda nas análises estatística.

Aos professores **Irvênia Luiza S. Prada**, **José Roberto Kfoury Junior**, **Arani Nanci B. Mariana**, **Francisco Javier H. Blazquez**, **Wilson Machado de Souza**, **Paula Pappa** e **Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro** pela amizade, companheirismo e ensinamentos.

Aos amigos **Karina Martinez Gagliardo**, **Sandra Regina Martinez Gagliardo**, **Irena Fateeva**, **Maria da Glória dos Santos**, **Pedro Acácio Gagliardo**, **Raphael**

Martinez Gagliardo e Fábio Linares Silva que foram a minha família em São Paulo.

Aos amigos **Ana Paula Vidotti, Emerson Ticona Fioretto, Carlos Eduardo Bezerra de Moura, Rafael Cardoso Carvalho, Lucas Alécio Gomes, Hildebrando Gomes Benedicto, Lílian de Jesus Oliveira, André Luís Filadelpho, Arlei José Birck, Eduardo Maurício Mendes de Lima, Danila Barreiro Campos, Ana Rita de Lima e Dulcinea Gonçalves Teixeira** pelo carinho e companhia nestes anos.

As amigas **Cláudia Cristina Batista Evangelista, Renata Brito Mari, Lucieni Christina Marques da Silva Pereira, Priscila de Freitas, Luiz Criastiano Valentini, Paulo Alexandre Galvani, Márcia Helena Marques Lara, Vanessa Daiana Pedrancini e Ana Paula Castello** pela amizade e apoio em todos estes anos.

A **todos os amigos da pós-graduação** que sempre estiveram comigo e me proporcionaram bons momentos, me fazendo muitas vezes, esquecer a tristeza que é estar longe de casa.

Ao **Fábio de Moraes Francisco** pela confecção dos desenhos deste trabalho.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelo auxílio na correção desta dissertação.

Aos **funcionários da Comissão de Pós-graduação** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela colaboração nos tramites legais para a realização do curso e defesa da dissertação.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP, área de concentração Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres – **Kazue Takiishi, Jaqueline Martins de Santana, Patrícia Aparecida da Paixão, Ana Paula Coppi Maciel Ribeiro, Maicon Barbosa da Silva, Edinaldo Ribas Farias, Diogo Nader Palermo, Ronaldo Agostinho da Silva e Wanderley Lima Guidi** pela amizade e serviços prestados.

À **Universidade Estadual de Maringá**, através do **Departamento de Ciências Morfofisiológicas** (DCM – UEM), que nos cedeu seus laboratórios para a realização de grande parte desta pesquisa.

A todos os **Professores da Universidade Estadual de Maringá** que sempre me acolheram e me ajudaram.

Aos técnicos dos laboratórios de anatomia, histologia, fisiologia e análise de imagem e funcionários da Universidade Estadual de Maringá **Ângela Cristina Benedito Mercena, Antônio Paulo Merceno, Cleonira Sarro, Elizete Rosa dos Santos Silva, João Batista Alves de Assis, José Antônio de Souza, Liana Ribeiro Zanzarine, Marcelo Vladimir Piloto, Maria Aparecida Pantoja Agostinho, Maria dos Anjos Moreira Fortunato, Maria Euride Carlos Cansino, Maria Vilma Moraes de Sarro, Waldir Trombeli e Waldmer Facina.**

“Amizade é uma dádiva divina que nasce com a vida e morre deixando as melhores lembranças. Amizade é um bem comum entre as pessoas de bom coração que desejam o melhor ao próximo. Amizade é pensar distante e o mais alto, que nos leve junto as estrelas e, poder até mesmo tocar o céu como agradecimento a Deus por poder ter amigos que me querem bem”.

(Daniel Lucas dos Santos de Carvalho - Amizade)

“Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança. E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores”.

(William Shakespeare – Aprendendo a viver)

“Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.

A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável: Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo:

O de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída”.

(Mahatma Gandhi - Se eu Pudesse)

“Eu sou a luz, sob cujos raios se aclamaram a pureza de tuas intenções e a nobreza de teus sentimentos! Quando se extinguir o ânimo para arrastares as vicissitudes da vida e te achares na iminência de desfalecer, chama-me... Eu sou o refúgio em cujo seio encontrarás guarida para o teu corpo e tranqüilidade para o teu espírito! Eu sou a sinceridade, que sabe corresponder a franqueza das tuas atitudes e excelsitudes de teus ideais! E quando enfim..., quiseses saber quem sou eu, pergunta ao riacho que murmura e ao pássaro que canta, a flor que desabrocha e a estrela que cintila, ao moço que espera e ao velho que recorda...

Chamo-me amor... o remédio para todos os males que te atormentam o espírito!

Eu sou Jesus!!!

(Oração psicografada por Chico Xavier – Eu sou a Luz)

RESUMO

CLEBIS, N. K. **Avaliação quantitativa e morfométrica dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos do estômago de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e suplementados com ácido ascórbico.** [Quantitative and morphometric evaluation of nadh-d stained myenteric neurons of the stomach of streptozotocin-induced diabetic rats supplemented with ascorbic acid]. 2003. 122 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

A neuropatia autonômica que se manifesta em animais portadores de diabetes mellitus (DM) compromete vários órgãos. A nível gastrointestinal pode acarretar diarreia, constipação, estase e dilatação gástrica, levando a anorexia, perda de peso e vômito. Embora os mecanismos que desencadeiam esses distúrbios não estejam totalmente esclarecidos, parece que alterações do plexo mioentérico estão envolvidas. O estresse oxidativo juntamente com o aumento do sorbitol resultante das alterações metabólicas presentes no DM resultam em edema e lesão neuronal e, entre as conseqüências desta lesão, tem sido descritas alterações nos neurônios mioentéricos. O ácido ascórbico (AA) além da ação antioxidante pode reduzir a concentração de sorbitol atuando, desse modo, como neuroprotetor. O presente trabalho teve como objetivos investigar possíveis alterações no número e no tamanho dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos (nadh-dr) do estômago de ratos diabéticos e o efeito da suplementação com AA (1g/L de água) nos referidos parâmetros. Para tanto, 15 ratos (*Rattus norvegicus*) foram separados em três grupos (n = 5): controle (C); diabético (D); e diabético suplementado com AA (DS). O DM foi induzido por estreptozotocina (35 mg/kg de peso corporal). Após 120 dias de experimento, os animais foram anestesiados, sacrificados e seus estômagos retirados. Os neurônios mioentéricos foram evidenciados pelo método da nadh-diaforase. Por meio de microscópio de luz foram contados os neurônios nadh-

dr e, pelo programa computadorizado para análise de imagens, foi mensurado o perfil do corpo celular (PCC) desses neurônios. As regiões aglandular e glandular do estômago foram analisadas separadamente. O número de neurônios nadh-dr foi maior ($P < 0,05$) na região glandular do grupo DS quando comparado com o grupo D. A média dos PCCs foi maior ($P < 0,05$) para os neurônios dos grupos D e DS do que para o grupo C. Ocorreu aumento na incidência de neurônios com PCC superior a $200 \mu\text{m}^2$ no grupo D quando comparada aos grupos DS e C. Os resultados sugerem que a suplementação com AA teve efeito neuroprotetor sobre os neurônios mioentéricos nadh-dr representado pelo aumento no número de neurônios e diminuição de neurônios grandes na região glandular do grupo DS.

Palavras-chave: Neurônios. Estômago. *Diabetes mellitus*. Ácidos ascórbicos.

ABSTRACT

CLEBIS, N. K. **Quantitative and morphometric evaluation of nadh-d stained myenteric neurons of the stomach of streptozotocin-induced diabetic rats supplemented with ascorbic acid.** [Avaliação quantitativa e morfométrica de neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos do estômago de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e suplementados com ácido ascórbico]. 2003. 122 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

The autonomous neuropathy present in animals with diabetes mellitus (DM) compromises several organic systems. On the gastrointestinal tract it may provoke diarrhea, constipation, estase and gastric dilation, leading to anorexia, weight loss and vomit. Although the triggering mechanisms of these disturbances are not completely clear, it seems that alterations of the myenteric plexus may be involved. The oxidizing stress – together with the sorbitol increase resulting from the metabolic alterations due to dm – results in an edema and in a neuronal lesion. Among the consequences of this lesion, alterations in the myenteric neurons have been described. The ascorbic acid (AA), besides its antioxidant effect, may also reduce the sorbitol concentration working as a neuroprotector. The aims of the present work were to investigate the possible alterations in the number and size of nadh-dr stained myenteric neurons of the stomach of diabetic rats and the effect of the aa-supplementation (1g/l of water). In order to do so, 15 rats (*rattus norvegicus*) were divided into three groups (n = 5): controls (C); diabetic (D); and diabetic supplemented with AA (DS). DM was induced by streptozotocin (35 mg/kg of body weight). 120 days later, the animals were sacrificed for obtaining their stomachs. The myentric neurons were stained employing the nadh-diaforase method. We counted the nadh-dr neurons employing the light microscope and we measured the cellular body profile (CBP) using an image analysis software. The aglandular and glandular

areas of the stomach were analyzed separately. The number of neurons nadh-dr was larger ($p < 0,05$) in the glandular area of group ds when compared to group d. The average of cbps was larger ($p < 0,05$) for neurons of groups d and ds than for group c. There was an increase in the incidence of neurons with cbps over 200 mm^2 in group D when compared to groups DS and C. The results suggest that the AA supplementation had a neuroprotector effect on the nadh-dr myenteric neurons represented by the increase in the number of neurons and the decrease of big neurons in the glandular area of group DS.

Key words: Neurons. Stomach. *Diabetes mellitus*. Ascorbic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fotografia demonstrando órgãos abdominais.	62
Figura 2 - Fotografia da face externa do estômago.	64
Figura 3 - Fotografia da parede interna do estômago de rato.	64
Figura 4 - Esquema de preparado de membrana evidenciando a túnica mucosa, a tela submucosa, a túnica muscular com as camadas circular e longitudinal, o plexo mioentérico e o plexo submucoso.	65
Figura 5 - Esquema da captura de imagem no programa ImagePro Plus	68
Figura 6 - Mensuração do perfil do corpo celular em μm^2 (PCC) dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos do estômago de rato, pelo programa ImagePro Plus.	68
Figura 7 - Fotomicrografias de preparados de membrana do estômago de rato evidenciando gânglios com neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos da região aglandular A (A), aglandular B (B), glandular A (C) e glandular B (D) do estômago do grupo controle.	74
Figura 8 - Fotomicrografia de preparado de membrana do estômago de rato do grupo controle evidenciando gânglio com os neurônios mioentéricos nadh-d reativos com perfis do corpo celular variados.	75
Figura 9 - Fotomicrografia de preparado de membrana do estômago de rato do grupo diabético evidenciando gânglio contendo neurônios mioentéricos nadh-d reativos com perfil do corpo celular de tamanhos variados.	75

Figura 10 - Fotomicrografia de preparado de membrana do estômago de rato do grupo diabético suplementado evidenciando gânglio com neurônios mioentéricos nadh-d reativos com perfil do corpo celular de tamanhos variados.

76

Figura 11 - Gráfico demonstrando a frequência dos neurônios mioentéricos nadh-d reativos da região aglandular A (AA) e B (AB) do estômago de ratos dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS) segundo os valores do perfil do corpo celular (PCC) em intervalos de $100 \mu\text{m}^2$.

80

Figura 12 - Gráfico demonstrando a frequência dos neurônios mioentéricos nadh-d reativos da região glandular A (GA) e B (GB) do estômago de ratos dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS) segundo os valores do perfil do corpo celular (PCC) em intervalos de $100 \mu\text{m}^2$.

81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química da ração comercial Nuvital ^{®1} .	60
Tabela 2 - Média ¹ das dosagens sanguíneas de glicose (mg.dl ⁻¹), de hemoglobina glicada (GHb) (%) e de ácido ascórbico (µg.ml ⁻¹), do peso corporal inicial e final (g), do consumo de água (ml) e de alimento (g) e volume urinário (ml) dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS).	72
Tabela 3 - Média do perfil (mm ²) da face posterior do estômago obtida dos animais dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS).	73
Tabela 4 - Número médio de neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos das regiões aglandular (A e B) e glandular (A e B) do estômago dos animais dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS).	77
Tabela 5 - Médias do perfil (µm ²) do corpo celular (PCC) dos neurônios nadh-diaforase reativos das regiões aglandular (A e B) e glandular (A e B) do estômago dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS).	78
Tabela 6 - Frequência relativa (%) dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos da região aglandular A e B do estômago de ratos dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS) segundo o perfil do corpo celular, em intervalos de 100 µm ² .	79
Tabela 7 - Frequência relativa (%) dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos da região glandular A e B do estômago de ratos dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS) segundo o perfil do corpo celular (PCC), em intervalos de 100 µm ² .	81

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 MORFOFISIOLOGIA DO ESTÔMAGO	27
2.2 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO	32
2.3 O DIABETES MELLITUS	38
2.4 AÇÃO DIABETOGENICA DA ESTREPTOZOOTOCINA	46
2.5 NEUROPATIA DIABÉTICA AUTÔNOMICA	47
2.6 AÇÃO ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO ASCÓRBICO	53
3 MATERIAIS E MÉTODOS	58
3.1 INDUÇÃO DO DIABETES POR ESTREPTOZOOTOCINA	60
3.2 SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO ASCÓRBICO	61
3.3 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	61
3.4 EVIDENCIAÇÃO NEURONAL PELO MÉTODO HISTOQUÍMICO DA NADH-DIAFORASE	62
3.5 OBTENÇÃO DOS PREPARADOS DE MEMBRANA	63
3.6 QUANTIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS NADH-DIAFORASE REATIVOS	66
3.7 MENSURAÇÃO DO PERFIL DO CORPO CELULAR DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS NADH-DIAFORASE REATIVOS	67
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
3.9 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	70
4 RESULTADOS	71
4.1 ANÁLISE QUANTITATIVA	76
4.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	77
5 DISCUSSÃO	82
6 CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS	106

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é uma doença que acomete seres humanos e animais, e se caracteriza por anormalidades endócrino-metabólicas que levam entre outros fatores, a hiperglicemia.

Entre as alterações provocados pelo diabetes está a neuropatia diabética autonômica que em nível gastrointestinal promove distúrbios motores, sensoriais e na função reflexa dos neurônios, manifestados como lentidão do trânsito gastrointestinal (IBER et al., 1993; YANG; AREM; CHAN, 1984), estase e dilatação gástrica com diminuição ou aumento de contrações peristálticas, bem como quadros gástricos mais graves como a gastroparesia (KATZ; SPIRO, 1966).

Acredita-se que a neuropatia diabética autonômica se manifesta em função de lesões de fibras nervosas periféricas por alterações na microcirculação dos nervos e no metabolismo dos neurônios (ARAÚJO, 1996). Contudo, a etiologia destes distúrbios não é totalmente conhecida e o comprometimento do sistema nervoso entérico tem sido sugerido.

Os neurônios do plexo mioentérico localizados entre os estratos longitudinal e circular da túnica muscular apresentam variações quantitativas, morfométricas, funcionais e neuroquímicas nos diferentes segmentos do trato gastrointestinal e em diversas espécies animais (FURNESS; COSTA, 1980; STERNINI, 1988).

Para o estudo dos neurônios mioentéricos diferentes técnicas são utilizadas, incluindo-se a obtenção de preparados de membrana gastrointestinais submetidos ao método de evidenciação neuronal pela nadh-diaforase (GABELLA, 1969).

Em animais, a indução do diabetes pode ser obtida com o uso de estreptozotocina. Esta substância provoca a depleção de NAD^+ das ilhotas pancreáticas com efeitos destrutivos sobre as células beta (GUNNARSSON; BERNE; HELLERSTRÖM, 1974).

Em ratos, após longos períodos de diabetes induzido por estreptozotocina, podem ocorrer alterações de neurônios mioentéricos no intestino delgado (HERNANDES et al., 2000), no colo (ROMANO; MIRANDA-NETO; CARDOSO, 1996), no ceco (ZANONI et al., 1997) e no estômago (FREGONESI et al., 2001).

Atividade motora gastrointestinal alterada pode afetar a motilidade do estômago levando a dilatação e retardo no esvaziamento gástrico, interferindo na coordenação entre estômago e duodeno, prejudicando, desse modo, o processo digestivo (CAMPBELL et al., 1977).

O dano neuronal relacionado às alterações diabéticas tem sido atribuído ao sorbitol, produzido na reação de redução da glicose pela enzima aldose redutase (CUNNINGHAM, 1998; VINSON et al., 1989).

O aumento da concentração de sorbitol verificado no diabetes leva a alterações da osmolaridade intracelular, aumentando-a, o que resulta em edema e lesão neuronal, com interrupção da condução de impulsos nervosos (COTRAN et al., 1996; HOSKING; BENNETT; HAMPTON, 1978; LINDSAY et al., 1998).

Entre as substâncias que reduzem a concentração de sorbitol por inibição da enzima aldose redutase está o ácido ascórbico (CUNNINGHAM, 1998; WIL; BYERS, 1996).

No diabetes, as concentrações teciduais de ácido ascórbico podem estar reduzidas pois seu transporte e sua reabsorção renal, em condição de hiperglicemia, ficam inibidos (CUNNINGHAM, 1998) ou também pelo fato dos indivíduos portadores

de diabetes se encontrarem mais expostos ao estresse oxidativo (YOUNG et al., 1992) o qual envolve, inclusive, alterações nas etapas de formação do sorbitol e aumento na sua concentração (BAYNES, 1991).

A suplementação com ácido ascórbico produz pouco efeito sobre a concentração da glicose sangüínea (YOUNG; TORNEY; TRIMBLE, 1992), porém reduz a fragilidade capilar e a concentração de sorbitol celular (WILL; BYERS, 1996; YOUNG; TORNEY; TRIMBLE, 1992) sugerindo uma função neuroprotetora.

Portanto, neste trabalho, utilizamos 15 ratos (*Rattus norvegicus*) reunidos em três grupos, controle, diabético e diabético suplementado com ácido ascórbico (1g/L de água/dia), e tivemos por objetivo:

- ✓ Verificar quais são as alterações quantitativas e morfométricas apresentadas por neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos do estômago de ratos portadores de diabetes crônico induzido por estreptozotocina;

- ✓ Verificar qual é o efeito da suplementação com ácido ascórbico nos parâmetros quantitativos e morfométricos dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos do estômago desses ratos.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

A literatura a respeito da constituição do estômago, da anatomia do plexo mioentérico e das alterações provocadas pelo diabetes no sistema nervoso é vasta. Neste capítulo, procuramos descrever de forma didática especialmente as relações entre o plexo mioentérico, o diabetes mellitus e os agentes antioxidantes (ácido ascórbico). Para tanto, dividimos este capítulo, em tópicos.

2.1 MORFOFISIOLOGIA DO ESTÔMAGO

Nos vertebrados superiores, de modo geral, o aparelho digestório é formado por órgãos que tem como função a recepção, a redução mecânica, a digestão química e a absorção de alimentos, bem como a eliminação de resíduos não digeridos (DYCE; SACK; WENSING, 1997; SISSON, 1986).

O canal alimentar, a partir do 1/3 inferior do esôfago, histologicamente é composto por quatro camadas ou túnicas distintas: a túnica mucosa; a tela submucosa; a túnica muscular; e a túnica serosa.

Nos segmentos do trato gastrointestinal, a túnica mucosa possui três partes: o epitélio; a lâmina própria (tecido conjuntivo); e a muscular da mucosa. A camada mucosa é altamente vascularizada e apresenta glândulas e também vasos e nódulos linfáticos (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

A tela submucosa é formada por tecido conjuntivo moderadamente denso, com vasos sangüíneos e linfáticos, e apresenta o plexo nervoso submucoso,

responsável pelo controle da motilidade da mucosa e da atividade secretora de suas glândulas e, segundo Gartner e Hiatt (2003) e Junqueira e Carneiro (1995), esta camada pode apresentar também glândulas.

A terceira túnica (túnica muscular) compreende a musculatura lisa disposta em duas camadas: uma interna (a circular) e outra externa (a longitudinal). Entre estas duas camadas musculares está localizado o plexo mioentérico que regula a atividade da túnica muscular, ou seja, a atividade peristáltica (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

A camada mais externa do trato gastrointestinal é a túnica serosa. Esta é formada por tecido conjuntivo frouxo, no qual há numerosas células adiposas e vasos sangüíneos e linfáticos e, também, pelo mesotélio constituído por epitélio simples (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

Apesar de todos os segmentos do trato gastrointestinal apresentarem basicamente a mesma constituição, ou seja, serem formados pelas quatro camadas descritas anteriormente, é necessário ressaltar que em cada órgão existem particularidades. Desta forma, as peculiaridades do estômago, órgão alvo deste trabalho, serão apresentadas a seguir.

Inicialmente, o estômago pode ser classificado quanto ao número de cavidades e quanto à composição do epitélio que reveste sua superfície interna.

Quanto ao número de cavidades, o estômago pode ser classificado como monocavitário ou não-compartimentalizado, quando possui apenas uma cavidade, como ocorre, por exemplo, no homem, rato, cão, gato, eqüino, suíno e no coelho, ou policavitário ou compartimentalizado, com mais de uma cavidade como, por exemplo, nos ruminantes (ALMEIDA, 1999; KUNSTYR; PETERS; GÄRTNER, 1976; SWENSON; REECE, 1996).

Em relação à composição do epitélio que reveste a superfície interna do órgão, o estômago pode ser classificado como simples, como o do homem, do cão e do gato, ou estômago composto onde, além da mucosa pilórica (antral), mucosa gástrica própria e mucosa cárdica, existe uma região de epitélio escamoso estratificado, como ocorre no rato, eqüino, suíno, ruminantes entre outros (ALMEIDA, 1999; BANKS, 1992; BROWNING; GANNON; O'BRIEN, 1983; HELANDER, 1981; KUNSTYR; PETERS; GÄRTNER, 1976; LUCIANO; REALE, 1992; SWENSON; REECE, 1996).

No rato, o estômago apresenta regiões distintas: a região aglandular conhecida também como região córnea ou estômago anterior e a região glandular (HELANDER, 1981; LEE et al., 1982; LUCIANO; REALE, 1992; REECE, 1996). Separando as regiões aglandular e glandular existe uma estrutura chamada prega limitante (BROWNING; O'BRIEN; GANNON, 1984; LUCIANO; REALE, 1992; ROBERT, 1971).

Acredita-se que a prega limitante possui células sensitivas na camada muscular da mucosa que poderiam determinar a abertura e o fechamento e/ou constrição da zona de transição do estômago, ou seja, da região localizada entre a porção aglandular e glandular, modulando a difusão do estômago glandular (LUCIANO; REALE, 1992).

A região aglandular do estômago possui epitélio de revestimento do tipo escamoso estratificado queratinizado, semelhante ao epitélio esofágico (BANKS, 1992; HELANDER, 1981; LUCIANO; REALE, 1992; OLIVEIRA et al., 2000; SWENSON; REECE, 1996).

A importância funcional da região aglandular ainda não está totalmente elucidada.

Toepfer¹ (1891 apud LUCIANO; REALE, 1992) atribuía à porção aglandular do estômago a função de maceração inicial dos alimentos.

Kunstyr, Peters e Gärtner (1976), verificando a reação de ratos quando retirada a porção aglandular do estômago, concluíram que esta região não possuía importância vital para os mesmos, pois os animais submetidos à cirurgia de retirada da porção aglandular viviam normalmente até um ano.

Segundo Browning, Gannon e O'Brien (1983), a região aglandular do estômago tem simplesmente a função de armazenamento, servindo, assim, como um depósito de alimento para o rato.

Alguns autores acreditam que, por meio de uma atividade mecânica, ela tenha a função de absorver íons (MARTENS; GÄBEL; STROZYK, 1991).

Em contra partida, a morfofisiologia da região glandular do estômago é amplamente conhecida.

A túnica mucosa da porção glandular apresenta dobras conhecidas como pregas gástricas. A superfície epitelial é formada por células prismáticas secretoras e é dividida em áreas (áreas gástricas) por meio de sulcos, sendo essas áreas gástricas marcadas por inúmeras e pequenas depressões chamadas fossetas

¹ TOEPFER, K. Die Morphologie des Magens der Rodentia. **Morphol. Jahrb.**, v. 17, p. 380-407, 1891.

gástricas, no fundo das quais se abrem as glândulas gástricas (BANKS, 1992; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; SEKI et al., 1993). Estas glândulas localizam-se na lâmina própria da mucosa, que é constituída de tecido conjuntivo frouxo, sendo amplamente vascularizada e apresentando grande quantidade de células linfóides, além de fibras musculares que entremeiam esta camada (BANKS, 1992; GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

A região glandular do estômago do rato apresenta alguns tipos celulares característicos, como por exemplo, as células de revestimento superficial, as células mucosas secretoras de muco, as células parietais ou oxínticas secretoras de ácido clorídrico, as células zimogênicas que secretam pepsinogênio e as células pertencentes ao sistema neuroendócrino conhecidas também como células APUD ou enteroendócrinas que secretam hormônios (BANKS, 1992; CUNNINGHAM, 1999; GARTNER; HIATT, 2003; GÜRTLER et al., 1987; GUYTON; HALL, 1997; HELANDER, 1981; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; LEE et al, 1982).

Nos animais em geral, a muscular da mucosa está presente, porém seu arranjo é variado (BANKS, 1992).

A tela submucosa é típica, sendo formada por tecido conjuntivo com rica rede vascular e linfática. Nesta camada encontra-se também o plexo submucoso, pertencente ao sistema nervoso entérico (BANKS, 1992; GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

Da mesma forma, a túnica muscular pode ser considerada típica, pois possui uma camada circular (interna) e uma longitudinal (externa) e, entre essas camadas, está o plexo mioentérico (BANKS, 1992; GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; OLIVEIRA et al., 2000).

A porção glandular do estômago tem, de maneira geral, a função de digerir os alimentos e secretar hormônios. Para tanto, cada tipo celular atua de forma específica. As células parietais e as células zimogênicas são as principais responsáveis pelos processos digestivos no estômago (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; SWENSON; REESE, 1996). Já, as células neuroendócrinas produzem os hormônios glucagon que atua na glicogenólise hepática, gastrina que estimula a secreção gástrica ácida, somatostatina inibidora de outras células neuroendócrinas, serotonina e substância P que aumentam a motilidade gástrica e o polipeptídeo intestinal vasoativo responsável pela eliminação de água e íons e estimulador da motilidade gástrica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

O estômago glandular pode ser dividido em corpo, antro e piloro (BANKS, 1992, HELANDER, 1981), sendo estas porções alvos de diversos estudos (MALBERT; RUCKEBUSCH, 1991; MEYER, 1980).

Para a realização deste trabalho, levamos em consideração a divisão do estômago em região aglandular e glandular e, também, a localização da curvatura menor e maior do estômago, assim como, a localização da prega limitante, seguindo os princípios de outros estudos (MOLINARI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2000; SCHULZE-DELRIEU; SHIRAZI, 1987).

2.2 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO

O sistema nervoso autônomo (SNA) compreende a porção eferente do sistema nervoso visceral e é constituído por neurônios motores viscerais que

controlam as atividades do músculo cardíaco, do músculo liso e das glândulas em geral. O SNA possui três subdivisões: sistema nervoso simpático; sistema nervoso parassimpático (DÂNGELO; FATTINI, 2002; FURNESS; COSTA, 1987; GARDNER; GRAY; O'RAHILLY, 1988; MACHADO, 2003; SPENCE, 1991); e sistema nervoso entérico (TORTOTA; GRABOWSKI, 2000).

O sistema nervoso entérico (SNE), formado por plexos ganglionados ou não, é relativamente independente do sistema nervoso central, e ajuda a coordenar funções complexas como a motilidade, a secreção e o fluxo sanguíneo do trato gastrointestinal (COSTA; SIMON; BROOKS, 1994; STERNINI, 1988).

Acredita-se que os neurônios do SNE têm origem, principalmente, na crista neural (NATARAJAN et al., 1999) em células localizadas no segmento vagal, que migram para a porção cranial do trato gastrointestinal, e desta para todo o canal alimentar (GABELLA, 1994).

No século XIX na Inglaterra, os pesquisadores William Bayliss (1860-1924) e Ernest Starling (1866-1927), estudando o intestino de cães, verificaram que quando a pressão interna do intestino aumentava, este se movimentava. A esta resposta do intestino deram o nome de “lei do intestino”, conhecida atualmente como movimento peristáltico ou simplesmente peristaltismo (FURNESS; COSTA, 1987; GERSHON, 2000).

Realizando novamente experimentos com cães, Bayliss e Starling descentralizaram o intestino, esperando, provavelmente, não encontrar mais os chamados movimentos peristálticos. Porém, para a surpresa de ambos, a “lei do intestino” continuou ocorrendo, mesmo sem a participação dos nervos oriundos do sistema nervoso central. Esta nova descoberta demonstrou que havia um mecanismo nervoso local do intestino (GERSHON, 2000).

A descoberta dos plexos entéricos ganglionados ocorreu por outros dois pesquisadores. Georg Meissner (1829-1903) observou a existência de uma rede nervosa na tela submucosa do intestino. Esta, atualmente, é denominada plexo submucoso. O cientista alemão Leopold Auerbach (1828-1897) na Alemanha, descreveu uma rede complexa de células e fibras nervosas localizada entre as camadas musculares da túnica muscular do intestino, atualmente, plexo mioentérico.

Os gânglios entéricos têm localização intramural no trato gastrointestinal (FURNESS; COSTA, 1987; GABELLA, 1994; OLIVEIRA et al., 2000; PAXINOS, 1994) e formam uma irregular e delicada rede (IRWIN, 1931).

Estes gânglios diferem dos gânglios simpáticos e parassimpáticos porque todos os neurônios são circundados por uma lâmina basal comum, sendo separados uns dos outros por células gliais, o que não acontece nos outros tipos ganglionares (GABELLA, 1994).

Como descrito anteriormente, a “autonomia” do SNE em relação ao sistema nervoso central é relativa, pois os neurônios motores finais, tanto da subdivisão simpática quanto da parassimpática do SNA relacionados com a inervação do trato gastrointestinal, estão localizados também no interior dos gânglios entéricos, juntamente com aqueles do plexo mioentérico (COSTA; SIMON; BROOKS, 1994; GUILFORD, 1990).

Os neurônios intrínsecos do trato gastrointestinal constituem uma complexa e variada população que, segundo Young et al. (1993), deve ser totalmente conhecida para a compreensão dos mecanismos envolvidos na digestão.

Furness (2000) relata que, entre os neurônios motores do SNE, há neurônios excitatórios da musculatura intestinal, inibitórios dos músculos

gastrointestinais, secretores e vasodilatadores, secretores e não vasodilatadores, e neurônios que inervam as células endócrinas do estômago.

O estômago, além dos plexos entéricos, recebe fibras do SNA, do plexo celíaco (sistema nervoso simpático), e pelo nervo vago (sistema nervoso parassimpático) sendo este o principal componente extrínseco, que desempenha importante papel na regulação da secreção gástrica (BURNSTOCK, 1959; FOGEL; ZHANG; RENEHAN, 1996; GABELLA, 1994; GUILFORD, 1990; LAUGHTON; POWLEY, 1987; OZAKI; SENGUPTA; GEBHART, 1999; PAGE; MARTIN; BLACKSHAW, 2002; SWITHERS; BARONOMSKY; POWLEY, 2002; TORTORA; GRABOWSKI, 2000).

Entre os componentes do SNE, o plexo mioentérico inerva a musculatura lisa gastrointestinal e vascular controlando a motricidade e o fluxo sanguíneo local. Embora recebam impulsos do sistema nervoso central pelas vias simpática e parassimpática, os neurônios do plexo mioentérico recebem impulsos principalmente de outros neurônios entéricos, determinando a motricidade gastrointestinal (COSTA; SIMON; BROOKES, 1994).

O plexo mioentérico tem sido investigado em diferentes condições fisiológicas como, por exemplo, o envelhecimento e a desnutrição (GOMES; SOUZA; LIBERTI, 1997; LINCOLN et al., 1984; MOLINARI et al., 2002; NATALI; MIRANDA-NETO, 1996; SANTER; BAKER, 1988; SOUZA et al., 1993; ZANONI et al., 2003; YOUNG, TORNEY; TRIMBLE, 1992).

O número e tamanho dos neurônios do plexo mioentérico, bem como sua disposição na túnica muscular do trato gastrointestinal, foram alvos de inúmeros estudos (BOR-SENG-SHU et al., 1994; BURNSTOCK, 1959, CRACCO; FILOGAMO, 1994; DEFANI, 2003; FREGONESI; MIRANDA-NETO, MOLINARI, 1998; FURLAN et

al., 1999; GABELLA, 1971; GABELLA, 1987; GABELLA; HALASY, 1987; IRWIN, 1931; KYOSOLA et al., 1975; MATSUO, 1934; PORCHER; JULÉ; HENRY, 2000; ROMANO; SOUZA; FURLAN, 2001; SOUZA et al., 1982; TIMMERMANS et al., 1991; YOUNG et al., 1993).

No estômago do rato, por exemplo, nas regiões aglandular e glandular, os gânglios do plexo mioentérico são mais numerosos na região central próximo à prega limitante e na região da curvatura menor e menos volumosos e mais esparsos nas proximidades da curvatura maior (MOLINARI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2000).

Tanto o número quanto o perfil do corpo celular dos neurônios podem variar de acordo com o segmento do trato gastrointestinal e com a espécie animal estudada (GABELLA, 1994).

A primeira classificação morfológica dos neurônios mioentéricos foi elaborada no século XIX por A H Dogiel. Esta classificação reúne os neurônios em três tipos: neurônios tipo I caracterizados por um corpo celular achatado, um axônio irregular e longo, e numerosos dendritos curtos na base do pericário e do axônio; neurônios tipo II que apresentam o corpo celular liso e oval, e somente um longo processo celular; e neurônios tipo III que possuem corpo celular oval ou retangular, um axônio longo e pequenos e numerosos dendritos irregulares (STERNINI, 1988; WOOD, 1994).

Outras classificações surgiram posteriormente considerando as dimensões do corpo celular, as características eletrofisiológicas e os tipos de neurotransmissores dos neurônios (FURNESS, 2000; FURNESS; BORNSTEIN; TRUSSEL, 1988; GABELLA, 1979; HODGKISS; LESS, 1983; NATALI; MIRANDA-NETO, 1996).

Um dos métodos utilizados para estudar tanto quantitativa quanto morfometricamente os neurônios do plexo mioentérico é o preparado de membrana (BARBOSA, 1978; FREGONESI; MIRANDA-NETO, MOLINARI, 1998; FREGONESI et al., 2001; GABELLA, 1987; MOLINARI et al., 2002; NATALI; MIRANDA-NETO, 1996; OLIVEIRA et al., 2000; SANT'ANA et al., 1997; SCHICHO et al., 2001; VAN GINNEKEN et al., 1998). Segundo Gabella (1990, 1994) este método oportuniza a observação de uma área maior, quando comparado com as técnicas que utilizam-se de cortes histológicos.

O preparado de membrana para observação do plexo mioentérico consiste da retirada das camadas mucosa e submucosa, preservando a camada muscular e serosa de um segmento. Desta forma, é possível identificar os componentes do plexo mioentérico.

Para a evidenciação dos neurônios, várias técnicas podem ser empregadas.

Algumas delas são consideradas clássicas e foram utilizadas pelos primeiros pesquisadores do SNE. Entre elas podemos citar a impregnação por prata e ouro (MATSUO, 1934), coloração com azul de metileno e com azul de toluidina (BARBOSA, 1973; BARBOSA, 1978; IRWIN, 1931; MATSUO, 1934), técnicas histoquímicas (ALI; MCLELLAND, 1979; GABELLA, 1969; GABELLA, 1989; YOUNG et al., 1993), imunohistoquímicas (BORNSTAEIN et al., 1984; DRENGK et al., 2000), imunofluorescência (GABELLA, 1979), acetil colinesterase (BOR-SENG-SHU et al., 1994; GABELLA, 1969; GABRIEL et al., 1992; STERNINI, 1988) além de técnicas de microscopia eletrônica (GABELLA, 1979; TAFURI, 1961).

Entre as técnicas de histoquímica destaca-se a reação utilizada por Gabella (1969) para detectar a atividade da enzima NADH-diaforase, tendo como aceptor artificial de elétrons o “nitro blue tetrazolium” ou simplesmente NBT. Este método

evidencia a população neuronal com maior atividade e concentração daquela enzima (SANT'ANA et al., 1997) que, segundo Young et al. (1993), representa 80% do total dos neurônios mioentéricos.

Muitos experimentos têm sido conduzidos para avaliar como o plexo mioentérico responde as diferentes patologias que manifestam alterações gastrointestinais. Entre as patologias que comprometem as funções do aparelho digestório está o diabetes mellitus, alvo de nosso estudo.

2.3 O DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus (DM) é uma doença que acomete seres humanos e animais. Considerado nos dias atuais como a terceira causa de morte nos Estados Unidos (VOET, 2000), o DM pode ser definido como um distúrbio crônico do metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas (KUMAR; COTRAN; ROBBINS, 1994), sendo resultado da diminuição da secreção de insulina pelas células beta das ilhotas pancreáticas conhecidas também como ilhotas de Langerhans.

Em animais como, por exemplo, o cão e o gato, o DM pode ocorrer, principalmente, em idades mais avançadas. Além da idade, a obesidade, a castração e o sexo podem ser considerados como fatores de risco para a incidência do DM em gatos (HOENIG, 2002).

Embora o DM tenha sido identificado em poucas raças de cães, segundo Kramer, Nottingham e Robinette (1980), algumas têm o risco aumentado de desenvolver tal doença, como por exemplo, os Keeshounds, Alasca Malamute, Finnish Spitzes, Schnauzers miniatura, Poodles miniatura e Springer Spaniels inglês,

enquanto outras, conforme Marmor et al. (1982), têm risco diminuído como os Boxers, Pastor Alemão, Cocker Spaniels e Collies. Porém, não é certo ainda se o aumento do risco em algumas dessas raças ocorre pela propensão das mesmas em desenvolver outras endocrinopatias que produzam hormônios antagonistas à insulina.

O DM em humanos pode ser do tipo primário ou do tipo secundário.

O DM secundário pode ocorrer devido a uma doença pancreática como a pancreatite crônica ou por secreção de hormônios que agem contra os efeitos da insulina, assim como ocorre na síndrome de Cushing (STEVES; LOWE, 1998).

Porém, no DM do tipo primário verifica-se um grupo heterogêneo de alterações ou distúrbios que possuem como característica comum a hiperglicemia. Este tipo de diabetes pode ser subdividido em: DM insulino-dependente (ou tipo I) e DM não-insulino-dependente (ou tipo II) (COTRAN et al., 1996).

O DM tipo I tem início antes dos 20 anos, sendo, por esta razão, conhecido também como diabetes juvenil, e representa aproximadamente 10% dos casos. É uma doença sintomática, manifestada por poliúria, polidipsia, polifagia e cetoacidose. Os níveis de insulina plasmática são baixos, enquanto que os níveis de glucagon são elevados e, nesta forma de diabetes, existe acentuada redução das células beta pancreáticas. Os mecanismos patogênicos propostos para o DM tipo I são: a predisposição genética, a auto-imunidade e os fatores ambientais (BRASILEIRO FILHO, 2000).

O DM tipo II que foi induzido através da droga estreptozotocina nos animais experimentais para a realização deste trabalho representa cerca de 90% dos casos de diabetes. Nesta forma de DM, os níveis de insulina plasmática são normais ou elevados, enquanto que os níveis de glicose são muito elevados,

podendo isto ocorrer pela falta de resposta normal de algumas células à insulina, as chamadas células insulino-resistentes (VOET, 2000).

De acordo com Cotran et al. (1996) o DM tipo II é subdividido em tipos obeso e não obeso, além do tipo DM do jovem com início na maturidade (DJIM) muito raro. Quanto à patogenia, acredita-se que o DM tipo II pode estar relacionado a fatores genéticos, ao estilo de vida e à falta de atividade física. O DJIM, porém, sabe-se que é de herança genética do tipo autossômica dominante e está ligada aos cromossomos 7 e 20.

Segundo Brasileiro Filho (2000), no DM podem ocorrer lesões nas ilhotas pancreáticas. Alterações como: redução congênita do número de ilhotas; diminuição da massa total das ilhotas provocada pela perda de células beta; desgranulação das células beta; vacuolização das células beta; e infiltração linfocitária das ilhotas pancreáticas são algumas das modificações morfológicas que ocorrem com o DM tipo I. No DM tipo II verificam-se, principalmente, diminuição da massa total das ilhotas, hialinose e fibrose das ilhotas. A vacuolização das células beta precedida pela desgranulação deste tipo celular é também evidenciada no diabetes experimental.

As ilhotas pancreáticas, além das células beta que produzem insulina e ocupam cerca de 60% do volume total das ilhotas (CLARK et al., 2001), são compostas por mais três tipos principais de células e dois tipos secundários conforme (COTRAN et al., 1996). Os tipos principais são:

- células A (alfa) produtoras de glucagon que induz a hiperglicemia pela atividade glicogenolítica no fígado;
- células D (delta) que contém somatostatina a qual, por sua vez, suprime a liberação de insulina e de glucagon e;

- células F ou PP: estão presentes tanto no pâncreas endócrino quanto no exócrino e que contém polipeptídio pancreático estimulador da secreção das enzimas gástricas e intestinas e inibidor da motilidade intestinal.

Ainda, segundo Cotran et al. (1996), os tipos secundários de células encontradas nas ilhotas pancreáticas são:

- células D1 que possuem grânulos e produzem o polipeptídio intestinal vasoativo, além de um hormônio que provoca a glicogenólise, a hiperglicemia, estimula a secreção de líquidos gastrointestinais e acarreta diarreia secretória;
- células enterocromafins sintetizadoras de serotonina e fonte dos tumores pancreáticos que induzem a síndrome carcinóide.

Por ser a insulina produzida pelas células beta das ilhotas pancreáticas, quaisquer alterações que ocorram nestas ilhotas podem interferir no funcionamento normal do pâncreas endócrino e, conseqüentemente, na produção deste hormônio.

Conforme Belivacqua et al. (1998), a insulina é uma proteína constituída por duas cadeias de aminoácidos unidas por pontes dissulfídicas cuja secreção é determinada por fatores como: a administração de carboidratos; o nível de glucagon; a ingesta de aminoácidos; a atividade do SNA; a utilização de medicamentos; e a somatotrofina. Além disso, a insulina atua no metabolismo glicídico, protéico e lipídico, favorece a penetração de potássio na célula e aumenta a reabsorção celular de sódio.

Após ser secretada no sangue, a porção de insulina que não se ligou a receptores de membrana é degradada pela enzima insulinase, principalmente no fígado e, em menor proporção, nos músculos e nos rins. A porção que alcança as

células-alvo se liga a receptores de membrana (proteínas) e atua controlando o mecanismo metabólico intracelular. Para tanto, a insulina se prende a receptores formados por quatro subunidades – duas alfas, localizadas externamente na membrana celular e, duas betas, que penetram na membrana celular e alcançam o interior da célula – ligadas por ponte de dissulfeto. A insulina fixa-se às subunidades alfa, porém, devido às ligações com as subunidades beta, ocorre um processo chamado fosforilação, o que faz com que a proteína se transforme em proteína quinase, provocando a fosforilação de diversas enzimas intracelulares. Desta forma, a insulina pode “controlar”: a permeabilidade da membrana celular à glicose, aos aminoácidos, aos íons potássio e fosfato; a fosforilação de enzimas; a tradução de RNAs mensageiros nos ribossomos; e a transcrição do DNA no núcleo da célula (GUYTON; HALL, 1997).

O DM em cães apresenta-se em três formas: uma semelhante ao DM tipo I de humanos, causado por destruição auto-imune das células beta pancreáticas; uma forma semelhante ao DM tipo II; e uma terceira forma de DM que ocorre juntamente com endocrinopatias (HOENIG, 2002).

No diabetes semelhante ao tipo I, os cães estão propensos a desenvolver cetoacidose, necessitando de insulina para sobreviverem e, quando estimulados pela glicose ou glucagon, não ocorre aumento de insulina ou peptídio-C, sugerindo que as células beta estão ausentes ou não respondem corretamente (HOENIG, 2002). Neste tipo de diabetes, Hoenig e Dawe (1992) identificaram anticorpos contra as células beta em 50% dos cães diagnosticados precocemente, sugerindo um componente imune na etiologia do diabetes canino. De acordo com Atkins, Hill e Johnson (1979) e Gepts e Youssaint (1967), as ilhotas pancreáticas em 30% dos

casos podem ser destruídas ou transformadas em tecido fibroso devido a pancreatites crônicas.

É sabido que a obesidade pode ser considerada um fator de risco para o diabetes em cães e a secreção de insulina aumenta de acordo com o grau de obesidade do animal. Em cães com 40% de gordura corporal a tolerância à glicose e a secreção de insulina são normais, porém em animais com aproximadamente 75% de gordura corporal existe uma menor tolerância à glicose (MATTHEEUWS et al., 1982).

Estudando as concentrações de insulina e glicose sanguínea em cães, Mattheeuws et al. (1984) verificaram dois grupos de cães diabéticos obesos: um grupo onde havia hiperinsulinemia, pois a secreção de insulina aumentava em resposta às mudanças da concentração de glicose; e um grupo onde também havia rápida hiperinsulinemia, porém por um curto período de tempo.

Conforme Cotran et al. (1996), este fato ocorre porque em portadores de DM tipo II não existem as oscilações normais de secreção de insulina e a diminuição da liberação deste hormônio justifica-se pela hiperglicemia crônica, conhecida como toxicidade da glicose, que reduz os transportadores GLUT-2 (unidades das proteínas para o transporte da glicose) que contribuem para a entrada de glicose na célula.

Diferentemente do DM humano, onde, a princípio, a pouca secreção de insulina sinaliza uma disfunção nas células beta pancreáticas, nos cães obesos é verificada uma rápida liberação desse hormônio independentemente da sua tolerância à glicose (MATTHEEUWS et al., 1982).

O terceiro tipo de diabetes em cães ocorre em conjunto com as endocrinopatias. Conforme Eigenmann et al. (1983) e Peterson, Nesbitt e Schaer

(1981), as endocrinopatias mais comuns são o hiperadrenocortismo e a acromegalia, respectivamente.

De acordo com Carlton e McGavin (1998), em cães as ilhotas pancreáticas são freqüentemente destruídas secundariamente a uma lesão inflamatória do pâncreas exócrino.

Em animais com diabetes e hiperadrenocortismo é possível verificar depósitos de glicogênio ou degranulações conforme o estágio da doença, além de hiperglicemia e hiperinsulinemia (CAMPBELL; PIERLUISSI; KOVACS, 1981).

Segundo Hoenig (2002), o DM é uma endocrinopatia comum em gatos domésticos, sendo a idade o maior fator de risco. Porém a obesidade, assim como o sexo do animal, podem também ser considerados como fatores de risco, estando o gato (macho) mais propenso a desenvolver o DM que a fêmea (ROOT et al., 1995; WOODS et al., 1994).

O DM felino é parecido com o DM tipo II em humanos, tanto clinicamente quanto patologicamente (O' BRIEN, 2002).

As similaridades do DM felino e do DM tipo II são que ambos ocorrem a partir da meia idade (JOHNSON et al., 1986) e são influenciados pela obesidade. Existe resistência para a cetoacidose. A concentração de insulina é baixa (O'BRIEN et al., 1985) e ocorrem lesões nas ilhotas pancreáticas (por deposição de amilina) e perda parcial das células beta pancreáticas (JOHNSON et al., 1986).

Outro tipo comum de lesão nas ilhotas pancreáticas de gatos diabéticos é a degeneração hidrópica (vacuolar) das células alfa e beta (CARLTON; MCGAVIN, 1998).

Além da diminuição da secreção de insulina, é verificada, em portadores de DM tipo II, resistência a este hormônio nos tecidos periféricos, provavelmente por

redução do número de receptores da insulina GLUT-4 (localizados nas células musculares e adiposas) e por defeitos pós-receptores. Por outro lado, ocorre aumento na produção de glicose no fígado, acentuando o processo de hiperglicemia (COTRAN et al., 1996).

Para impedir os efeitos deletérios do DM, é importante manter controlada a glicemia em níveis normais, e este controle pode ser bem monitorado através da mensuração das concentrações sangüíneas de glicose e hemoglobina glicada (COSTA; BETTI, 1998; COTRAN et al. 1996).

Por ser a insulina um importante hormônio anabólico, qualquer alteração que ocorra em sua liberação pode interferir no metabolismo tanto da glicose quanto dos lipídeos e proteínas. Em humanos, assim como em animais, quando a glicose ultrapassa o limiar real ocorre a glicosúria. Esta, por sua vez, induz diurese osmótica levando à poliúria, com grande perda de água e de eletrólitos, principalmente Na, K, Mg e P. A perda de água juntamente com a hiperosmolaridade acarretam a depleção de água intracelular atingindo, por exemplo, os osmorreceptores dos centros da sede no encéfalo, ocasionando a polidipsia. É verificada também em indivíduos diabéticos, a polifagia (BEVILACQUA et al., 1998; CARLTON; MCGAVIN, 1998; COTRAN et al., 1996).

A longo prazo, os distúrbios metabólicos presentes no DM são responsáveis por complicações crônico-degenerativas com comprometimentos vascular e nervoso manifestados na forma de macro e microangiopatias e neuropatias diabéticas (COTRAN et al., 1996).

2.4 AÇÃO DIABETOGENICA DA ESTREPTOZOOTOCINA

Para avaliar os efeitos do DM sobre os diferentes sistemas do organismo, muitos pesquisadores têm utilizado os chamados agentes diabetogênicos que induzem o diabetes experimental. Entre estes agentes está a estreptozotocina (CARDINAL; ALLAN; CAMERON, 1998; JUNOD et al., 1967; MILLER, 1990; PESCHKE et al., 2000; RASSCHAERT; EIZIRIK; MALAISSE, 1992; SAINI et al., 1996; SZKUDELSKI, 2001; THULESEN et al., 1997) utilizada neste trabalho.

Este modelo de diabetes também tem sido utilizado para avaliar possíveis comprometimentos dos neurônios de vários segmentos intestinais, em especial os neurônios do plexo mioentérico (BELAI et al., 1985; BELAI et al., 1988; BURNSTOCK; MIRSKY; BELAI, 1988; BÜTTOW; MIRANDA-NETO; BAZOTTE, 1997; SCHMIDT; PLURAD; ROTH, 1988).

A estreptozotocina é um antibiótico conhecido também por streptozoocina, 2-Deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose ou simplesmente STZ, e, segundo e Junod et al. (1967), foi isolada primeiramente em 1960 de culturas de *Streptomyces achromogenis*.

A estreptozotocina possui um mecanismo citotóxico nas células beta pancreáticas que não é totalmente conhecido (CARDINAL; ALLAN; CAMERON, 1998). Além disso, sabe-se que o GLUT-2 é o mediador da glicose para o interior das células beta e acredita-se que este mediador é utilizado similarmente pela estreptozotocina (SCHNEDL et al., 1994), podendo esse fato explicar porque a estreptozotocina provoca diabetes quando administrada em animais em jejum.

A estreptozotocina causa fragmentação do DNA nas células beta pancreáticas, depleção de NAD⁺/NADH celular para níveis não fisiológicos o que

resulta em morte celular (CARDINAL; ALLAN; CAMERON, 1998; GUNNARSSON; BERNE; HELLERSTRÖM, 1974; SAINI et al., 1996; YANG; WRIGHT JR., 2002).

Tay e Wong (1994) verificaram que a administração de estreptozotocina provoca alterações nos núcleos motores do nervo vago e Haluzík e Nedvídková (2000) mencionaram que a estreptozotocina aumenta a produção de radicais livres provocando estresse oxidativo, sendo este um dos mecanismos patofisiológicos das células beta durante o diabetes induzido. Os efeitos da estreptozotocina são observados logo entre o primeiro e o terceiro dia após sua administração. Os neurônios começam a desenvolver cromatólise cujo processo de regeneração se prolonga por aproximadamente seis semanas (MONCKTON; PEHOWICH, 1980).

Porém, para verificar a atividade diabetogênica da estreptozotocina é necessário ser administrada doses superiores a 25 mg/Kg (AR'RAJAB; AHRÉN, 1993; JUNOD et al., 1969).

2.5 NEUROPATIA DIABÉTICA AUTONÔMICA

As complicações degenerativas resultantes do DM, principalmente as que acometem o sistema nervoso, vêm se colocando como problema de saúde pública (FOSS, 1991; WATKINS et al., 2000) e em clínicas veterinárias, pois pioram a qualidade de vida e diminuem a sobrevida.

As lesões de fibras nervosas periféricas por alterações no metabolismo dos neurônios e na microcirculação dos nervos (CLEMENTS JR., 1979) resultam em sérias repercussões às áreas inervadas (ARAÚJO, 1996; DYCK; GIANNINI, 1996; MCLAREN, 1976; STEVENS; FELDMAN; GREENE, 1995).

Muitas classificações foram propostas para as neuropatias diabéticas (BARREIRA, 1991; FREITAS et al., 1992; HOROWITZ, 1993), porém aquela que se refere ao SNA é denominada neuropatia diabética autonômica (ARAÚJO, 1996).

Este tipo de neuropatia compromete vários sistemas orgânicos. Em nível gastrointestinal, leva a distúrbios motor, sensorial e na função reflexa desse sistema que causam considerável morbidade em portadores de DM (CLARKE; EWING; CAMPBELL, 1979; FELDMAN; SCHILLER, 1983; OLIVEIRA, 1991).

Podem surgir diarreia e constipação, lentidão do trânsito gastrointestinal (IBER et al., 1993; YANG; AREM; CHAN, 1984), estase e dilatação gástrica com diminuição ou aumento de contrações peristálticas, bem como quadros gástricos mais graves como a gastroparesia cujos sintomas, muitas vezes não diagnosticados, se caracterizam por anorexia, perda de peso, náuseas, vômitos (KATZ; SPIRO, 1966).

Conforme Duchon et al. (1980), a neuropatia diabética autonômica também provoca disfunção da vesícula biliar, distensão dos neurônios nos gânglios simpáticos e diminuição das fibras mielínicas do nervo vago e do tronco simpático.

A etiologia destes distúrbios, contudo, não é totalmente conhecida, porém constata-se que alterações degenerativas do plexo mioentérico podem estar presentes (DIANI et al., 1979).

Como ressaltado anteriormente, os neurônios motores finais para as células do trato gastrointestinal estão localizados principalmente nos gânglios entéricos, incluindo os do plexo mioentérico. Entre eles estão os motoneurônios que inervam a musculatura lisa do trato e dos vasos sangüíneos controlando a motricidade e o fluxo sangüíneo local. Embora recebam impulsos do sistema nervoso central pelas vias simpática e parassimpática, esses neurônios recebem impulsos principalmente

de outros neurônios entéricos. Esses circuitos são responsáveis pelo comportamento motor do trato gastrointestinal (COSTA; SIMON; BROOKS, 1994).

Alterações na atividade motora gastrointestinal podem afetar a motilidade do estômago levando a dilatação e retardo no esvaziamento gástrico, interferindo na coordenação entre estômago e duodeno e prejudicando, desse modo, o processo digestivo (CAMPBELL et al., 1977). Contudo, os referidos autores mencionam que a atonia gástrica observada no DM é similar àquela observada após vagotomia.

A acomodação gástrica ao alimento é mediada por fibras vagais aferentes e eferentes, sendo que neurotransmissores liberados pelos neurônios mioentéricos, entre eles o óxido nítrico, atuam como mediador final do relaxamento da musculatura do estômago (QUIGLEY, 1997).

Diani et al. (1979) sugerem que uma das principais causas da motilidade gástrica anormal, distensão e atonia gástrica, observadas em hamster diabéticos é resultante da diminuição da população de neurônios do plexo mioentérico, o mesmo ocorrendo para a estase gástrica manifestada em humanos diabéticos (CAMPBELL et al., 1977; FELDMAN; SCHILLER, 1983).

Em ratos portadores de diabetes crônico induzido por estreptozotocina, a diminuição no número de neurônios mioentéricos, bem como alterações morfométricas nessas células, foram relatadas no íleo (HERNANDES et al., 2000) e estômago (TAKAHASHI et al., 1997).

No colo de ratos tornados diabéticos aos 75 dias de idade, Romano, Miranda-Neto e Cardoso (1996) não constataram alteração no número de neurônios mioentéricos corados por azul de metileno no grupo de animais que permaneceram diabéticos por dois meses. Contudo, no grupo diabético de oito meses, descreveram diminuição de neurônios de tamanho médio e grande.

Büttow, Miranda-Neto e Bazotte (1997), utilizando o duodeno de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, verificaram redução no número de neurônios mioentéricos e aumento na incidência de neurônios grandes, tanto ao final de sete dias de diabetes como ao final de dois meses.

Aumento no perfil do ceco com redução na densidade neuronal do plexo mioentérico de ratos diabéticos aos 75 dias de idade e assim mantidos por dois meses foi observado por Zaroni et al. (1997). Já nos ratos que permaneceram diabéticos por oito meses as alterações não foram verificadas. Nesses estudos o diabetes foi induzido por estreptozotocina e os neurônios corados pelo método de Giemsa de acordo com Barbosa (1978).

Diabetes agudo por sete dias também foi induzido em ratos por Furlan et al. (1999) que relataram aumento no número de neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos no duodeno, sem alteração na densidade neuronal evidenciada pelo azul de metileno. Já, no colo proximal, Furlan, Molinari e Miranda-Neto (2002) não verificaram hipertrofia do órgão e nos neurônios mioentéricos corados por azul de metileno, e encontraram diminuição na quantidade de neurônios nadh-diaforase reativos. Porém, Lincoln et al. (1984) verificaram hipertrofia no colo de animais diabéticos.

Outras pesquisas evidenciaram alterações nos níveis de vários neurotransmissores nos neurônios mioentéricos (BALLMANN; CONLON, 1985; KARAKIDA, ITO; HOMMA, 1989; WRZOS et al., 1997), sugerindo que a neuropatia diabética autonômica não é seletiva (BELAI et al., 1991), apesar de não acometer simultaneamente todos os tipos de neurônios com a mesma intensidade e extensão (VISON et al., 1989). Baynes (1991) relatou, por exemplo, a redução de alguns

tipos de neurotransmissores em alguns neurônios, mas não em outros, atribuindo este diferencial ao estresse oxidativo.

No caso do estômago de ratos portadores de diabetes induzidos por estreptozotocina, as alterações gástricas observadas são decorrentes do comprometimento da inervação da musculatura lisa devido a perda de neurônios mioentéricos (FREGONESI et al., 2001). No estômago de ratos tornados diabéticos por estreptozotocina aos 75 dias de idade e mantidos nesta condição por dois meses, os referidos autores descreveram distensão pilórica e diminuição no número de neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos na região da curvatura menor do estômago. Já em ratos diabéticos aos 105 dias de idade e mantidos assim até os 210 dias, Fregonesi (2003) relatou predominância de neurônios nadph-diaforase reativos grandes no corpo do estômago quando comparado aos animais normoglicêmicos.

A etiologia da neuropatia diabética autonômica não é totalmente conhecida, e parece envolver alterações vasculares e metabólicas nos neurônios (WARD; THOMAS, 1975). Tanto em humanos, como em animais, as lesões envolvem o neurônio, seu axônio, as células de Schwann e os componentes vasculares dos nervos com conseqüentes alterações funcionais dos mesmos (SCHMEICHEL; SMELZER; LOW, 2003; SIMA; GREENE, 1995).

As lesões vasculares podem ser resultantes de modificações na microcirculação dos nervos. Stevens, Feldman e Greene (1995) relataram que a redução do fluxo sanguíneo nos nervos surge por defeitos no endotélio microvascular, por alterações nos agentes vasoativos – entre eles o óxido nítrico – que regulam o fluxo sanguíneo e alterações da própria inervação autônoma dos vasos sanguíneos nervosos (*vasa vasorum*).

Proliferação de fibras musculares lisas, obstrução capilar, aumento da viscosidade sangüínea e formação de trombos também são descritas (SCHMID-SCHÖNBEIN; VOLGER, 1976; LOWE et al., 1980).

As alterações de natureza metabólica incluem a ativação excessiva da via do sorbitol, depleção de mioinositol, alteração na Na^+/K^+ ATPase, desequilíbrio osmótico, distúrbios do sistema redox das células, anormalidades do metabolismo lipídico, formação de produtos glicosilados, lesões oxidativas e, também, alterações dos fatores de crescimento nervoso (STEVENS; FELDMAN; GREENE, 1995).

Como mencionado neste trabalho, o DM além de provocar alterações nos níveis de insulina altera também os níveis de glicose extra e intracelular. Em todos os tecidos que não necessitam da insulina para o transporte da glicose como o do sistema nervoso, cristalino, rins e vasos sangüíneos, a hiperglicemia gera um aumento da glicose dentro da célula e essa glicose em excesso é metabolizada para sorbitol (um poliol) pela enzima aldose redutase e para frutose pela enzima sorbitol desidrogenase (COTRAN et al., 1996; CUNNINGHAM, 1998; VISON et al., 1989).

O aumento da concentração de sorbitol leva a alterações da osmolaridade intracelular, aumentando-a, o que resulta em edema e lesão neuronal, com interrupção da condução de impulsos nervosos (COTRAN et al., 1996; HOSKING; BENNETT; HAMPTON, 1978; LINDSAY et al., 1998).

Conforme Sima e Greene (1995), a ativação da via dos polióis também causa dano vascular, resultando em hipoxia no nervo e, conseqüentemente, alterações funcionais do mesmo.

No DM, o estresse oxidativo é intensificado pela redução na concentração de enzimas que atuam no sistema antioxidante (PARTHIBAN et al., 1995; OBROSOVA et al., 2002), e também pela redução nos níveis de substâncias

antioxidantes como é o caso do ácido ascórbico (YOUNG; TORNEY; TRIMBLE, 1992).

Além disso, o aumento na oxidação da glicose, a glicação não enzimática das proteínas e degradação oxidativa das proteínas glicadas (MARITIM; SANDERS; WATKINS, 2003), bem como a ativação da via do poliol e as micro e macroangiopatias provocam aumento na formação de radicais livres intensificando, assim, o estresse oxidativo (BAYNES, 1991; BROWNLEE, 2001; DAVISON et al., 2002; FELDMAN, 2003; GIULIANO; CERIELLO; PAOLISSO, 1996; KSIAZEK; WISNIEWSKA, 2001).

As disfunções neurovasculares, a modificação na condução nervosa, as alterações metabólicas e os danos oxidativos presentes nas neuropatias diabéticas podem ser minimizados ou até revertidos pela administração de inibidores da aldose redutase ou por substâncias antioxidantes (CAMERON et al., 1993; OBROSOVA et al., 2002).

2.6 AÇÃO ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO ASCÓRBICO

Como descrito anteriormente, os danos neuronais provocados pelo DM, ou seja, as neuropatias, estão relacionados entre outros fatores, com as alterações na concentração do sorbitol e com o estresse oxidativo (DYCK et al., 1988; GREENE; LATTMER; SIMA, 1987).

O estresse oxidativo é verificado quando a formação de radicais livres aumenta, superando a capacidade antioxidante da célula, quadro este considerado um dos prováveis causadores de morte neuronal (BAYNES, 1991; KLEIN;

ACKERMAN, 2003). Além disso, os mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo não são ativados na mesma extensão na população neuronal. Neurônios e nervos com mecanismos de defesa diminuídos podem ser mais susceptíveis a alterações degenerativas.

Vários mecanismos podem originar os chamados compostos reativos ao oxigênio, inclusive alterações nas etapas de formação do sorbitol (BAYNES, 1991).

O radical livre é um átomo ou molécula que possui elétrons não-pareados em sua órbita mais externa. Eles são altamente reativos, sendo o hidrogênio ($H^\cdot$) o tipo mais simples de radical livre. Porém, outros radicais podem ser formados a partir do oxigênio pela via oxigenase, como por exemplo, o radical superóxido ($2O_2^\cdot$), o radical hidroxila ($HO^\cdot$), o radical peroxil ($ROO^\cdot$), o óxido nítrico ($NO^\cdot$) e o não-radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que estão envolvidos no processo de estresse oxidativo (KUYVENHOVEN; MEINDERS, 1999).

Embora o peróxido de hidrogênio não seja um radical livre, ele pode dentro da célula se ligar ao ferro ($Fe^\cdot$), reação de Fenton, formando radicais hidroxila que agem diretamente contra a membrana plasmática (KLEIN; ACKERMAN, 2003).

Os compostos reativos ao oxigênio podem destruir diversos componentes celulares entre eles os lipídeos, as proteínas e o DNA, causando, inclusive, morte celular (KANNAN; JAIN, 2000), podendo também promover o desenvolvimento precoce de alterações neurovasculares em diabetes experimental (COTTER et al., 1995).

Segundo Nabuurs-Franssen et al. (2002), as polineuropatias diabéticas estão associadas a anormalidades na microcirculação, que levam a diminuição do fluxo sanguíneo. Os danos no endotélio vascular podem ocorrer devido à formação de radicais hidroxila (CAMERON; COTTER, 1999).

Para amenizar tais alterações provocadas pelo sorbitol e pelo estresse oxidativo muitas pesquisas propõem terapias com agentes antioxidantes e inibidores da aldose redutase como o ácido ascórbico (CAMERON; COTTER; MAXFIELD, 1993; CUNNINGHAM, 1998; GROSSMANN et al., 2001; PENNATHUR et al., 2001; VINSON et al., 1989; YOUNG, TORNEY; TRIMBLE, 1992).

O plasma contém várias moléculas antioxidantes como o alfa-tocoferol, ácido ascórbico, ácido úrico, proteínas (transferina, ceruloplasmina) e enzimas (glutadiona peroxidase, catalase, superóxido dismutase). Entretanto, a contribuição relativa de cada antioxidante para a capacidade antioxidativa total de um fluido biológico ainda não é bem compreendida (COURDEROT-MASUYER et al., 2000).

Em muitas espécies animais, incluindo o rato, o metabolismo hepático da glicose inclui a síntese de ácido ascórbico, porém isso não acontece no homem (LEVINE, 1986).

Conforme May (1999), o ácido ascórbico pode atuar de duas maneiras na célula: no citosol atua como um antioxidante primário, combatendo os compostos reativos ao oxigênio; e na membrana plasmática atua de forma indireta reduzindo o radical alfa-tocoferil para alfa-tocoferol (vitamina E).

Lindsay et al. (1998) e McLennan et al. (1988) verificaram que as concentrações plasmáticas de ácido ascórbico eram reduzidas em ratos diabéticos, e as interações entre este ácido e mecanismos bioquímicos tais como a síntese de proteínas estruturais, estresse oxidativo, via dos polióis e glicosilação não-enzimática foram sugestivas de que o metabolismo do ácido ascórbico poderia ser importante na patogênese da microangiopatia diabética.

Segundo Cunningham (1998), tal fato poderia ser explicado, pois o transporte do ácido ascórbico bem como a sua reabsorção renal em condição de

hiperglicemia ficam diminuídos. Além disso, a hiperglicemia dificulta a captação do ácido ascórbico pela células (MOSTER; WEBER, 1984). Para Young, Torney e Trimble (1992), outro fator que poderia acarretar diminuição das concentrações de ácido ascórbico seria o próprio estresse oxidativo, ao qual o portador de DM está exposto.

Embora o ácido ascórbico e a glicose compartilhem o mecanismo de transporte nos leucócitos e fibroblastos (LYSY; ZIMMERMAN, 1992; MANN; NEWTON, 1975), a suplementação com ácido ascórbico produz pouco efeito sobre a concentração da glicose sangüínea (SOM et al., 1981; YOUNG, TORNEY; TRIMBLE, 1992), porém, reduz a fragilidade capilar e a concentração de sorbitol celular (CUNNINGHAM, 1998; CUNNINGHAM; MEARKLE; BROW, 1994; WILL; BYERS, 1996; YOUNG; TORNEY; TRIMBLE, 1992) sugerindo uma função neuroprotetora.

Em ratos diabéticos que receberam ácido ascórbico (1g/L água/dia) durante 16 semanas, Zanoni et al. (2002) relataram diminuição da glicemia, do consumo de água e de alimento e menor imunoreatividade nos neurônios VIPérgicos do plexo submucoso do íleo. Já, no plexo mioentérico do íleo de ratos diabéticos por 16 semana, Zanoni et al. (2003) comentaram que a suplementação com ácido ascórbico (1g/L água/dia) não preveniu a perda neuronal e o aumento do perfil do corpo celular dos neurônios reativos à miosina-V. No entanto, não alterou o número de neurônios nadph-diaforase reativos e contribuiu para a redução do perfil desses neurônios. O diabetes havia sido induzido pela estreptozotocina.

De acordo com Young, Torney e Trimble (1992), o ácido ascórbico pode ser incluído na água a ser fornecida para ratos na concentração de 1g/L, nível este

suficiente para não interferir prejudicialmente na síntese de colágeno e para garantir um consumo médio diário de 116 mg de ácido ascórbico suplementar.

Lysy e Zimmerman (1992) descreveram, também, que existe uma correlação negativa entre quantidade de hemoglobina glicosilada e os níveis de ácido ascórbico sangüíneo, sugerindo que o não controle da glicemia pode contribuir para a deficiência dos níveis de ácido ascórbico em pacientes diabéticos.

Portanto, se as neuropatias estão relacionadas com alterações metabólicas das células nervosas desencadeadas pela hiperativação da via dos polióis, pela glicosilação não-enzimática das proteínas estruturais, pelo comprometimento dos fatores de crescimento, pelas alterações vasculares e hipoxia, pelo estresse oxidativo e pelo comprometimento do metabolismo dos lipídeos, entre outros fatores, é de se esperar que substâncias que apresentam ação antioxidante possam contribuir para a prevenção ou controle dos processos degenerativos neuronais característicos das neuropatias.

Considerando os indícios de que o plexo mioentérico está comprometido na neuropatia autonômica e de que o ácido ascórbico poderia interferir nas concentrações de sorbitol e no estresse oxidativo, nos é de interesse verificar as prováveis alterações quantitativas e morfométricas dos neurônios deste plexo em condição de diabetes crônico induzido e os possíveis efeitos da suplementação com ácido ascórbico sobre esses neurônios.

Material e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o presente estudo foram utilizados os estômagos de 15 ratos adultos machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá.

Aos 80 dias de idade, os animais foram transferidos para o Biotério Setorial do laboratório de pesquisa onde permaneceram alojados em caixas de polipropileno com dimensões 40x33x17 cm (comprimento, largura e altura) providas de bebedouro e comedouro, e mantidos em condições ambientais controladas de temperatura (22° C) e de iluminação (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro).

Após um período de dez dias de adaptação ao novo ambiente, os ratos, então com 90 dias de idade, foram disponibilizados para o período experimental que teve duração de 120 dias. Para tanto, foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de cinco animais, segundo os tratamentos a que foram submetidos como segue:

Grupo C - animais normoglicêmicos;

Grupo D - animais diabéticos induzidos pela estreptozotocina;

Grupo DS - animais diabéticos induzidos pela estreptozotocina e suplementados com ácido ascórbico.

Para os três grupos foi fornecida ração comercial referência para ratos (nuvital®) e água suplementada ou não com ácido ascórbico *ad libitum*. A

composição química da ração analisada segundo silva (1981) encontra-se apresentada na tabela 1.

Tabela 1. composição química da ração comercial nuvital[®]1.

nutrientes	%
matéria seca	89,88
proteína bruta	22,23
fibra bruta	5,73
cálcio	0,92
fósforo	0,87
energia bruta (kcal/kg)	3976

¹Análises realizadas pelo laboratório de nutrição animal da Universidade Estadual de Maringá.

Os animais foram pesados aos 90 dias de idade e no final do experimento com 210 dias de idade.

O consumo de água e de ração, bem como o volume urinário, foram mensurados sete dias por mês. para a obtenção desses dados, os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas individuais onde permaneceram pelo período referido.

3.1 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS POR ESTREPTOZOOTOCINA

após jejum prévio de 14 horas durante o último dia de ambientação, cada animal dos grupos d e ds recebeu dose única de estreptozotocina (35 mg/kg de peso corporal, sigma[®], usa) dissolvida em tampão citrato 10 mm, ph 4,5, por meio de injeção endovenosa.

Os animais do grupo c receberam a mesma dosagem de veículo (tampão citrato 10 mm).

3.2 SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO ASCÓRBICO

A partir do primeiro dia do experimento, após a injeção de estreptozotocina, os animais do grupo ds passaram a receber diariamente água suplementada com ácido ascórbico (sigma[®], usa) na dosagem de 1g//dia (YOUNG et al., 1992).

Para evitar oxidação, os recipientes para fornecimento de água com ácido ascórbico foram pintados de preto.

Os animais dos grupos c e d continuaram a receber água sem suplementação.

3.3 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Ao final do experimento, com 210 dias de idade, os animais foram pesados, anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental (40mg/kg de peso corpóreo, sigma, usa) e laparotomizados por meio de uma incisão mediana da fúrcula até o púbis (Figura 1). de cada animal foi coletado sangue, por punção cardíaca, destinado às dosagens de glicose pelo método da glicose oxidase (BERGMEYER; BERNET, 1974), de hemoglobina glicada (KOENIG et al., 1976) e de ácido ascórbico (HENRY et al., 1980) para confirmar a condição de diabetes.

Figura 1 - Fotografia demonstrando órgãos abdominais do rato, entre eles o estômago, *in situ* (estrela). (barra = 10 mm)

3.4 EVIDENCIAÇÃO NEURONAL PELO MÉTODO HISTOQUÍMICO DA NADH-DIAFORASE

Os estômagos dos animais dos três grupos foram utilizados para evidenciar a população de neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos segundo Gabella (1969). o referido método utilizou solução de krebs e um meio de reação conforme detalhado a seguir.

A solução de Krebs (pH 7,3) consistiu de 1,3 g de NaHCO_3 (Sinth[®], BRA), 0,24 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sinth[®], BRA), 0,44 g de KCl (Sinth[®], BRA), 0,165 g de NaH_2PO_2 (Sinth[®], BRA), 7,05 g de NaCl (Sinth[®], BRA) e 0,27 g de CaCl_2 (Sinth[®], BRA) em 1 litro de água destilada.

Para o meio de reação (pH 7,3), foram utilizados 25 ml de solução estoque de nitro blue tetrazolium (NBT, solução estoque na concentração de 0,5 mg/ml, Sigma[®],

USA), 25 ml de tampão fosfato de sódio (Sinth[®], BRA), 0,1 m, 50 ml de água destilada e 0,05g de β -nadh (Sigma[®], USA).

Cada estômago coletado foi lavado com solução de Krebs e teve uma das extremidades ligada com fio de sutura para que quantidade suficiente de solução de Krebs fosse injetada na luz do estômago promovendo leve preenchimento. imediatamente após a ligadura da outra extremidade, o estômago foi submetido aos procedimentos para a evidenciação neuronal. para tanto o seguinte protocolo foi adotado:

- duas lavagens de 10 minutos em solução de Krebs;
- permeabilização em Krebs contendo Triton x-100 (Sigma[®], USA) a 0,3% por cinco minutos;
- duas lavagens de 10 minutos em solução de Krebs;
- incubação por 45 minutos em meio de reação;
- fixação em solução de formol a 10% em tampão fosfato 0,1 m, pH 7,3.

3.5 OBTENÇÃO DOS PREPARADOS DE MEMBRANA

Para a obtenção dos preparados de membrana, o estômago foi seccionado ao longo da extensão das curvaturas maior e menor (Figura 2). Em seguida, cada órgão foi decalcado em papel branco, para a determinação do perfil estomacal da face dorsal (mm²). Os desenhos obtidos foram escaneados juntamente com uma escala (papel milimetrado) e o perfil estomacal foi determinado por meio do programa de análise de imagem Imagepro Plus, versão 3.0.1.

Figura 2 - Fotografia da face externa do estômago. Região aglandular (1), região glandular (2), região da curvatura menor do estômago (a), região da curvatura maior do estômago (b), esôfago (seta) e duodeno (estrela). (barra=10 mm)

Posteriormente, foi separada a região aglandular da região glandular tendo como ponto de referência a estrutura denominada prega limitante, visualizada na superfície interna da parede do estômago (Figura 3).

Figura 3 - Fotografia da parede interna do estômago de rato (face dorsal). Região aglandular (1), região central (A) próximo à prega limitante (seta), região da curvatura maior do estômago (B). Região glandular (2), região da curvatura menor do estômago (C) e região da curvatura maior do estômago (D).

Cada região isolada do estômago foi microdessecada em placa de vidro, com auxílio de micro pinça e micro tesoura (Petrovich[®], BRA), ao estereomicroscópio com transiluminação (Olympus[®], JAP) para a retirada da túnica mucosa (região glandular) e da camada queratinizada (região aglandular) e da tela submucosa (ambas as regiões) e preservação das túnicas muscular e serosa (Figura 4).

Cada preparado de membrana assim obtido foi desidratado em série crescente de álcoois (90%, 95% e absoluto) e diafanizados por três imersões consecutivas em xilol (Synth[®], BRA).

Figura 4 - Esquema da parede do estômago evidenciando suas camadas: a túnica mucosa, a tela submucosa, a túnica muscular com as camadas circular e longitudinal, o plexo mioentérico e o plexo submucoso.

Cada preparado de membrana foi então colocado entre lâmina e lamínula de vidro e montado com resina permount (Synth[®], BRA). Para assegurar a correta aderência do material e impedir a formação de bolhas, as lâminas foram mantidas sob peso por no mínimo 48 horas.

De cada estômago foram obtidos, portanto, um preparado de membrana da região glandular e outro da região aglandular de boa qualidade para visualização, quantificação e mensuração do perfil do corpo celular dos neurônios nadh-diaforase reativos do plexo mioentérico.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS NADH-DIAFORASE REATIVOS

A quantificação dos neurônios foi feita por amostragem nas regiões aglandular (A e B) e glandular (A e B) dos preparados de membrana do estômago (Figura 3), realizada em microscópio Olympus bx40, com objetiva de 40x.

Escolheu-se ao acaso 80 campos por preparado de membrana, sendo 40 da região A e 40 da região B. em cada campo foram contados os corpos celulares dos neurônios nadh-diaforase reativos, considerando os meios neurônios de um campo e desprezando os do campo seguinte.

A área do campo do microscópio visualizada com objetiva de 40x foi mensurada com uma régua micrometrada (Zeiss[®], GER) e a área equivalente a 40 campos foi 8,96 mm². Foi estabelecido o número de neurônios presentes em 8,96 mm² de cada área por região analisada do estômago.

3.7 MENSURAÇÃO DO PERFIL DO CORPO CELULAR DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS NADH-DIAFORASE REATIVOS

Nos preparados de membrana da porção aglandular foram consideradas a região central do estômago, próximo à prega limitante (aglandular A) e a região da curvatura maior do estômago (aglandular B) (Figura 3).

Nos preparados de membrana da porção glandular foram consideradas as regiões da curvatura menor do estômago (aglandular A) e curvatura maior do estômago (aglandular B) (Figura. 3).

As imagens dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos evidenciadas nos preparados de membrana foram capturadas por câmara de alta resolução acoplada ao microscópio Flympus BX40, e transmitidas para microcomputador e gravadas em “compact disc” (Figura 5).

Por meio do programa computadorizado de análise de imagens ImagePro Plus, versão 3.0.1 (Figura 6), foi mensurado o perfil do corpo celular em μm^2 (PCC) de 100 neurônios obtidos ao acaso, por preparado de membrana, sendo 50 da região A e 50 da região B tanto da porção aglandular quanto da porção glandular, perfazendo o total de 1000 neurônios em cada grupo estudado.

Figura 5 - Esquema da captura de imagem no programa imagepro plus, versão 3.0.1.

Figura 6 - Mensuração do perfil do corpo celular em μm^2 (PCC) dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos do estômago de rato, pelo programa ImagePro Plus 3.0.1.

Após a obtenção da média e do desvio padrão das mensurações os neurônios foram agrupados em intervalos de $100\ \mu\text{m}^2$. Este procedimento foi realizado para os neurônios mensurados em cada região separadamente.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa estatístico StatSoft (2003).

Os dados referentes às dosagens de glicemia, hemoglobina glicada, ao peso (inicial e final), ao consumo de água e de ração, ao volume urinário, a ácido ascórbico, bem como ao perfil estomacal, foram analisados por meio do teste Tukey.

Os dados referentes à quantificação dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos foram analisados por meio do teste Kruskal-Wallis.

Os dados obtidos na morfometria foram analisados pelo teste Shapiro-Wilks para determinar a normalidade e pelo teste Tukey para comparação das médias.

O alfa utilizado foi sempre 5%, desta forma o nível de significância para todas as análises foi $P < 0,05$ e os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão.

3.9 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

As fotomicrografias do material selecionado para documentação dos resultados foram realizadas utilizando fotomicroscópio BX50 (Olympys[®], JAP) e equipamento fotográfico PM10AK.

Resultados

4 RESULTADOS

Os dados referentes às dosagens sangüíneas de glicose e hemoglobina glicada, ao peso dos animais, aos consumos de água e ração, e volume urinário apresentados na tabela 2 demonstraram o estabelecimento da síndrome diabética induzida pela estreptozotocina.

Tabela 2 - Média¹ das dosagens sangüíneas de glicose (mg.dl⁻¹), de hemoglobina glicada (GHb) (%) e de ácido ascórbico (µg.ml⁻¹), do peso corporal inicial e final (g), do consumo de água (ml) e de alimento (g) e volume urinário (ml) dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS)

Parâmetros	C	D	DS
Glicose (mg.dl⁻¹)	129 ±3,92 ^a	466,4±24,59 ^b	493±10,02 ^{bc}
GHb (%)	4,1±0,3 ^a	8,1±0,2 ^b	7,9±0,5 ^{bc}
Peso inicial (g)	339,4±12,36 ^a	329,6±8,48 ^a	339±12,45 ^a
Peso final (g)	456,2±14,57 ^a	318,6 ± 8,22 ^b	304,5±20,29 ^{bc}
Água (ml)	64,86±5,92 ^a	158,6±8,38 ^b	133,6±5,41 ^c
Ração (g)	30,7±1,06 ^a	49,84±1,68 ^b	43,4±3,78 ^c
Volume urinário (ml)	3,3±0,4 ^a	59,3±7,1 ^b	72,4±4,0 ^{bc}
Ácido ascórbico (µg.ml⁻¹)	24,58±5,53 ^a	12,6±1,85 ^b	33,05±2,49 ^c

¹Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

Conforme apresentado na tabela 2, as dosagens sangüíneas de glicose e de hemoglobina glicada foram maiores ($P<0,05$) nos grupos D e DS e a dosagem de ácido ascórbico menor ($P<0,05$) no grupo D.

O ganho de peso foi menor ($P<0,05$) e o de ração foi maior ($P<0,05$) para os animais dos grupos D e DS. O consumo de água diferiu ($P<0,05$) entre os três grupos sendo maior para o grupo D e menor para o grupo C.

O volume médio de urina eliminada foi maior ($P<0,05$) nos grupos D e DS.

Com relação a dimensão do perfil da face posterior do estômago não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos estudados (Tabela 3).

Tabela 3 - Média do perfil (mm^2) da face posterior do estômago obtida dos animais dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS).

Grupos	Perfil (mm^2)¹
C	1226 $\pm$ 77,62 ^a
D	1167 $\pm$ 80,32 ^a
DS	1403 $\pm$ 72,93 ^a

¹Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Em todos os grupos, ao microscópio de luz, os neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos foram evidenciados reunidos em gânglios interligados à semelhança de uma rede (Figura 7).

Os corpos celulares dos neurônios contidos nos gânglios apresentaram tamanhos variados (Figuras 8, 9, e 10).

Figura 7 - Fotomicrografias de preparados de membrana do estômago de rato do grupo controle evidenciando gânglios com neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos da região aglandular A (A), aglandular B (B), glandular A (C) e glandular B (D). (objetiva 10x, barra = 150 μ m)

Figura 8 - Fotomicrografia de preparado de membrana do estômago de rato do grupo controle evidenciando gânglio com os neurônios mioentéricos nadh-d reativos com perfis do corpo celular variados. (objetiva 40x, barra = 50μm)

Figura 9 - Fotomicrografia de preparado de membrana do estômago de rato do grupo diabético evidenciando gânglio contendo neurônios mioentéricos nadh-d reativos com perfil do corpo celular de tamanhos variados. (objetiva 40x, barra = 50μm)

Figura 10 - Fotomicrografia de preparado de membrana do estômago de rato do grupo diabético suplementado evidenciando gânglio com neurônios mioentéricos nadh-d reativos com perfil do corpo celular de tamanhos variados. (objetiva 40x, barra = 50μm)

4.1 ANÁLISE QUANTITATIVA

Os resultados da quantificação dos corpos celulares dos neurônios nadh-diaforase reativos presentes em 8,96 mm² (40 campos) das regiões aglandular (A e B) e glandular (A e B) do estômago dos animais dos grupos C, D e DS encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 - Número médio de neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos das regiões aglandular (A e B) e glandular (A e B) do estômago dos animais dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS)

Regiões	Média ¹ de neurônios/grupo (n = 5)		
	C	D	DS
Aglandular A	515 ± 37,32 ^a	370,6 ± 44,55 ^a	495,4 ± 38,86 ^a
Aglandular B	204,2 ± 42,42 ^a	204 ± 53,12 ^a	176 ± 16,49 ^a
Glandular A	742,8 ± 55,27 ^a	578 ± 81,7 ^{ab}	972,4 ± 102,1 ^{ac}
Glandular B	401,2 ± 7,23 ^a	329,4 ± 37,02 ^{ab}	546,2 ± 62,17 ^{ac}

¹Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

Não houve diferenças significativas (P>0,05) entre os grupos na quantidade de neurônios presentes na região aglandular A e aglandular B (Tabela 4).

Nas regiões glandular A e glandular B ocorreu incidência maior (P<0,05) de neurônios no grupo DS quando comparada com o grupo D (Tabela 4).

4.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

A análise dos dados obtidas na mensuração dos neurônios pelo teste Shapiro-Wilks demonstrou que os valores do PCC dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos apresentaram distribuição normal.

O PCC variou de 18,05 a 488,05 μm^2 no grupo C, de 22,57 a 1469,31 μm^2 no grupo D e de 42,53 a 1034,41 μm^2 no grupo DS.

Em todas as regiões analisadas do estômago, a média do PCC dos neurônios mioentéricos foi maior ($P < 0,05$) para os grupos D e DS do que para o grupo C (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias do perfil (μm^2) do corpo celular (PCC) dos neurônios nadh-diaforase reativos das regiões aglandular (A e B) e glandular (A e B) do estômago dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS)

Regiões	Média ¹ do PCC/grupo		
	C	D	DS
Aglandular A	$123,7 \pm 19,11^a$	$213,6 \pm 18,27^b$	$199,6 \pm 7,7^{bc}$
Aglandular B	$121,2 \pm 12,82^a$	$207,1 \pm 17,87^b$	$218 \pm 22,77^{bc}$
Glandular A	$123 \pm 7,45^a$	$255,6 \pm 37,87^b$	$212,5 \pm 9,38^{bc}$
Glandular B	$137,8 \pm 15,05^a$	$320,9 \pm 31,57^b$	$252,8 \pm 6,47^{bc}$

¹Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para os grupos C, D e DS, as distribuições de frequência de neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos presentes na região aglandular (A e B) e glandular (A e B) do estômago segundo os valores do PCC em intervalos de $100 \mu\text{m}^2$ estão apresentadas nas tabelas 6 e 7 e nas figuras 11 e 12.

Na região aglandular do grupo C predominaram neurônios com valores do PCC inferiores a $200 \mu\text{m}^2$ na região A (84%) e na região B (86,4%) (Tabela 6 e Figura 11).

No grupo D ocorreu freqüência maior de neurônios com valores de PCC inferior e superior a $200 \mu\text{m}^2$ na região aglandular A (51,6%) e B (50,4%), respectivamente (Tabela 6 e Figura 11).

No grupo DS, neurônios com PCC inferior a $200 \mu\text{m}^2$ foram os mais freqüentes na região aglandular A (51,34%) e B (54,67%) (Tabela 6 e Figura 11).

Tabela 6 - Freqüência relativa (%) dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos da região aglandular A e B do estômago de ratos dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS) segundo o perfil do corpo celular, em intervalos de $100 \mu\text{m}^2$

PCC (μm^2)	Freqüência de neurônios/grupo					
	Aglandular A (AA)			Aglandular B (AB)		
	C	D	DS	C	D	DS
0 + 100	44.8	10.4	8.67	56.8	22.4	4.67
100 + 200	39.2	41.2	42.67	29.6	27.2	50
200 + 300	12.4	32	38	11.2	33.2	34.67
300 + 400	2.4	12.4	7.33	2	9.2	9.33
400 + 500	1.2	2.4	1.33	0.4	6.4	1.33
500 + 600		0.8	0.67		1.2	
> 600		0.8	1.33		0.4	
TOTAL	100	100	100	100	100	100

Figura 11 - Gráfico demonstrando a frequência dos neurônios mioentéricos nadh-d reativos da região aglandular A (AA) e B (AB) do estômago de ratos dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS) segundo os valores do perfil do corpo celular (PCC) em intervalos de 100 μm^2

Na região glandular do estômago dos ratos do grupo C observamos incidência maior de neurônios com PCC inferior a 200 μm^2 nas porções A (85,2%) e B (82%) (Tabela 7 e Figura 12).

No grupo D ocorreu maior frequência de neurônios nadh-diaforase reativos com PCC superior a 200 μm^2 na região glandular A (56%) e B (74,4%) (Tabela 7 e Figura 12).

No grupo DS foi maior o número de neurônios com PCC inferior a 200 μm^2 na região glandular A (55%) e B (74,5%) (Tabela 7 e Figura 12).

Tabela 7 - Frequência (%) dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos da região glandular A e B do estômago de ratos dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS) segundo o perfil do corpo celular (PCC), em intervalos de $100 \mu\text{m}^2$

PCC (μm^2)	Frequência de neurônios/grupo					
	Glandular A (GA)			Glandular B (GB)		
	C	D	DS	C	D	DS
0 + 100	46.4	4.4	4	40.4	3.6	4.5
100 + 200	38.8	39.6	51	41.6	22	70
200 + 300	10.4	31.6	30	11.6	30.4	14.5
300 + 400	4	9.6	10.5	4.4	18.4	7
400 + 500	0.4	7.6	2	2	11.2	2.5
500 + 600		4	1.5		8	1.5
> 600		3.2	1		6.4	
TOTAL	100	100	100	100	100	100

Figura 12 - Gráfico demonstrando a frequência dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos da região glandular A (GA) e B (GB) do estômago de ratos dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético suplementado (DS) segundo os valores do perfil do corpo celular (PCC) em intervalos de $100 \mu\text{m}^2$

Discussão

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos em nosso estudo permitiram comprovar que a administração de estreptozotocina (35 mg/Kg de peso corporal) foi suficiente para induzir o DM nos ratos dos grupos D e DS, uma vez que foram observados sinais típicos do estado diabético relatados por outros autores com a utilização de dosagem semelhante de estreptozotocina como discutido a seguir.

Considerando que o DM é caracterizado por hiperglicemia (COTRAN et al., 1996), as dosagens sangüíneas de glicose e de hemoglobina glicada são necessárias para certificar a instalação do DM pela ação da estreptozotocina.

Em nossos resultados verificou-se que a dosagem sangüínea de glicose foi maior ($P < 0,05$) nos animais dos grupos D ($466,4 \pm 24,59 \text{ mg.dl}^{-1}$) e DS ($493 \pm 10,02 \text{ mg.dl}^{-1}$) do que nos do grupo C ($129 \pm 3,92 \text{ mg.dl}^{-1}$), confirmando, portanto, a presença de hiperglicemia quando da eutanásia dos animais.

A hiperglicemia é resultante da diminuição dos níveis de insulina provocada por danos e necrose das células beta pancreáticas quando administrada a estreptozotocina em animais em jejum. A estreptozotocina utiliza o mesmo transportador que a glicose, o GLUT-2 e, quando os animais encontram-se em jejum, os níveis de glicose ficam diminuídos, facilitando a entrada da estreptozotocina nas células beta do pâncreas (SCHNEDL et al., 1994). Uma vez no interior dessas células, essa substância destrói o DNA e reduz o $\text{NAD}^{\pm}$, provocando morte celular conforme verificado em camundongos por Cardinal, Allan e Cameron (1998), em ratos por Peschke et al. (2000), Yang e Wright Jr (2002) e Szkudelski (2001), e em cultura de células beta pancreáticas por Saini et al (1996).

Ar'Rajab e Ahrén (1993) estudaram o efeito de diferentes dosagens de estreptozotocina na indução do diabetes e constataram que, independentemente da dose utilizada, os níveis de glicose apresentavam-se elevados. Observaram também que a hiperglicemia foi transitória nos animais que receberam doses de estreptozotocina entre 30 e 40 mg/Kg de peso corporal. Porém, estes resultados não foram evidenciados em nossos estudos. Os animais dos grupos D e DS permaneceram diabéticos até o final do experimento, que teve duração de 120 dias, com dosagem de 35 mg/Kg de peso corporal. A mesma dosagem utilizada por nós foi empregada com sucesso por outros pesquisadores para indução de diabetes em ratos (HERNANDES et al., 2000; ROMANO; MIRANDA NETO; CARDOSO, 1996; SOUZA; FURLAN, 2001).

Com administração de estreptozotocina na dosagem de 60 mg/kg de peso, Tay e Wong (1994) verificaram glicemia acima de 400 mg/dl em ratos. Já Lincoln et al. (1984), com dose ainda maior de estreptozotocina (65 mg/kg de peso corporal), descreveram que os animais tornaram-se severamente hiperglicêmicos ($483 \pm 18,4$ mg/dl) quando comparados ao controle ($125 \pm 8,9$ mg/dl). Estes dados revelam que doses iguais ou superiores a 35 mg/kg de peso corporal administradas para ratos em jejum possuem ação diabetogênica não transitória. Em nosso estudo, portanto, o aumento de 72,3% na concentração sangüínea de glicose no grupo D e de 73,8% no grupo DS em relação ao grupo C comprovou a instalação do diabetes. Vale ressaltar que a dose de 35 mg/kg de peso corpóreo é a dose única mínima capaz de acarretar diabetes no rato (JUNOD et al., 1969).

A dosagem de glicemia, contudo, não pode ser considerada sozinha como indicativo de diabetes não transitório, pois expressa a glicemia de um determinado momento (COSTA; BETTI, 1998). Portanto, para nos certificarmos da hiperglicemia

dosamos também a hemoglobina glicada que, segundo os referidos autores, expressa a concentração sangüínea de glicose das últimas seis a oito semanas.

As concentrações de hemoglobina glicada nos animais do grupo D ($8,1 \pm 0,2\%$) e do grupo DS ($7,8 \pm 0,5\%$) foram significativamente maiores ($P < 0,05$) do que a encontrada para o grupo C ($4,1 \pm 0,3\%$). Ocorreu aumento de 49,4% e de 47,4% nas concentrações deste parâmetro nos grupos D e DS, respectivamente, em relação ao controle. Esses resultados estão em conformidade com os relatos de Lindsay et al. (1998) que também verificaram maior concentração de hemoglobina glicada em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina ($11,9 \pm 1,4\%$) do que em ratos normoglicêmicos ($2,8 \pm 0,2\%$).

Não houve diferença ($P > 0,05$) na concentração de hemoglobina glicada entre os grupos D e DS o que nos permite afirmar que os animais de ambos os grupos foram submetidos a mesma severidade de diabetes.

Além da hiperglicemia, no estado diabético podem ser observadas perda de peso, polidipsia, polifagia e poliúria (BEVILACQUA et al., 1998; CARLTON; MCGAVIN, 1998; COTRAN et al., 1996).

No início de nosso experimento, não havia diferença significativa ($P > 0,05$) no peso corpóreo dos animais entre os grupos C, D e DS. Contudo, ao final do experimento constatamos que, ao longo dos 120 dias, ocorreu perda de peso nos animais dos grupos D ($318 \pm 8,22$ g) e DS ($304,5 \pm 20,29$ g) quando comparados com o grupo C ($456,2 \pm 14,57$ g). Enquanto os animais do grupo controle ganharam, em média, 25,6% de peso corpóreo, os animais dos grupos D e DS perderam 3,33% e 10,2% de peso, respectivamente, em relação ao início do experimento.

Menor ganho de peso corporal por animais diabéticos tem sido descrito na literatura. Em ratos, Thulesen et al. (1997) relataram que, comparados a animais

normoglicêmicos, os animais diabéticos perderam 16% de peso. Lindsay et al. (1998) verificaram perda de 25,6% no peso de ratos diabéticos e na pesquisa de Furlan, Molinari e Miranda-Neto (2002), os animais diabéticos chegaram a perder 19,6% de peso corpóreo.

Em relação a polidipsia, a polifagia e a poliúria também características da síndrome diabética, achamos de extrema importância apresentar e ressaltar tais resultados, pois esses sintomas, associados ao menor ganho de peso, na maioria das vezes podem alertar os proprietários de animais quanto a alterações nos hábitos de seus animais e o risco de diabetes, uma vez que as dosagens de glicose e de hemoglobina glicada não são rotineiras, sendo realizadas apenas quando os animais encontram-se sob os cuidados de médicos veterinários para o diagnóstico de DM ou de outras doenças.

No DM, devido a glicosúria, há perda de água e de eletrólitos, levando a diminuição extra e intracelular desses componentes. De acordo com Cotran et al. (1996), nessas condições os centros da sede localizados no encéfalo deflagram mecanismos neurais que levam a polidipsia, ou seja, maior vontade de ingestão de água.

A quantidade média de água ingerida pelos animais de nosso estudo foi maior ($P < 0,05$) nos grupos D ($158 \pm 8,38$ ml) e DS ($133,6 \pm 5,41$ ml) quando comparada com o grupo C ($64,86 \pm 92$ ml), comprovando o estabelecimento da polidipsia diabética. Portanto, os animais do grupo D e DS consumiram 58,9% e 51,5% a mais de água do que os do grupo C. Quando comparados os grupos D e DS, o consumo foi menor ($P < 0,05$) para o grupo DS.

Nossos resultados estão de acordo com os relatos de Souza e Furlan (2001) que também evidenciaram aumento significativo de 47,7% na quantidade de

água ingerida pelos animais hiperglicêmicos quando comparados com os animais normoglicêmicos e de Furlan, Molinari e Miranda-Neto (2002) que relataram aumento de 55,9% no consumo de água entre os ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina.

A polifagia também é uma característica do DM que pode ser facilmente observada pelos proprietários de animais.

Em nosso estudo constatamos aumento significativo ($P<0,05$) de consumo de alimento para os animais do grupo D ($49,84\pm6,8$ g) e DS ($43,4\pm3,78$ g) quando comparados com o consumo do grupo C ($30,7\pm1,06$ g). Os ratos diabéticos não suplementados ingeriram 38,4% mais ração do que os animais do grupo C, enquanto que no grupo DS o consumo foi 29,2% maior e 12,9% menor do que no grupo C e D, respectivamente.

A polifagia pode ocorrer como uma resposta à falta de glicose nas células dependentes de insulina para o transporte de glicose, já que no DM ocorre diminuição da insulina circulante, dificultando, assim, a captação da glicose pelas células (CARLTON; MCGAVIN, 1998). Então, apesar da abundância de nutrientes disponíveis na corrente sangüínea, as células se encontram em um estado de "jejum" pela falta de glicose. Para compensar, o animal ingere mais alimento. Contudo, o acréscimo de consumo de alimento não é revertido em ganho de peso para o animal, pois verifica-se diminuição na conversão alimentar (FURLAN; MOLINARI; MIRANDA-NETO, 2002).

Furlan, Molinari e Miranda-Neto (2002) também verificaram um consumo de ração 19,6% maior ($P<0,05$) entre ratos hiperglicêmicos e normoglicêmicos sustentando nossos resultados.

O menor consumo de ração verificado em nosso estudo para os ratos do grupo DS quando comparado ao grupo D poderia ser explicado pelo fato do ácido ascórbico ser também um componente calórico, sendo assim, ao ser acrescentado entre os componentes da dieta do animal poderia ter levado ao menor consumo de ração pelos animais do grupo DS. Além disso, o ácido ascórbico compete com a glicose para a captação celular. Como no grupo DS o nível de ácido ascórbico foi equiparado ao nível normal, é possível que sua entrada na célula tenha sido aumentada refletindo em menor consumo. Contudo esta possibilidade deverá ser futuramente investigada.

Elevado nível de glicemia acarreta, entre outros fatores, a poliúria, ou seja, aumento do débito urinário com a finalidade de eliminar o excesso de glicose circulante (BEVILCQUA et al., 1998).

Em nosso estudo, como era esperado, foi possível observar aumento significativo ($P < 0,05$) de 94,4% no volume de urina eliminado pelos animais dos grupos D e de 72,4% pelos do grupo DS quando comparado com o grupo C, explicitando a poliúria característica do DM.

Esses resultados estão de acordo com os estudos realizados por Junod et al. (1967) que encontraram valores maiores para o débito urinário em animais diabéticos. Segundo os autores, antes da indução do diabetes o volume urinário dos ratos variava entre 1 a 5 ml/dia e, após a indução pela estreptozotocina, o volume urinário variou entre 105 e 185 ml/dia. Aumento de 53,4% no volume urinário também foi relatado por Souza e Furlan (2001) em ratos diabéticos agudos quando comparados aos ratos normais.

A longo prazo, sabe-se que os distúrbios metabólicos verificados no DM são responsáveis por complicações crônico-degenerativas que levam ao comprometimento vascular e nervoso (COTRAN et al., 1996).

O tecido nervoso não necessita da insulina para a captação de glicose, portanto, no portador de DM a concentração intracelular de glicose encontra-se alterada (aumentada) no tecido nervoso (CUNNINGHAM, 1998; VISON et al., 1989).

As alterações provocadas pelo DM no sistema nervoso entérico estão incluídas na neuropatia diabética autonômica (ARAÚJO, 1996). Contudo, a etiologia deste tipo de neuropatia não está totalmente esclarecida. Inúmeros fatores são propostos, incluindo alterações microvasculares e metabólicas que acabam tendo efeito deletério sobre sistema nervoso (CLEMENTS JR., 1979; LINDSAY et al., 1998; STEVENS; FELDMAN; GREENE, 1995).

Recentemente, Feldman (2003) resumiu bem essas questões. Segundo o referido autor, o acúmulo de superóxidos, aumento da atividade da via do poliol, acúmulo de produtos AGEs (advanced glycation end), alteração da atividade da proteína quinase-C e do fluxo da via das hexosaminas desencadeiam uma progressiva disfunção celular no portador de diabetes. Cada via torna-se alterada em consequência direta ou indireta da superprodução de superóxidos pela cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias, tudo mediado pela hiperglicemia. Desta forma, a inibição da produção de superóxidos ou a euglicemia pode restaurar os desequilíbrios metabólicos e vasculares e bloquear o início e a progressão de complicações no organismo.

A intensificação do estresse oxidativo no DM tem sido relatada (BAYNES, 1991; DAVISON et al., 2002; KSIAZEK; WISNIWSKA, 2001).

A utilização de substâncias antioxidantes e de substâncias inibidoras da enzima aldose-redutase – imprescindível para a via do poliol – têm sido amplamente investigada com o intuito de encontrar formas de minimizar ou evitar os efeitos deletérios resultantes do DM. Contudo, poucas pesquisas têm evidenciado os efeitos de substâncias antioxidantes no plexo mioentérico do estômago em DM.

Pelo motivo então aventado, escolhemos o ácido ascórbico que tem ação antioxidante (LEVINE, 1986) e também inibidora da aldose-redutase (CUNNINGHAM; MEARKLE; BROW, 1994; WILL; BYERS, 1996) bem estabelecidas para averiguar seus efeitos no referido plexo sob condições de diabetes.

A dosagem sangüínea de ácido ascórbico foi maior ($P < 0,05$) nos grupos C ($24,58 \pm 5,53 \mu\text{g.ml}^{-1}$) e DS ($33,05 \pm 2,49 \mu\text{g.ml}^{-1}$) quando comparadas com o grupo D ($12,6 \pm 1,85 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Menor concentração de ácido ascórbico em diabéticos é também relatada em ratos (MCLENNAN et al., 1998; YOUNG; TORNEY; TRIBLE, 1992) e em humanos (LYSY; ZIMMERMAN, 1982).

A hiperglicemia dificulta a captação do ácido ascórbico pelos tecidos (MOSER; WEBER, 1984), além disso, também inibe a reabsorção deste ácido nos rins, aumentando sua excreção na urina (CUNNINGHAM, 1998). A depleção de ácido ascórbico em portadores de DM poderia ser explicada, também, pelo fato dele possuir o mecanismo de transporte nos leucócitos semelhante ao da glicose (LYSY; ZIMMERMAN, 1992; MANN; NEWTON, 1975). Porém, não há correlação entre as dosagens sangüíneas de glicose e de ácido ascórbico (SOM et al., 1981). Já, entre as concentrações sangüíneas de hemoglobina glicada e de ácido ascórbico, Lysy e Zimmerman (1992) verificaram correlação negativa e unidirecional. Assim, quando a glicose sangüínea aumenta ocorre diminuição na quantidade de ácido ascórbico no sangue, porém, o inverso não é verdadeiro, o aumento de ácido ascórbico

sangüíneo não é acompanhado por diminuição da glicemia (YOUNG; TORNEY; TRIMBLE, 1992).

A média diária de ácido ascórbico ingerido pelos animais do grupo DS foi 136,6 mg/133,6 ml de água, representando uma quantidade cerca de três vezes e meio superior a quantidade de ácido ascórbico sintetizada diariamente por ratos (YOUNG; TORNEY; TRIMBLE, 1992). A suplementação para os animais do grupo DS elevou a concentração de ácido ascórbico em 61,8% em relação ao grupo D.

Em nosso trabalho, contudo, a suplementação com ácido ascórbico não reduziu a glicemia e nem a hemoglobina glicada nos animais do grupo DS para os níveis normais comprovando que a administração de ácido ascórbico não influenciou esses parâmetros.

Na neuropatia autonômica é relatada gastroparesia com alteração da motilidade gástrica que pode levar a estase, atonia e dilatação gástrica com aumento ou diminuição no peristaltismo (CAMPBELL, 1977; FELDMAN, 1983; KATZ; SPIRO, 1966). Em hamster chineses espontaneamente diabéticos observa-se distensão e atonia do estômago e do intestino quando comparados a ratos não diabéticos (DIANI et al., 1979). Para verificarmos possíveis alterações do tônus muscular, mensuramos o perfil do estômago dos animais dos três grupos. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) no perfil do estômago dos ratos entre os grupos C ($1226 \pm 77,62 \text{ mm}^2$), D ($1167 \pm 80,32 \text{ mm}^2$) e DS ($1403 \pm 72,93 \text{ mm}^2$), indicando que o estômago não alterou de tamanho durante o período experimental, apesar da perda de peso nos animais do grupos D e DS.

Alterações no tamanho e no peso de segmentos gastrointestinais em animais diabéticos têm sido relatadas. Conforme observado por nós no estômago de

ratos diabéticos, Zanoni et al. (1997) verificaram que o tamanho do perfil do ceco em ratos mantidos diabéticos por oito meses não foi alterado quando comparado aos animais normoglicêmicos. Contudo, em ratos mantidos diabéticos por dois meses os referidos autores constataram aumento do ceco. Diminuição significativa na circunferência e área do colo proximal de ratos diabéticos agudo e não significativa no comprimento e peso daquele segmento foram encontradas por Furlan, Molinari e Miranda-Neto (2002) em animais diabéticos. Hipertrofia de colo é relatada também por Belai et al. (1988), Belai et al. (1991), Lincoln et al, (1984) e por Karakida, Ito e Homma (1989) em animais diabéticos.

As diferenças entre o tamanho dos cecos dos ratos mantidos diabéticos por dois e oito meses foram atribuídas por Zanoni et al. (1997) ao restabelecimento da função reguladora sobre a motilidade intestinal nos animais que permaneceram diabéticos por mais tempo. Segundo os autores, como era esperado, os neurônios que sofreram os efeitos tóxicos da estreptozotocina, como esperado foram se regenerando ao longo do tempo e recuperando suas funções. Essas suposições também poderiam justificar nossos resultados quanto ao tamanho inalterado do estômago entre os grupos. Ressalta-se que Fregonesi et al. (2001) relataram distensão pilórica no estômago de ratos mantidos diabéticos por dois meses. Os animais de nosso estudo permaneceram diabéticos por quatro meses o que possibilitaria uma recuperação funcional, mesmo apesar do diabetes.

As diferenças relacionadas ao tamanho dos segmentos gastrointestinais encontradas na literatura também podem ser justificadas pelo fato do DM induzido por estreptozotocina não atingir simultaneamente todos os órgãos do trato gastrointestinal. Segundo Belai et al. (1991), o colo distal, por exemplo, é o último segmento a ser afetado pelo diabetes.

Contudo, os resultados obtidos são relevantes, pois permitem estabelecer que o perfil do estômago dos animais estudados é semelhante entre os grupos. Desta forma, quaisquer alterações na quantificação dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos estarão relacionadas diretamente aos efeitos das condições experimentais sobre o plexo mioentérico e não ao aumento ou redução da área estudada, o que poderia acarretar erros em nossa contagem uma vez que os neurônios poderiam se encontrar mais dispersos em um órgão distendido do que em um órgão retraído e, por trabalharmos com contagem de partículas por superfície (área), os dados referentes ao do tamanho do órgão em estudo são extremamente relevantes.

De acordo com Irwin (1931), os neurônios mioentéricos na túnica muscular do trato gastrointestinal encontram-se agrupados em gânglios que se unem por meio das fibras nervosas formando uma malha ou uma rede ganglionada. Disposição neuronal semelhante também foi observada por nós nos preparados de membrana de estômago de todos os grupos, inclusive no grupo D, independentemente da região analisada, indicando que o DM não alterou a disposição espacial do plexo mioentérico no estômago.

A organização dos neurônios mioentéricos em rede ganglionada é característica e foi também evidenciada em cobaia por Matsuo (1934), Sternini (1988) e Gabella (1989) no estômago, no duodeno e no intestino delgado como um todo, respectivamente. Descrições semelhantes foram feitas para o estômago de tartarugas (TIMMERMANS et al., 1991), de axolote (GABRIEL et al., 1992), de gato (KYOSOLA et al., 1975) e, também, no estômago da galinha (GABELLA; HALASY, 1987) e nas regiões aglandular e glandular do estômago de ratos (FREGONESI et al., 1998; MOLINARI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2000).

Para verificar os efeitos do DM e da suplementação com ácido ascórbico sobre os neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos (nadh-dr), realizamos a quantificação desses neurônios numa área total de $8,96 \text{ mm}^2$ de cada região do estômago, bem como a mensuração do perfil do corpo celular (PCC) de 100 neurônios mioentéricos nadh-dr por preparado de membrana perfazendo o total de 1000 neurônios por grupo.

Pesquisas anteriores indicaram que o número e o tamanho dos neurônios diferem significativamente entre as regiões aglandular e glandular do estômago de ratos, por esse motivo no presente trabalho analisamos os neurônios mioentéricos de cada região separadamente.

Na análise quantitativa da região aglandular A (AA), ou seja, na região central do estômago próximo à prega limitante, o número de neurônios mioentéricos nadh-dr foi menor no grupo D ($370,6 \pm 44,55 / 8,96 \text{ mm}^2$). Contudo, quando comparado aos grupos C ($515 \pm 37,22 / 8,96 \text{ mm}^2$) e DS ($495,4 \pm 38,96 / 8,96 \text{ mm}^2$) não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$). O mesmo ocorreu na região aglandular B (AB), próximo à curvatura maior do estômago, na qual o número de neurônios do grupo D ($204 \pm 53,12 / 8,96 \text{ mm}^2$), do grupo DS ($176 \pm 16,49 / 8,96 \text{ mm}^2$) e do grupo C ($204,2 \pm 42,42 / 8,96 \text{ mm}^2$) foram estatisticamente equivalentes ($P > 0,05$). Portanto, em relação a região aglandular do estômago não houve efeito do diabetes e da suplementação com ácido ascórbico na densidade dos neurônios mioentéricos nadh-dr.

Nossos resultados diferem de outros estudos. Perda de neurônios em ratos acarretada pelo DM foi verificada no duodeno (BÜTTOW; MIRANDA-NETO; BAZOTTE, 1997; FURLAN et al., 1999), no íleo (ZANONI et al., 2003), no intestino delgado como um todo (HERNANDES et al., 2000), no ceco (ZANONI et al., 1997),

no colo proximal (FURLAN; MOLINARI; MIRANDA-NETO, 2002; ROMANO; MIRANDA-NETO; CARDOSO, 1996) e no corpo do estômago (FREGONESI et al., 2001). No entanto, o tempo de indução e de manutenção do estado de diabetes não foram os mesmos nessas pesquisas o que poderia explicar as diferenças encontradas.

Na região glandular A (GA), na curvatura menor do estômago, não ocorreram diferenças significativas ($P>0,05$) quanto ao número de neurônios mioentéricos nadh-dr entre os grupos C ($742,8 \pm 55,27$) e D ($578 \pm 81,7$) e entre C e DS ($972,4 \pm 102,1$). Contudo, ao compararmos os grupos D e DS, verificamos aumento significativo de neurônios no grupo DS ($P<0,05$). Constatamos aumento de 40,5% no número de neurônios nos animais suplementados com ácido ascórbico em relação ao diabéticos não suplementados e aumento de 23,6% em relação aos normoglicêmicos, embora este último não tenha sido significativo ($P>0,05$).

Na região glandular B (GB), na curvatura maior do estômago, situação similar foi detectada, ou seja, ocorreu aumento significativo ($P<0,05$) de 39,7% no número de neurônios no grupo DS ($546,2 \pm 62,17/8,96 \text{ mm}^2$) quando comparado ao grupo D ($329,4 \pm 37,02/8,96 \text{ mm}^2$). Em relação ao grupo C ($401,2 \pm 7,23/8,96 \text{ mm}^2$) verificou-se a presença de 26,5% neurônios a mais no grupo DS, porém como observado na região glandular A (GA), este último aumento não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$).

O fato do número de neurônios não ser semelhante entre as quatro regiões analisadas já era esperado. Fregonesi et al. (2001), pesquisando os neurônios mioentéricos, relataram quantidades diferentes de neurônios para a curvatura maior e menor do estômago, tanto em ratos normoglicêmicos como em hiperglicêmicos. Em comparação com a região central próxima a prega limitante e na curvatura

menor do estômago, o número inferior de neurônios nas proximidades da curvatura maior do estômago, tanto na região aglandular como na glandular, nos três grupos estudados por nós, pode ser justificado pelo fato dos gânglios estarem distribuídos de modo mais esparsos, levando a uma diminuição no número de neurônios por área, como ressaltado também por Fregonesi et al. (2001) e Oliveira et al. (2000). Além disso, a espessura da túnica muscular nessa região é mais delgada do que na curvatura maior do estômago e, segundo Saffrey e Burnstock (1994), há maior densidade neuronal nas regiões do trato gastrointestinal onde a túnica muscular é mais espessa.

Molinari et al. (2002), analisando neurônios mioentéricos nadh-dr da região aglandular do estômago de ratos normoglicêmicos, mencionaram que na curvatura maior, os gânglios são menores e contêm poucos e esparsos neurônios, com maior densidade neuronal na região anterior à prega limitante ($570,8/6,64 \text{ mm}^2$) do que na região da curvatura maior ($140,8/6,64 \text{ mm}^2$).

Fregonesi et al. (2001) avaliaram quantitativamente neurônios nadh-dr no corpo do estômago de ratos de 75 dias de idade, diabéticos induzidos por estreptozotocina, e mantidos diabéticos pelo período de dois meses. Neste estudo, os autores verificaram diminuição de neurônios junto à curvatura menor do estômago e não na curvatura maior. O fato de não termos encontrado diminuição no número de neurônios, diferenciando, assim, nossos resultados daqueles relatados por Fregonesi et al. (2001), pode ser justificado pelo tempo de manutenção do diabetes. Em nosso experimento os ratos permaneceram diabéticos por quatro meses, tempo este possivelmente suficiente para que os neurônios que iniciaram processos degenerativos em função dos efeitos tóxicos da estreptozotocina pudessem completar o processo de regeneração como também ressaltado por

Zanoni et al. (1997) ao comparar a densidade neuronal no ceco de ratos com tempo de diabetes de dois e de oito meses.

As diferenças entre os resultados obtidos por nós e por Fregonesi et al. (2001) também podem ser explicadas pela distensão da região pilórica do estômago mencionada nos animais utilizados por aqueles pesquisadores. Esta distensão, embora não mensurada por eles, poderia também estar presente em outras regiões do estômago favorecendo maior dispersão dos neurônios e contribuindo para a diminuição da densidade neuronal por área, fato este não constatado em nosso experimento.

Outro fator a ser considerado é a idade do animal quando da indução do diabetes. Malone et al. (1996) relatam que os nervos de ratos mais jovens são mais suscetíveis a alterações morfológicas e fisiológicas. O mesmo poderia estar ocorrendo com os neurônios do plexo mioentérico. Fregonesi et al. (2001) induziram o diabetes em ratos que apresentavam 75 dias de idade, portanto mais jovens. Já, como em nosso experimento, Zanoni et al. (1997) utilizaram ratos de 90 dias de idade.

Apesar de não termos encontrado diminuição estatisticamente significativa no número de neurônios nos animais do grupo D em todas as regiões analisadas, ao contrário do esperado, não podemos, contudo, afirmar que não ocorreu perda de neurônios mioentéricos em função do diabetes, uma vez que o método empregado por nós para detecção de neurônios (histoquímica da nadh-diaforase) não evidencia toda a população neuronal. De acordo com Young et al. (1993) o método da nadh-diaforase permite evidenciar 80% da população total de neurônios no plexo mioentérico.

Portanto outros neurônios não reativos a nadh-diaforase podem ter sido alterados ou perdidos. Esses resultados são reforçados pelo fato da neuropatia autonômica, apesar de não ser seletiva (BELAI et al., 1991), não acometer simultaneamente todos os tipos neurônios com a mesma intensidade e extensão (VISON et al., 1989).

Ballmann e Conlon (1985), por exemplo, constataram aumento de reatividade ao VIP e à substância P no estômago de ratos mantidos diabéticos por dez semanas e diminuição no intestino. Wrzos et al. (1997), por sua vez, relataram diminuição de neurônios nitrérgicos no antro do estômago de ratos diabéticos, mas não em outros segmentos. Karakida, Ito e Homma (1989) verificaram aumento de substância P no "extrafundo" do estômago e Takahashi et al. (1997) constataram diminuição no número de neurônios mioentéricos nadph-diaforase reativos no corpo do estômago de ratos mantidos diabéticos por seis meses. Ressalta-se que os métodos utilizados pelos referidos autores também não evidenciam toda a população neuronal, mas sim sub-populações.

Análises quantitativas da população total de neurônios mioentéricos são possíveis com a utilização, por exemplo, da coloração por azul de metileno (BARBOSA, 1978; IRWIN, 1931; MATSUO, 1934) e também detectando os neurônios reativos a miosina-V (DRENGK et al., 2000).

Inúmeras pesquisas utilizaram o azul de metileno ou a miosina-V juntamente com a histoquímica da nadh-d para quantificar neurônios do plexo mioentérico em diferentes segmentos do trato gastrointestinal de ratos diabéticos. Nesses estudos, alterações na densidade neuronal na população neuronal total, mas não nos neurônios nadh-dr foram detectadas no ceco (ZANONI et al., 1997), no

colo proximal (FURLAN; MOLINARI; MIRANDA-NETO, 2002) e no colo como um todo (ROMANO; MIRANDA-NETO; CARDOSO, 1996).

Nossos resultados são sugestivos de que a suplementação com ácido ascórbico para ratos diabéticos apresentou um efeito neuroprotetor para neurônios mioentéricos nadh-dr, minimizando a perda neuronal no grupo DS, ao menos na região glandular A e B, embora a suplementação com ácido ascórbico não tenha impedido a perda de neurônios reativos a miosina-V e nem alterado o número de neurônios nadhp-dr no íleo de ratos (ZANONI et al., 2003). Nossa afirmação é justificável pelo maior número de neurônios encontrados na região glandular A e B do estômago dos ratos do grupo DS do que no grupo D.

Sabe-se que o envelhecimento leva a diminuição no número de neurônios do plexo mioentérico (GABELLA, 1989; SANTER; BAKER, 1988; SOUZA et al., 1993). Os ratos foram mantidos diabéticos durante o período de 90 a 210 dias de idade. Este fato poderia explicar os resultados obtidos na contagem dos neurônios, o ácido ascórbico provavelmente por sua ação antioxidante, minimizou os efeitos do envelhecimento aos quais os animais dos três grupos estavam submetidos, atuando como neuroprotetor no grupo suplementado, explicando a maior densidade neuronal neste grupo quando comparada ao grupo D.

Os processos degenerativos que levam a perda de neurônios o fazem de maneira diferenciada conforme a sub-população considerada. Diminuição na população de neurônios no intestino de ratos e cobaia (SANTER; BAKER, 1988) e no intestino delgado e grosso de seres humanos (GOMES; SOUZA; LIBERTI, 1997; SOUZA et al., 1993) tem sido atribuída ao envelhecimento, independentemente das condições fisiopatológicas. Em nosso experimento, somaram-se aos efeitos do envelhecimento a condição de diabetes que por si já é debilitante.

Em relação a média do PCC dos neurônios mioentéricos nadh-dr, de modo geral ela foi significativamente maior ($P < 0,05$) nos neurônios dos grupos D e DS do que no grupo C. Ao compararmos as médias do PCC entre os grupos D e DS da região aglandular A e B, constatamos que os neurônios do grupo DS apresentaram PCCs 6,5% e 5% menores do que aqueles presentes na região aglandular A e B do grupo D, respectivamente. Entretanto, na região glandular A e B, os neurônios do grupo DS foram 16,8% e 21,23% menores, respectivamente, do que os presentes nas regiões correspondentes do grupo D. Porém estas diminuições não foram estatisticamente significativas ($P > 0,05$). Aumento na média do PCC de neurônios nitrérgicos do corpo do estômago de ratos diabéticos por estreptozotocina foi observado também por Fregonesi (2003).

Nas regiões aglandular A (AA) e B (AB), observamos diminuição na frequência de neurônios mioentéricos nadh-dr com PCC igual ou inferior a $200 \mu\text{m}^2$ no grupo D (AA: 51,6%; AB: 49,6%) e no grupo DS (AA: 51,34%; AB: 54,67%) quando comparados com o grupo controle (AA: 84%; AB: 86,4%). Observamos também aumento na frequência de neurônios com PCC superior a $200 \mu\text{m}^2$ nos grupos D e DS em relação ao grupo C.

Nas regiões glandulares A (GA) e B (GB) observamos aumento na frequência de neurônios com PCC inferior a $200 \mu\text{m}^2$ no grupo DS (GA: 55%; GB: 74,5%) quando comparado com o grupo D (GA: 44%; GB: 25,6%). Nesta região do estômago, o grupo controle apresentou 85,2% e 82% do número total de neurônios com dimensões inferiores a $200 \mu\text{m}^2$. Com o aumento de neurônios com perfil inferior a $200 \mu\text{m}^2$ no grupo DS, acabou-se por verificar diminuição de neurônios com dimensões superiores a $200 \mu\text{m}^2$ para o referido grupo (GA: 45% e GB: 25,5%) e aumento destes no grupo D (GA: 56%; GB: 74,4%).

Esses resultados são indicativos de que, embora não tenha alterado o número de neurônios nadh-dr no grupo D quando comparado com o controle, ocorreu no grupo D incidência maior ($P < 0,05$) de neurônios com dimensões superiores a $200 \mu\text{m}^2$ principalmente na região glandular. Já, para o grupo DS ocorreu diminuição ($P < 0,05$) de neurônios grandes e médios e aumento de neurônios pequenos se aproximando mais dos resultados observados para o grupo C, sugerindo, mais uma vez, um efeito neuroprotetor do ácido ascórbico nos neurônios nadh-dr desta região do estômago.

Em ratos diabéticos tratados com a mesma dosagem de ácido ascórbico utilizada por nós, Zanoni et al. (2003) verificaram que o PCC de neurônios nitrérgicos dos ratos diabéticos suplementados era menor do que a dos ratos diabéticos não tratados. O aumento do tamanho dos neurônios mioentéricos em ratos diabéticos é uma constatação freqüente (BÜTTOW; MIRANDA-NETO; BAZOTTE, 1997; DEFANI, 2003; ZANONI et al., 1997, 2003).

Em nossos resultados, neurônios com perfis iguais ou superiores a $200 \mu\text{m}^2$ predominaram na região aglandular B e na região glandular A e B apenas no grupo D.

Freqüência aumentada de neurônios grandes foi relatado por Büttow, Miranda-Neto e Bazotte (1997) no duodeno de ratos diabéticos. Os referidos pesquisadores atribuíram o fato à degeneração neuronal e também ao acúmulo de lipofucsina decorrente do envelhecimento. Este fato poderia também ser a justificativa para a incidência maior de neurônios com PCC superior a $200 \mu\text{m}^2$ na região aglandular B e para a região glandular A e B, ambas do grupo D. Durante o envelhecimento e sob condições de diabetes o número de neurônios médios e

grandes é aumentado e são os primeiramente perdidos (ROMANO; MIRANDA-NETO; CARDOSO, 1996).

Schmeichel, Schmelzer e Low (2003) comentam que, no DM, a progressiva disfunção celular oriunda da confluência dos distúrbios metabólicos e vasculares levam ao comprometimento da função neural e a perda de suportes neurotróficos, que, a longo prazo, pode resultar em apoptose de neurônios, células de Schwann e de elementos gliais no sistema nervoso periférico.

Brownlee (2001) postula que tanto a inibição do acúmulo de superóxido verificado no DM como a euglicemia podem restaurar o equilíbrio metabólico e vascular e bloquear o início e a progressão das complicações presentes no diabetes.

A suplementação com ácido ascórbico preveniu o aumento do PCC de neurônios mioentéricos nadph-dr do íleo de ratos diabéticos (ZANONI et al., 2003), assim como preveniu o aumento do PCC de neurônios imunoreativos para o peptídeo intestinal vasoativo no plexo submucoso do íleo (ZANONI et al., 2001). Ao contrário do observado por nós no estômago dos animais do grupo D, em todas as regiões do estômago analisadas nos grupos DS e C predominaram neurônios com PCC inferior a $200 \mu\text{m}^2$. A diferença foi mais ressaltada ainda na região glandular B onde o grupo DS apresentou 65,7% neurônios a mais com PCC inferior a $200 \mu\text{m}^2$ do que o grupo D. Contudo, o fato dos resultados obtidos nas análises quantitativa e morfométrica terem revelado alterações mais significativas na região glandular A e B do que na região aglandular A e B, talvez possa ser explicado, mais uma vez, pela ação diferencial do diabetes em relação ao tipo de neurotransmissor do neurônio. Mas, esta suposição precisa ser averiguada para condições experimentais semelhantes a utilizada por nós, empregando-se técnicas específicas para evidenciação das sub-populações neuronais.

No entanto, apesar da função antioxidante e inibidora da aldose redutase (CUNNINGHAM; MEARKLE; BROW, 1994; LEVINE, 1986; WILL; BYERS, 1996), o ácido ascórbico não restaurou para níveis normais as concentrações sanguíneas de glicose e de hemoglobina glicada, não impedindo, assim, a instauração de poliúria e da polidipsia no grupo DS. Também não propiciou ganho de peso aos animais diabéticos suplementados.

Feldman (2003) comenta que atualmente não há tratamento para as neuropatias além daqueles que tratam a condição diabética em si, e que cada vez mais deve-se buscar o desenvolvimento de novas terapias. Segundo o autor, bloqueando a ação de componentes das inúmeras vias envolvidas na patogênese do DM, bloquearia-se as múltiplas causas do estresse oxidativo, prevenindo, assim, danos ao sistema nervoso.

Portanto, de modo geral, a partir de nossos resultados podemos inferir que a suplementação com ácido ascórbico protegeu os neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos da região glandular do estômago minimizando os efeitos deletérios do diabetes. Contudo, acreditamos que o tratamento com ácido ascórbico associado a outras substâncias antioxidantes ou inibidoras de etapas das vias metabólicas que se encontram alteradas no diabetes deva ser investigada pois poderia culminar em uma ação sinérgico eficaz.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Após análise dos resultados obtidos podem concluir que:

✓ Não houve alteração no número de neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos da região aglandular A e B entre os grupos estudados. Já, na região glandular A e B observou-se maior quantidade de neurônios no grupo DS do que no grupo D;

✓ Em todas as regiões estudadas, houve aumento no perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos nos grupos D e DS. Entretanto, não houve diferença entre esses dois grupos;

✓ O ácido ascórbico teve efeito neuroprotetor nos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos do estômago, pois minimizou a perda neuronal no grupo DS nas regiões glandular A e B e preveniu o aumento da frequência de neurônios grandes neste grupo aproximando aos resultados observados para o grupo C.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALI, H. A.; MCLLELAND, J. Neuron number in the intestinal myenteric plexus on the domestic frull (*Gallus gallus*) Lbl. **Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryol.**, v. 8, p. 277-283, 1979.
- ALMEIDA, J. M. **Embriologia veterinária comparada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 67-89
- ARAÚJO, L. Neuropatia autonômica. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 32, p. 207-209, 1996.
- AR'RAJAB, A.; AHRÉN, B. Long-term diabetogenic effect of streptozotocin in rats. **Pancreas**, v. 8, n. 1, p. 50-57, 1993.
- ATKINS, C. E.; HILL, J. R.; JOHNSON, R. K. Diabetes mellitus in the juvenile dog: a report of 4 cases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 175, p. 362-368, 1979.
- BALLMANN, M.; CONLON, J. M. Changes in the somatostatin, substance P and vasoactive intestinal polypeptide content of the gastrointestinal tract following streptozotocin-induced diabetes in the rat. **Diabetologia**, v. 28, p. 335-358, 1985.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 425-464
- BARBOSA, A. J. A. Auerbach's plexus of the albino rat. I. Quantitative study of the ganglia and nerve cells in the caecum and colon. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 6, p. 253-262, 1973.
- BARBOSA, A. J. A. Técnica histológica para gânglios intramurais em preparados espessos. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 11, p. 95-97, 1978.
- BARREIRA, A. A. Classificação das neuropatias diabéticas. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 27, n. 1, p.9-11, 1991.
- BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, p. 405-412, 1991.
- BELAI, A.; LINCOLN, J.; MILNER, P.; BURNSTOCK, G. Progressive changes in adrenergic, serotonergic, and pepdergic nerves in proximal colon of streptozotocin-diabetic rats. **Gastroenterology**, v. 95. p. 1234-1241, 1988.

BELAI, A.; LINCOLN, J.; MILNER, P.; BURNSTOCK, G. Differential effect of streptozotocin induced diabetes on the ileum and distal colon. **Gastroenterology**, v. 100, p. 1024-1032, 1991.

BELAI, A.; LINCOLN, J.; MILNER, P.; CROWN, A.; LOESCH, A.; BURNSTOCK, G. Enteric nerves in diabetic retas: increase in vasoactive intestinal polypeptide but not substance P. **Gastroenterology**, v. 89, p. 967-976, 1985.

BEVILACQUA, F.; BENSOUSSAN, E.; JANSEN, J. M.; SPÍNOLA E CASTRO, F. **Fisiopatologia clínica**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 1998. p. 660

BERGMAYER, H. U.; BERNET, E. **Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase**: methods of enzymatic analysis. New York: Verlag Chemiem-Academic Press, 1974. p.1205-1215.

BOR-SENG-SHU, E.; CHAD, G.; BOR-JIUN-SHU, F.; FERRAS DE CARVALHO, C. A.; SOUZA, R. R. Myenteric neurons of the mouse small intestine: morphometry and acetylcholinesterase activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 101-108, 1994.

BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo patologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1326

BROWNING, J., GANNON, B. J.; O'BRIEN, P. The microvascular and gastric lumenal pH of the forestomach of the rat: a comparison with the glandular stomach. **International Journal of Microcirculation. Clinical and Experimental**, v. 2, p. 109-118, 1983.

BROWNING, J.; O'BRIEN, P.; GANNON, B. J. Low forestomach acidity in the rat and the role of the gastric bolus. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 78, n.1, p. 63-65, 1984.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetes complications. **Nature**, v. 415, p. 813-820, 2001.

BURNSTOCK, G. The innervation of the gut of the Brown trout (*Salmo trutta*). **The Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 100, p. 199-220, 1959.

BURNSTOCK, G.; MIRSKY, R.; BELAI, A. Reversal of nerve damage in streptozotocin-diabetic rats by acute application of insulin in vitro. **Clinical Science**, v. 75, p. 629-635, 1988.

BÜTTOW, N. C.; MIRANDA NETO, M. H.; BAZOTTE, R. B. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the duodenum of streptozotocin-induced diabetic rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 34., n. 1, p. 35-42, 1997.

CAMERON, N. E.; COTTER, M. A. Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 45, n. 2, p. 137-146, 1999.

CAMERON, N. E.; COTTER, M. A.; MAXFIELD, E. K. Anti-oxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetics rats. **Diabetologia**, v. 36, p. 299-304, 1993.

CAMPBELL, I. W.; HEADING, C. T.; TOTHILL, P.; BUIST, T. A. S.; EWING, D. J.; CLARKE, B. F. Gastric emptying in diabetic autonomic neuropathy. **Gut**, v. 18, p. 462-467, 1977.

CAMPBELL, J.; PIERLUISSI, J.; KOVACS, K. Pancreatite islet ultrastructure, serum and pancreatic insulin in somatotrophic and pancreatic immune reactive insulin in somatotrophic and metasomatrophic diabetes in dogs. **Journal of Submicroscopic Cytology**, v. 3, p. 599-608, 1981.

CARDINAL, J. W.; ALLAN, D. J.; CAMERON, D. P. Differential metabolic accumulation may be the cause of strain differences in sensitivity to streptozotocin-induced B cell death in inbred mice. **Endocrinology**, v. 139, n. 6, p. 2885-289, 1998.

CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 1998 p.295-304

CLARK, A.; JONES, L. C.; KONING, E.; HANSEN, B. C.; MATTEWS, D. R. Decreased insulin secretions in type 2 diabetes: a problem of cellular mass or function? **Diabetes**, v. 50, n. 1, p. 169-171, 2001.

CLARKE, B. F.; EWING, D. J.; CAMPBELL, I. W. Diabetic autonomic neuropathy. **Diabetologia**, v. 17, p. 195-212, 1979.

CLEMENTS JR., R. S. Diabetic neuropathy: new concepts of its etiology. **Diabetes**, v. 28, p. 604-611, 1979.

COSTA, A. A.; BETTI, R. T. Hiperglímia e glicotoxicidade. **Terapêutica em Diabetes**, v. 4, n. 21, p. 1-8, 1998.

COSTA, M.; SIMON, F. A. A.; BROOKS, J. H. The enteric nervous system. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 89, n. 8, p. 125-137, 1994.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L., SCHOEN, F. J. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 780

COTTER, M. A.; LOVE, A.; WATT, M. J.; CAMERON, N. E.; DINES, K. C. Effects of natural free radical scavengers on peripheral nerve and neurovascular function in diabetic rats. **Diabetologia**, v. 38, p. 1285-1294, 1995.

COOURDEROT-MASUYER, C.; LAHET, J. J.; VERGES, B.; BRUN, J. M.; ROCHETTE, L. ascorbyl free radical release in diabetic pathies. **Cellular and Molecula Biology**, v. 46, n. 8, p. 1397-1401, 2000.

CRACCO, C.; FILOGAMO, G. Quantitative study of the nadph-diaphorase-positive myenteric neurons of the rat ileum. **Neuroscience**, v. 61, n. 2, p. 351-359, 1994.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 177-254

CUNNINGHAM, J. J. The glucose/insulin system and vitamin C: implications in insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of American College of Nutrition**, v. 17, n. 2, p. 105-108, 1998.

CUNNINGHAM, J. J.; MEARKLE, P. L.; BROW, R. G. Vitamin C: an aldose reductase inhibitor that normalizes erythrocyte sorbitol in insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of American College of Nutrition**, v. 13, p. 344-350, 1994.

DÂNGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 671

DAVISON, G. W.; GEORGE, L.; JACKSON, S. K.; YOUNG, I. S.; DAVIES, B.; BAILEY, D. M.; PETERS, J. R.; ASHTON, T. Exercise, free radicals, and lipid peroxidation in type I diabetes mellitus. **Free Radical Biology**, v. 33, p. 1543-1551, 2002.

DEFANI, M. A. **Avaliação morfométrica e quantitativa dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase positivos do jejuno de ratos diabéticos suplementados com acetil-L-carnitina**. 2003. 55f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia, Maringá, 2003.

DIANI, A. R.; GROGAN, D. M.; YATES, M. E.; RISINGER, D. L.; GERRITSEN, G. C. Radiologic abnormalities and autonomic neuropathology in the digestive tract of the ketonuric diabetic chinese hamster. **Diabetologia**, v. 17, p. 33-40, 1979.

DRENGK, A. C.; KAJIWARA, J. K.; GARCIA, S. B.; CARMO, V. S.; LARSON, R. E.; ZUCOLOTO, S.; ESPREAFICO, E. M. Immunolocalization of myosin-V in the enteric nervous system of the rat. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 78, p. 109-112, 2000.

DUCHEN, L. W.; ANJORIN, A.; WATKINS, P. J.; MACKAY, J. D. Pathology of autonomic neuropathy in diabetes mellitus. **Annals of Internal Medicine**, v. 92, n. 2, p. 301-303, 1980.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 96-117

DYCK, P. J.; GIANNINI, C. Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 55, n. 12, p. 1181-1193, 1996.

DYCK, P. J.; ZIMMERMAN, B. R.; VILEN, T. H.; MINNERATH, S. R.; KARNES, J. L.; YAO, J. K.; PODUSLO, J. F. Nerve glucose, fructose, sorbitol, myo-inositol, and fiber degeneration and regeneration in diabetic neuropathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 9, p. 542-548, 1988.

EIGENMANN, J. E.; EIGENMANN, R. Y.; RIJNBERK, A.; VAN DER GAAG, I.; ZAPF, J.; FROESCH, E. R. Progesterone-controlled growth hormone overproduction and naturally occurring canine diabetes mellitus and acromegaly. **Acta Endocrinologica**, v. 104, p. 167-176, 1983.

FELDMAN, E. L. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 431-433, 2003.

FELDMAN, M.; SCHILLER, L. R. Disorders of gastrointestinal motility associated with diabetes mellitus. **Annls of Internal Medicine**, v. 98, p. 378-384, 1983.

FOGEL, R.; ZHANG, X.; RENEHAN, W. E. Relationship between the morphology and function of gastric and intestinal distension-sensitive neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 364, p. 78-91, 1996.

FOSS, M. C. Diabetes mellitus e suas complicações crônicas. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 27, n. 1, p. 3-6, 1991.

FREGONESI, C. E. P. T. **Estudo morfoquantitativo de neurônios mioentéricos nadph-diaforase positivos do estômago e colo distal de ratos portadores de diabetes mellitus induzida por estreptozotocina e suplementados com acetil-L-carnitina**. 2003. 91 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia, Maringá, 2003.

FREGONESI, C. E. P. T.; MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L. Estudo morfológico e quantitativo dos neurônios do plexo mioentérico do corpo do estômago de *Rattus norvegicus*. **Acta Scientiarum**, v. 20, n. 2, p. 221-224, 1998.

FREGONESI, C. E. P. T.; MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L. ZANONI, J. N. Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 59, n. 1, p. 50-53, 2001.

FREITAS, M. R. G.; NASCIMENTO, O. J. M.; CHIMELLI, L.; ESCADA, T. M.; NEVARES, M. T. Neuropatia diabética: conceito, epidemiologia, classificação, quadro clínico e eletroneuromiográfico. Estudo de 210 casos. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 28, n. 3, p. 69-73, 1992.

FURLAN, M. M. D. P.; MIRANDA NETO, M. H.; SANT'ANA, D. M. G.; MOLINARI, S. L. Number and sinze of myenteric neurons of the duodenum of adult rats with acute diabetes. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 57, n. 3B, p. 740-745, 1999.

FURLAN, M. M. D. P.; MOLINARI, S. L.; MIRANDA NETO, M. H. Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 60, n. 3, p. 576-581, 2002.

FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**. v. 81, p. 87-96, 2000.

FURNESS, J. B.; BORNSTEIN, J. C.; TRUSSEL, D. C. Shapes of nerve cells in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine revealed by the intracellular injection of dye. **Cell and Tissue Research**, v. 254, p. 561-571, 1988.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. **The Enteric Nervous System**. New York: Churchill Livingstone, 1987. p. 87-96

GABELLA, G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. **Experientia**, v. 25, p. 218-219, 1969.

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

GABELLA, G. Inervation of the gastrointestinal tract. **Internat. Rev. Citol.**, v. 59, p. 129-191, 1979.

GABELLA, G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. **Journal of Anatomy**, v. 191, n. 1, p. 81-95, 1971.

GABELLA, G. On the plasticity of form and structire of enteric ganglia. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 30, p. 59-66, 1990.

GABELLA, G. Strusture of muscles and nerves in the gastrointestinal tract. In. JONHNSON, L. D. **Physiology of the gastrointestinal tract**. 3 ed. New York: Raven Press, 1994. p.381-422

GABELLA, G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pig and sheep. **Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 737-752, 1987.

GABELLA, G.; HALASY, K. On the nerve plexus of the chicken gizzard. **Anatomy and Embryology**, v. 177, p. 97-103, 1987.

GABRIEL, R.; TIMMERMAN, J. P.; ADRIAENSEN, D.; DE GROODT-LASSEEL, M. H. A.; SCHEUERMANN, D. W. Morphological features of the myenteric plexus of the stomach of the axolatl, *Ambystoma mexicanum*, revealed by immunocytochemistry. **Histochemical Journal**, v. 24, p. 181-189, 1992.

GARDNER, E.; GRAY, D. J.; O'RAHILLY, R. **Anatomia: estudo regional do corpo humano**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p.773

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 311-336

GEPTS, W.; YOUSSEF, D. Spontaneous diabetes in dogs and cats. A pathological study. **Diabetologia**, v. 3, p. 249-265, 1967.

GERSHON, M. D. **O segundo cérebro**. Rio de Janeiro: Campus, 2000. p. 350

GIULIANO D; CERIELLO A; PAOLISSO G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care**, v. 19, p. 257-267, 1996.

GOMES; O. A.; SOUZA, R. R.; LIBERTI, E. A. A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. **Gerontology**, v. 43, p. 210-217, 1997.

GREENE, D. A.; LATTIMER, S. A.; SIMA, A. A. F. Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. **The New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 10, p. 599-66, 1987.

GROSSMANN, M.; DOBREV, D.; HIMMEL, H. M.; RAVENS, U.; KIRCH, W. Ascorbic acid-induced modulation of venous tone in humans. **Hypertension**, v. 37, p. 949-954, 2001.

GUILFORD, W. G. The enteric nervous system: function, dysfunction, and pharmacological manipulation. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery. Small Animal**, v. 5, n. 1, p. 46-56, 1990.

GUNNARSSON, R.; BERNE, C.; HELLERSTRÖM, C. Cytotoxic effects of streptozotocin and N-nitrosomethylurea on the pancreatic B cells with special regard to the role of nicotinamide-adenine dinucleotide. **The Biochemical Journal**, v. 140, n. 3, p. 487-494, 1974.

GÜRTLER, H.; KETZ, H. A.; KOLB, E.; SCHRÖDER, L.; SEIDEL, H. **Fisiologia veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p. 105-127

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 181-188, 812-814

HALUZÍK, M.; NEDVÍDKOVÁ, J. The role of nitric oxid in the development of streptozotocin-induced diabetes mellitus: experimental and clinical implications. **Physiological Research**, v. 49, n. 1, p. 37-42, 2000.

HELANDER, H. F. The cells of the gastric mucosa. **International Review of Cytology**, v. 70, p. 217-289, 1981.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKILMAN, J.W. **Química clínica bases e técnicas**. Barcelona: Editorial JIMS, 1980. p. 529

HERNANDES, L.; BAZOTTE, R. B.; GAMA, P.; MIRANDA NETO, M. H. Streptozotocin-induced diabetes duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 58, n. 4, p. 1035-1039, 2000.

HODGKISS, J. P.; LESS, G. M. Morphological studies of electro physiologically-identified myenteric plexus neurons of the guinea-pig ileum. **Neuroscience**, v. 8, p. 593-608, 1983.

HOENIG, M. comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, p. 221-229, 2002.

HOENIG, M.; DAWE, D. L.; A quantitative assay for beta cell antibodies. Preliminary results in dogs with diabetes mellitus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 32, p. 195-203, 1992.

HOROWITZ, S. H. Diabetic neuropathy. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 296, p. 78-85, 1993.

HOSKING, D. J.; BENNETT, T.; HAMPTON, D. M. Diabetic autonomic neuropathy. **Diabetes**, v. 27, p. 1043-1055, 1978.

IBER, F. L.; PARVEEN, S.; VANDRUNEN, M.; SOOD, K. B.; REZA, F.; SERLOVSKY, R.; REDDY, S. Relation of symptoms to impaired stomach, small bowel, and colon motility in long-standing diabetes. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 38, n. 1, p. 45-50, 1993.

IRWIN, D. A. The anatomy of Auerbach's plexus. **The American Journal of Anatomy**, v. 49, n. 1, p. 141-165, 1931.

JOHNSON, K. H.; HAYDEN, D. W.; O'BRIEN, T. D.; WESTERMARK, P. Animal model of human disease: spontaneous diabetes mellitus islet amyloid complex in adult cats. **American Journal of Pathology**, v. 125, p. 416-419, 1986.

JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; ORCI, L.; PICTET, R.; GONETA, E. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 126, p. 201-205, 1967.

JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A. E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 48, p. 2129-2139, 1969.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 241-284

KANNAN, K.; JAIN, S. K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology**, v. 7, p. 153-163, 2000.

KARAKIDA, T.; ITO, S.; HOMMA, S. In vitro motor activity of intestinal segments of streptozotocin diabetes rats. **Journal of Autonomic Nervous System**, v. 26, p. 43-50, 1989.

KATZ, L. A.; SPIRO, H. M. Gastrointestinal manifestations of diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 275, n. 24, p. 1350-1361, 1966.

KLEIN, J. A.; ACKERMAN, S. L. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 785-793, 2003.

KRAMER, J. W.; NOTTINGHAM, S.; ROBINETTE, J. Inherited, early onset, insulin-requiring diabetes mellitus of keeshond dogs. **Diabetes**, v. 29, p. 558-565, 1980.

KSIAZEK, K.; WISNIEWSKA, J. The role of glucose and reactive oxygen species in the development of vascular complications of diabetes mellitus. **Przegląd Lekarski**, v. 58, p. 915-8, 2001.

KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. **Patologia básica**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p. 624

KUNSTYR, I.; PETERS, K.; GÄRTNER, K. Investigations on the function of the rat forestomach. **Laboratory Animal Science**, v. 26, n. 2, p. 166-170, 1976.

KUYVENHOVEN, J. P.; MEINDERS, A. E. Oxidative stress and diabetes mellitus: Pathogenesis of long-term complications. **European Journal of Internal Medicine**, v. 10, n. 1, p. 9-19, 1999.

KYOSOLA, K.; VEIJOLA, L.; RECHARDT, L.; Cholinergie innervation of the gastric wall of the cat. **Histochemistry**, v. 44, p. 23-30, 1975.

LAUGHTON, W. B.; POWLEY, T. T. Localization of efferent function in the dorsal motor nucleus of the vagus. **The American Journal of Physiology**, v. 252, p. 13-25, 1987.

LEE, E. R.; TRASLER, J.; DWIVEDI, S.; LEBLOND, C. P. Division of the mouse gastric mucosa into zymogenic and mucous regions on the base of gland features. **The American Journal of Anatomy**, v. 164, p. 187-207, 1982.

LEVINE, M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. **The New England Journal of Medicine**, v. 314, p. 892-902, 1986.

LINCOLN, J.; BOKOR, J. T.; CROWE, R.; GRIFFITH, S. G.; HAVEN, A. J.; BURNSTOCK, G. Myenteric plexus in streptozotocin-treated rats. **Gastroenterology**, v. 86, p. 654-661, 1984.

LINDSAY, R. M.; JAMIESON, N. S. D.; WALKER, S. A.; McGUIGAN, C. C.; SMITH, W.; BAIRD, J. D. Tissue ascorbic acid and polyol pathway metabolism in experimental diabetes. **Diabetologia**, v. 41, p. 516-523, 1998.

LOWE, G. D.; LOWE, J. M.; DRUMMOND, M. M.; REITH, S.; BELCH, J. J.; KESSON, C. M.; WYLIE, A.; FOULDS, W. S.; FORBES, C. D.; MacCUISH, A. C.; MANDERSON, W. G. Blood viscosity in young male diabetics with and without retinopathy. **Diabetologia**, v. 18, n. 5, p. 359-363, 1980.

LUCIANO, L.; REALE, E. The "limiting ridge" of the rat stomach. **Archives of Histology and Cytology**, v. 55, p. 131-138, 1992.

LYSY, J.; ZIMMERMAN, J. Ascorbic acid status in diabetes mellitus. **Nutrition Research**, v. 12, p. 713-720, 1992.

MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 129-150

MALBERT, C. H.; RUCKEBUSCH, Y. Relationships between pressure and flow across the gastroduodenal junction in dogs. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 260, p. 653-657, 1991.

MANN, G. V.; NEWTON, P. The membrane transport of ascorbic acid. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 258, p. 243-252, 1975.

MARMOR, M.; WILLEBERG, P.; GLICKMAN, L. T.; PRIESTER, W. A.; CYPESS, R. H.; HURVITZ, A. I. Epizootiologic pattern of diabetes mellitus in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 465-470, 1982.

MARTENS, H.; GÄBEL, G.; STROZYK, B. Mechanism of electrically silent Na and Cl transport across the rumen epithelium of sheep. **Experimental Physiology**, v. 76, p. 103-114, 1991.

MARITIM A. C.; SANDERS R. A.; WATKINS J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003.

MATSUO, H. A contribution on the anatomy of Auerbach's plexus. **Jap. J. Med. Sci. Anat.**, v.4, p.417-428, 1934.

MATTHEEUWS, D.; ROTTIERS, R.; BAEYENS, D.; VERMEULEN, A. Glucose tolerance and insulin response in obese dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 20, p. 287-293, 1982.

MATTHEEUWS, D.; ROTTIERS, R.; KANEKO, J. J.; VERMEULEN, A. Diabetes mellitus in dogs: relationship of obesity to glucose tolerance and insulin response. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 98-103, 1984.

MAY, J. M. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 13, p. 995-1006, 1999.

McLAREN, E. H. Diabetic neuropathy. **Comprehensive Therapy**, v. 4, n. 6, p. 54-58, 1976.

McLENNAN, S.; YUE, D. K.; FISHER, E.; CAPOGRECO, C.; HEFFERNAN, S.; ROSS, G. R.; TURTLE, J. R. Deficiency of ascorbic acid in experimental diabetes. **Diabetes**, v. 37, p. 359-361, 1988.

MEYER, J. H. Gastric emptying of ordinary food: effect of antrum on particle size. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 239, p. 133-135, 1980.

MILLER, D. Experimental diabetes: effects of streptozotocin in the Golden Syrian Hamster. **American Association for Laboratory Animal Science**, v. 40, n. 5, p. 539-540, 1990.

MOLINARI, S. L.; FERNANDES, C. L.; OLIVEIRA, L. R.; SANT'ANA, D. M. G.; MIRANDA-NETO, M. H. NADH-DIAPHORASE POSITIVE MYENTERIC NEURONS OF THE AGLANDULAR REGION OF THE STOMACH OF RATS (*Rattus norvegicus*) SUBJECTED TO DESNUTRITION. **Revista Chilena de Anatomia**, v. 20, n. 1, p. 19-22, 2002.

MONCKTON, G.; PEHOWICH, E. Autonomic neuropathy in the streptozotocin diabetic rat. The **Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 7, p. 142-153, 1980.

MOSER, U.; WEBER, F. Uptake of ascorbic acid by human granulocytes. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 54, p. 47-53, 1984.

NABUURS-FRANSSSEN, M. H.; HOUBEN, A. J. H. M.; TOOKE, J. E.; SCHAPER, N. C. The effect of polyneuropathy on foot microcirculation in type II diabetes. **Diabetologia**, v. 45, p. 1164-1171, 2002.

NATALI, M. R. M.; MIRANDA-NETO, M. H. Effect of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of the duodenum of rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 54, p. 273-279, 1996.

NATARAJAN, D.; GRIGORIOU, M.; MARCOS-GUTIERREZ, C. V.; ATKINS, C.; PACHNIS, V. Multipotential progenitors of the mammalian enteric nervous system capable of colonizing aganglionic bowel in organ culture. **Development**, v. 126, p. 157-168, 1999.

O'BRIEN, T. D. Pathogenesis of feline diabetes mellitus. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, p. 213-219, 2002.

O'BRIEN, T. D.; HAYDEN, D. W.; JOHNSON, K. H.; STEVENS, J. B.; High dose intravenous glucose tolerance test and serum insulin and glucagons levels in diabetic and non-diabetic cats: relationship to insular amyloidosis. **Veterinary Pathology**, v. 22, p. 250-261, 1985.

OBROSOVA I. G.; VAN HUYSEN C.; FATHALLAH L.; CAO X.; GREENE D. A.; STEVENS M. J. Na aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 16, p. 123-25, 2002.

OLIVEIRA, L. R.; MOLINARI, S. L.; NATALI, M. R. M.; MICHELAN, A. C.; SCAPINELLO, C. Morphologic considerations about the wall of the glandular stomach of Young rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Revista Chilena de Anatomia**, v. 19, n. 3, p. 253-258, 2001.

OLIVEIRA, L. R.; MOLINARI, S. L.; PEREIRA, M. A. S.; MIRANDA NETO, M. H.; SANT'ANA, D. M. G. Localização dos neurônios mientéricos no estômago aglandular e glandular de ratos (*Rattus norvegicus*). **Arquivos de Ciências da Saúde Unipar**, v. 4, n. 3, p. 215-220, 2000.

OLIVEIRA, R. B. Disfunções gastrointestinais nas neuropatias diabéticas. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 27, n. 1, p. 29-31, 1991.

OZAKI, N.; SENGUPTA, J. N.; GEBHART, G. F. Mechanosensitive properties of gastric vagal afferent fibers in the rat. **Journal of Neurophysiology**, v. 82, p. 2210-2220, 1999.

PAGE, A. J.; MARTIN, C. M.; BLACKSHAW, L. A. Vagal mechanoreceptors and chemoreceptors in mouse stomach and esophagus. **Journal of Neurophysiology**, v. 87, p. 2095-2103, 2002.

PARTHIBAN, A.; VIJAYALINGAM, S.; SHANMUGASUNDARAM, K. R.; MOHAN, R. Oxidative stress and the development of diabetic complications-antioxidants and lipid peroxidation in erythrocytes and cell membrane. **Cell Biology International**, v. 19, p. 987-993, 1995.

PAXINOS, G. **The rat nervous system**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 1994. p. 81-103

PENNATHUR, S.; WAGNER, J. D.; LEEUWENBURGH, C.; LITWAK, K. N.; HEINECKE, J. W. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, p. 853-860, 2001.

PESCHKE, E.; EBELT, H.; BRÖMME, H. J.; PESCHKE, D. 'Classical' and 'new' diabetogens – comparison of their effects on isolated rat pancreatic islets in vitro. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 158-164, 2000.

PETERSON, M. E.; NESBITT, G. H.; SCHAEER, M. Diagnosis and management of concurrent diabetes mellitus and hyperadrenocorticism in thirty dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 178, p. 66-69, 1981.

PORCHER, C.; JULÉ, Y.; HENRY, M. A qualitative and quantitative study on the enkephalinergic innervation of the pig gastrointestinal tract. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 48, n. 3, p. 333-343, 2000.

QUIGLEY, E. M. M. The pathophysiology of diabetic gastroenteropathy: more vague than vagal? **Gastroenterology**, v. 113, n. 3, p. 1790-1794, 1997.

RASSCHAERT, J.; EIZIRIK, D. L.; MALAISSE, W. J. Long term in vitro effects of streptozotocin, interleukin-1, and high glucose concentration on the activity of mitochondrial dehydrogenase and the secretion of insulin in pancreatic islets. **Endocrinology**, v. 130, n. 6, p. 3522-3528, 1992.

REECE, W. O. **Fisiologia de animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1996. p. 201-251, 319-329

ROBERT, A. Proposed terminology for the anatomy of the stomach. **Gastroenterology**, v. 60, n. 2, p. 344-345, 1971.

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

ROOT, M. V.; JOHNSON, K. H.; ALLEN, W. T.; JOHNSTON, S. D. Diabetes mellitus associated with pancreatic endocrine insufficiency in a kitten. **The Journal of Small Animal Practice**, v. 36, p. 416-420, 1995.

SAFFREY, M. J.; BURNSTOCK, G. Growth factors and the development and plasticity of the enteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 49, p. 183-196, 1994.

SAINI, K. S.; THOMPSON, C.; WINTERFORD, C. L.; WALKER, N. I.; CAMERON, D. P. Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in murine pancreatic B cell line, INS-1. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 39, n. 6, p. 1229-1236, 1996.

SANT'ANA, D. M. G.; MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L.; SANT'ANA, M. A. Neurons number in the myenteric plexus of the ascending colon of rats. A comparative study using two staining techniques. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 55, n. 3, p. 460-465, 1997.

SANTER, R. M.; BAKER, D. M. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 25, p. 25-57, 1988.

SCHICHO, R.; SCHEMANN, M.; HOLZER, P.; LIPPE, I. T. Mucosal acid challenge activates nitrenergic neurons in myenteric plexus of rat stomach. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, p. 1316-1321, 2001.

SCHMEICHEL, A. M.; SCHMELZER, J. D.; LOW, P. A. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. **Diabetes**, v. 52, p. 165-171, 2003.

SCHMID-SCHÖNBEIN, H.; VOLGER, E. Red-cell aggregation and red-cell deformability in diabetes. **Diabetes**, v. 25, n. 2, p. 897-902, 1976.

SCHMIDT, R. E.; PLURAD, D. D.; ROTH, K. A. Effects of chronic experimental streptozotocin-induced diabetes on the noradrenergic and peptidergic innervation of the rat alimentary tract. **Brain Research**, v. 458, p. 353-360, 1988.

SCHNEDL, W. J.; FERBER, S.; JOHNSON, J. H.; NEWGARD, C. B. STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells. **Diabetes**, v. 43, p. 1326-1333, 1994.

SCHULZE-DELRIEU, K.; SHIRAZI, S. S. Pressure and length adaptations in isolated cat stomach. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 252, p. 92-99, 1987.

SEKI, M.; KIMURA, K.; TANIGUCHI, Y.; YOSHIDA, Y.; IDO, K.; MATO, M. Histologic differentiation and motility of rat stomach. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 1, p. 151-160, 1993.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1981. p. 33-46.

SIMA, A. A. F.; GREENE, D. A. Diabetic neuropathy in the elderly. **Drugs & Aging**, v. 6, n. 2, p. 125-135, 1995.

SINSSON, S. Aparelho digestório geral. In: GETTY, R. **Sisson/Grossman: anatomia dos animais domésticos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. p. 100-107

SOM, S.; BASU, S.; MUKHERJEE, D.; DEB, S.; ROY CHOUDHURY, P; MUKHERJEE, S; CHATTERJEE, S. N.; CHATTERJEE, I. B. Ascorbic acid metabolism in diabetes mellitus. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 30, n. 6, 1981.

SOUZA, J. A.; FURLAN, M. M. D. P. Avaliação morfométrica de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos normais e com diabetes experimental. **Arquivos de Ciências da Saúde Unipar**, v. 5, n. 2, p. 141-147, 2001.

SOUZA, R. R.; FEARI, S.; FERRAZ DE CARVALHO, C. A.; PARANHOS, G. S. Myenteric plexus in Freshwater teleost intestine: quantitative study of nerve cells. **Anatomischer Anzeiger**, v. 152, p. 359-362, 1982.

SOUZA, R. R.; MORATELLI, H. B.; BORGES, N.; LIBERTI, E. A. Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. **Inteational Journal of Experimental Clinical of Gerontology**, v. 39, p. 183-188, 1993.

SPENCE, A. P. **Anatomia humana básica**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1991. p. 647

STATSOFT. **Statistica (data analysis software system)**, version 6, 2003.

STERNINI, C. Strutural and chemical organization of the myenteric plexus. **Annals. Review Physiology**, v. 50, p. 81-93, 1988.

STEVENS, M. J.; FELDMAN, E. L.; GREENE, D. A. The aetiology of diabetic neuropathy: the combined roles of metabolic and vascular defects. **Diabetic Medicine**, v. 12, p. 566-579, 1995.

STEVES, A.; LOWE, J. **Patologia**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1998. p. 504-507

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes: Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

SWITHERS, S. E.; BARONOMSKY, E.; POWLEY, T. L. Vagal intraganglionic laminar endings and intramuscular arrays mature at different rates in pre-weanling rat stomach. **Autonomic Neuroscience:Basic and Clinical**, v. 102, p. 13-19, 2002.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol. Res.**, v. 50, p. 536-546, 2001.

TAFURI, W. L. Ultrastructure of the vesicular component in the intramural nervous system of the guinea-pig's intestine. **Zeitschrift fur Naturforschg**, v. 19, p. 622-625, 1961.

TAKAHASHI, T.; NAKAMURA, K.; ITOH, H.; SIMA, A. A. F. Impaired expression of nitric oxide synthase in the gastric myenteric plexus of spontaneously diabetic rats. **Gastroenterology**, v. 113, p. 1535-1544, 1997.

TAY, S. S. W.; WONG, W. C. Short-and long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the dorsal motor nucleus of the vagus nerve in the rat. **Acta Anatomy**, v. 150, p. 274-281, 1994.

THULESEN, J.; ORKOVIC, C.; HOLST, J. J.; POULSEN, S.S. Short term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. **Endocrinology**, v. 138, n. 1, p. 62-68, 1997.

TIMMERMANS, J. P.; SCHEUERMANN, D. W.; GABRIEL, R.; ADRIAENSEN, D.; FEKETE, E.; GROODT-LASSEEL, M. H. A. The innervation of the gastrointestinal tract of a chelonian reptile, *Pseudemys scripta elegans*. **Histochemistry**, v. 95, p. 397-402, 1991.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Principles of anatomy and physiology**. 9 ed. New York: Wiley, 2000.

VAN GINNEKEN, C.; SMET, M.; MEIR, F. V.; WEYNS, A. Microwave staining of intestinal whole-mount preparations with cuproline blue. **Histochemical Journal**, v. 30, p. 703-709, 1998.

VINSON, J. A.; STARETZ, M. A.; BOSE, P.; KASSM, H. M. In vitro and in vivo reduction of erythrocyte sorbitol by ascorbic acid. **Diabetes**, v. 38, p. 1036-1041, 1989.

VOET, D. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

WARD, J. D.; THOMAS, P. K. Diabetic neuropathy. In. KEEN, H.; JARRET R. J. **Complications of diabetes**. London: Arnold, 1975.

WATKINS, C. C.; SAWA, A.; JAFFREY, S.; BLAEKSHAW, S.; BARROW, R. K.; SNYDER, S. H.; FERRIS, C. D. Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression and function that is lost in diabetic gastropathy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 3, p. 373-384, 2000.

WILL, J. C.; BYERS, T. Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C? **Nutrition Review**, v. 54, p. 193-202, 1996.

WOOD, J. D. Application of classification schemes to the enteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 48, p. 17-29, 1994.

WOODS, J. P.; PANCIERA, D. L.; SNYDER, P. S.; JACKSON, M. W. SMEDES, S. L. Diabetes mellitus in a kitten. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 30, p. 177-180, 1994.

WRZOS, H. F.; CRUZ, A.; POLAVARAPU, R.; SHEARER, D.; OUYANG, A. Nitric oxide syntase (NOS) expression in the myenteric plexus of streptozotocin-diabetic rats. **Digestory Disease Sciences**, v. 42, p. 2106-2110, 1997.

YANG, H.; WRIGHT JR, J. R. Human β cells are exceedingly resistant to streptozotocin in vivo. **Endocrinology**, v. 143, n. 7, p. 2497-2495, 2002.

YANG, R.; AREM, R.; CHAN, L. Gastrointestinal tract complications of diabetes mellitus: pathophysiology and management. **Archives of Internal Medicine**, v. 144, p. 1251-1256, 1984.

YOUNG, H. M.; FURNESS, J. B.; SEWELL, P.; BURCHER, E. F.; KANDIAH, C. J. Total numbers of neurons in myenteric ganglia of guinea-pig small intestine. **Cell and Tissue Research**, v. 272, p. 197-200, 1993.

YOUNG, I. S.; TORNEY, J. J.; TRIMBLE, E. R. The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. **Free Radical Biology**, v. 13, p. 41-46, 1992.

ZANONI J. N.; BUTTOW N. C.; BAZOTTE R. B.; MIRANDA-NETO M. H. Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid. **Autonomic Neuroscience**, v. 104, p. 32-38, 2003.

ZANONI, J. N.; MIRANDA-NETO, M. H.; BAZOTTE, R. B.; SOUZA, R. R. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin-induced diabetic rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 55, n. 4, p. 696-702, 1997.