

Avaliação da população de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos do corpo do estômago de ratos com diabetes crônico induzido pela estreptozotocina

Cristina Elena Prado Teles Fregonesi^{1*}, Sônia Lucy Molinari² e Marcílio Hubner de Miranda Neto²

¹Departamento de Fisioterapia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Presidente Prudente, Rua Roberto Simonsen, 305, 19060-900, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. ²Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-9000, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: cristina@prudente.unesp.br

RESUMO. O presente estudo teve por objetivo analisar as características morfoquantitativas de neurônios mioentéricos nitrérgicos do corpo do estômago de ratos diabéticos. O corpo do estômago de 5 ratos normoglicêmicos e de 5 ratos diabéticos foi submetido a preparatos de membrana corados pela técnica histoquímica da NADPH-diaforase. Verificaram-se, nos animais diabéticos, diminuição do peso corporal, aumento do consumo diário de água, da glicemia em jejum e da hemoglobina glicada. Com os dados obtidos, não foi observada diferença significativa na densidade de neurônios nitrérgicos entre os dois grupos, porém as áreas dos perfis celulares neuronais dos ratos diabéticos foram significativamente maiores. Constatou-se, portanto, que o diabetes induzido por estreptozotocina não acelera a morte dos neurônios nitrérgicos, contudo aumenta a expressão desses neurônios.

Palavras-chave: diabetes, plexo mioentérico, neurônios nitrérgicos, estômago de ratos.

ABSTRACT. Evaluation of the population of NADPH-diaphorase positive myenteric neurons from the body of the stomach of diabetic rats induced by streptozotocin. The aim of this study was to analyze the morphoquantitative features of the nitrergic myenteric neurons from the body of the stomach of diabetic rats. The body of the stomach of five normoglycemic rats and of five diabetic rats were prepared as whole-mounts stained by the histochemical technique of NADPH-diaphorase. Decreased body weight and increased daily ingestion of water, fast glycemia and glycated hemoglobin were verified in diabetic animals. According to the data obtained, significant difference in the density of nitrergic neurons was not observed between the two groups, but the areas of the neuronal cell body profiles in the diabetic rats were significantly larger. Results showed that the streptozotocin that induced diabetes does not accelerate the death of the nitrergic neurons, but increases the expression of these cells.

Key words: diabetes; myenteric plexus; nitrergic neurons; stomach of rats.

Introdução

O Diabetes Mellitus (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos caracterizados por hiperglicemia, resultante de um déficit na secreção e/ou na ação da insulina, estando essa, a longo prazo, associada com alteração, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (American Diabetes Association, 1997), sendo as manifestações neurológicas, provavelmente, a complicação mais comum (Afzaal *et al.*, 2002).

As neuropatias diabéticas ocorrem no sistema nervoso periférico, atingindo o sistema nervoso

entérico. Diversos autores vêm descrevendo alterações em neurônios do plexo mioentérico, estando esses diminuídos em vários segmentos intestinais de ratos diabéticos (Romano *et al.*, 1996; Hernandes, *et al.*, 2000; Fregonesi *et al.*, 2001; Furlan *et al.*, 2002; Zaroni *et al.*, 2003). Foram também evidenciadas alterações em neurotransmissores peptidérgicos (Belai *et al.*, 1985), adrenérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos (Lincoln *et al.*, 1984) e nitrérgicos (Zochodne *et al.*, 2000), no entanto, para esses últimos, as informações relatadas são escassas.

Os neurônios nitrérgicos possuem uma função inibitória crucial no controle da motilidade do trato gastrointestinal (Bult *et al.*, 1990; Jarvinen *et al.*, 1999).

O óxido nítrico (NO), produzido quando a L-arginina é reduzida para L-citrulina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Olsson e Holmgren, 2001) numa reação dependente de cálcio, calmodulina e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (Bredt *et al.*, 1991), é um neurotransmissor gasoso que tem sido implicado tanto em processos fisiológicos quanto em patológicos (Garside *et al.*, 1997). Assim que é produzido, o NO, por ser lipofílico, atravessa as membranas das células efectoras. Nestas, interage com o ferro da porção heme da enzima guanilato ciclase, resultando em mudança conformacional da enzima para um estado ativado, levando à síntese da guanosina monofosfato cíclico (GMPC) um mensageiro secundário (Burks, 1994), que produz os efeitos fisiológicos nas células alvo.

Tem sido demonstrado que a enzima óxido nítrico sintase causa evidenciação neuronal através da redução do nitroblue tetrazolium na presença de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH-reduzido), indicando que a histoquímica da NADPH-diaforase pode ser usada como marcador de neurônios nitrérgicos (Santer, 1994).

Assim, neste trabalho, analisamos as características morfoquantitativas de neurônios mioentéricos nitrérgicos do corpo do estômago de ratos diabéticos, já que o óxido nítrico, por ser o maior neurotransmissor inibitório do trato gastrointestinal, quando alterado, em condições patológicas como no diabetes mellitus, pode estar relacionado a sinais e sintomas normalmente encontrados no trato digestório, como gastroparesia e megacolon.

Material e métodos

Foram utilizados 10 ratos Wistar machos, com 105 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. Desses, 5 animais foram mantidos normoglicêmicos como controle (grupo C) e 5 receberam injeção intravenosa (i.v.) de estreptozotocina (35mg/Kg, Sigma, USA), dissolvida em tampão citrato 10mM e pH 4,5, a fim de que se tornassem diabéticos (grupo D). Os animais, mantidos em gaiolas individuais, em um ambiente com fotoperíodo (6:00 a.m – 6:00 p.m) e temperatura (24°C \pm 2°C) controlados, receberam água e alimento Nuvital® lab *ad libitum*.

Decorridos 105 dias de tratamento experimental, os animais foram anestesiados com tiopental (40mg/kg/peso corporal) intraperitoneal, as distâncias focinho-cauda foram mensuradas, os animais foram submetidos à laparotomia, sendo retirado sangue

através de punção cardíaca para dosagem da hemoglobina glicada e da glicemia em jejum, e os estômagos foram retirados, pesados e mensurados. Os estômagos foram lavados e distendidos com tampão fosfato salinado (PBS), (0,01 M, pH 7,4) e submetidos à histoquímica da NADPH-diaforase para evidenciação de neurônios mioentéricos nitrérgicos (Scherer-Singler *et al.*, 1983). Para tal, os estômagos foram fixados com paraformaldeído (Merck, Darmstadt, Germany) a 4%, preparado em PBS (0,1 M, pH 7,4) por 30 minutos, imersos em Triton X-100® (Sigma, St. Louis, USA) a 0,3%, dissolvido em PBS (0,01 M, pH 7,4), por 10 minutos, lavados 10 vezes em PBS (0,01 M) (10 minutos cada uma) e incubados no meio de reação, por 2 horas e 30 minutos. Este meio continha, para cada 200 ml, 50mg de Nitro Blue Tetrazolium (NBT), (Sigma Chemical, USA), 100mg de β -NADPH (Sigma, Steinheim, Germany) e 0,6ml de Triton X-100® a 0,3% em tampão Tris-HCl (0,1M, pH 7,6) (GibcoBRL, N.Y., USA). A reação foi interrompida por 3 lavagens consecutivas de 5 minutos cada uma em PBS (0,01 M), com os estômagos abertos nas extremidades oral e aboral, com posterior imersão em solução de paraformaldeído a 4% em PBS (0,1 M).

Após período de fixação, o estômago glandular foi retirado e o corpo foi separado do piloro. A seguir, o corpo foi microdissecado originando um preparado de membrana que foi desidratado, diafanizado e montado entre lâmina e lamínula com resina sintética Permount (Fisher Chemical, USA). Esse preparado foi dividido em três regiões, sendo desprezada a região intermediária e analisadas as regiões próximas às curvaturas gástricas maior e menor.

Para a quantificação neuronal, foi utilizado um microscópio óptico Leica DM RX, com objetiva de 50X, sendo contados 80 campos microscópicos aleatórios, em cada região. A área de cada campo foi de 0,149mm², perfazendo um total de 11,92mm² por região. Meios-neurônios foram contados em campos alternados.

A mensuração dos perfis dos corpos celulares foi realizada com auxílio de analisador de imagens (Image Pro Plus 4.1) computadorizado acoplado ao microscópio Leica DM RX. Foram mensurados 50 neurônios em cada região, perfazendo um total de 100 neurônios por segmento e 500 por grupo. Com base na média \pm desvio padrão do tamanho neuronal, os neurônios foram categorizados como pequenos, médios e grandes.

Os conjuntos de dados obtidos foram avaliados estatisticamente por análise de variância, teste t de Student e teste de Tukey, todos com nível de

significância de 5%. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

Resultados

Através dos dados apresentados na Tabela 1, podemos verificar a instalação da síndrome diabética nos animais que receberam a droga estreptozotocina, fato observado quando comparamos os valores do peso corporal, do consumo diário de água, da glicemia em jejum e da hemoglobina glicada dos animais normoglicêmicos com os diabéticos. Além disso, durante o período em que os ratos permaneceram nas gaiolas, observou-se maior irritabilidade dos animais diabéticos.

Tabela 1. Peso corporal inicial (PCI), peso corporal final (PCF), distâncias focinho-cauda (DFC), consumo diário de água (CDA), glicemia (GI) e hemoglobina glicada (HbG) dos animais dos grupos: normoglicêmico (C) e diabético (D). Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

Parâmetros/Grupos	C	D
PCI/g	362 \pm 17,9 ^a	365,8 \pm 2,3 ^a
PCF/g	472 \pm 23,9 ^a	312 \pm 7,0 ^b
DFC/cm	44,6 \pm 1,0 ^a	45,2 \pm 0,3 ^a
CDA/ml	62,1 \pm 0,9 ^a	182,7 \pm 2,3 ^b
GI/ mg.dl ⁻¹	105,4 \pm 11,2 ^a	362 \pm 15,1 ^b
HbG/ %	3,9 \pm 0,2 ^a	6,8 \pm 0,2 ^b

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

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

A densidade neuronal média, em 11,92mm², e as médias das áreas dos perfis dos corpos celulares de 250 neurônios NADPH-diaforase positivos, da região próxima à curvatura gástrica menor e da maior, dos dois grupos experimentais, estão contidas na Tabela 2, onde se verificou que não existem diferenças significantes na densidade desses neurônios, enquanto as áreas dos perfis dos corpos celulares dos animais diabéticos é significativamente maior.

Tabela 2. Densidade (neurônios/11,92mm²) e área dos perfis celulares (250 neurônios por região) de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos das regiões próximas às curvaturas gástricas menor e maior do corpo do estômago glandular dos animais dos grupos: normoglicêmico (C) e diabético (D). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

Grupo	Densidade		Área do perfil celular	
	Curv. Menor	Curv. Maior	Curv. Menor	Curv. Maior
C	428,2 \pm 11,9 ^a	231,6 \pm 15,8 ^a	306,1 \pm 7,6 ^a	445,2 \pm 14,3 ^a
D	443,6 \pm 25,6 ^a	212 \pm 17,8 ^a	416,6 \pm 26,9 ^b	572,3 \pm 27,8 ^b

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas (teste de t de student, p<0,05).

Os neurônios mioentéricos foram classificados em 3 grupos de acordo com o perfil do corpo celular. A Tabela 3 mostra a porcentagem e o número de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos, classificados em pequenos, médios e grandes. As áreas mensuradas dos perfis dos corpos celulares variavam, na curvatura gástrica menor, de 120,68µm² a 718,83µm² (grupo C) e de 123,46µm² a 961,11µm² (grupo D) e na curvatura gástrica maior, de 187,35µm² a 807,41µm² (grupo C) e de 190,74µm² a 1228,09µm² (grupo D).

Tabela 3. Porcentagem (%) e número (entre parênteses) de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos, de acordo com seus tamanhos classificados em pequenos, médios e grandes, evidenciados nas regiões próximas à curvatura gástrica menor e maior, nos animais dos grupos normoglicêmico (C) e diabético (D).

Grupo/Tamanho	Curvatura menor		Curvatura maior	
	C	D	C	D
P	53,6% (134)	16,4% (41)	46% (115)	18,8% (47)
M	7,6% (19)	11,6% (29)	16,8% (42)	10% (25)
G	38,8% (97)	72% (180)	37,2% (93)	71,2% (178)
Total	100% (250)	100% (250)	100% (250)	100% (250)
n = 5	P = \leq 289,22µm ²		P = \leq 413,22µm ²	
	M = 289,23 - 322,97µm ²		M = 413,23 - 477,17µm ²	
	G = \geq 322,98µm ²		G = \geq 477,18µm ²	

Discussão

Nesse experimento, observamos nos animais diabéticos um aumento do consumo diário de água, da glicemia em jejum e também da hemoglobina glicada, uma diminuição do peso corporal e uma maior irritabilidade. Esses sinais são característicos do diabetes e são facilmente observados em animais com diabetes experimental induzido por estreptozotocina. Furlan *et al.* (2002) enumeram perda de peso, hiperfagia, polidipsia, poliúria, hiperglicemia e maior irritabilidade dos animais uma semana após a indução do diabetes.

O fato de termos observado menor densidade de neurônios NADPH-diaforase positivos na região da curvatura gástrica maior, nos dois grupos experimentais, faz parte da distribuição neuronal característica do estômago, conforme podemos notar na literatura consultada. Em experimentos realizados com outros grupos de ratos da mesma espécie, nos quais foi analisada a subpopulação de neurônios NADH-diaforase positivos, também foi observada menor densidade neuronal próxima à curvatura gástrica maior do corpo do estômago, tanto em ratos normoglicêmicos (Fregonesi *et al.*, 1998, 2001) como em diabéticos (Fregonesi *et al.*, 2001). Molinari *et al.* (2002) também verificaram menor densidade de neurônios NADH-diaforase positivos na região próxima à curvatura gástrica maior, no estômago

aglandular de ratos controle e desnutridos. Gabella (1979), estudando o estômago de rato e cobaia, observou maior densidade neuronal em gânglios do plexo mioentérico próximos à curvatura gástrica menor, tornando-se progressivamente menos freqüente próximos à curvatura gástrica maior. Acreditamos que a reduzida densidade neuronal nas proximidades da curvatura gástrica maior possa estar relacionada à menor densidade de fibras musculares lisas evidenciadas nessa região durante a elaboração dos preparados de membrana. Gabella (1979) relata uma possível relação entre densidade neuronal e espessura das camadas musculares. Diversos autores têm relatado uma maior densidade de neurônios mioentéricos em áreas onde as camadas de músculo liso são mais espessas (Saffrey e Burnstock, 1994). Essas afirmações confirmam a necessidade de avaliar cada região do trato digestivo, individualmente, para não ocorrer erro interpretativo (Miranda-Neto *et al.*, 2001).

A técnica de marcação neuronal pela histoquímica da enzima NADPH-diaforase evidencia neurônios com atividade da enzima NOS e não necessariamente toda a população neuronal, permitindo assim, visualizar aproximadamente 50% dos neurônios evidenciados pela técnica da NADH-diaforase no intestino delgado de ratos (Santer, 1994) e no estômago de humanos (Manneschi *et al.*, 1998). Considerando que a condição experimental imposta não provocou alteração na densidade de neurônios NADPH-diaforase positivos das regiões próximas às curvaturas gástricas maior e menor do corpo do estômago de ratos e considerando a diminuição na densidade de neurônios NADH-diaforase positivos (Fregonesi *et al.*, 2001; Furlan *et al.*, 2002) e na densidade neuronal da população total (Romano *et al.*, 1996; Buttow *et al.*, 1997; Hernandez *et al.*, 2000; Zanoni *et al.*, 1997, 2003) de neurônios mioentéricos em animais submetidos à condição de diabetes, podemos sugerir que os neurônios nitrérgicos são mais resistentes às condições fisiopatológicas que se instalam e, por isso, perdem-se menos.

O estresse oxidativo, observado no diabetes mellitus (Giuliano *et al.*, 1996), associado a um aumento de NO, decorrente do aumento na proporção de neurônios nitrérgicos, poderia, segundo Murphy (1999), resultar na formação de nitrito que, por ser altamente reativo, pode danificar as células neuronais, levando à morte celular, principalmente daquelas não-produtoras de NO, pois, segundo Bolaños *et al.* (1997), as células neuronais que contêm NOS apresentariam maior efeito defensivo antioxidante. Bredt e Snyder (1994)

relatam uma resistência seletiva à morte celular nas células neuronais que contêm NOS. Acreditamos que o NO, por ser lipofílico, atravesse facilmente as membranas celulares, atingindo, também, as células neuronais que não expressem NO, podendo, assim, danificá-las.

As áreas dos perfis dos neurônios NADPH-diaforase positivos, tanto em animais normoglicêmicos quanto nos diabéticos, apresentaram-se maiores próximo à curvatura gástrica maior onde a densidade neuronal era menor. Acreditamos que possa haver uma relação entre densidade e tamanho neuronal. Manneschi *et al.* (1998) relatam a presença de grandes neurônios NADPH-diaforase positivos no estômago de humanos e relacionam a possibilidade de neurônios grandes como um mecanismo de compensação para a baixa população neuronal na região.

O significativo aumento na área dos perfis dos corpos celulares e o predomínio de neurônios grandes, tanto na região próxima à curvatura gástrica menor quanto na maior, nos animais diabéticos, quando comparados aos normoglicêmicos, é semelhante ao observado por Zanoni *et al.* (2003) no íleo de ratos diabéticos. Como essa técnica de marcação neuronal evidencia a atividade da enzima NOS, quando as mesmas condições de marcação neuronal são mantidas, um aumento na área dos perfis desses neurônios em um grupo experimental, em relação ao seu controle, é sugestivo de aumento na atividade da maquinaria enzimática responsável pela síntese de NO. No íleo de cobaias submetidos à denervação extrínseca, foi observada uma potencialização da transmissão inibitória do músculo longitudinal, estando essa associada a um aumento no número de neurônios mioentéricos com imunorreatividade ao óxido nítrico (Yunker e Galligan, 1998). O aumento das áreas dos perfis dos corpos celulares dos neurônios NADPH-diaforase positivos pode decorrer de alterações da inervação extrínseca adrenérgica relacionada à neuropatia diabética; em uma tentativa de suprir o relaxamento muscular gástrico, induzido pela via simpática, esses neurônios, que também induzem a um relaxamento muscular, teriam sua maquinaria enzimática aumentada. Zanoni *et al.* (2002) relacionam a neuropatia diabética, comprometendo a integridade de corpos celulares e de fibras nervosas dos neurônios simpáticos, implicando um déficit da ação inibitória do sistema nervoso simpático sobre a submucosa, com uma sobrecarga e um aumento dos perfis de neurônios VIP-érgicos.

Conclusão

O diabetes induzido por estreptozotocina não acelera a morte dos neurônios nitrérgicos, uma vez que não foram encontradas diferenças quantitativas significantes entre os dois grupos. O aumento das áreas dos perfis com predomínio de neurônios grandes nos ratos diabéticos indica aumento na expressão desses neurônios. Se, por um lado, o aumento da expressão dos neurônios nitrérgicos pode representar um importante mecanismo compensatório para possíveis danos à inervação inibitória extrínseca, por outro lado, a liberação de quantidades maiores de óxido nítrico no ambiente do plexo mioentérico poderia contribuir para acelerar a morte de neurônios não-produtores de óxido nítrico.

Referências

- AFZAAL, S. *et al.* Actiopathogenesis and management of neuropathy. *J. Assoc. Physicians Índia*, Twf State, v.50, n.5, p.707-711, 2002.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, Alexandria, v.20, n.7, p.1183-1197, 1997.
- BELAI, A. *et al.* Enteric nerves in diabetic rats: increase in vasoactive intestinal polypeptide but not substance P. *Gastroenterology*, Lawrence, v.89, p.967-976, 1985.
- BOLAÑOS, J. P. *et al.* Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.*, Haghstown, v.68, p.2227-2240, 1997.
- BREDDT, D. S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiological messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v.63, p.175-195, 1994.
- BREDDT, D. S. *et al.* Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, London, v.351, p.714-718, 1991.
- BULT, H. *et al.* Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic, non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*, London, v.345, p.346-347, 1990.
- BURKS, T. F., In: *Physiology of the gastrointestinal tract*, New York: Raven Press, 1994.
- BUTTOW, N. C. *et al.* Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the duodenum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arq Gastroenterol*, v.34, p.34-42, 1997.
- FREGONESI, C. E. P. T. *et al.* Estudo morfológico e quantitativo dos neurônios do plexo mioentérico do corpo do estômago de *Rattus norvegicus*. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.20, n.2, p.221-224, 1998.
- FREGONESI, C. E. P. T. *et al.* Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Arq Neuro-Psiquiatr*, São Paulo, v.59, p.50-53, 2001.
- FURLAN, M. M. D. P. *et al.* Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats. *Arq Neuro-Psiquiatr.*, v.60, p.576-581, 2002.
- GABELLA G. Innervation of the gastrointestinal tract. *Int. Rev. Citol*, San Diego, v.59, p.129-191, 1979.
- GARSIDE, S. *et al.* The ontogeny of NADPH-diaphorase neurons in serum-free striatal cultures parallels in vivo development. *Neuroscience*, Kidlington, v.76, n.4, p.1221-1230, 1997.
- GIULIANO, D. *et al.* Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, Alexandria, v.19, n.3, p.257-267, 1996.
- HERNANDES, L. *et al.* Streptozotocin-induced diabetes duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, São Paulo, v.58, n.4, 2000.
- JARVINEN, M. K. *et al.* Nitric oxide synthase-containing neurons in the myenteric plexus of the rat gastrointestinal tract: distribution and regional density. *Anat Embryol*, Berlin, v.199, p.99-112, 1999.
- LINCOLN, J. *et al.* Myenteric plexus in streptozotocin-treated rats - Neurochemical and histochemical evidence for diabetic neuropathy in the gut. *Gastroenterology*, Lawrence, v.86, p.654-661, 1984.
- MANNESCHI, L. I. *et al.* Neuron density and distribution of NADPH-diaphorase positive neurons in the human stomach. *Neurosci. Lett.*, Sharmon, v.250, p.169-172, 1998.
- MIRANDA-NETO, M. H. *et al.* Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, São Paulo, v.59, n.1, p.54-59, 2001.
- MOLINARI, S. L. *et al.* NADH-diaphorase positive myenteric neurons of the aglandular region of the stomach of rats (*Rattus norvegicus*) subjected to desnutrition. *Rev. Chil. Anat.*, Temuco, v.20, n.1, p.19-23, 2002.
- MURPHY, M. P. Nitric oxide and cell death. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1411, p.401-414, 1999.
- OLSSON, C.; HOLMGREN, S. The control of gut motility. *Comp. Biochem. Physiol. A*, New York, v.128, n.3, p.481-503, 2001.
- ROMANO, E. B. *et al.* Preliminary investigation about the effects of streptozotocin-induced chronic diabetes on the nerve cell number and size of myenteric ganglia in rat colon. *Rev Chil Anat*, Temuco, v.14, p.139-145, 1996.
- SAFFREY, M. J.; BURNSTOCK, G. Growth factors and the development and plasticity of the enteric nervous system. *J. Aut. Nervous System*, Amsterdam, v.49, p.183-196, 1994.
- SANTER, R. M. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. *J. Aut. Nervous System*, Amsterdam, v.49, p.115-121, 1994.
- SCHERER-SINGLER, U. *et al.* Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase

- histochemistry. *J. Neurosci Methods*, Amsterdam, v.9, p.229-234, 1983.
- YUNKER, A. M. R.; GALLIGAN, J. J. Extrinsic denervation increases myenteric nitric oxide synthase-containing neurons and inhibitory neuromuscular transmission in guinea pig. *J. Aut. Nervous System*, Amsterdam, v.71, n.2-3, p.148-158, 1998.
- ZANONI, J. N. et al. Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid. *Auton. Neurosci.*, Amsterdam, v.104, n.1, p.32-38, 2003.
- ZANONI, J. N. et al. Terminal ileum submucous plexus: study of the diabetes rats treated with ascorbic acid. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, São Paulo, v.60, n.1, p.32-37, 2002.
- ZANONI, J. N. et al. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin-induced diabetics rats. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, São Paulo, v.55, p.696-702, 1997.
- ZOCHODNE, D. W. et al. Nitric oxide synthase activity and expression in experimental diabetic neuropathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, Lawrence, v.59, p.798-807, 2000.

Received on June 18, 2003.

Accepted on December 08, 2003.