



SÔNIA TRANNIN DE MELLO

**ESTUDO QUANTITATIVO E MORFOMÉTRICO DOS CORPOS
CELULARES DE NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS HuC/HuD,
NADHd E nNOS DO DUODENO DE RATOS COM DIABETES
AGUDO TRATADOS COM INSULINA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Ciências Biológicas (Área
de concentração - Biologia Celular e
Molecular) da Universidade Estadual de
Maringá, para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas.**

MARINGÁ, OUTUBRO DE 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SÔNIA TRANNIN DE MELLO

**ESTUDO QUANTITATIVO E MORFOMÉTRICO DOS CORPOS CELULARES DE
NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS HuC/HuD, NADhd E nNOS DO DUODENO DE
RATOS COM DIABETES AGUDO TRATADOS COM INSULINA**

**Professor Dr. Marcílio Hubner de Miranda Neto
(Orientador)**

Maringá, outubro de 2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M527e Mello, Sônia Trannin de
Estudo quantitativo e morfométrico dos corpos celulares de neurônios mioentéricos HuC/HuD, NaDHd e nNOS do duodeno de ratos com diabetes agudo tratados com insulina / Sônia Trannin de Mello. -- Maringá : [s.n.], 2008.
80 f.

Orientador : Prof. Dr. Marcílio Hubner de Miranda Neto.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2008.

1. Neurônios mioentéricos. 2. Diabetes agudo. 3. Insulina. 4. Densidade neuronal. 5. Perfil celular. 6. Relação núcleo/citoplasma. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. II. Título.

CDD 21.ed. 611.0188

BIOGRAFIA

Sônia Trannin de Mello nasceu em Maringá/PR em 19/03/1961. Possui graduação em Enfermagem pela Universidade Estadual de Maringá (1999) e Mestrado em Ciências Morfofuncionais pela Universidade de São Paulo (2003). Atualmente é Professora Assistente do Departamento de Ciências Morfofisiológicas (DCM) da Universidade Estadual de Maringá. Tem experiência na área de Enfermagem Clínica e Anatomia Humana. Membro do Grupo de Pesquisa em Neurônio Entérico do Laboratório de Neurônios Entéricos do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá, atuando em pesquisa nas áreas de desnutrição, diabetes e alcoolismo. Membro do Museu Dinâmico Interdisciplinar (MUDI) da Universidade Estadual de Maringá, onde atua na área de extensão nos seguintes temas: Efeitos do Tabagismo no Homem e no Meio Ambiente, Doenças Sexualmente Transmissíveis e Educação Fiscal, por meio do teatro, atuando em duas peças teatrais de autoria do Professor Dr. Marcílio Hubner de Miranda Neto: “O Auto da Barca do Fisco” e “A Farsa do Fiscal que se Casou com a Trambiqueira”.

Marcílio e Sônia,

Com vocês tenho aprendido a “construir” pontes e a “destruir” meus muros...

Muito obrigada pelo carinho, amizade, companheirismo e presença.

Quando se procura determinar diferentes deveres, deve-se preferir os que melhor servem à sociedade. Uma ação sábia deve ser resultado de Ciência e prudência, concluindo-se que será melhor fazê-la do que falar dela.

(Dos Deveres – Cícero).

DEDICATÓRIAS

Ao meu pai, Luiz Pinheiro de Mello,

E a minha mãe, Maria José Trannin de Mello,

Que, desde muito cedo, ensinaram-me o valor da moderação, da prudência e da justiça.

Aos meus filhos:

**Rafael de Mello Zanin, Mariana de Mello Zanin Michellazo/Daniel A. Machado
Michellazo e Thiago de Mello Zanin,**

Pelo orgulho que sinto (e que, a cada dia, aumenta) em ter vocês como filhos.

Aos meus netos:

**Paola Zanin Michellazo, Daniel Zanin Michellazo e João Zanin Michellazo (ainda
protegido no útero da Mariana),**

**A segunda chance que a vida me deu para tentar fazer o que não fiz (por
desconhecimento, pela preocupação em educar, por falta de tempo...) para meus filhos.**

Ao meu “namorado”:

Marcelo Henrique Galdioli,

Pela presença constante, marcante e intensa em todos os momentos...

Aos meus irmãos:

**Raul Trannin de Mello, Rosany de Mello Cionek, Claudia Trannin de Mello Stabile,
Rogério Trannin de Mello e Elaine Trannin de Mello,
Pela eterna cumplicidade que o amor exige.**

Aos meus cunhados e cunhadas:

**Doraci Aparecida Minatel de Mello, Renato Cionek, Márcio Stabile e Sheila Luz,
Por fazerem felizes (vocês se esforçam...) meus irmãos e minhas irmãs.**

As minhas duas queridas afilhadas (filhas):

**Elaine Trannin de Mello e Vivian de Mello Cionek,
Pela virtude da generosidade...**

A todos os meus sobrinhos e sobrinhas:

**Que seguem pela vida disseminando, senão todas, mas a maioria das sementes plantadas
por meus pais.**

**"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".**

(Fernando Sabino)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Marcelo,

Que, de repente, virou minha vida de pernas para o ar...

Mas com tamanha intensidade que não pude (e nem quis) dizer não!

(...)

O terceiro me chegou

Como quem chega do nada

Ele não me trouxe nada

Também nada perguntou

Mal sei como ele se chama

Mas entendo o que ele quer

Se deitou na minha cama

E me chama de mulher

Foi chegando sorrateiro

E antes que eu dissesse não

Se instalou feito um posseiro

Dentro do meu coração

(Terezinha – Chico Buarque)

A Jacqueline Nelisis Zanoni,

Pela sabedoria em orientar, pelos ricos conselhos e sugestões, pela disponibilidade, atenção e boa vontade em colaborar...

A Célia Regina de Godoy Gomes,

Pelo carinho e amizade...

A Maria Raquel Marçal Natali,

Pela disponibilidade, sugestões, companheirismo...

A Maria Montserrat Dias Pedrosa Furlan,

Pelas sugestões e pela ajuda com o inglês.

A Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana,

Pelas inúmeras demonstrações práticas sobre o ato de compartilhar...

A Sandra Regina Stabile,

Pela sensibilidade e presteza em ajudar em um momento que foi crucial em minha vida.

Aos técnicos e colegas de laboratório,

Pela valiosa ajuda na elaboração das técnicas...

A Troupe: “Arte Ética e Cidadania” e “Grupo Abacatu - Música, Poesia e Cidadania”,

Pelos momentos maravilhosos de alegria, emoção, companheirismo, descontração e troca de experiências, tão necessários à fome de minha alma.

Agradeço também os momentos de adversidades, que sempre me levam à reflexão...

**“A rigidez é boa na pedra, não no homem!
A ele cabe firmeza, o que é muito diferente...”**

(Guerdjef)

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de ascensão.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá pela seriedade e comprometimento na realização deste curso de Doutorado.

Ao Professor Dr. Marcílio Hubner de Miranda Neto, pela orientação concisa e equilibrada.

Ao Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, pela presteza no atendimento.

Aos colegas do Departamento de Ciências Morfofisiológicas, pelo agradável convívio.

Aos colegas da área de Anatomia pelo apoio para meu afastamento.

Aos técnicos dos Laboratórios do DCM, pela ajuda indispensável no tratamento, morte dos animais e utilização dos equipamentos de análise de imagens.

Aos funcionários do DCM pela prontidão em ajudar.

Aos colegas de pós-graduação, pela troca de idéias e experiências...

A Prof^a. Dra. Ângela pelas sugestões e ajuda quanto à análise estatística.

Ao Prof. Dr. Roberto Barbosa Bazotte, pela doação de material indispensável à realização desta pesquisa.

A Prof^a. Dra. Jeanette Monteiro De Cnop, pela correção do português.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente para conclusão deste trabalho,

Muito Obrigada!

"A distância que você consegue percorrer na vida depende da sua ternura para com os jovens, compaixão pelos idosos, solidariedade com os esforçados e tolerância para com os fracos e os fortes, porque chegará o dia em que você terá sido todos eles."

(George Washington)

APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta de dois artigos científicos. Inicia descrevendo os efeitos do tratamento com insulina na população total e sub-populações de neurônios mioentéricos no artigo **“Efeitos do tratamento com insulina sobre os neurônios mioentéricos HuC/HuD, NADH diaforase positivos e nNOS do duodeno de ratos adultos com diabetes agudo”**.

Tem continuidade com o artigo **“Estudo morfométrico dos neurônios HuC/HuD e nNOS do duodeno de ratos com diabetes agudo tratados com insulina”** que descreve os efeitos do tratamento com insulina nas áreas dos perfis celulares e nucleares dos neurônios do plexo mioentérico de ratos diabéticos tratados com insulina. Em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, os artigos foram redigidos de acordo com as revistas: *Digestive Disease and Science* e *Journal of Gastroenterology*.

1)

1.1 - Sônia Trannin de Mello, Marcílio Hubner de Miranda Neto, Jacqueline Nelisis Zanoni, Maria Montserrat D. P. Furlan. Efeitos do tratamento com insulina sobre os neurônios mioentéricos HuC/HuD, NADH diaforase positivos e nNOS do duodeno de ratos adultos com diabetes agudo.

Página 01

1.2 - Sônia Trannin de Mello, Marcílio Hubner de Miranda Neto, Jacqueline Nelisis Zanoni, Maria Montserrat D. P. Furlan. Effects of Insulin Treatment on HuC/HuD, NADH Diaphorase, and nNOS-Positive Myoenteric Neurons of the Duodenum of Adult Rats with Acute Diabetes. Este artigo foi aceito pela revista *Digestive Diseases Science* (DOI: 10.1007/s10620-008-0430-8) em Junho de 2008, encontrando-se já disponível no formato online. Normas da revista em anexo.

Página 23

2)

2.1 - Sônia Trannin de Mello, Marcílio Hubner de Miranda Neto, Jacqueline Nelisis Zanoni, Sonia Lucy Molinari. Estudo morfométrico dos neurônios HuC/HuD e nNOS do duodeno de ratos com diabetes agudo tratados com insulina.

Página 44.

2.2 - Sônia Trannin de Mello, Marcílio Hubner de Miranda Neto, Jacqueline Nelisis Zanoni, Sonia Lucy Molinari. Morphometric study of the HuC/HuD e nNOS neurons of the duodenum of rats with acute diabetes treated with insulin. Este artigo foi submetido à apreciação, visando publicação na revista Journal of Gastroenterology, em 02/10/2008.

Normas da revista em anexo.

Página 63.

RESUMO GERAL

A combinação de desordens na sinalização intracelular com alterações quantitativas e neuroquímicas dos neurônios do SNE pode estar relacionada com perdas neuronais e problemas clínicos relevantes das manifestações neurológicas do diabetes mellitus, como, por exemplo, dilatação do estômago, dos intestinos delgado e grosso, constipação e diarreia diabética. Realizamos este trabalho com o objetivo de verificar se o tratamento com insulina previne alterações na densidade e nas áreas dos perfis celulares e nucleares dos neurônios mioentéricos no duodeno de ratos Wistar com diabetes agudo induzido por estreptozotocina. Os neurônios foram evidenciados pelas seguintes técnicas: histoquímica da NADH diaforase e imunohistoquímica da nNOS e HuC/HuD. Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, com 7 meses de idade (g), obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, divididos em 3 grupos: grupo controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (T). Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas individuais e mantidos em temperatura constante com foto-período de 12 horas. Aí permaneceram por 7 dias, recebendo água e ração NUVILAB *ad libitum*. O diabetes foi induzido nos grupos D e T, por meio de injeção e.v. de estreptozotocina (35mg/Kg de peso corporal). Do segundo ao sexto dia do experimento os animais do grupo T receberam, no período da manhã, injeção subcutânea de insulina NPH, dissolvida em solução salina (0,9%) na dose de 10U/Kg. Durante esse período foram controlados os parâmetros peso corporal, ingestão de água e alimentos e eliminação de urina de todos os animais. Ao fim do sétimo dia do período experimental os animais foram mortos por meio de injeção intraperitoneal de tiopental (40mg/kg). Coletou-se sangue e realizou-se a dosagem da glicemia em jejum. A seguir, por meio de uma laparotomia, os duodenos foram coletados para realização das técnicas histoquímica e imunohistoquímica. A densidade de neurônios foi avaliada com as técnicas da NADH diaforase, nNOS e HuC/HuD. As áreas dos perfis celulares foram avaliadas com as técnicas da nNOS e HuC/HuD, e as áreas dos perfis

nucleares com a técnica da nNOS. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio dos programas Statistica e GraphPad Prism, sendo expressos como média \pm desvio padrão. Os animais do grupo diabético (D) sofreram perda de peso superior à média de perda sofrida pelos controles (grupo C), enquanto o tratamento com insulina (grupo T) preveniu a perda de peso em três animais e levou a uma maior proporção de gordura visceral em todos os animais desse grupo. O tratamento com insulina não preveniu a perda precoce de neurônios mioentéricos HuC/HuD. A densidade de neurônios nNOS positivos não sofreu alterações significantes nos grupos D e T. A densidade de neurônios NADHD positivos nos animais dos grupos D e T foi maior que no grupo C, indicando que na fase aguda o diabetes leva a um aumento na atividade das enzimas da cadeia respiratória. As áreas dos perfis celulares dos neurônios HuC/HuD do plexo mioentérico dos animais do grupo D ($243,69 \pm 18,91 \mu\text{m}^2$) apresentaram-se significativamente menores do que as dos grupos C ($288,18 \pm 17,81 \mu\text{m}^2$) e T ($284,11 \pm 30,64 \mu\text{m}^2$). Na técnica da nNOS, as áreas dos perfis celulares dos animais do grupo D ($293,32 \pm 24,65 \mu\text{m}^2$) apresentaram-se significativamente menores do que as áreas dos animais do grupo C ($331,73 \pm 17,58 \mu\text{m}^2$). Os perfis dos núcleos dos neurônios nNOS dos animais do grupo D ($152,36 \pm 3,52 \mu\text{m}^2$) eram significativamente menores que o verificado nos grupos C ($178,29 \pm 9,0 \mu\text{m}^2$) e T ($163,47 \pm 5,50 \mu\text{m}^2$). Nota-se também que a relação núcleo/citoplasma foi mantida, ou seja, as áreas dos perfis dos núcleos, quando comparadas com as áreas dos perfis celulares, representavam, no grupo C, 53,74%; no grupo D, 51,94%; e no grupo T, 54,12%. Discute-se que a síntese de proteínas é um processo que ocorre de maneira integrada entre núcleo e citoplasma, e que a falta aguda de insulina afeta simultaneamente esses dois compartimentos celulares dos neurônios nNOS. Em síntese: 1) O tratamento com insulina é capaz de prevenir a perda aguda de peso em parte dos animais; 2) a insulina, devido a sua ação anabólica e poupadora de energia, levou à manutenção de uma maior proporção de gordura nos animais do grupo diabético tratado com insulina; 3) o

tratamento com insulina não previne a perda precoce de neurônios HuC/HuD no plexo mioentérico do duodeno de ratos diabéticos; 4) o número de neurônios nNOS positivos não sofre alterações significantes no diabetes agudo, com ou sem tratamento com insulina; 5) a maior densidade de neurônios NADHd positivos nos animais dos grupos D e T indicam que na fase aguda o diabetes leva a um aumento na atividade de enzimas da cadeia respiratória desses neurônios; 6) as áreas dos perfis celulares dos neurônios HuC/HuD e nNOS sofreram reduções significantes nos animais do grupo D; 7) as áreas dos perfis nucleares dos neurônios nNOS sofreram reduções significantes nos animais do grupo D.

PALAVRAS-CHAVE: neurônios mioentéricos; diabetes agudo; insulina; densidade neuronal; perfil celular; relação núcleo/citoplasma.

ABSTRACT

The combination of disorders in intracellular signaling with quantitative and neurochemical changes of the neurons of the ENS can be related to neuronal losses and relevant clinical problems of the neurological manifestations of diabetes mellitus, such as dilatation of the stomach, of the small and large intestines, gastroparesis, constipation and diabetic diarrhea. We carried out this work with the purpose of verifying whether insulin treatment prevents changes in the density and areas of cell body and nucleus profiles of myoenteric neurons from the duodenum of Wistar rats with acute streptozotocin-induced diabetes. The neurons were stained with the following techniques: NADH diaphorase histochemistry and nNOS and HuC/HuD immunohistochemistry. It was used 30 male Wistar rats aging seven months, supplied by the Central Animal House of the State University of Maringá, divided into three groups: control group (C), diabetic group (D) and insulin-treated diabetic groups (T). The animals were housed in individual metabolic cages and kept at constant temperature and 12-hour photoperiod for seven days under *ad libitum* supply of water and NUVILAB rat chow. Diabetes was induced in groups D and T through i.v. injection of streptozotocin (35 mg/kg body weight). From the second to the sixth morning of the experiment the animals from group T received subcutaneous injections of NPH insulin dissolved in saline solution (0.9%) at the dose of 10 U/kg body weight. During this period body weight, water and food ingestion and urine volume were recorded. At the end of the seventh day the animals were killed with i.p. injection of thiopental (40 mg/kg body weight). Blood was collected and fasting plasma glucose was determined. The duodenum was collected through laparotomy and subjected to the histochemical and immunohistochemical techniques. The density of neurons was assessed with the techniques of NADH diaphorase, nNOS and HuC/HuD. The areas of the cell body profiles were evaluated with the techniques of nNOS and HuC/HuD, and the areas of the

nuclear profiles with the technique of nNOS. The results were subjected to statistical analysis with the softwares Statistica and GraphPad Prism, being expressed as mean±standard deviation. The animals from group D had a body weight loss greater than the mean of group C, while insulin treatment (group T) prevented this in three animals and led to a greater proportion of visceral fat in all the animals of this group. However, insulin treatment did not prevent the early loss of HuC/HuD myoenteric neurons. The density of nNOS-positive neurons did not change significantly in groups D and T. The density of NADHD-positive neurons in the animals of groups D and T was greater than in group C, indicating that in its acute phase diabetes leads to an increase on the activity of the respiratory chain enzymes. The areas of the cell body profiles of the HuC/HuD-positive neurons of the myoenteric plexus of the animals from group D ($243.69\pm 18.91 \mu\text{m}^2$) were significantly smaller than those of groups C ($288.18\pm 17.81 \mu\text{m}^2$) and T ($284.11\pm 30.64 \mu\text{m}^2$). The nNOS technique evidenced areas of cell body profiles in group D ($293.32\pm 24.65 \mu\text{m}^2$) which were significantly smaller than those of group C ($331.73\pm 17.58 \mu\text{m}^2$). The nuclear profiles of the nNOS-positive neurons of the animals from group D ($152.36\pm 3.52 \mu\text{m}^2$) were markedly smaller than in group C ($178.29\pm 9.0 \mu\text{m}^2$) and T ($163.47\pm 5.50 \mu\text{m}^2$). It is noticed as well that the nucleus/cytoplasm ratio was maintained, that is, the areas of the nuclear profiles, when compared to the areas of the cell body profiles, represented 53.74% in group C, 51.94% in group D and 54.12% in group T. It is discussed that protein synthesis is a process occurring in an integrated manner between the nucleus and the cytoplasm, and that the acute lack of insulin affects equally both these cellular compartments of the nNOS-positive neurons. In summary: 1) Insulin treatment is capable of preventing the acute body weight loss in some of the animals; 2) Insulin, due to its anabolic and energy-saving actions, led to a maintenance of a greater proportion of fat in the animals from the insulin-treated diabetic group; 3) Insulin treatment does not prevent the early loss of HuC/HuD-positive neurons of the myoenteric plexus of the duodenum of

diabetic rats; 4) The number of nNOS-positive neurons does not change significantly in acute diabetes either with or without insulin treatment; 5) The greater density of NADHD-positive neurons in the animals from groups D and T indicate that acute diabetes increases the activity of respiratory-chain enzymes of these neurons; 6) The areas of the cell body profiles of the HuC/HuD- and nNOS-positive neurons were significantly reduced in the animals from group D; 7) The areas of the nuclear profiles of the nNOS-positive neurons were markedly reduced in the animals from group D.

KEY WORDS: myoenteric neurons; acute diabetes; insulin; neuronal density; cellular profile, nucleus/cytoplasm ratio.

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM INSULINA SOBRE OS NEURÔNIOS
MIOENTÉRICOS HuC/HuD, NADH DIAFORASE POSITIVOS E nNOS DO
DUODENO DE RATOS ADULTOS COM DIABETES AGUDO**

Sônia Trannin de Mello¹, Marcílio Hubner de Miranda Neto¹, Jacqueline Nelisis Zandoni¹,
Maria Montserrat D. P. Furlan¹

¹Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Laboratório de Neurônios Entéricos,
Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, nº 5790 Bloco H-79 – CEP 87020-900,
Maringá, PR, Brasil.

Endereço para correspondência. Telefone: +55 44 32614708; Fax: +55 44 32614340; E-mail:
stmello@uem.br

RESUMO

Realizamos este trabalho com o objetivo de verificar se o tratamento com insulina previne alterações na densidade de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos Wistar com diabetes agudo induzido por estreptozotocina. Os animais do grupo diabético (D) sofreram perda de peso superior à média de perda sofrida pelos controles (grupo C), enquanto o tratamento com insulina (grupo T) preveniu a perda de peso em três animais e levou a uma maior proporção de gordura visceral em todos os animais desse grupo. O tratamento com insulina não preveniu a perda precoce de neurônios mioentéricos HuC/HuD. A densidade de neurônios nNOS positivos não sofreu alterações significantes nos grupos D e T. A densidade de neurônios NADHd positivos nos animais dos grupos D e T foi maior que no grupo C, indicando que na fase aguda o diabetes leva a um aumento na atividade das enzimas da cadeia respiratória.

PALAVRAS-CHAVE: neurônios mioentéricos, diabetes agudo, duodeno, nNOS, NADHd

Introdução

O termo diabetes descreve várias síndromes do metabolismo relacionadas com redução relativa ou absoluta de secreção de insulina, caracterizadas por hiperglicemia e variados graus de resistência periférica à ação da insulina¹.

O SNE apresenta habilidade única no controle da maioria das funções intestinais, como a regulação da absorção/secreção, controle da motilidade e do tônus vascular, não sendo surpresa que injúrias resultem em desordens e distúrbios digestivos^{2, 3}.

A combinação de desordens na sinalização intracelular⁴ com alterações quantitativas e neuroquímicas dos neurônios do SNE podem estar relacionadas com perda neuronal e com problemas clínicos resultantes das manifestações neurológicas do diabetes mellitus, como, por exemplo, dilatação do estômago, dos intestinos delgado e grosso, constipação e diarreia diabética^{2,4-7}.

Propriedades histoquímicas e eletrofisiológicas mostram que 80 a 100 milhões de neurônios entéricos podem ser classificados em sub-populações distintas, como neurônios aferentes primários, interneurônios, neurônios motores, neurônios secretomotores e neurônios vasomotores³.

Sub-populações neuronais são diferentemente afetadas pelo diabetes, de acordo com o segmento intestinal⁸⁻¹⁰, bem como de acordo com distintas formas de tratamento e com a duração do diabetes¹¹⁻¹⁶. Estudos prévios têm mostrado redução no número de neurônios entéricos¹⁶⁻¹⁹.

Tendo como base a população total e as sub-populações neuronais com suas diferentes funções no SNE, realizamos este trabalho com o objetivo de investigar, no duodeno de ratos, os efeitos do diabetes agudo experimental e do tratamento com insulina, sob os seguintes parâmetros: 1) densidade total de neurônios mioentéricos – HuC/HuD; 2) densidade da sub-

população de neurônios nitrérgicos – nNOS; 3) densidade da sub-população de neurônios NADHd+ .

Material e Métodos

Grupos de estudo

Todos os experimentos descritos neste artigo estão de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram previamente submetidos à análise do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual e Maringá – UEM (Protocolo N° 006/2005).

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, com 7 meses de idade, obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, divididos em três grupos: grupo controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (T). Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas individuais e mantidos em temperatura constante, com foto-período de 12 horas. Aí permaneceram por 7 dias, recebendo água e ração NUVILAB *ad libitum*.

No primeiro dia do experimento, após jejum noturno, os ratos dos grupos D e T receberam injeção i.v. de estreptozotocina para indução do diabetes (35mg/kg peso corporal; Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolvidos em tampão citrato pH 4.5 (10mM). Após indução, a glicemia dos animais foi determinada pelo método da glicose oxidase²⁰ para confirmar o estabelecimento do modelo experimental. Todos os animais dos grupos D e T apresentaram glicemia superior a 210 mg/dl. O grupo C recebeu volume equivalente de veículo.

Nos cinco dias subseqüentes o grupo T recebeu toda manhã injeção subcutânea de insulina NPH dissolvida em solução salina (0,9%), na dose de 10U/Kg (Novolin® N. Novo Nordisk A/S. Dinamarca). Foram mensurados diariamente o peso corporal, o consumo de alimento, de água, e o volume urinário eliminado.

No sexto dia suspendeu-se a injeção de insulina no grupo T e todos os animais foram colocados em jejum noturno; no sétimo dia do período experimental, os animais foram mortos, sendo previamente anestesiados com dose intraperitoneal de 40mg/kg de tiopental (Abbott Labs., Chicago, IL, USA).

Por punção cardíaca, coletou-se sangue para avaliação da glicemia de jejum, e posteriormente realizou-se uma laparotomia para coleta dos duodenos e das gorduras periepididimal e retroperitoneal. As gorduras foram pesadas, e foi calculada a proporção para cada 100 gramas de peso corporal. Os duodenos foram retirados, tomando-se como limites o piloro e a flexura duodenojejunal. Foram pesados e a seguir mensurados seu comprimento e sua largura.

As amostras de duodenos submetidas às técnicas imunohistoquímica foram lavadas em PBS pH 7.4 (0.1M) e infladas com solução fixadora de Zamboni²¹ e mantidas sob refrigeração, por 18 horas, na mesma solução. Ao fim deste período, os segmentos foram abertos ao longo da borda mesentérica e lavados sucessivamente em álcool 80% para remoção de todo fixador. Na seqüência, foram desidratados em álcool (95% e 100%), diafanizados em xilol e reidratados em séries decrescente de álcoois (100%, 90%, 80%, 50%) e, ao final, colocados em solução de PBS 0.1M. A seguir, os segmentos foram dissecados para obtenção dos preparados de membrana.

Os duodenos foram preparados para a técnica histoquímica da NADH-diaforase, imunohistoquímica anti-HuC/HuD, que marca proteínas estruturais presentes em todos os neurônios, e imunohistoquímica anti-óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), como segue:

- *HuC/HuD*²²: Os preparados totais foram lavados duas vezes (10 minutos cada lavagem) em solução de PBS 0.1M acrescida de Triton X-100 (0.5%). Após, foram incubados em BSA (1% PBS 0.1M), permanecendo nessa solução por 1 hora, em temperatura ambiente.

Foram incubados em anticorpo primário anti-HuC/HuD (Tabela 1), diluído em solução contendo BSA 1%, Triton X-100 (0.5%) e PBS 0,1M por 48 horas, em temperatura ambiente. Os tecidos foram lavados por três vezes em PBS e incubados com anticorpo secundário (Tabela 1) por 2 horas em temperatura ambiente. Após, foram lavados três vezes sucessivas em PBS. Foram montados em lâmina com glicerol tamponado (9:1) e armazenados em geladeira. Controle negativo foi feito com a omissão do anticorpo primário.

- *nNOS*¹⁰: Os preparados foram inicialmente lavados três vezes em solução de PBS e Triton X-100 (0,5%). Na seqüência, foram incubados em BSA (1% em PBS) durante 1 hora. Após o bloqueio, os tecidos foram incubados por 48 horas, temperatura ambiente, com anticorpo primário específico para nNOS (Tabela 1). Os tecidos foram lavados por três vezes em PBS e incubados com anticorpo secundário (Tabela 1) por 2 horas em temperatura ambiente. Terminado esse período, foram lavados por três vezes sucessivas em PBS. Controle negativo foi feito com a omissão do anticorpo primário.

- *NADH-diaforase*: Os duodenos foram amarrados nas duas extremidades após serem injetados com solução de Krebs. Imersos por 5 minutos em solução de Triton X-100 0,3% (Sigma, St, Louis, MO, USA), na seqüência foram lavados por duas vezes em solução de Krebs. Após, foram imersos em solução contendo β -NADH (Sigma, St, Louis, MO, USA) e Nitro Blue Tetrazolium (Sigma, St. Louis, MO, USA), por 45 minutos. A reação foi interrompida com solução de formol tamponado. Os anéis duodenais foram dissecados sob estereomicroscópio para obtenção dos preparados de membrana. Após, foram desidratados e diafanizados, e montados entre lâmina e lamínula. O produto da reação de NADH-d aparece com uma coloração de diferentes tonalidades de azul/púrpura.

Análise quantitativa dos neurônios mioentéricos HuC/HuD, nNOS imunoreativos e NADHd positivos.

A quantificação dos neurônios mioentéricos HuC/HuD e nNOS imunoreativos e NADHd positivos foi realizada por meio de imagens obtidas por amostragem. As imagens foram capturadas por uma câmera de alta resolução AxioCam (Zeiss, Jena, Alemanha), acoplada ao microscópio de luz Axioskop Plus (Zeiss), transferidas para um computador pelo programa AxioVision 4 versão 4.1 e gravadas em compact disc (CD). O software de análise de imagens Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) foi utilizado para a realização da quantificação neuronal nas imagens gravadas em CD.

Para cada animal foram contados todos os neurônios presentes em 30 imagens, capturadas em objetiva de 20X. A área de cada imagem, mensurada pelo Image-Pro Plus, foi de 0,369 mm², totalizando 11,07 mm².

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio dos programas Statistica e GraphPad Prism, sendo expressos como média ± desvio padrão. Os dados quantitativos foram analisados em bloco seguido pelo teste de Tukey. Para os outros resultados usamos análise de variância One-way ANOVA, seguido do teste de Tukey. O nível de significância foi de 5%.

Resultados

No dia seguinte à injeção de estreptozotocina, o consumo de água e o volume urinário para 100g de peso corporal nos animais do grupo D foi de 17,11 ml e 6,17 ml, enquanto no grupo T foi de 15,84 ml e 7,89 ml, respectivamente. Esses valores são bem

superiores ao verificado no grupo C, 10,46 ml de água e 1,39 ml de urina, indicando a instalação do quadro de diabetes nos grupos D e T.

No decorrer do experimento, a polidipsia e a poliúria somaram-se à perda significativa de peso corporal nos grupos D e T. No final do experimento, a hiperglicemia confirmou a ocorrência do diabetes.

A média de consumo de alimento do grupo C foi discretamente superior à dos grupos D e T, sem, contudo, apresentar diferença significativa. Por outro lado, a quantidade de gordura retroperitoneal e epididimal apresentou-se superior no grupo T. (Tabela 2)

Os animais do grupo D desenvolveram comportamento agressivo, enquanto os do grupo T não apresentaram tal comportamento.

O peso e a área dos duodenos não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados. (Tabela 2)

Nos três grupos foram evidenciados gânglios do plexo mioentérico, constituídos por numerosos corpos de neurônios densamente agrupados com a marcação neuronal, com a imunohistoquímica para HuC/HuD (10 a 93 neurônios por campo) e com a histoquímica da NADHd (5 a 74 neurônios por campo). (Figuras 1 e 2)

Nos preparados de membrana submetidos a imunohistoquímica para nNOS foram marcados corpos celulares e processos neuronais. Foram encontrados neurônios isolados e gânglios com poucos neurônios, esparsamente distribuídos (2 a 32 neurônios por campo). (Figura 3)

A análise quantitativa dos neurônios marcados com a técnica do HuC/HuD demonstrou uma redução significativa no número de neurônios dos animais dos grupos D e T. Com a técnica imunohistoquímica da nNOS não foi encontrada diferença significativa no número de neurônios marcados, nos três grupos. A histoquímica da NADHd evidenciou

densidade de neurônios significativamente maior nos animais dos grupos D e T, quando comparados ao Grupo C. (Tabela 3)

Discussão

A injeção de estreptozotocina leva rapidamente ao aparecimento de sintomas característicos do diabetes. Em poucas horas são observadas elevação da glicemia e redução no conteúdo sérico e pancreático da insulina²³. Neste estudo, no dia seguinte à injeção de estreptozotocina verificamos, nos grupos D e T, uma grande alteração no volume de água ingerida e no volume de urina eliminado, seguindo-se a isso perda de peso e hiperglicemia. Esses sintomas resultam das alterações metabólicas provocadas pela ausência/insuficiência de insulina e das mudanças no funcionamento celular, devido à hiperglicemia²³⁻²⁴.

Acreditamos que a discreta perda de peso evidenciada nos animais do grupo C se deva ao estresse provocado pela manipulação dos animais durante o período de experimentação. Por outro lado, a perda mais intensa de peso nos animais dos grupos D e T estaria relacionada às alterações fisiopatológicas do diabetes. Embora não existam diferenças significantes entre as médias de perda de peso entre os grupos D e T, cabe destacar que entre os animais diabéticos todos apresentaram perda de peso superior à média do grupo C, enquanto, entre os animais do grupo T, três apresentaram valores situados no intervalo de confiança da média dos animais do grupo C, o que revela que a resposta ao tratamento com insulina, nessa fase aguda, é heterogênea, e que a média do grupo não expressa as respostas de todos os indivíduos.

A proporção de gordura retroperitoneal e epididimal por 100g de peso corporal apresentou-se significativamente maior nos ratos do grupo T, o que, somado ao fato de três ratos do grupo T apresentarem pequena perda de peso, semelhante à média do grupo C, leva-nos a especular que o diabetes não controlado tenha provocado em todos os animais do grupo

D mobilização de massa corporal, para que substratos energéticos fossem supridos a células carentes de glicose e as vias neoglicogênicas²⁵, sem contudo levar ao esgotamento das reservas lipídicas. Por outro lado, a maior proporção de gordura encontrada nos animais do grupo T possivelmente se relaciona ao fato de a insulina ser um hormônio essencialmente anabólico e poupador de reservas energéticas^{24, 25}. Essa idéia é reforçada quando analisamos cada animal individualmente, uma vez que o animal do grupo diabético que mais perdeu peso (20,76%) possuía 1,8g dessa gordura para cada 100g de peso corporal, enquanto o animal diabético tratado com insulina que mais perdeu peso (25,99%) possuía 2,83 g por 100 gramas de peso corporal.

Os ratos do grupo D, sem tratamento, apresentaram-se agressivos, enquanto os ratos do grupo D tratado com insulina, apesar de serem manipulados todos os dias e de receberem injeções de insulina, não exibiram tal comportamento. Padrão de comportamento semelhante foi observado por outros autores¹⁶.

O diabetes agudo não levou a alterações no peso e na área do duodeno, enquanto outros autores verificaram, no diabetes crônico, dilatação do estômago, do intestino delgado e do intestino grosso^{2,4-7}.

Para avaliar as repercussões do diabetes agudo induzido por estreptozotocina sobre a população total de neurônios empregamos a técnica imunohistoquímica anti-HuC/HuD, uma vez que as proteínas HuC/HuD são encontradas exclusivamente em neurônios^{22,26,27}, e também porque a avaliação dessa técnica em preparados de membrana demonstrou-se eficaz para a estimativa do número total de neurônios do plexo mioentérico²².

Uma vez estabelecida a densidade de neurônios HuC/HuD foi possível avaliar a representatividade das sub-populações de neurônios NADHd+ e de neurônios nitrérgicos. Os neurônios que sintetizam óxido nítrico compõem uma fração significativa da população

neuronal mioentérica nos diferentes segmentos do tubo digestivo, e podem ser visualizados pelo emprego da histoquímica da NADPH-d²⁸⁻³² e pela imunohistoquímica nNOS¹⁰⁻¹².

Os animais dos grupos D e T possuíam densidade de neurônios HuC/HuD 18,60% e 19,77% menor que os do grupo C, demonstrando que o diabetes agudo provocou uma perda significativa de neurônios mioentéricos e que o tratamento com insulina não foi capaz de prevenir tal perda. Redução na densidade total de neurônios do plexo mioentérico do colo de ratos com diabetes agudo foi também verificada pela marcação neuronal, pela técnica histoquímica de Giensa¹⁶.

Nos animais do grupo C a densidade de neurônios nitrérgicos (nNOS) positivos representou 30,88% da densidade de neurônios HuC/HuD; no grupo D representou 34,67%; e no grupo T, 35,68%, enquanto em estudo realizado no íleo de ratos os neurônios nitrérgicos representaram 20,31% da população total, marcada com a técnica de Giensa²⁸.

A densidade de neurônios nNOS dos grupos D e T apresentou-se 8,62% e 7,30% menor que a densidade do grupo C. Essa diferença não tem significância estatística. Por outro lado, a densidade de neurônios HuC/HuD dos dois grupos diabéticos foi quase 20% menor que a do grupo controle, o que evidencia que os neurônios nitrérgicos são menos sensíveis ao diabetes agudo que outras sub-populações neuronais. Não foram também encontradas alterações significantes na expressão da nNOS no duodeno de ratos com diabetes crônico¹⁰. Os resultados de várias investigações têm demonstrado que os neurônios nitrérgicos são resistentes a agressões ambientais, tais como excitotoxicidade, hipóxia, doença de Huntington e envelhecimento³¹.

Outros estudos, porém, demonstram redução do número de neurônios nitrérgicos no intestino delgado e grosso de ratos com diabetes crônico¹⁷ e na atividade motora dependente de NO, em estômago de roedores com diabetes crônico^{10,33,34}.

A marcação neuronal pela histoquímica da NADHd é amplamente empregada em estudos de neurônios entéricos^{22,23,34}. Evidencia os neurônios devido à formação de grânulos de formazana a partir da atuação de um aceptor artificial de elétrons, o Nitro Blue Tetrazolium, o que nos permite avaliar a atividade respiratória dos neurônios, por fornecer indícios de sua atividade metabólica^{18, 28,35,36}.

Ao calcularmos os percentuais de neurônios NADHd positivos em relação aos neurônios HuC/HuD, temos uma idéia de qual é a proporção de neurônios NADHd positivos em relação à população total de neurônios mioentéricos do duodeno, e também se essa subpopulação foi afetada da mesma maneira que a população total ou de neurônios nNOS. As proporções encontradas foram as seguintes: Grupo C, 42,89%; grupo D, 68,40%; grupo T, 83,57%. No íleo de ratos, os neurônios NADHd positivos representavam 69,18% da população total, evidenciada com a técnica de Giemsa²⁸. Em estudos realizados no colo proximal de ratos constatou-se 58,13% de neurônios mioentéricos NADHd positivos nos animais normoglicêmicos, e 66,56% nos animais com diabetes agudo, enquanto a população total de neurônios dos animais diabéticos sofreu uma redução de 10,30%¹⁶.

Uma possível explicação para o aumento na densidade e na proporção de neurônios NADHd positivos verificada nos grupos D e T é oferecida por autores que atribuem o aumento na relação NADH/NAD⁺ aos elevados níveis glicêmicos^{37,38} e suas conseqüências vasculares¹³ e metabólicas, o que influencia a atividade das enzimas que usam esses cofatores³⁹. Dessa forma, o diabetes agudo, ao mesmo tempo que leva à perda de parte da população total de neurônios (neurônios HuC/HuD), provocaria uma intensificação na atividade da cadeia respiratória e de suas enzimas, o que explicaria uma maior disponibilidade de elétrons para serem captados pelo nitroblue tetrazolium, o qual origina os grânulos de formazana a partir de sua atuação como aceptor artificial de elétrons.

Em síntese, todos os animais do grupo D apresentaram-se agressivos e tiveram perda de peso corporal superior à média de perda do grupo C. Entre os 10 animais do grupo T, três sofreram pequena perda de peso corporal, assemelhando-se a perda sofrida pelo grupo C. A proporção de gordura retroperitoneal e epididimal por 100g de peso corporal foi significativamente maior nos animais do grupo T do que no grupo D demonstrando que a insulina, devido a sua ação anabólica e poupadora de energia, levou a manutenção de uma maior proporção de gordura nos animais do grupo diabético tratado com insulina.

Os animais dos grupos D e T, sofreram redução significativa na densidade de neurônios HuC/HuD e não apresentaram alteração significativa na densidade de neurônios nNOS, o que evidencia que o tratamento com insulina não previne a perda precoce de neurônios HuC/HuD no plexo mioentérico do duodeno de ratos diabéticos. A maior densidade de neurônios NADHd positivos nos animais dos grupos D e T indicam que na fase aguda o diabetes leva a um aumento na atividade de enzimas da cadeia respiratória destes neurônios intensificando a sua evidenciação. Por outro lado o número de neurônios nNOS positivos não sofre alterações significante no diabetes agudo com ou sem tratamento com insulina demonstrando sua maior resistência a esta condição em relação a outras populações neuronais.

Referências Bibliográficas

1. McCulloch DK. Definition and classification of diabetes mellitus. Up to date in endocrinology and diabetes 2003; 11(2): 1-13.
2. Furness JB, Costa M. The enteric nervous system. New York: Churchill Livingstone; 1987.
6. Wood JD, Alpers DH, Andrews PL. Fundamentals of neurogastroenterology. Gut 1999; 45(2): 6-16.
3. Wood JD, Alpers DH, Andrews PL. Fundamentals of neurogastroenterology. Gut 1999; 45(2): 6-16.
4. De Giorgio R, Camilleri M. Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. Neurogastroenterology and Motility 2004; 16(5): 515.
5. Zanoni JN, Hernandez L, Bazotte RB, Miranda Neto MH. Terminal ileum submucous plexus: study of the VIP-ergic neurons of diabetic rats treated with ascorbic acid. Arq Neuropsiquiatr 2002; 60: 32-37.
6. Bytzer P, Talley NJ, Leemon M et al. Prevalence of Gastrointestinal symptoms associated with diabetes mellitus: a population-based survey of 15,000 adults. Arch Intern Med 2001; 161: 1989-1996.
7. Belai A, Lincoln J, Milner P, Burnstock G. Progressive changes in adrenergic, serotonergic, and peptidergic nerves in proximal colon of streptozotocin-diabetic rats. Gastroenterology 1988; 95: 1234-1241.
8. Chandrasekharan B, Srinivasan S. Review Article: Diabetes and the enteric nervous system. Neurogastroenterol Motil 2007; 19: 951-960.
9. Shotton HR, Lincoln J. Diabetes only affects nitric oxide synthase-containing myenteric neurons that do not contain heme oxygenase 2. Brain Res 2006; 1068: 248-256.

10. Wrzos HF, Cruz A, Polavarapu R, Shearer D, Ouyang A. Nitric oxide synthase (NOS) expression in the myenteric plexus of streptozotocin-diabetic rats. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 2106-2110.
11. Jeyabal PVS, Kumar R, Gangula PRR, Micci MA, Pasricha PJ. Inhibitors of advanced glycation end-products prevent loss of enteric neuronal nitric oxide synthase in diabetic rats. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 253-261.
12. Shotton HR, Adams A, Lincoln J. Effect of aminoguanidine treatment on diabetes-induced changes in myenteric plexus of rat ileum. *Auton Neurosci* 2007; 132: 16-26.
13. Shotton HR, Broadbent S, Lincoln J. Prevention and partial reverse of diabetes-induced changes in enteric neurons of the rat ileum by combined treatment with alpha-lipoic and evening primrose oil. *Auton Neurosci* 2004; 111: 57-65.
14. Zanoni JN, Freitas P, Pereira RVF, Pereira MAS. Effects of supplementation with ascorbic acid for a period of 120 days on the myosin-V and NADPHd positive myenteric neurons of the ileum of rats. *Anat Histol Embryol* 2005; 34: 149-153.
15. Adeghate E, al-Ramadi B, Saleh AM, Vijayarasathy C, Ponery AS, Arafat K, Howarth FC, el-Sharkawy T. Increase in neuronal nitric oxide synthase content of the gastroduodenal tract of diabetic rats. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(6): 1172-1179.
16. Furlan MM, Molinari SL, Miranda Neto MH. Morphoquantitative effect of acute diabetes on the proximal colon of adult rats. *Arq Neuropsiquiatr* 2002; 60: 576-581.
17. Izbéki F, Wittman A, Rosztóczy N, Linke N, Bódi É, Fekete M, Bagýanszki M. Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations and loss of nitrergic neurons in the ileum and colon of rats with streptozotocin-induced diabetes *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 80:192-198.

18. Pereira MAS, Bagatin MC, Zanoni JN. Effects of the ascorbic supplementation on NADH-diaphorase myenteric neurons in the duodenum of diabetic rats. *Biocell* 2006; 30(2): 295-300.
19. Hernandez L, Bazotte RB, Gama P, Miranda-Neto MH. Streptozotocin-induced diabetic duration is important to determine changes in the number and basophilia of myenteric neurons. *Arq Neuropsiquiatr* 2000; 58: 1035-1039.
20. Bergmeyer HE; Bernet E. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase. New York: Methods of enzymatic analysis; 1974.
21. Stefanini M, De Martino C, Zamboni L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 1967; 216: 173-174.
22. Lin Z, Gao N, Hu HZ, Liu S, Gao C, Kim G, Ren J, Xia Y, Peck OC, Wood JD. Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol* 2002; 14: 197-204.
23. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969; 48: 2129-2139.
24. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. *Patologia estrutural e funcional*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 1996; 1227p.
25. Genuth S. Hormônios das ilhotas pancreáticas. In: Berne RM., Levy MN (Eds.), *Fisiologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2000; pp. 774-797.
26. Dalmau J, Furneaux HM, Cordon-Cardo C, Posner JB. The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuropathy) antigen in human normal and tumor tissue. *Am J Pathol* 1992; 141: 881-886.
27. Graus F, Cordon-Cardo C, Posner JB. Neuronal antinuclear antibody in sensory neuropathy from lung câncer. *Neurology* 1985; 35: 538-543.

28. De Miranda Neto MH, Molinari SL, Natali MR, Sant'Ana DM. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of the neuronal evidentiatio. *Arq Neuropsiquiatr* 2001; 59: 54-59.
29. Johnson RJR, Shemann M, Santer RM, Cowen T. The effects of age on the overall population and on sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J Anat* 1998; 192: 479-488.
30. Belai A, Cooper S, Burnstock G. Effect of age on NADPH-diaphorase-containing myenteric neurons of rat ileum and proximal colon. *Cell Tissue Res* 1995; 279: 379-383.
31. Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7797-7801.
32. Koy JY, Peters S, Choi DM. Neurons containing NADPH-diaphorase are selectively resistant to quinolinate toxicity. 1986; 234: 73-76.
33. Takahashi T, Nakamura K, Itoh H, Sima AAF. Impaired expression of oxide synthase in the gastric myenteric plexus os spontaneously rats. *Gastroenterology* 1997; 113: 1535-1544.
34. Jenkinson KM, Reid JJ. Altered non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in gastric fundus from streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2000; 401: 251-258.
35. Young HM, Furness JB, Sewell P, Burcher EF, Kandiah CJ. Total numbers of neurons in myenteric ganglia of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1993; **272**: 197-200.
36. Gabella G. Detection of nerve cells by histochemical technique. *Experientia* 1969; 25: 218-9.
37. Van den Enden MK, Nyengaard JR, Ostrow E, Burgan JH, Williamson JR. Elevated glucose levels increase retinal glycolysis and sorbitol pathway metabolism; implications for diabetic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 1675-85.

38. Ferraz M, Brunaldi K, Oliveira CE, Bazotte RB. Hepatic glucose production from L-alanine is absent in perfused liver of diabetic rats. *Res Commun Molec Pathol Pharmacol* 1997; 95: 147-56.
39. Stevens MJ, Feldman EL, Greene DA. The aetiology of diabetic neuropathy: the combined roles of metabolic and vascular defects. *Diabetic Med* 1995; **12**: 566-579.

Tabela 1. Anticorpos primários e secundários utilizados nas imunoreações para HuC/HuD e nNOS

Primário	Hospedeiro	Dose	Empresa	Secundário	Dose	Empresa
HuC/HuD	Camundongo	1:500	Molecular Probes, Invitrogen	Alexia 488 anticamundongo	Flúor 1:500	Molecular Probes, Invitrogen
nNOS	Coelho	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA	Alexia 488 Anticoelho	Flúor 1:500	Molecular Probes, Invitrogen

Tabela 2 – Parâmetros encontrados em ratos Wistar machos, com 210 dias de idade, pertencentes ao grupo controle (C) e aos grupos com diabetes agudo sem tratamento (D), tratados com insulina NPH subcutânea (T). (n = 10 ratos por grupo). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.

Parâmetros/grupos	Grupo C	Grupo D	Grupo T
Peso inicial (g)	430,0±15,38	450,0±29,10	451,0±25,16
Peso final (g)	410,4±13,92	391,35±39,28	384,80±40,45
Perda de peso corporal (%)	4,50±0,93	13,06±4,38 ^A	14,57±8,55 ^A
Área do duodeno (fresco)	11.37±0.48	12.36±0.87	12.15±0.69
Área do duodeno (fixado)	12.97±2.21	13.10±1.80	13.31±2.03
Gordura visceral por 100g de peso corporal	2,89±0,45	2,69±0,45 ^B	3,58±0,64 ^C
Consumo de alimento por 100g de peso corporal	7,30±1,31	6,98±1,13	6,16±1,40
Consumo de água por 100g de peso corporal	10,91±2,01	21,32±4,91 ^D	19,57±5,26 ^D
Volume urinário por 100g de peso corporal	1,83±0,80	11,07±3,42 ^D	9,14±4,1 ^D
Glicemia (mg.dl ⁻¹)	135,4±33,90	315,2±69,60 ^D	355,9±70,89 ^D

^Ap<0.01 em relação ao grupo C

^Bp<0.01 em relação ao grupo T

^Cp<0.05 em relação ao grupo C

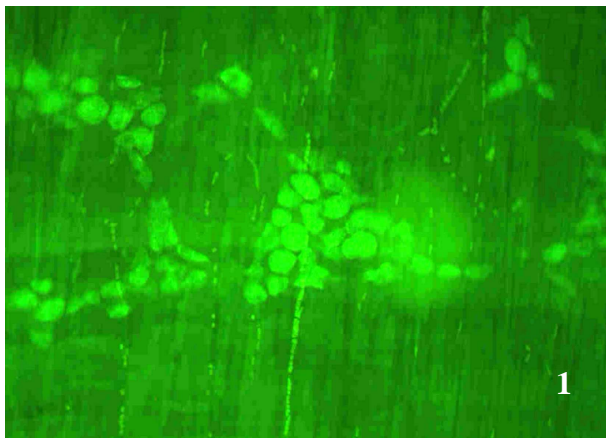
^Dp<0.001 em relação ao grupo C

Tabela 3 – Densidade (neurônios/11,07mm²) de neurônios reativos às técnicas imunohistoquímica HuC/HuD, nNOS e histoquímica NADHd, do plexo mioentérico do duodeno de ratos adultos submetidos ao diabetes agudo experimental. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.

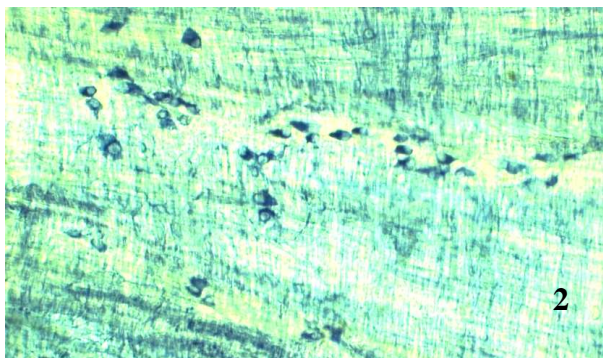
Técnica	Grupos	Densidade
HU	Controle (n=5)	1472,80±179,14
	Diabético (n=5)	1198,80±237,24 ^A
	Tratado (n=5)	1181,60±179,53 ^A
NADH	Controle (n=5)	631,80±5,18
	Diabético (n=4)	820,0±8,13 ^A
	Tratado (n=4)	987,5±19,69 ^{AB}
NOS	Controle (n=5)	454,80±59,41
	Diabético (n=5)	415,60±109,30
	Tratado (n=5)	421,60±48,22

^Ap<0,001 em relação ao grupo C

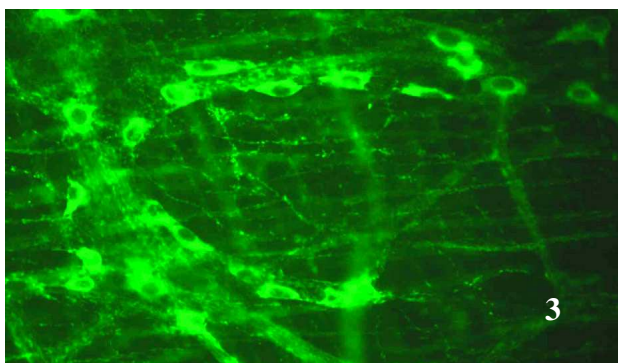
^Bp<0,001 em relação ao grupo D



Neurônios imunoreativos à técnica HuC/HuD (20X)



Neurônios imunoreativos à técnica NADH-d (20X)



Neurônios imunoreativos à técnica nNOS (20X)

**EFFECTS OF INSULIN TREATMENT ON HuC/HuD, NADH DIAPHORASE AND
nNOS-POSITIVE MYOENTERIC NEURONS OF THE DUODENUM OF ADULT
RATS WITH ACUTE DIABETES**

Sônia Trannin de Mello¹, Marcílio Hubner de Miranda Neto¹, Jacqueline Nelisis Zanon¹,
Maria Montserrat D. P. Furlan¹

¹Department of Morphophysiological Sciences, Laboratory of Enteric Neurons, State
University of Maringá, Avenida Colombo, nº 5790 Bloco H-79 – CEP 87020-900, Maringá,
PR, Brazil.

Corresponding author: Phone: +55 (44) 3261-4708; +55 (44) 8402-5110; Fax: +55 (44) 3261-
4340; E-mail: stmello@uem.br

ABSTRACT

We carried out this investigation with the purpose of verifying if insulin treatment prevents changes in the density of myoenteric neurons of the duodenum of Wistar rats with streptozotocin short-term diabetes. The animals from the diabetic group (D) lost weight more than the controls (group C), while insulin treatment (group T) prevented the weight loss in three animals and increased visceral fat in all the animals of this group. Insulin treatment did not prevent the early loss of HuC/HuD myoenteric neurons. The density of nNOS-positive neurons did not change significantly in groups D and T. The density of NADHd-positive neurons in these groups was greater than in group C, indicating that short term diabetes increases the activity of respiratory chain enzymes.

KEY WORDS: myoenteric neurons, acute diabetes, duodenum, nNOS, NADHd

Introduction

The word diabetes describes several metabolic syndromes connected to the relative or absolute reduction in insulin secretion and characterized by hyperglycemia and varied degrees of peripheral resistance to insulin action¹.

The ENS has a unique capacity of controlling most of the intestinal functions, such as regulation of absorption/secretion and control of the motility and vascular tonus; it is not surprising that injuries to it result in digestive disorders and disturbances^{2,3}.

The combination of intracellular signaling disorders⁴ with quantitative and neurochemical changes of the ENS neurons can be related to the neuronal loss and relevant clinical problems of the neurological manifestations of diabetes mellitus, such as dilatation of the stomach, small and large intestines, constipation and diabetic diarrhea^{2,4-7}.

Histochemical and electrophysiological features show that the 80-100 millions of enteric neurons can be classified into distinct subpopulations of primary afferent neurons, interneurons, motor neurons, secretomotor neurons and vasomotor neurons³.

The neuronal subpopulations are affected differently by diabetes according to the intestinal segment⁸⁻¹⁰, as well as the distinct ways of diabetes treatment and duration¹¹⁻¹⁶. Previous studies have shown reduction in the number of enteric neurons¹⁶⁻¹⁹.

Based on the total population and on neuronal subpopulations with their different functions on the ENS, we carried out this work with the purpose of investigating, on the duodenum of rats, the effects of acute experimental diabetes and of insulin treatment on the following parameters: 1) total density of myoenteric neurons – HuC/HuD; 2) density of the subpopulation of nitrenergic neurons – nNOS; 3) density of the subpopulation of NADH diaphorase-positive neurons.

Materials and methods

Study groups

All experimental procedures described in this paper are in agreement with ethical principles stated by the Brazilian Academy of Animal Experimentation (COBEA) and were previously submitted to analysis by the Committee of Ethics in Animal Experimentation of the State University of Maringá (UEM) (Protocol N. 006/2005).

It was used 30 male Wistar rats aging seven months, supplied by the Central Animal House of UEM; these were divided in three groups: control (C), diabetic (D), and insulin-treated diabetic (T). The animals were placed in individual metabolic cages and kept at constant temperature and 12/12 hr photoperiod for seven days with free access to water and NUVILAB rodent chow.

On the first experimental day, after overnight fast, the rats from groups D and T received an i.v. injection of streptozotocin (Sigma, St. Louis, MO, USA) for diabetes induction (35 mg/kg body weight), dissolved in citrate buffer pH 4.5 (10mM). The controls received an equal volume of the buffer. After induction, the plasma glucose level of the animals was determined by the method of glucose oxidase²⁰ in order to confirm the establishment of the experimental model. All animals of groups D and T presented glucose levels higher than 210 mg/dL.

During the next five days, group T received every morning a subcutaneous injection of NPH insulin (Novolin[®] N. Novo Nordisk A/S. Denmark) dissolved in saline (0.9%) at the dose of 10U/kg body weight. Body weight, food and water ingestion and urine volume were recorded daily.

On the sixth day, insulin injection in group T was interrupted and all the animals were fasted overnight. Next morning the animals were killed after being weighted and anesthetized with a 40mg/kg body weight i.p. dose of thiopental (Abbott Labs., Chicago, IL, USA).

Through cardiac puncture, blood was collected for determination of fasting plasma glucose level and then laparotomy was carried out for collection of the duodenum and of both periepididymal and retroperitoneal fat pads. These pads were weighted and corrected for 100g body weight. The duodenum was removed with the pylorus and the duodenojejunal flexure being taken as its limits. The duodenal length and width were then measured.

Duodenal preparation and neuronal staining

The duodena were prepared for the histochemical technique of NADH-diaphorase, immunohistochemistry anti-HuC/HuD – which labels structural proteins present in all neurons – and immunohistochemistry anti-neuronal nitric oxide synthase (nNOS). The samples subjected to immunohistochemical techniques were washed in PBS pH 7.4 (0.1M), filled with Zamboni fixative²¹ and maintained for 18 hours in the same solution under refrigeration. At the end of this period, the segments were cut along the mesenteric border and successively washed in alcohol 80% until the visible removal of the fixative. Then, they were dehydrated in alcohol (95% and 100%), clarified in xylol, hydrated again in decreasing series of alcohol (100%, 90%, 80%, 50%) and, finally, put in PBS 0.1M. Later, the segments were dissected to obtain the whole-mount muscular layer preparations and immunostained as follows:

- *HuC/HuD*²²: The whole mounts were washed twice (10 min each wash) in PBS 0.1M added with Triton X-100 0.5% (Sigma, St, Louis, MO, USA). Then, they were incubated in BSA (1% PBS 0.1M) and remained in this solution for one hour at room temperature.

The whole mounts were incubated in anti-HuC/HuD primary antibody (Table 1) diluted in solution containing BSA 1%, Triton X-100 0.5% and PBS 0.1M for 48 hours at room temperature. They were washed three times in PBS and incubated with the secondary antibody (Table 1) for 2 hours at room temperature. Then, they were washed three successive

times in PBS, mounted in slide with buffered glycerol (9:1) and stored at the refrigerator. Negative control was performed with the omission of the primary antibody.

- *nNOS*¹⁰: The preparations were initially washed three times in PBS solution of Triton X-100 0.5%. Soon afterwards, they were incubated in BSA (1% in PBS) for one hour. Once blocked, the tissues were incubated for 48 hours at room temperature in *nNOS*-specific primary antibody (Table 1). The tissues were washed three times in PBS and incubated with the secondary antibody (Table 1) for two hours at room temperature. After, they were washed three successive times in PBS. Negative control was performed with the omission of the primary antibody.

For NADH diaphorase histochemistry, the duodena were ligated at one end and injected with Krebs solution, immersed for 5 min in Triton X-100 0.3% solution, next washed twice in Krebs solution. Then, they were immersed in solution containing β -NADH (Sigma, St. Louis, MO, USA) and Nitro Blue Tetrazolium (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 45 minutes. The reaction was interrupted with buffered formol. The duodenal rings were dissected to whole mounts under stereomicroscope. They were dehydrated, cleared and mounted between slide and coverslip. The reaction product of the NADHd appears as varied shades of blue/purple.

Quantitative analysis of the HuC/HuD, nNOS-immunoreactive and NADHd-positive myoenteric neurons.

The counts of the HuC/HuD, *nNOS*-immunoreactive and NADHd-positive myoenteric neurons were carried out through images obtained by sampling. The images were captured by a high-resolution AxioCam camera (Zeiss, Jena, Germany) coupled to an Axioskop Plus light microscope (Zeiss), transferred to a computer through the AxioVision 4 program, version 4.1, and recorded in CD. The software of image analysis Image-Pro Plus, version 4.5.0.29 (Media

Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), was used to count the neurons of the CD-recorded images.

For each animal, all the neurons present in 30 images, captured under 20X objective, were counted. The area of each image measured with Image-Pro Plus was 0.369 mm², yielding 11.07 mm².

Statistical analysis.

The results were subjected to statistical analyses through the programs Statistica and GraphPad Prism, being expressed as mean \pm standard deviation. Quantitative data were set in delineation blocks followed by Tukey's test. For the other results, one-way ANOVA was used, followed by Tukey's test. Significance level was set at 5%.

Results

On the day after streptozotocin injection, water ingestion and urine volume per 100g body weight in the animals of group D were 17.11 mL and 6.17 mL, while in group T they were 15.84 mL and 7.89 mL, respectively. These values were markedly higher than those of group C – 10.46 mL of water and 1.39 mL of urine – indicating the presence of diabetes in groups D and T.

During the experiment, polydipsia and polyuria were added to the significant weight loss in groups D and T; at the end of the period, hyperglycemia confirmed the diabetic condition.

The mean food consumption of group C was slightly higher than that of groups D and T, yet not significantly different. On the other hand, the amount of retroperitoneal and periepididymal fat was higher in group T (Table 2). The duodenal area did not show significant difference among the groups (Table 2).

The animals from group D displayed an aggressive behavior, while those of group T did not exhibit such feature.

In the three groups the ganglia of the myoenteric plexus, made up of several densely packed neuronal cell bodies, were seen both with the HuC/HuD immunohistochemistry (10 to 93 neurons per field) and the NADHD histochemistry (5 to 74 neurons per field) (Figs 1 and 2).

In the whole mounts stained with nNOS immunohistochemistry, both cell bodies and neuronal processes were stained. Isolated neurons and ganglia with few scattered neurons (2 to 32 neurons per field) were found (Fig. 3).

The quantitative analysis of the neurons stained with HuC/HuD demonstrated a significant reduction in the number of neurons in the animals of groups D and T. With nNOS, there was no significant difference in the number of neurons stained in the three groups. NADHD histochemistry evidenced a neuronal density significantly higher in the animals of groups D and T when compared to group C (Table 3).

Discussion

Streptozotocin injection quickly leads to the appearance of symptoms characteristic of diabetes. In a few hours, increased glycemia and decreased serum and pancreatic insulin content are observed²³. In this study, one day after streptozotocin injection, large changes in the volume of both ingested water and excreted urine were observed in groups D and T, followed by weight loss and hyperglycemia. These symptoms result from the metabolic alterations caused by the absence/insufficiency of insulin and the changes in cellular functioning due to hyperglycemia²³⁻²⁴.

We believe that the slight body weight loss seen in the animals of group C is due to the stress caused by their handling during the experimental period. On the other hand, the more

intense weight loss of the animals of groups D and T would be related to the pathophysiological changes of diabetes. Although there were not significant differences between the average weight losses of groups D and T, it should be pointed out that all the diabetic animals had weight losses higher than the mean of group C, while three animals of group T had values within the confidence interval of group C. This reveals that the response to insulin treatment, at this acute phase, is heterogeneous, and that the mean of the group does not express the responses of all the individuals.

The proportion of retroperitoneal and periepididymal fat per 100g body weight was significantly higher in the rats of group T. This, in addition to the fact that three rats of group T had a smaller weight loss, similar to the mean of group C, prompted us to speculate that uncontrolled diabetes (group D) caused body mass mobilization so that energy substrates were supplied to the glucose-deprived cells and to the gluconeogenic pathways²⁵, without however exhausting lipid stores. On the other hand, the greater proportion of fat found in the animals of group T is possibly related to the fact that insulin is an essentially anabolic, energy store-sparing hormone^{24,25}. This idea is reinforced when we analyze each animal individually, once the animal from group D that lost more weight (20.76%) had 1.8g of this fat per 100g of body weight, while the diabetic animal treated with insulin that lost more weight (25.99%) had 2.83g of fat/100g body weight.

The untreated diabetic rats were aggressive, while those treated with insulin, despite being handled and receiving insulin injections every day, did not show such a behavior. A similar behavioral pattern was observed in a previous work¹⁶.

Acute diabetes did not cause changes of duodenal area, while other authors observed, in chronic diabetes, dilatation of the stomach, small and large intestines^{2,4-7}.

To assess the outcomes of acute streptozotocin-induced diabetes on the total population of enteric neurons, it was employed the anti-HuC/HuD immunohistochemical

technique, once the HuC/HuD proteins are found exclusively in neurons^{22,26-27}, and also because it was demonstrated that the employment of this technique in whole mounts is effective in the estimation of the total number of neurons of the myoenteric plexus²².

Once the HuC/HuD neuronal density was established, it was possible to evaluate the representativeness of the NADHd+ and nitrenergic neuronal subpopulations. The nitric oxide-synthesizing neurons make up a significant fraction of the myoenteric neuronal population in the different segments of the digestive tract and can be visualized by the use of NADPHd histochemistry²⁸⁻³² and nNOS immunohistochemistry¹⁰⁻¹².

The animals of groups D and T had a density of HuC/HuD-neurons 18.60% and 19.77% lower, respectively, than those of group C, demonstrating that acute diabetes caused a significant decrease of myoenteric neurons and that insulin treatment was not capable of preventing this loss from taking place. A decrease in the total density of neurons of the myoenteric plexus of the colon of rats with acute diabetes was also verified through neuronal staining with Giemsa histochemistry¹⁶.

In the animals of group C, the density of nitrenergic (nNOS) positive neurons represented 30.88% of the density of HuC/HuD neurons, in group D it represented 34.67% and in group T 35.68%, while in a study of the ileum of rats the nitrenergic neurons represented 20.31% of the total population, stained with Giemsa²⁸.

The density of nNOS neurons of groups D and T was 8.62% and 7.30% lower than that of group C, a difference that did not attain statistical significance. On the other hand, the density of HuC/HuD neurons of both diabetic groups was almost 20% lower than the control group, evidencing that the nitrenergic neurons are less sensitive to acute diabetes than other neuronal subpopulations. Significant changes were not found either in the expression of nNOS in the duodenum of rats with chronic diabetes¹⁰. The results of several investigations

have demonstrated that the nitrergic neurons are resistant to environmental aggressions such as excitotoxicity, hypoxia, Huntington's disease and aging²⁹⁻³¹.

Other studies, however, demonstrate reduction in the number of nitrergic neurons in the small and large intestines of rats with chronic diabetes¹⁷ and in the NO-dependent motor activity in the stomach of rodents having chronic diabetes^{10,33-34}.

The neuronal staining by NADHd histochemistry is widely employed in studies of enteric neurons^{22,23,34}. It stains neurons due to the formation of formazan granules from an artificial electron acceptor, nitro blue tetrazolium. Therefore, it allows the assessment of the respiratory activity of the neurons, providing clues to their metabolic activity^{18,28,35-36}.

When approaching the NADHd-positive neurons as percentages of HuC/HuD neurons, we get a glimpse of the proportion of NADHd-positive neurons relative to the total population of duodenal myoenteric neurons, and also whether this subpopulation was affected in the same way as the total population or as that of nNOS neurons. The percentages found were the following: group C 42.89%; group D 68.40%; group T 83.57%. In the ileum of rats, the NADHd-positive neurons represented 69.18% of the total, Giemsa-stained, population³⁹. In studies carried out in the proximal colon of rats, it was recorded 58.13% of NADHd-positive myoenteric neurons in normoglycemic animals and 66.56% in animals with acute diabetes, while the total population of neurons of the diabetic animals had a reduction of 10.30%¹⁶.

A possible explanation for the increase in both the density and proportion of NADHd-positive neurons observed in groups D and T is offered by authors who attribute the increase in the NADH/NAD⁺ ratio to the high plasma glucose levels^{37,38} and its vascular¹³ and metabolic consequences, which influence the activity of enzymes using those cofactors⁴⁰. In this way, acute diabetes, at the same time that leads to loss of a fraction of the total population of neurons (HuC/HuD neurons) would heighten the activity of the respiratory chain and its

enzymes, resulting in a greater availability of electrons to be transferred to nitro blue tetrazolium, which turns into formazan granules when acting as an artificial electron acceptor.

In summary, all the animals from group D were aggressive and had body weight loss greater than the mean loss of group C. Among the 10 animals of group T, three had a small reduction of body weight, similar to that of group C. The proportion of retroperitoneal and epididymal fat per 100 g body weight was significantly higher in the animals of group T than in group D, demonstrating that insulin, due to its anabolic and energy-saving actions, led to a maintenance of the fat in the animals of the insulin-treated diabetic group.

The animals of groups D and T had a marked reduction in the density of HuC/HuD neurons and did not show a significant change in the density of nNOS neurons, evidencing that insulin treatment does not prevent the early loss of HuC/HuD neurons from the myoenteric plexus of the duodenum of diabetic rats. The greater density of NADHD-positive neurons in the animals from groups D and T indicate that acute diabetes increases the activity of respiratory chain enzymes on these neurons, heightening their staining. On the other hand, the number of nNOS-positive neurons does not change significantly in acute diabetes, either with or without insulin treatment, demonstrating their greater resistance to this condition as compared to other neuronal populations.

Bibliographic References

1. McCulloch DK. Definition and classification of diabetes mellitus. Up to date in endocrinology and diabetes 2003; 11(2): 1-13.
2. Furness JB, Costa M. The enteric nervous system. New York: Churchill Livingstone; 1987.
3. Wood JD, Alpers DH, Andrews PL. Fundamentals of neurogastroenterology. Gut 1999; 45(2): II6-II16.
4. De Giorgio R, Camilleri M. Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. Neurogastroenterology and Motility 2004; 16(5): 515.
5. Zanoni JN, Hernandez L, Bazotte RB, Miranda Neto MH. Terminal ileum submucous plexus: study of the VIP-ergic neurons of diabetic rats treated with ascorbic acid. Arq Neuropsiquiatr 2002; 60: 32-37.
6. Bytzer P, Talley NJ, Leemon M et al. Prevalence of Gastrointestinal symptoms associated with diabetes mellitus: a population-based survey of 15,000 adults. Arch Intern Med 2001; 161: 1989-1996.
7. Belai A, Lincoln J, Milner P, Burnstock G. Progressive changes in adrenergic, serotonergic, and peptidergic nerves in proximal colon of streptozotocin-diabetic rats. Gastroenterology 1988; 95: 1234-1241.
8. Chandrasekharan B, Srinivasan S. Review Article: Diabetes and the enteric nervous system. Neurogastroenterol Motil 2007; 19: 951-960.
9. Shotton HR, Lincoln J. Diabetes only affects nitric oxide synthase-containing myenteric neurons that do not contain heme oxygenase 2. Brain Res 2006; 1068: 248-256.
10. Wrzos HF, Cruz A, Polavarapu R, Shearer D, Ouyang A. Nitric oxide synthase (NOS) expression in the myenteric plexus of streptozotocin-diabetic rats. Dig Dis Sci 1997; 42: 2106-2110.

11. Jeyabal PVS, Kumar R, Gangula PRR, Micci MA, Pasricha PJ. Inhibitors of advanced glycation end-products prevent loss of enteric neuronal nitric oxide synthase in diabetic rats. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 253-261.
12. Shotton HR, Adams A, Lincoln J. Effect of aminoguanidine treatment on diabetes-induced changes in myenteric plexus of rat ileum. *Auton Neurosci* 2007; 132: 16-26.
13. Shotton HR, Broadbent S, Lincoln J. Prevention and partial reverse of diabetes-induced changes in enteric neurons of the rat ileum by combined treatment with alpha-lipoic and evening primrose oil. *Auton Neurosci* 2004; 111: 57-65.
14. Zanoni JN, Freitas P, Pereira RVF, Pereira MAS. Effects of supplementation with ascorbic acid for a period of 120 days on the myosin-V and NADPHd positive myenteric neurons of the ileum of rats. *Anat Histol Embryol* 2005; 34: 149-153.
15. Adeghate E, al-Ramadi B, Saleh AM, Vijayarasathy C, Ponery AS, Arafat K, Howarth FC, el-Sharkawy T. Increase in neuronal nitric oxide synthase content of the gastroduodenal tract of diabetic rats. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(6): 1172-1179.
16. Furlan MM, Molinari SL, Miranda Neto MH. Morphoquantitative effect of acute diabetes on the proximal colon of adult rats. *Arq Neuropsiquiatr* 2002; 60: 576-581.
17. Izbéki F, Wittman A, Rosztóczy N, Linke N, Bódi É, Fekete M, Bagýanszki M. Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations and loss of nitrergic neurons in the ileum and colon of rats with streptozotocin-induced diabetes *Diabetes Res Clin Pract* 2008.
18. Pereira MAS, Bagatin MC, Zanoni JN. Effects of the ascorbic supplementation on NADH-diaphorase myenteric neurons in the duodenum of diabetic rats. *Biocell* 2006; 30(2): 295-300.
19. Hernandez L, Bazotte RB, Gama P, Miranda-Neto MH. Streptozotocin-induced diabetic duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons. *Arq Neuropsiquiatr* 2000; 58: 1035-1039.

20. Bergmeyer HE; Bernet E. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase. New York: Methods of enzymatic analysis; 1974.
21. Stefanini M, De Martino C, Zamboni L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 1967; 216: 173-174.
22. Lin Z, Gao N, Hu HZ, Liu S, Gao C, Kim G, Ren J, Xia Y, Peck OC, Wood JD. Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol. Mot.* 2002; 14: 197-204.
23. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969; 48: 2129-2139.
24. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. *Patologia estrutural e funcional*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 1996; 1227p.
25. Genuth S. Hormônios das ilhotas pancreáticas. In: Berne RM., Levy MN (Eds.), *Fisiologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2000; pp. 774-797.
26. Dalmau J, Furneaux HM, Cordon-Cardo C, Posner JB. The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuropathy) antigen in human normal and tumor tissue. *Am J Pathol* 1992; 141: 881-886.
27. Graus F, Cordon-Cardo C, Posner JB. Neuronal antinuclear antibody in sensory neuropathy from lung câncer. *Neurology* 1985; 35: 538-543.
28. Miranda-Neto MH, Molinari SL, Natali MR, Sant'Ana DM. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of the neuronal evidentiatio. *Arq Neuropsiquiatr* 2001; 59: 54-59.
29. Johnson RJR, Shemann M, Santer RM, Cowen T. The effects of age on the overall population and on sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J Anat* 1998; 192: 479-488.

30. Belai A, Cooper S, Burnstock G. Effect of age on NADPH-diaphorase-containing myenteric neurons of rat ileum and proximal colon. *Cell Tissue Res* 1995; 279: 379-383.
31. Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7797-7801.
32. Koy JY, Peters S, Choi DM. Neurons containing NADPH-diaphorase are selectively resistant to quinolinate toxicity. 1986; 234: 73-76.
33. Takahashi T, Nakamura K, Itoh H, Sima AAF. Impaired expression of oxide synthase in the gastric myenteric plexus of spontaneously diabetic rats. *Gastroenterology* 1997; 113: 1535-1544.
34. Jenkinson KM, Reid JJ. Altered non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in gastric fundus from streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2000; 401: 251-258.
35. Gabella G. Detection of nerve cells by histochemical technique. *Experientia* 1969; 25: 218-9.
36. Young HM, Furness JB, Sewell P, Burcher EF, Kandiah CJ. Total numbers of neurons in myenteric ganglia of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1993; 272: 197-200.
37. Enden MK, Nyengaard JR, Ostrow E, Burgan JH, Williamson JR. Elevated glucose levels increase retinal glycolysis and sorbitol pathway metabolism; implications for diabetic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 1675-85.
38. Ferraz M, Brunaldi K, Oliveira CE, Bazotte RB. Hepatic glucose production from L-alanine is absent in perfused liver of diabetic rats. *Res Commun Molec Pathol Pharmacol* 1997; 95: 147-56.
39. Miranda Neto MH, Molinari SL, Natali MR, Sant'Ana DM. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of the neuronal identification. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001; 59:54-59.

40. Stevens MJ, Feldman EL, Greene DA. The aetiology of diabetic neuropathy: the combined roles of metabolic and vascular defects. *Diabetic Med* 1995; 12: 566-579.

Table 1. Primary and secondary antibodies used in the immunoreactions for HuC/HuD and nNOS.

Primary	Host	Dose	Company	Secondary	Dose	Company
HuC/HuD	Mouse	1:500	Molecular Probes, Invitrogen	Alexia Fluor 488 antimouse	1:500	Molecular Probes, Invitrogen
nNOS	Rabbit	1:500	Santa Cruz Biotechnology, California, EUA	Alexia Fluor 488 antirabbit	1:500	Molecular Probes, Invitrogen

Table 2. Parameters recorded in male Wistar rats aging 210 days, belonging to the control group (C), and to the groups with acute diabetes without treatment (D) or treated with subcutaneous NPH insulin (T). (n = 10 rats per group). The results are expressed as mean \pm standard deviation.

Parameters/group	Group C	Group D	Group T
Initial weight (g)	430.0 \pm 15.38	450.0 \pm 29.10	451.0 \pm 25.16
Final weight (g)	410.4 \pm 13.92	391.35 \pm 39.28	384.80 \pm 40.45
Body weight loss (%)	4.50 \pm 0.93	13.06 \pm 4.38 ^A	14.57 \pm 8.55 ^A
Duodenal area (fresh)	11.37 \pm 0.48	12.36 \pm 0.87	12.15 \pm 0.69
Duodenal area (fixed)	12.97 \pm 2.21	13.10 \pm 1.80	13.31 \pm 2.03
Visceral fat (g/100g body weight)	2.89 \pm 0.45	2.69 \pm 0.45 ^B	3.58 \pm 0.64 ^C
Food ingestion (g/100 g body weight)	7.30 \pm 1.31	6.98 \pm 1.13	6.16 \pm 1.40
Water ingestion (g/100 g body weight)	10.91 \pm 2.01	21.32 \pm 4.91 ^D	19.57 \pm 5.26 ^D
Urine volume (g/100 g body weight)	1.83 \pm 0.80	11.07 \pm 3.42 ^D	9.14 \pm 4.1 ^D
Plasma glucose (mg.dl ⁻¹)	135.4 \pm 33.90	315.2 \pm 69.60 ^D	355.9 \pm 70.89 ^D

^Ap<0.01 relative to group C

^Bp<0.01 relative to group T

^Cp<0.05 relative to group C

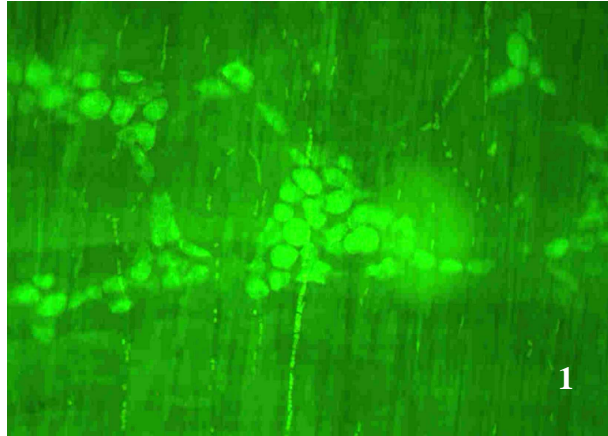
^Dp<0.001 relative to group C

Table 3. Density of neurons (neurons/11.07mm²) reactive to the HuC/HuD and nNOS immunohistochemical techniques and NADHd histochemistry of the myoenteric plexus of the duodenum of adult rats subjected to experimental acute diabetes. The results are expressed as mean \pm standard deviation.

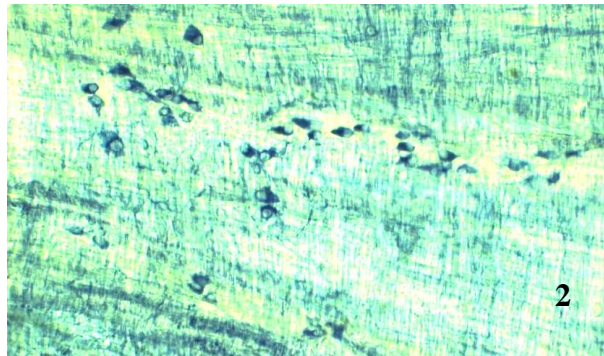
Technique	Group	Density
HU	Control (n=5)	1472.80 \pm 179.14
	Diabetic (n=5)	1198.80 \pm 237.24 ^A
	Treated (n=5)	1181.60 \pm 179.53 ^A
NADH	Control (n=5)	631.80 \pm 5.18
	Diabetic (n=4)	820.0 \pm 8.13 ^A
	Treated (n=4)	987.5 \pm 19.69 ^{AB}
NOS	Control (n=5)	454.80 \pm 59.41
	Diabetic (n=5)	415.60 \pm 109.30
	Treated (n=5)	421.60 \pm 48.22

^Ap<0.001 relative to group C

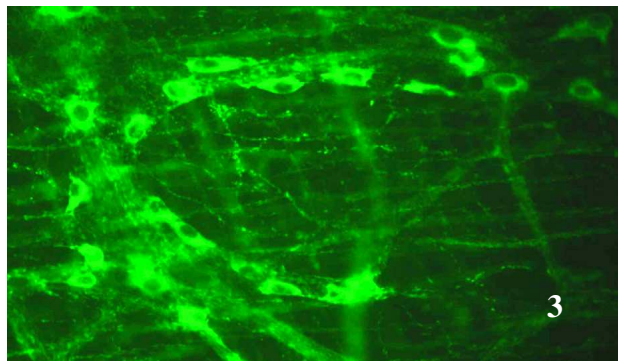
^Bp<0.001 relative to group D



**Neurons immunoreactive to the
technique of HuC/HuD (20X)**



**Neurons immunoreactive to the
technique of NADH-diaphorase (20X)**



**Neurons immunoreactive to the
technique of nNOS (20X)**

**ESTUDO MORFOMÉTRICO DOS NEURÔNIOS HuC/HuD e nNOS DO DUODENO
DE RATOS COM DIABETES AGUDO, TRATADOS COM INSULINA**

Sônia Trannin de Mello¹; Marcílio Hubner de Miranda Neto¹; Jacqueline Nelisis Zanoni¹;
Sonia Lucy Molinari¹

¹Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Laboratório de Neurônios Entéricos,
Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, nº 5790 Bloco H-79 – CEP 87020-900,
Maringá, PR, Brazil.

Endereço para correspondência. Telefone: +55 44 32614708; Fax: +55 44 32614340; E-mail:
stmello@uem.br

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo mensurar e comparar as áreas dos perfis celulares e nucleares dos neurônios do plexo mioentérico de ratos normoglicêmicos (C), diabéticos (D) e diabéticos tratados com insulina (T). Os neurônios foram evidenciados pelas técnicas imunohistoquímica da nNOS e HuC/HuD. As áreas dos perfis celulares dos neurônios HuC/HuD do plexo mioentérico dos animais do grupo D ($243,69 \pm 18,91 \mu\text{m}^2$) apresentaram-se significativamente menores do que as dos grupos C ($288,18 \pm 17,81 \mu\text{m}^2$) e T ($284,11 \pm 30,64 \mu\text{m}^2$). Os perfis dos núcleos dos neurônios nNOS dos animais do grupo D ($152,36 \pm 3,52 \mu\text{m}^2$) eram significativamente menores que o verificado nos grupos C ($178,29 \pm 9,0 \mu\text{m}^2$) e T ($163,47 \pm 5,50 \mu\text{m}^2$). Nota-se também que a relação núcleo/citoplasma foi mantida, ou seja, as áreas dos perfis dos núcleos, quando comparadas com as áreas dos perfis celulares, representavam: no grupo C, 53,74%; no grupo D, 51,94% e no grupo T, 54,12%. Discute-se que a síntese de proteínas é um processo que ocorre de maneira integrada entre núcleo e citoplasma, e que a falta aguda de insulina afeta simultaneamente esses dois compartimentos celulares dos neurônios nNOS.

PALAVRAS-CHAVE: perfil celular; relação núcleo/citoplasma; diabetes agudo; insulina; neurônios mioentéricos

Introdução

O Sistema Nervoso Entérico (SNE) localiza-se ao longo do trato gastrintestinal, controlando e coordenando motilidade, fluxo sanguíneo local e secreções. Constituído por, aproximadamente, 10^8 neurônios sensitivos, motores e interneurônios, distribui-se em dois grandes plexos – plexo mioentérico e plexo submucoso¹.

Pesquisas sobre as alterações induzidas pelo diabetes experimental no SNE são bastante amplas. Foi descrito, por exemplo, que 75% dos pacientes com diabetes apresentam sintomas gastrintestinais como náusea, dor abdominal, diarreia, constipação e esvaziamento gástrico lento².

Outros estudos acrescentam que grupos neuroquímicos específicos apresentam padrões de resposta ao diabetes que dependem do segmento intestinal e da duração do quadro diabético³⁻⁵.

O uso da estreptozotocina tem revelado que alguns nervos sofrem processo degenerativo, alguns têm seu conteúdo de neurotransmissores alterado mas sem evidências de degeneração, e outros não são afetados pela condição diabética⁶.

Tendo como base a população total e as sub-populações neuronais com suas diferentes funções no SNE, realizamos este trabalho com o objetivo de investigar, no duodeno de ratos, os efeitos do diabetes agudo experimental e do tratamento com insulina, sob os seguintes parâmetros: 1) morfometria dos neurônios do plexo mioentérico – HuC/HuD e 2) morfometria da sub-população de neurônios nitrérgicos do plexo mioentérico – nNOS.

Material e métodos

Grupos de estudo

Todos os experimentos descritos neste artigo estão de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram previamente submetidos à análise do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual e Maringá – UEM (Protocolo N. 006/2005).

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, com 7 meses de idade, obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, divididos em 3 grupos: grupo controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (T). Os animais foram alojados em gaiolas metabólicas individuais e mantidos em temperatura constante com foto-período de 12 horas. Aí permaneceram por 7 dias, recebendo água e ração NUVILAB *ad libitum*.

No primeiro dia do experimento, após jejum noturno, os ratos dos grupos D e T receberam injeção i.v. de estreptozotocina para indução do diabetes (35mg/kg peso corporal; Sigma, St. Louis, MO, USA), dissolvida em tampão citrato, pH 4.5 (10mM). Após a indução, a glicemia dos animais foi determinada pelo método da glucose oxidase⁷, para o estabelecimento do modelo experimental. Todos os animais dos grupos D e T apresentaram glicemia superior a 210 mg/dl. O grupo C recebeu volume equivalente de veículo.

Nos cinco dias subsequentes, o grupo T recebeu toda manhã injeção subcutânea de insulina NPH dissolvida em solução salina (0,9%), na dose de 10U/Kg (Novolin[®] N. Novo Nordisk A/S. Dinamarca). Foram mensurados diariamente o peso corporal, o consumo de alimento, de água, e o volume urinário eliminado.

No sexto dia suspendeu-se a injeção de insulina no grupo T e todos os animais foram colocados em jejum noturno; no sétimo dia do período experimental os animais foram mortos, previamente anestesiados com 40mg/kg de tiopental intraperitoneal (Abbott Labs., Chicago, IL, USA).

Por punção cardíaca, coletou-se sangue para avaliação da glicemia de jejum, e posteriormente realizou-se uma laparotomia para coleta dos duodenos e das gorduras

periepididimal e retroperitoneal. As gorduras foram pesadas e calculadas a proporção para cada 100 gramas de peso corporal. Os duodenos foram retirados, tomando-se como limites o piloro e a flexura duodenojejunal. Foram pesados, e a seguir mensurados seu comprimento e sua largura.

As amostras de duodenos submetidas às técnicas imunohistoquímica foram lavadas em PBS pH 7.4 (0.1M) e infladas com solução fixadora de Zamboni⁸. Logo depois, os duodenos foram mantidos por 18 horas sob refrigeração, na mesma solução. Ao final desse período os segmentos foram abertos ao longo da borda mesentérica e lavados sucessivamente com álcool 80% até a completa remoção do fixador. Na seqüência foram desidratados em série de álcoois (100%, 90%, 80%, 50%) e colocados em PBS 0.1M. Após, os segmentos foram dissecados para obtenção dos preparados de membrana.

Os duodenos foram preparados para a técnica imunohistoquímica anti HuC/HuD, que marca proteínas estruturais presentes em todos os neurônios, e imunohistoquímica anti-óxido nítrico sintase neuronal (nNOS):

- *HuC/HuD*⁹: Os preparados totais foram lavados duas vezes (10 minutos cada lavagem) em solução de PBS 0.1M acrescida de Triton X-100 (0.5%). Após, foram incubados em BSA (1% PBS 0.1M), permanecendo nessa solução por 1 hora, em temperatura ambiente.

Foram incubados em anticorpo primário anti-HuC/HuD (Tabela 1) diluído em solução contendo BSA 1%, Triton X-100 (0.5%) e PBS 0,1M, por 48 horas, em temperatura ambiente. Os tecidos foram lavados por três vezes em PBS e incubados com anticorpo secundário (Tabela 1) por 2 horas. Após foram lavados três vezes sucessivamente em PBS e montados em lâmina com glicerol tamponado (9:1) e armazenados em geladeira. Controle negativo foi realizado com a omissão do anticorpo primário.

- *nNOS*¹⁰: Os preparados foram lavados inicialmente três vezes em solução de PBS e Triton X-100 (0,5%). A seguir foram incubados em BSA (1% em PBS) durante 1 hora. Na

seqüência foram incubados por 48 horas, em temperatura ambiente, com anticorpo primário específico para nNOS (Tabela 1). Após esse período foram lavados por três vezes sucessivas em PBS e incubados com anticorpo secundário (Tabela 1) por 2 horas, em temperatura ambiente. Foram lavados novamente, por três vezes sucessivas, em PBS. Controle negativo foi realizado com a omissão do anticorpo primário.

Análise morfolométrica dos neurônios mioentéricos HuC/Hu e nNOS imunoreativos

A morfometria dos neurônios mioentéricos HuC/HuD e nNOS imunoreativos foi realizada por meio de imagens obtidas por amostragem. As imagens foram capturadas por uma câmera de alta resolução AxioCam (Zeiss, Jena, Alemanha) acoplada ao microscópio de luz Axioskop Plus (Zeiss), transferidas para um computador pelo programa AxioVision 4 versão 4.1 e gravadas em compact disc (CD). Software de análise de imagens Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) foi utilizado para a realização da morfometria neuronal nas imagens gravadas em CD.

Na técnica HuC/HuD foram medidos, para cada animal, os perfis dos corpos celulares de 100 neurônios presentes em 30 imagens. Nas técnicas nNOS foram medidos, para cada animal, os perfis dos corpos celulares de 100 neurônios e dos núcleos celulares de 100 neurônios presentes em 30 imagens. Todas as imagens foram capturadas em objetiva de 20X. A área de cada imagem mensurada no Image-Pro Plus foi de $0,369 \text{ mm}^2$, totalizando $11,07 \text{ mm}^2$.

Análise estatística

Resultados foram submetidos à análise estatística por meio dos programas Statistica e GraphPad Prism, expressos como média \pm desvio padrão. Os dados morfolométricos foram analisados em bloco, seguidos pelo teste de Tukey. Para os outros resultados usamos análise

de variância One-way ANOVA, seguidos do teste de Tukey. O nível de significância foi de 5%.

Resultados

No dia seguinte à injeção de estreptozotocina, o consumo de água e o volume urinário por 100g de peso corporal nos animais do grupo D foi 17,11 ml e 6,17 ml, enquanto no grupo T foi de 15,84 ml e 7,89 ml, respectivamente. Esses valores foram bem superiores ao verificado no grupo C, 10,46 ml de água e 1,39 ml de urina, indicando a instalação do quadro de diabetes nos grupos D e T (Tabela 2).

No decorrer do experimento, a polidipsia e a poliúria somaram-se à perda significativa de peso corporal nos grupos D e T, sendo que ao final do experimento a hiperglicemia confirmou a ocorrência do diabetes (Tabela 2).

Nos três grupos foram evidenciados gânglios do plexo mioentérico, constituídos por numerosos corpos de neurônios, densamente agrupados com a marcação neuronal para imunohistoquímica HuC/HuD (10 a 93 neurônios por campo).

Nos preparados de membrana submetidos a imunohistoquímica para nNOS foram marcados corpos celulares e processos neuronais. Foram encontrados neurônios isolados e gânglios com poucos neurônios, esparsamente distribuídos (2 a 32 neurônios por campo). A análise morfométrica dos neurônios marcados com a técnica HuC/HuD demonstrou redução significativa na área do perfil do corpo celular no grupo D, enquanto a área do perfil do corpo celular no grupo T permaneceu próxima dos valores da área do grupo C (Tabela 3).

Na imunohistoquímica para nNOS, os perfis das áreas dos corpos celulares e dos núcleos mostraram redução significativa nos animais do grupo D. (Tabela 3)

Discussão

A clássica polifagia verificada no diabetes crônico não ocorreu na situação de diabetes agudo do presente experimento. Acreditamos que nessa fase o organismo tenha se utilizado da mobilização de massa corporal dos tecidos de reserva para que substratos energéticos fossem supridos as células carentes de glicose e as vias neoglicogênicas, o que é evidenciado pela perda de peso dos animais¹¹⁻¹². Em diversos experimentos realizados por nosso grupo de pesquisa e por outros pesquisadores foi verificada a polifagia em ratos com diabetes crônico possivelmente porque suas reservas teciduais apresentam-se muito reduzidas, o que foi evidenciado pela significativa perda de peso^{11,13-15}. No diabetes crônico, a polifagia apresenta-se como uma resposta compensatória às células dependentes de insulina, para o transporte de glicose¹⁶.

Por outro lado, os animais diabéticos apresentaram grande aumento na ingestão de água e na eliminação de urina. No diabetes mellitus, a glicosúria leva à perda de água e de eletrólitos, ocasionando a diminuição extra e intra-celular desses componentes. Em tais condições, os centros neurais da sede deflagram mecanismos que levam à polidipsia¹⁷.

Neste trabalho, utilizamos duas técnicas para evidenciação dos neurônios entéricos. A marcação HuC/HuD é específica e evidencia os corpos de todos os neurônios, uma vez que marca a proteína estrutural Hu^{9,18-19}, o que nos possibilitou avaliar as áreas dos perfis da população geral de neurônios do plexo mioentérico e estabelecer comparações com as áreas dos perfis dos neurônios evidenciados pela imunodeteção da nNOS (neurônios nitrérgicos do plexo mioentérico).

As áreas dos perfis celulares dos neurônios HuC/HuD do plexo mioentérico dos animais do grupo D apresentaram-se significativamente menores do que as dos grupos C e T, ou seja, os neurônios mioentéricos dos animais do grupo D sofreram redução de tamanho apesar do curto período de tempo em que os ratos permaneceram diabéticos. A redução nas

áreas dos corpos celulares da população geral de neurônios do plexo mioentérico foi também observada no colo de ratos com diabetes agudo¹¹.

Os neurônios nitrérgicos dos ratos do grupo D também exibiram áreas dos perfis celulares significativamente menores que as do grupo C; contudo, estudo quantitativo realizado com os mesmos animais que empregamos no presente trabalho demonstrou, nos animais diabéticos, redução de cerca de 20% na densidade de neurônios HuC/HuD, enquanto a densidade de neurônios nNOS dos grupos D e T não apresentou redução significativa²⁰. Isso evidencia que os neurônios nitrérgicos, apesar de sofrerem redução aguda no volume de seu núcleo e no do citoplasma, são menos acometidos pela morte celular provocada pelo diabetes agudo que outras sub-populações neuronais que compõem o plexo mioentérico. Estudos dos neurônios mioentéricos nNOS de ratos com diabetes crônico evidenciam que esses neurônios são os que menos se perdem²¹⁻²⁵. Diversos estudos têm demonstrado que os neurônios nitrérgicos são resistentes a agressões como excitotoxicidade, hipoxia, doença de Huntington, envelhecimento e diabetes^{10, 23,26-28}.

WROS et al. (1997)²³ verificaram redução na expressão de nNOS nos neurônios mioentéricos do antro de ratos, o que pode contribuir para as alterações do esvaziamento gástrico observadas no diabetes. Por outro lado, os referidos autores não encontraram diferenças estatísticas significantes na expressão de nNOS no duodeno, no íleo e no colo de ratos controle e com diabetes crônico. Cabe ressaltar que realizaram seus estudos quantitativos e qualitativos empregando cortes histológicos e também não realizaram análises morfométricas do perfil do núcleo e do citoplasma.

A insulina causa o transporte de muitos aminoácidos para dentro das células, além de atuar diretamente sobre os ribossomas, aumentando a tradução de mRNA, formando assim novas proteínas. Na ausência de insulina a atividade ribossômica é interrompida, e cessam a síntese e o armazenamento de proteínas. A maior parte do excesso de aminoácidos é usada

diretamente para energia ou como substrato para gliconeogênese. Dessa forma, a depleção protéica constitui um dos mais graves distúrbios do diabetes mellitus²⁹. Redução das áreas dos corpos celulares associada à cromatólise foi também evidenciada em estudos que realizamos anteriormente em neurônios mioentéricos do ceco de ratos diabéticos³⁰. Outros autores também observaram ocorrência de cromatólise após 3 dias de indução do diabetes³². A cromatólise é caracterizada pela desintegração do nucléolo e dos polirribosomos como resposta a uma agressão sofrida por um neurônio³¹⁻³³. O diabetes indubitavelmente agride a célula de várias maneiras, dentre as quais por meio da privação de substratos energéticos e da redução da síntese protéica, relacionadas à falta de insulina. À semelhança do que ocorre em outras células, a maioria das proteínas formadas nos neurônios vai para a constituição do citosol. As proteínas citosólicas são distribuídas por todo o neurônio e incluem as enzimas citosólicas e os elementos fibrilares do citoesqueleto, que determinam a forma da célula. Essas enzimas são usadas tanto para a produção de energia quanto para as vias especiais de biosíntese, e consomem ou transformam as múltiplas substâncias de baixo peso molecular dentro da célula³⁴. Reduções na síntese dessas proteínas, mesmo que temporariamente, implicam alterações do funcionamento celular, podendo ocasionar redução no volume do citoplasma e, conseqüentemente, na área do perfil celular. Alterações na área do núcleo ou do citoplasma em outras regiões do sistema nervoso também são relatadas³⁵⁻³⁷. Portanto, a redução na área dos perfis celulares, verificada no presente experimento, pode estar diretamente relacionada à desestruturação dos polirribosomos, com conseqüente alteração na biosíntese de proteínas, devido à ausência de insulina.

No presente estudo a hipótese acima é reforçada pelo fato de os neurônios HuC/HuD dos animais diabéticos tratados com insulina não terem apresentado redução significativa nas áreas de seus perfis quando comparados ao grupo C. Por outro lado, a sub-população de neurônios nitrérgicos do grupo T possuía áreas de perfis celulares menores que as do grupo C

e maiores que as do grupo D, o que demonstra que o tratamento com insulina minimizou a ação fisiopatológica do diabetes sobre essas células.

Com a imunomarcção pela HuC/HuD não há delimitação do perfil do núcleo como ocorre com a técnica da nNOS; por esse motivo não realizamos tal análise. Por outro lado, os perfis dos núcleos dos neurônios nNOS dos animais do grupo D ($152,36 \pm 3,52 \mu\text{m}^2$) eram significativamente menores que o verificado nos grupos C ($178,29 \pm 9,0 \mu\text{m}^2$) e T ($163,47 \pm 5,50 \mu\text{m}^2$). Nota-se também que a relação núcleo-citoplasma foi mantida, ou seja, as áreas dos perfis dos núcleos representavam: no grupo C, 53,74%; no grupo D, 51,94%; e no grupo T, 54,12%. Como a síntese de proteínas é um processo que ocorre de maneira integrada entre núcleo e citoplasma, entendemos que a falta de insulina afeta simultaneamente esses dois compartimentos celulares dos neurônios nNOS.

Cabe destacar que as informações genéticas do núcleo são transcritas em mRNA e conduzidas através dos poros nucleares para dentro do citoplasma, onde são traduzidas em uma das três classes de proteínas: 1) proteínas citosólicas; 2) proteínas nucleares e mitocondriais; e 3) proteínas para o principal sistema de membrana do neurônios. As proteínas nucleares e as mitocôndriais são codificadas pelo núcleo da célula e formadas nos ribossomos livres. Após a síntese são dirigidas para as organelas apropriadas por meio de importação pós-tradução³⁴. Logo, a redução da síntese protéica no citoplasma implica uma menor quantidade de proteínas para serem importadas pelo núcleo, ocasionando a redução de seu volume. Por outro lado, o tratamento com insulina possibilitou uma maior síntese de proteínas, evidenciada indiretamente pela maior área do perfil do núcleo e do citoplasma apresentada pelos animais do grupo T.

Os neurônios mioentéricos nNOS imunoreativos possuem atividade inibitória sobre a musculatura lisa intestinal e suas alterações qualitativas ou quantitativas repercutem sobre a

motilidade intestinal, podendo relacionar-se tanto à diarreia quanto à constipação intestinal^{10,38-39}.

Referências

1. Chandrasekharan B, Srinivasan S. Review Article: Diabetes and the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 951-960.
2. Bytzer P, Talley NJ, Leemon M, et al. Prevalence of Gastrointestinal symptoms associated with diabetes mellitus: a population-based survey of 15,000 adults. *Arch Intern Med* 2001; 161: 1989-1996.
3. Belai A, Lincoln J, Milner P, Burnstock G. Differential effects of streptozotocin-induced diabetes on the innervation of the ileum and distal colon. *Gastroenterology* 1991; 100:1024-1032.
4. Balmann M, Conlon JM. Changes in the somatostatin, substance P and vasoactive intestinal polypeptide content of the gastrointestinal tract following streptozotocin-induced diabetes in the rat. *Diabetologia* 1985; 28:355-358.
5. Lincoln J, Bokor JT, Crowe R, Griffith SG, Haven AJ, Burnstock G. Myenteric plexus in streptozotocin-treated rats. Neurochemical and histochemical evidence for diabetic neuropathy in the gut. *Gastroenterology* 1984; 86:654-661.
6. Shotton HR, Broadbent S, Lincoln J. Prevention and partial reverse of diabetes-induced changes in enteric neurons of the rat ileum by combined treatment with alpha-lipoic and evening primrose oil. *Auton Neurosci* 2004; 111: 57-65.
7. Bergmeyer HE, Bernet E. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase. New York: *Methods of enzymatic analysis*, 1974.
8. Stefanini M, De Martino C, Zamboni L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 1967; 216: 173-174.
9. Lin Z, Gao N, Hu HZ, Liu S, Gao C, Kim G, et al. Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol* 2002; 14: 197-204.

10. Wrzos HF, Cruz A, Polavarapu R, Shearer D, Ouyang A. Nitric oxide synthase (NOS) expression in the myenteric plexus of streptozotocin-diabetic rats. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 2106-2110.
11. Furlan MM, Molinari SL, Miranda Neto MH. Morphoquantitative effect of acute diabetes on the proximal colon of adult rats. *Arq Neuropsiquiatr* 2002; 60: 576-581.
12. Genuth S. Hormônios das ilhotas pancreáticas. In: Berne RM., Levy MN (Eds.), *Fisiologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2000. p. 774-797.
13. Shotton HR, Adams A, Lincoln J. Effect of aminoguanidine treatment on diabetes-induced changes in myenteric plexus of rat ileum. *Auton Neurosci* 2007; 132: 16-26.
14. Zanoni JN, Freitas P, Pereira RVF, Pereira MAS. Effects of supplementation with ascorbic acid for a period of 120 days on the myosin-V and NADPHd positive myenteric neurons of the ileum of rats. *Anat Histol Embryol* 2005; 34: 149-153.
15. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969; 48: 2129-2139.
16. Carlton WW, McGavin MD. *Patologia veterinária especial de Thomson*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 1998.
17. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
18. Dalmau J, Furneaux HM, Cordon-Cardo C, Posner JB. The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuropathy) antigen in human normal and tumor tissue. *Am J Pathol* 1992; 141: 881-886.
19. Graus F, Cordon-Cardo C, Posner JB. Neuronal antinuclear antibody in sensory neuropathy from lung cancer. *Neurology* 1985; 35: 538-543.

20. Mello ST, Miranda Neto MH, Zanoni JN, Furlan MMDP. Effects of Insulin Treatment on HuC/HuD, NADH Diaphorase, and nNOS-Positive Myenteric Neurons of the Duodenum of Adult Rats with Acute Diabetes. *Dig Dis Sci* 2008.
21. Zanoni JN, Buttow NC, Bazotte RB, Miranda Neto MH. 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* 2003; 104: 32-8.
22. Miranda Neto MH, Molinari SL, Natali MR, Sant'Ana DM. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of the neuronal evidentiatio. *Arq Neuropsiquiatr* 2001; 59: 54-59.
23. Belai A, Cooper S, Burnstock G. Effects of age on NADPH-diaphorase-containing myenteric neurons of rat ileum and proximal colon. *Cell Tissue Rev* 1995; 279:379-383.
24. Cracco C, Filogamo G. Quantitative study of the NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons of the rat ileum. *Neuroscience* 1994; 61:351-359.
25. Santer RM. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of age rats. *J Auton Nerv* 1994; 49:115-121.
26. Johnson RJR, Shemann M, Santer RM, Cowen T. The effects of age on the overall population and on sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J Anat* 1998; 192: 479-488.
27. Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7797-7801.
28. Koy JY, Peters S, Choi DM. Neurons containing NADPH-diaphorase are selectively resistant to quinolinate toxicity. *Science* 1986; 234: 73-76.
29. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

30. Zanoni JN, De Miranda Neto MH, Bazotte RB, De Souza RR Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arq Neuropsiquiatr* 1997; 55: 696-702.
31. Belai A, Burnstock G. Changes in adrenergic and peptidergic nerves in the submucous plexus of streptozotocin-diabetic rats ileum. *Gastroenterology* 1990; 98:1427-1436.
32. Monckton G, Pehowich E. Autonomic neuropathy in the streptozotocin diabetic rat. *J Can Sci Neural* 1980; 7:135-142.
33. Liberman AR. The axon reaction: a review of the principle features of responses to axonal injury. *Int Rev Neuro* 1971; 14:49-124.
34. Kandel ER, Schwartz JH. *Princípios da Neurociência*. São Paulo: Manole, 1995.
35. Dheen ST, Tay SSW, Wong WC. Ultrastructural changes in the hypothalamic paraventricular nucleus of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Acta Anat* 1994; 149:291-299.
36. Dheen ST, Tay SSW, Wong WC. Ultrastructural changes in the hypothalamic supraoptics nucleus of the streptozotocin-induced diabetic rat. *J Anat* 1994a; 184: 615-623.
37. Kniel PC, Junker U, Perrin IV, Bestetti GE, Rossi GL. Varied effects of experimental diabetes on the autonomic nervous system of the rats. *Lab Invest* 1986; 54:523-530.
38. De Giorgio R, Camilleri M. Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. *Neurogastroenterology and Motility* 2004; 16(5): 515.
39. Belai A, Lincoln J, Milner P, Burnstock G. Progressive changes in adrenergic, serotonergic, and peptidergic nerves in proximal colon of streptozotocin-diabetic rats. *Gastroenterology* 1988; 95: 1234-1241.

Tabela 1. Anticorpos primários e secundários utilizados nas imunoreações para HuC/HuD e nNOS

Primário	Hospedeiro	Dose	Empresa	Secundário	Dose	Empresa
HuC/HuD	Camundongo	1:500	Molecular Probes, Invitrogen	Alexia 488 anticamundongo	Flúor 1:500	Molecular Probes, Invitrogen
nNOS	Coelho	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA	Alexia 488 Anticoelho	Flúor 1:500	Molecular Probes, Invitrogen

Tabela 2 – Parâmetros encontrados em ratos Wistar machos com 210 dias de idade, pertencentes ao grupo controle (C) e aos grupos com diabetes agudo sem tratamento (D) e tratado com insulina NPH subcutânea (T). (n = 10 ratos por grupo).

Parâmetros/grupos	Grupo C	Grupo D	Grupo T
Peso inicial (g)	430,0±15,38	450,0±29,10	451,0±25,16
Peso final (g)	410,4±13,92	391,35±39,28	384,80±40,45
Perda de peso corporal (%)	4,50±0,93	13,06±4,38 ^A	14,57±8,55 ^A
Consumo de alimento por 100g de peso corporal	7,30±1,31	6,98±1,13	6,16±1,40
Consumo de água por 100g de peso corporal	10,91±2,01	21,32±4,91 ^B	19,57±5,26 ^B
Volume urinário por 100g de peso corporal	1,83±0,80	11,07±3,42 ^B	9,14±4,1 ^B
Glicemia (mg.dl ⁻¹)	135,4±33,90	315,2±69,60 ^B	355,9±70,89 ^B

^Ap<0,01 em relação ao grupo C

^Bp<0,001 em relação ao grupo C

Tabela 3 – Área (mm²) dos perfis celulares (500 neurônios por grupo) de neurônios reativos às técnicas imunohistoquímica nNOS e HuC/HuD, do plexo mioentérico do duodeno de ratos adultos submetidos ao diabetes agudo experimental. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. (n = 5 ratos por grupo).

Técnica	Grupos	Área
HU	Controle	288,18±17,81
	Diabético	243,69±18,91 ^A
	Tratado	284,11±30,64
NOS	Controle	331.73 ± 17,58
	Diabético	293.32 ± 24,65 ^A
	Tratado	302.07± 10,61

^Ap<0,05 em relação ao grupo C

Tabela 4 – Área dos perfis dos núcleos celulares (500 neurônios por grupo) de neurônios reativos à técnica imunohistoquímica nNOS, do plexo mioentérico do duodeno de ratos adultos submetidos ao diabetes agudo experimental. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. (n = 5 ratos por grupo).

Técnica	Grupos	Área
NOS	Controle	178,29±9,0
	Diabético	152,36±3,52 ^A
	Tratado	163,47±5,50 ^{B,C}

^Ap<0,001 em relação ao grupo C

^Bp<0,01 em relação ao grupo C

^Cp<0,05 em relação ao grupo D

**MORPHOMETRIC STUDY OF THE HuC/HuD E nNOS NEURONS OF THE
DUODENUM OF RATS WITH ACUTE DIABETES TREATED WITH INSULIN**

Sônia Trannin de Mello¹; Marcílio Hubner de Miranda Neto¹; Jacqueline Nelisis Zanoni¹;
Sonia Lucy Molinari¹

¹Departament of Morphophysiological Sciences, Enteric Neuron Lab, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, nº 5790 Bloco H-79 – CEP 87020-900, Maringá, PR, Brazil.

Corresponding author. Phone: +55 44 32614708; Fax: +55 44 32614340; E-mail:
stmello@uem.br

ABSTRACT

This work had the purpose of measuring and comparing the areas of the cellular and nuclear profiles of the neurons of the myoenteric plexus of normoglycemic (C), diabetic (D) and insulin-treated diabetic rats (T). The neurons were stained with the immunohistochemical techniques of nNOS and HuC/HuD. The areas of the cellular profiles of the HuC/HuD-stained neurons of the myoenteric plexus of the animals from group D ($243.69 \pm 18.91 \mu\text{m}^2$) were markedly smaller than those from groups C ($288.18 \pm 17.81 \mu\text{m}^2$) and T ($284.11 \pm 30.64 \mu\text{m}^2$). The nuclear profiles of the nNOS-positive neurons of the animals from group D ($152.36 \pm 3.52 \mu\text{m}^2$) were significantly smaller than those from groups C ($178.29 \pm 9.0 \mu\text{m}^2$) and T ($163.47 \pm 5.50 \mu\text{m}^2$). It was also noticed that the nucleus/cytoplasm ratio was maintained, that is, the areas of the nuclear profiles, when compared to the areas of the cellular profiles were 53.74% in group C, 51.94% in group D and 54.12% in group T. It is discussed that protein synthesis is a process that takes place in an integrated manner between nucleus and cytoplasm and that the acute lack of insulin affects simultaneously these two cellular compartments of the nNOS-positive neurons.

KEY WORDS: cellular profile; nucleus/cytoplasm ratio; acute diabetes; insulin; myoenteric neurons

Introduction

The Enteric Nervous System (ENS) is placed within the length of the gastrointestinal tract, where it controls and coordinates motility, local blood flux and secretions. Made up of about 10^8 sensitive, motor and integrative nerve cells, it is arranged into two large ganglionated plexuses – the myoenteric and the submucous¹.

Research on the alterations induced by experimental diabetes on the ENS is quite broad. It was described, for instance, that 75% of the diabetic patients show gastrointestinal symptoms such as nausea, abdominal pain, diarrhea, constipations and slow gastric emptying².

Other studies add that the specific neurochemical groups show response patterns to diabetes that depend on both the intestinal segment and the duration of the diabetes³⁻⁵.

The use of streptozotocin has revealed that some nerves undergo degenerative process, some have their neurotransmitter content altered without evidence of degeneration and others are not affected by the diabetic condition⁶.

Based on the total population and the neuronal subpopulations with their different functions within the ENS, we carried out this investigation with the purpose of investigating on the rat duodenum the effects of acute experimental diabetes and insulin treatment on the following parameters: 1) morphometry of the myoenteric neurons – HuC/HuD and 2) morphometry of the nitrergic subpopulation of the myoenteric plexus – nNOS.

Material and methods

Study groups

All experimental procedures described in this paper are in agreement with ethical principles stated by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and were

previously submitted to the Committee of Ethics in Animal Experimentation of the State University of Maringá (UEM) (Protocolo N. 006/2005).

It was used 30 male Wistar rats aging seven months, obtained from the Central Animal House of UEM, which were divided into three groups: control (C), diabetic (D) and insulin-treated diabetic (T). The animals were housed in individual metabolic cages and kept at constant temperature and 12-hr photoperiod for seven days under *ad libitum* supply of water and NUVILAB rat chow.

On the first day of the experiment, after overnight fast, the rats from groups D and T received an i.v. injection of streptozotocin (35 mg/kg body weight; Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolved in citrate buffer pH 4.5 (10 mM) for diabetes induction. Group C was injected with an equivalent volume of vehicle. After that, glycemia was determined by the method of glucose oxidase⁷ for confirmation of the experimental model. All the animals from groups D and T showed glycemia higher than 210 mg/dl.

On the next five days, group T received daily morning subcutaneous injections of NPH insulin dissolved in saline solution (0.9%) at the dose of 10 U/kg body weight (Novolin[®] N, Novo Nordisk A/S, Denmark). Body weight, food and water ingestion and urine volume were recorded daily.

On the sixth day insulin injection was suspended and all the animals were fasted overnight; on the seventh day the animals were killed under previous anesthesia with i.p. thiopental (40 mg/kg body weight, Abbott Labs., Chicago, IL, USA).

Through cardiac puncture, blood was collected for determination of fasting plasma glucose and then the abdominal cavity was opened for collection of the duodenum and the periepididymal and retroperitoneal fat pads. These were weighted and normalized for 100 g body weight. The duodenum was removed by sectioning at the pylorus and the duodeno-jejunal flexure. Its length and width were immediately measured.

The samples of duodenum subjected to the immunohistochemical techniques were washed in PBS pH 7.4 (0.1 M) and filled with Zamboni fixative solution⁸. Soon after, they were washed on the same solution for 18 hours under refrigeration. At the end of this period, the segments were opened along the mesenteric attachment and washed in 80% alcohol until the complete removal of the fixative. Next, they were dehydrated in series of alcohol (100%, 90%, 80%, 50%) and placed in PBS 0.1 M. Finally, the segments were dissected to whole-mount preparations.

The duodenal segments were prepared for the immunohistochemical techniques of anti-HuC/HuD, which stains structural proteins present in all neurons, and anti-nitric oxide synthase (nNOS):

- *HuC/HuD*⁹: The whole mounts were washed twice (10 min each wash) in PBS 0.1 M solution added with Triton X-100 (0.5%). Next, they were incubated in BSA (1% PBS 0.1 M), remaining in this solution for one hour at room temperature.

The segments were then incubated in anti-HuC/HuD primary antibody (Table 1) diluted in a solution containing 1% BSA, Triton X-100 (0.5%) and PBS 0.1 M for 48 hours at room temperature. The tissues were washed three times in PBS and incubated with the secondary antibody (Table 1) for two hours. Then they were washed three times in PBS, mounted in slide with buffered glycerol (9:1) and stored at the refrigerator. The negative control was carried out in the absence of the primary antibody.

- *nNOS*¹⁰: The whole mounts were initially washed three times in PBS/Triton X-100 (0.5%) solution. Next, they were incubated in BSA (1% in PBS) for one hour, and then incubated for 48 hours, at room temperature, with nNOS-specific primary antibody (Table 1). After this period they were washed three times in PBS and incubated with the secondary antibody (Table 1) for two hours at room temperature. Finally, they were again washed three times in PBS. Negative control was carried out in the absence of the primary antibody.

Morphometric analysis of the HuC/HuD- and nNOS-immunoreactive myoenteric neurons

The morphometry of the HuC/HuD- and nNOS-immunoreactive myoenteric neurons was made through images obtained by sampling. The images were captured with a high-resolution AxioCam camera (Zeiss, Jena, Germany) coupled to an Axioskop Plus (Zeiss) light microscope, transferred to a computer through the software AxioVision 4 version 4.1 and recorded in CD. All the images were captured under 20X objective. The image-analysis software Image-Pro Plus version 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) was used for the measuring of the neuronal morphometry of the CD-recorded images.

For the HuC/HuD technique, the profiles of the cell bodies of 100 neurons seen in 30 images of each animal were measured. For the nNOS technique, 100 cell body and nuclear profiles of 100 neurons seen in 30 images of each animal were measured. The area of each image on Image-Pro Plus was 0.369 mm², totaling 11.07 mm².

Statistical analysis

The results were statistically analyzed through Statistica and GraphPad Prism, being expressed as mean±standard deviation. The morphometric data were analyzed as a whole followed by Tukey's test. For the other results one-way ANOVA was used, followed by Tukey's test. The significance level was 5%.

Results

The day after streptozotocin injection, water ingestion and urine volume per 100 g body weight in group D were 17.11 ml and 6.17 ml, while in group T they were 15.84 ml and 7.89 ml, respectively. These were markedly higher than those of group C, 10.46 ml and 1.39 ml, indicating the diabetic condition in groups D and T (Table 2).

As the experimental period continued, polydipsia and polyuria were accompanied by a significant loss of body weight in groups D and T, and at the end of the experiment hyperglycemia confirmed the diabetic condition (Table 2).

In all three groups, the ganglia of the myoenteric plexus were seen made up of numerous densely packed neuronal cell bodies with the immunohistochemical staining of HuC/HuD (10 to 93 neurons per field).

On the whole mounts subjected to nNOS immunohistochemistry, neuronal cell bodies and processes were stained. Isolated neurons and ganglia with a few scattered neurons (2 to 32 neurons per field) were observed.

The morphometric analysis of the HuC/HuD-stained neurons demonstrated a significant decrease of the area of the cell body profile in group D, while that of group T remained close to that of group C (Table 3).

Under nNOS immunohistochemistry, the areas of the cell body and nuclear profiles were markedly reduced in group D (Tables 3 and 4).

Discussion

The classic polyphagia seen in long-term diabetes did not occur in the acute diabetes of this investigation. It is believed that in this phase the organism used the mobilization of storage tissues to supply energy substrates to the glucose-starved cells and to the neoglycogenic pathways, which is evidenced by the body weight loss of the animals¹¹⁻¹². In several experiments carried out by our research group and others, polyphagia was observed in long-term diabetic rats, possibly because their tissue reserves were quite reduced, as evidenced by the significant body weight reduction^{11,13-15}. In chronic diabetes polyphagia arises as a compensatory response to the insulin-dependent cells¹⁶.

On the other hand, the diabetic animals had a great increase in water ingestion and urine volume. In diabetes mellitus glycosuria leads to a concomitant loss of water and electrolytes, causing an extra- and intracellular decrease of these components. Under these conditions, the neural centers of thirst trigger mechanisms that result in polydipsia¹⁷.

In this work we used two techniques for the staining of the enteric neurons. The HuC/HuD staining is specific and stains the cell body of every neuron, because it stains the structural protein Hu^{9,18-19}. This made it possible for us to evaluate the areas of the profiles of the general population of neurons of the myoenteric plexus and establish comparisons with the areas of the profiles of the neurons stained with nNOS immunodetection (nitrenergic neurons of the myoenteric plexus).

The areas of the cellular profiles of the HuC/HuD-positive neurons of the myoenteric plexus of group D were significantly smaller than those of groups C and T, that is, the myoenteric neurons of the animals of group D underwent a decrease in size despite the short period the animals were diabetic. The reduction in the areas of the cell bodies of the general population of neurons of the myoenteric plexus was also observed in the colon of rats with acute diabetes¹¹.

The nitrenergic neurons of the rats of group D also had areas of the cell body profiles markedly smaller than those of group C; however, a quantitative study carried out with the same animals of this investigation demonstrated that the diabetic animals had a 20% reduction in the density of HuC/HuD-positive neurons, while the density of nNOS-positive neurons of group D and T did not show a significant reduction²⁰. This indicated that the nitrenergic neurons, despite undergoing an acute reduction in the volume of their nucleus and cytoplasm, were less affected by cell death triggered by acute diabetes than other neuronal subpopulations of the myoenteric plexus. Studies of the nNOS-positive myoenteric neurons of rats with long-term diabetes evidenced that these neurons are minimally lost²¹⁻²⁵. Several

studies have been demonstrating that the nitrergic neurons are resistant to insults such as excitotoxicity, hypoxia, Huntington's disease, aging and diabetes^{10,23,26-28}.

WROS et al. (1997)²³ verified reduction in the expression of NOS in the myoenteric neurons of the gastric antrum of rats, this possibly contributing to the alterations of gastric emptying observed in diabetes. On the other hand, these authors did not find statistically significant differences in the expression of nNOS in the duodenum, ileum and colon of control and long-term diabetic rats. It is worth emphasizing that those quantitative and qualitative studies employed histological sections, and that morphometric analyses of the nuclear and cytoplasmic profiles were not carried out.

Insulin stimulates the uptake of many aminoacids by the cells, in addition to acting directly on the ribosomes to increase mRNA translation, thus forming new proteins. In the absence of insulin ribosomal activity is interrupted and protein synthesis and storage cease. Most of the excess aminoacids is used directly as energy or as substrate for neoglycogenesis. In this way, protein depletion is one of the most serious disturbances of diabetes mellitus²⁹. Reduced areas of the cell bodies associated with chromatolysis were also evidenced in studies we carried out previously in myoenteric neurons of the cecum of diabetic rats³⁰. Other authors also observed the occurrence of chromatolysis after three days of diabetes induction³². Chromatolysis is characterized by disintegration of the nucleolus and polyribosomes as a response to an aggression suffered by a neuron³¹⁻³³. Diabetes undoubtedly strikes the cell in many ways, including shortage of energy substrates and reduction of protein synthesis related to insulin lack. Similar to what takes place in other cells, most of the proteins formed in neurons goes to the cytosol. The cytosolic proteins are delivered to all the neuron and include the cytosolic enzymes and the fibrillar elements of the cytoskeleton that determine the shape of the cell. These enzymes are used both for the production of energy and for the special biosynthetic pathways, and consume or transform the multiple low-molecular-weight

substances inside the cell³⁴. Reductions on the synthesis of these proteins, even temporarily, imply in alterations of the cellular functioning, which may cause decreased cytoplasmic volume and therefore of the cell body profile area. Changes in the area of the nucleus or cytoplasm in other regions of the nervous system are also reported³⁵⁻³⁷. In this way, the reduction of the area of the cell body profiles seen in this experiment can be directly related to the dismantling of the polyribosomes with change in protein biosynthesis due to the absence of insulin.

In this study the hypothesis outlined above is reinforced by the fact that the HuC/HuD-positive neurons of the diabetic rats treated with insulin did not show a significant reduction in the areas of their profiles when compared to group C. On the other hand the subpopulation of nitrenergic neurons of group T had cell body areas smaller than those of group C and larger than those of group D, demonstrating that insulin treatment minimized the pathophysiological action of diabetes on these cells.

With HuC/HuD immunostaining there is no delimitation of the nuclear profile as with the nNOS technique, and that is why this measure was not taken. On the other hand, the profiles of the nucleus of the nNOS-positive neurons of the animals from group D ($152.36 \pm 3.52 \mu\text{m}^2$) were significantly smaller than in groups C ($178.29 \pm 9.0 \mu\text{m}^2$) and T ($163.47 \pm 5.50 \mu\text{m}^2$). It is also noticed that the nucleus/cytoplasm ratio was maintained, that is, the areas of the nuclear profiles represented 53.74% in group C, 51.94% in group D and 54.12% in group T. As protein synthesis is a process taking place in an integrated manner between nucleus and cytoplasm, we believe that insulin lack affects both compartments of the nNOS-positive neurons simultaneously.

It should be emphasized that the genetic information of the nucleus are transcribed into mRNA and taken across the nuclear pores into the cytoplasm, where it is translated into one of three classes of proteins: 1) cytosolic proteins, 2) nuclear and mitochondrial proteins and 3)

proteins for the major membrane system of the neuron. The nuclear and mitochondrial proteins are encoded by the cell nucleus and synthesized by free ribosomes. After their synthesis, they are directed to the right organelles by means of post-translational importation³⁴. Thus, the reduced protein synthesis in the cytoplasm leads to a smaller amount of proteins to be imported by the nucleus, causing its reduction in volume. On the other hand, insulin treatment made a greater protein synthesis possible, indirectly seen as a greater area of both the nucleus and the cytoplasm profiles in the animals from group T.

The nNOS-immunoreactive myoenteric neurons have inhibitory action on the intestinal smooth muscle. Their qualitative or quantitative changes reflect on the intestinal motility, resulting either in diarrhea or intestinal constipation^{10,38-39}.

Table 1. Primary and secondary antibodies used in the immunoreactions for HuC/HuD and nNOS.

Primary	Host	Dose	Company	Secondary	Dose	Company
HuC/HuD	Mouse	1:500	Molecular Probes, Invitrogen	Alexia Fluor 488 antimouse	1:500	Molecular Probes, Invitrogen
nNOS	Rabbit	1:500	Santa Cruz Biotechnology, California, EUA	Alexia Fluor 488 antirabbit	1:500	Molecular Probes, Invitrogen

Table 2 – Parameters of male 210-days-old Wistar rats from the control group (C), diabetic untreated group (D) and diabetic group treated with subcutaneous NPH insulin (T). (n = 10 rats per group).

Parameters/groups	Group C	Group D	Group T
Initial weight (g)	430.0±15.38	450.0±29.10	451.0±25.16
Final weight (g)	410.4±13.92	391.35±39.28	384.80±40.45
Body weight loss (%)	4.50±0.93	13.06±4.38 ^A	14.57±8.55 ^A
Food ingestion per 100 g body weight	7.30±1.31	6.98±1.13	6.16±1.40
Water ingestion per 100 g body weight	10.91±2.01	21.32±4.91 ^B	19.57±5.26 ^B
Urine volume per 100 g body weight	1.83±0.80	11.07±3.42 ^B	9.14±4.1 ^B
Glycemia (mg.dl ⁻¹)	135.4±33.90	315.2±69.60 ^B	355.9±70.89 ^B

^Ap<0.01 relative to group C

^Bp<0.001 relative to group C

Table 3 – Area (mm²) of the cell body profiles (500 neurons per group) of neurons stained with the immunohistochemical techniques of nNOS and HuC/HuD of the myoenteric plexus of the duodenum of adult rats subjected to acute experimental diabetes. The results are expressed as mean±standard deviation. (n = 5 rats per group).

Technique	Groups	Area
HU	Control	288.18±17.81
	Diabetic	243.69±18.91 ^A
	Treated	284.11±30.64
NOS	Control	331.73 ± 17.58
	Diabetic	293.32 ± 24.65 ^A
	Treated	302.07± 10.61

^Ap<0.05 relative to group C

Table 4 – Area of the cell nucleus profiles (500 neurons per group) of neurons stained with the immunohistochemical technique of nNOS, of the myoenteric plexus of the duodenum of adult rats subjected to acute experimental diabetes. The results are expressed as mean ± standard deviation. (n = 5 rats per group).

Technique	Groups	Area
NOS	Control	178.29±9.0
	Diabetic	152.36±3.52 ^A
	Treated	163.47±5.50 ^{B,C}

^Ap<0.001 relative to group C

^Bp<0.01 relative to group C

^Cp<0.05 relative to group D

Bibliographic References

1. Chandrasekharan B, Srinivasan S. Review Article: Diabetes and the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 951-960.
2. Bytzer P, Talley NJ, Leemon M, et al. Prevalence of Gastrointestinal symptoms associated with diabetes mellitus: a population-based survey of 15,000 adults. *Arch Intern Med* 2001; 161: 1989-1996.
3. Belai A, Lincoln J, Milner P, Burnstock G. Differential effects of streptozotocin-induced diabetes on the innervation of the ileum and distal colon. *Gastroenterology* 1991; 100:1024-1032.
4. Balmann M, Conlon JM. Changes in the somatostatin, substance P and vasoactive intestinal polypeptide content of the gastrointestinal tract following streptozotocin-induced diabetes in the rat. *Diabetologia* 1985; 28:355-358.
5. Lincoln J, Bokor JT, Crowe R, Griffith SG, Haven AJ, Burnstock G. Myenteric plexus in streptozotocin-treated rats. Neurochemical and histochemical evidence for diabetic neuropathy in the gut. *Gastroenterology* 1984; 86:654-661.
6. Shotton HR, Broadbent S, Lincoln J. Prevention and partial reverse of diabetes-induced changes in enteric neurons of the rat ileum by combined treatment with alpha-lipoic and evening primrose oil. *Auton Neurosci* 2004; 111: 57-65.
7. Bergmeyer HE, Bernet E. Determination of glucose with glucose oxidase and peroxidase. New York: *Methods of enzymatic analysis*, 1974.
8. Stefanini M, De Martino C, Zamboni L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature* 1967; 216: 173-174.
9. Lin Z, Gao N, Hu HZ, Liu S, Gao C, Kim G, et al. Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol* 2002; 14: 197-204.

10. Wrzos HF, Cruz A, Polavarapu R, Shearer D, Ouyang A. Nitric oxide synthase (NOS) expression in the myenteric plexus of streptozotocin-diabetic rats. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 2106-2110.
11. Furlan MM, Molinari SL, Miranda Neto MH. Morphoquantitative effect of acute diabetes on the proximal colon of adult rats. *Arq Neuropsiquiatr* 2002; 60: 576-581.
12. Genuth S. Hormônios das ilhotas pancreáticas. In: Berne RM., Levy MN (Eds.), *Fisiologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2000. p. 774-797.
13. Shotton HR, Adams A, Lincoln J. Effect of aminoguanidine treatment on diabetes-induced changes in myenteric plexus of rat ileum. *Auton Neurosci* 2007; 132: 16-26.
14. Zanoni JN, Freitas P, Pereira RVF, Pereira MAS. Effects of supplementation with ascorbic acid for a period of 120 days on the myosin-V and NADPHd positive myenteric neurons of the ileum of rats. *Anat Histol Embryol* 2005; 34: 149-153.
15. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969; 48: 2129-2139.
16. Carlton WW, McGavin MD. *Patologia veterinária especial de Thomson*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 1998.
17. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
18. Dalmau J, Furneaux HM, Cordon-Cardo C, Posner JB. The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuropathy) antigen in human normal and tumor tissue. *Am J Pathol* 1992; 141: 881-886.
19. Graus F, Cordon-Cardo C, Posner JB. Neuronal antinuclear antibody in sensory neuropathy from lung cancer. *Neurology* 1985; 35: 538-543.

20. Mello ST, Miranda Neto MH, Zanoni JN, Furlan MMDP. Effects of Insulin Treatment on HuC/HuD, NADH Diaphorase, and nNOS-Positive Myenteric Neurons of the Duodenum of Adult Rats with Acute Diabetes. *Dig Dis Sci* 2008.
21. Zanoni JN, Buttow NC, Bazotte RB, Miranda Neto MH. 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* 2003; 104: 32-8.
22. Miranda Neto MH, Molinari SL, Natali MR, Sant'Ana DM. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of the neuronal evidentiatio. *Arq Neuropsiquiatr* 2001; 59: 54-59.
23. Belai A, Cooper S, Burnstock G. Effects of age on NADPH-diaphorase-containing myenteric neurons of rat ileum and proximal colon. *Cell Tissue Rev* 1995; 279:379-383.
24. Cracco C, Filogamo G. Quantitative study of the NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons of the rat ileum. *Neuroscience* 1994; 61:351-359.
25. Santer RM. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of age rats. *J Auton Nerv* 1994; 49:115-121.
26. Johnson RJR, Shemann M, Santer RM, Cowen T. The effects of age on the overall population and on sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J Anat* 1998; 192: 479-488.
27. Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7797-7801.
28. Koy JY, Peters S, Choi DM. Neurons containing NADPH-diaphorase are selectively resistant to quinolinate toxicity. *Science* 1986; 234: 73-76.
29. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

30. Zanoni JN, De Miranda Neto MH, Bazotte RB, De Souza RR Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arq Neuropsiquiatr* 1997; 55: 696-702.
31. Belai A, Burnstock G. Changes in adrenergic and peptidergic nerves in the submucous plexus of streptozotocin-diabetic rats ileum. *Gastroenterology* 1990; 98:1427-1436.
32. Monckton G, Pehowich E. Autonomic neuropathy in the streptozotocin diabetic rat. *J Can Sci Neural* 1980; 7:135-142.
33. Liberman AR. The axon reaction: a review of the principle features of responses to axonal injury. *Int Rev Neuro* 1971; 14:49-124.
34. Kandel ER, Schwartz JH. *Princípios da Neurociência*. São Paulo: Manole, 1995.
35. Dheen ST, Tay SSW, Wong WC. Ultrastructural changes in the hypothalamic paraventricular nucleus of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Acta Anat* 1994; 149:291-299.
36. Dheen ST, Tay SSW, Wong WC. Ultrastructural changes in the hypothalamic supraoptics nucleus of the streptozotocin-induced diabetic rat. *J Anat* 1994a; 184: 615-623.
37. Kniel PC, Junker U, Perrin IV, Bestetti GE, Rossi GL. Varied effects of experimental diabetes on the autonomic nervous system of the rats. *Lab Invest* 1986; 54:523-530.
38. De Giorgio R, Camilleri M. Human enteric neuropathies: morphology and molecular pathology. *Neurogastroenterology and Motility* 2004; 16(5): 515.
39. Belai A, Lincoln J, Milner P, Burnstock G. Progressive changes in adrenergic, serotonergic, and peptidergic nerves in proximal colon of streptozotocin-diabetic rats. *Gastroenterology* 1988; 95: 1234-1241.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)