

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DE NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS DO DUODENO DE RATOS (*Rattus norvegicus*) ADULTOS NORMAIS E COM DIABETES EXPERIMENTAL

José Antônio de Souza*

Maria Montserrat Diaz Pedrosa Furlan**

SOUZA, José Antônio de; FURLAN, Maria Montserrat Diaz Pedrosa. Avaliação Morfométrica de Neurônios Mioentéricos do Duodeno de Ratos (*rattus Norvegicus*). Adultos Normais e com Diabetes Experimental. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 5 (2): 141-147., 2001.

RESUMO: O *diabetes mellitus* é uma doença que reduz a expectativa e a qualidade de vida do indivíduo portador. Várias alterações ocorrem nos diversos órgãos do organismo, inclusive no sistema digestório. Os neurônios entéricos, responsáveis pela manutenção e coordenação das funções digestivas, também são afetados pela doença. O presente estudo analisa as alterações morfométricas dos neurônios mioentéricos duodenais de ratos com diabetes agudo induzido por estreptozotocina em comparação com ratos controles, criados sob as mesmas condições ambientais. As análises morfométricas foram feitas com equipamento computadorizado a partir de preparados de membrana corados pela técnica da NADH-diaforase. Os animais diabéticos apresentaram, de um modo geral, uma população neuronal mioentérica de menor tamanho em relação aos controles, especialmente na região antimesentérica da circunferência duodenal. Neurônios pequenos foram menos abundantes no duodeno dos animais controles, indicando possivelmente uma desidratação neuronal nos animais diabéticos, decorrente do quadro experimental.

PALAVRAS-CHAVE: *diabetes mellitus*, NADH-diaforase, neurônios mioentéricos, tamanho neuronal

MORPHOMETRIC EVALUATION OF MYENTERIC NEURONS OF THE DUODENUM OF NORMAL AND EXPERIMENTALLY DIABETIC ADULT RATS (*Rattus norvegicus*)

SOUZA, José Antônio de; FURLAN, Maria Montserrat Diaz Pedrosa. Morphometric Evaluation of Myenteric Neurons of the Duodenum of Normal and Experimentally Diabetic Adult Rats (*rattus Norvegicus*). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 5 (2): 141-147., 2001.

ABSTRACT: Diabetes mellitus is a disease which reduces the patient's life expectancy and welfare. Several changes occur in the many organs of the subject, including the digestive system. The enteric neurons, responsible for the maintenance and coordination of the digestive functions, are also affected by the disease. The present study analyzes the morphometric alterations of the duodenal myenteric neurons in rats with acute diabetes induced by streptozotocin in comparison with control rats, raised under the same environmental conditions. The morphometric analyses were carried out using a computerized system in whole-mounts stained with the NADH-diaphorase technique. The diabetic animals showed, in general, a myenteric neuronal population of smaller size relative to the controls, especially in the antimesenteric region of the duodenal circumference. Small neurons were less abundant in the duodenum of the control animals, possibly indicating a neuronal dehydration in the diabetic animals caused by the experimental condition.

KEY WORDS: diabetes mellitus, myenteric neurons, NADH-diaphorase, neuronal size

Introdução

Por muito tempo, o Sistema Nervoso Entérico (SNE) foi encarado como a porção pós-ganglionar da divisão parassimpática do Sistema Nervoso Autônomo (SNA). Entretanto, hoje é reconhecido como uma divisão autônoma

própria, juntamente com os sistemas simpático e parassimpático (STERNINI, 1988). O SNE é uma complexa rede de fibras nervosas e corpos celulares neuronais que se localiza na parede gastrointestinal e é diretamente responsável pelo controle das funções do tubo digestório, incluindo

* Técnico de nível superior do Laboratório de Microscopia do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá. Pr.

** Professora Assistente do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá. Pr

* Trabalho de monografia de especialização em Morfofisiologia Humana Aplicada a Educação Corporal e à Reabilitação do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá. Pr.

Endereço: Av Colombo, 5790 bloco H79 sala 113. 87020-900 Maringá. Pr Brasil. E-mail: mmdpurlan@uem.br

motilidade, secreção e absorção. Através das interconexões com o restante do SNA, o SNE permite que a função digestiva se integre harmoniosamente com as demais funções do organismo.

O SNE também é a maior e mais complexa divisão do sistema nervoso periférico; contém número de neurônios tão grande quanto a medula espinhal, e ainda é capaz de mediar a atividade reflexa na ausência de aferências neurais centrais; segundo STERNINI (1988), é considerado o "cérebro intestinal".

O plexo mioentérico é o mais evidente plexo ganglionado do sistema nervoso entérico. Devido à sua acessibilidade, as investigações sobre sua estrutura, função e disfunção, usando os mais variados tipos de abordagens experimentais, são mais numerosas do que as referentes ao plexo submucoso.

O *diabetes mellitus* produz no trato gastrointestinal uma série de manifestações, como diminuição do esvaziamento gástrico, anorexia, náusea, vômito, diarréia e constipação (ZAUPA, 1998). Como o plexo mioentérico constitui-se de uma malha de tecido nervoso altamente especializada funcional e estruturalmente, é de se esperar que seus neurônios e nervos também estejam envolvidos nas manifestações fisiopatológicas do diabetes no trato gastrointestinal.

Segundo ZAUPA (1998), os indivíduos portadores de diabetes têm complicações intestinais que envolvem, entre outros eventos, perda de neurônios e alterações neuronais. Portanto, os estudos dos neurônios entéricos em modelos experimentais podem contribuir para a compreensão de tais complicações. O diabetes afeta de maneira diferenciada os intestinos delgado e grosso, sendo o intestino delgado mais suscetível que o grosso (BELAI *et al.*, 1991).

As análises morfológicas e quantitativas dos neurônios entéricos são excelentes ferramentas para a análise das alterações neuronais decorrentes da ação do diabetes no organismo. Verifica-se, na literatura, trabalhos experimentais voltados aos efeitos agudos ou crônicos do diabetes induzido por estreptozotocina sobre o plexo mioentérico do duodeno de ratos (BUTTOW *et al.*, 1997; FURLAN *et al.*, 1999). As avaliações

morfológicas usam geralmente evidências neuronais baseadas no azul de metileno (técnica de Giemsa, BARBOSA, 1978).

Esta pesquisa teve o objetivo de estudar, com o emprego de analisador de imagens computadorizado, os aspectos morfométricos dos neurônios NADH-diaforase positivos do plexo mioentérico do duodeno de ratos normais e com *diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina, expostos a esta condição experimental pelo período de uma semana. Foi possível também comparar os métodos de avaliação morfométrica utilizados ao longo do tempo em nosso laboratório.

Material e Métodos

Este trabalho foi realizado utilizando-se o segmento duodenal de 10 ratos albinos de laboratório, *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá.

Os ratos adultos, com 210 dias de idade ($440,30 \pm 7,77$ g), foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura constante e alternância de ciclos claro-escuro de 12 horas, e divididos em dois grupos:

-Grupo controle: constou de cinco animais que durante sete dias receberam ração e água *ad libitum*.

-Grupo diabético: para produzir o diabetes experimental nos cinco ratos deste grupo, utilizou-se estreptozotocina em aplicação intravenosa na concentração de 35 mg/kg de peso corporal. Durante os sete dias seguintes, os animais receberam ração e água *ad libitum*.

Durante o período experimental foram acompanhados a ingestão hídrica e o débito urinário dos animais de ambos os grupos. A pesagem dos animais foi realizada no dia anterior ao sacrifício.

O nível glicêmico do plasma, conforme avaliado pela técnica da glicose oxidase, foi utilizado para confirmação do diabetes por ocasião do sacrifício dos animais.

Os animais foram sacrificados após jejum noturno por inalação de excesso de éter etílico. O duodeno foi retirado, distendido com solução de Krebs pH 7,3 e submetido à técnica de NADH-diaforase (GABELLA, 1969), para a evidênciação neuronal. O tempo de incubação foi estabelecido

em 45 minutos para todas as amostras. Após a fixação, os segmentos foram submetidos à elaboração de preparados de membrana, os quais foram montados para visualização ao microscópio.

A mensuração dos perfis das áreas dos corpos celulares neuronais foi feita a partir dos preparados de membrana, com auxílio de microscópio óptico Olympus BX 40, com ocular de 10 X e objetiva de 40 X. O material foi fotografado utilizando uma câmara digital 3 CCD, e as fotos digitais armazenadas, separadas e catalogadas como antimesentéricas ou intermediárias, de acordo com a localização dos neurônios na circunferência duodenal. Neste trabalho foi mensurado um "n" mínimo de 280 neurônios por região circunferencial em cada grupo. O método adotado foi o de mensuração por amostragem.

As fotos digitais foram submetidas ao analisador de imagens (Image Pro Plus® versão 4), para a análise morfométrica dos neurônios. Inicialmente, o analisador foi calibrado utilizando uma foto padrão de régua micrometrada com aumento de 400 X.

A comparação dos resultados foi feita pelo teste *t* bi-caudado para dados não pareados com nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

Resultados

Todos os animais do grupo diabético apresentaram hiperglicemia ($218,00 \pm 15,89$ mg/dl). Por outro lado, os animais do grupo controle tiveram glicemia de jejum de $134,30 \pm 16,70$ mg/dl. Consistentemente, a ingestão de água e o débito urinário dos diabéticos mostraram-se aumentados em relação aos controles (ingestão de água de $10,14 \pm 0,99$ ml/100 g de peso corporal nos controles e de $19,88 \pm 2,07$ ml/100 g de peso corporal nos diabéticos, $p < 0,01$; débito urinário de $4,02 \pm 0,44$ ml/100 g de peso corporal nos controles e de $8,62 \pm 1,04$ ml/100 g de peso corporal nos diabéticos, $p < 0,01$), ao mesmo tempo em que observou-se perda de peso (controles $473,80 \pm 9,85$ g e diabéticos $353,10 \pm 3,33$ g, $p < 0,001$).

Os preparados de membrana permitiram visualizar os neurônios NADH-diaforase

positivos do plexo mioentérico de maneira bastante individualizada. Apesar da técnica evidenciar apenas uma parte da população mioentérica total, foi possível distinguir a organização ganglionar. Neste texto, os termos "área neuronal" e "tamanho neuronal" e referem-se à mensuração realizada das áreas dos perfis dos corpos celulares neuronais.

Os neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos apresentaram-se bem corados, especialmente nos preparados de membrana dos ratos diabéticos. Em função da retirada apenas parcial da camada muscular circular sobrejacente, a determinação dos contornos de alguns neurônios não era muito precisa. Nesses casos, optou-se por aumentar o número total de neurônios mensurados, a fim de suavizar as distorções.

Na mensuração dos preparados de membrana ao analisador de imagens os seguintes resultados foram obtidos:

- 1) nos ratos controle (região antimesentérica), o tamanho neuronal médio foi de $166,68 \mu\text{m}^2 \pm 3,91$ ($n=280$). Na região intermediária, foi encontrado um tamanho médio de $151,62 \mu\text{m}^2 \pm 2,33$ ($n=280$).
- 2) nos ratos diabéticos, encontrou-se na região antimesentérica uma área média de $137,25 \mu\text{m}^2 \pm 3,51$ ($n=320$). Na região intermediária, a média foi de $134,81 \mu\text{m}^2 \pm 2,46$ ($n=270$).

Apenas os neurônios da região antimesentérica, mostraram-se significativamente menores nos diabéticos que nos controles ($P=0,003$), enquanto que na região intermediária a diferença existente não alcançou significância ($P=0,07$).

As áreas neuronais encontradas nos dois grupos foram separadas em classes de $50 \mu\text{m}^2$, como mostrado na Figura 1 para a região antimesentérica e na Figura 2 para a região intermediária.

Houve uma maior porcentagem de neurônios entre 0 e $150 \mu\text{m}^2$ nos ratos diabéticos na região antimesentérica; já os neurônios com áreas entre $150 \mu\text{m}^2$ e $300 \mu\text{m}^2$ foram encontrados em maiores percentuais nos ratos controle (Figura 1). Também observa-se que neurônios acima de $300 \mu\text{m}^2$ são quase igualmente escassos nos dois grupos (4,28% do total nos controles e 4,69% nos diabéticos).

Na região intermediária observa-se

também uma maior predominância de neurônios com áreas entre 0 e 150 μm^2 nos ratos diabéticos, enquanto os acima de 150 até 250 μm^2 predominam nos controles. Já nos valores superiores a 250 μm^2 nesta região encontrou-se pequenas diferenças entre os percentuais (3,55% nos controles e 3,35% nos diabéticos). A mesma observação é válida para os neurônios com área de

perfil neuronal acima de 300 μm^2 (Figura 2).

Em ambos os grupos, neurônios com área de perfil neuronal acima de 250 μm^2 representam uma parcela pequena da população NADH-diaforase positiva. Na região antimesentérica, entretanto, essa porcentagem é ligeiramente maior.

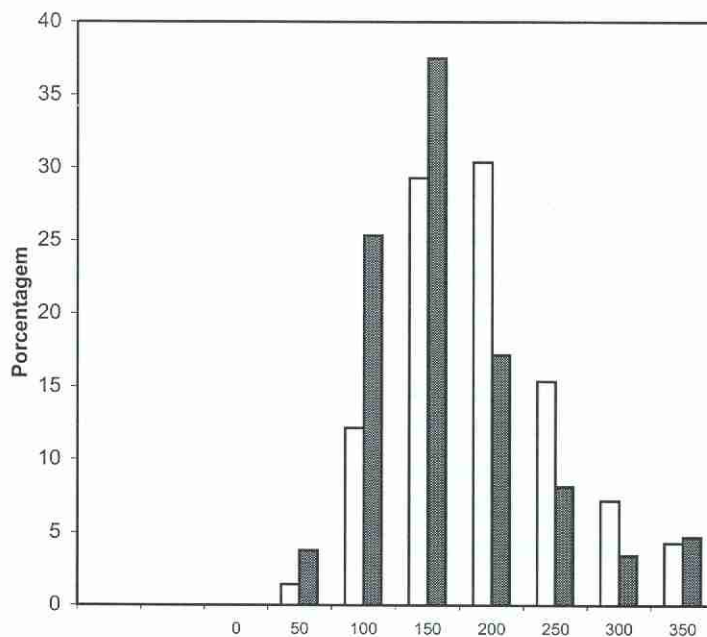


Figura 1- Porcentagem de áreas neuronais na região antimesentérica do duodeno de ratos controles (branco) e diabéticos (preto). Os valores da abscissa estão expressos em μm^2 .

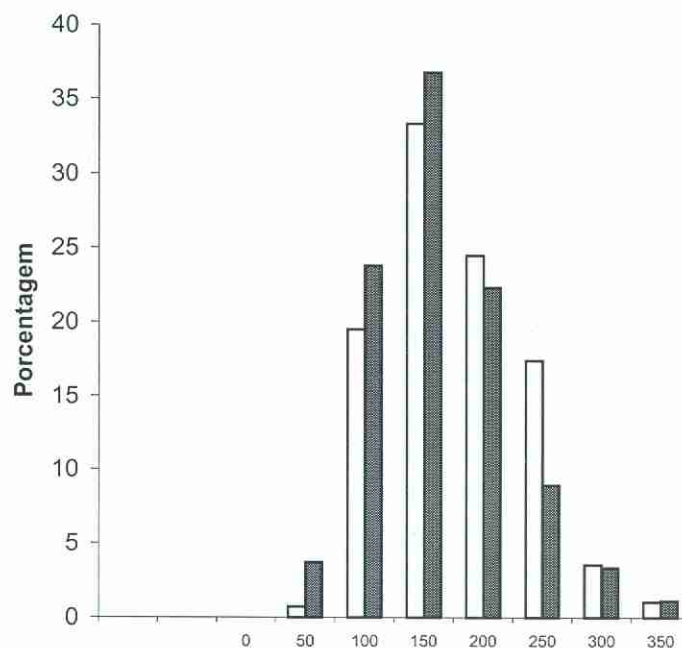


Figura 2 - Porcentagem de áreas neuronais na região intermediária do duodeno de ratos controles (branco) e diabéticos (preto). Os valores da abscissa representam valores expressos em μm^2 .

Discussão

As variações porcentuais dos perfis neuronais mostradas na Figura 1 e na Figura 2 refletem-se nos tamanhos neuronais médios, os quais mostram-se menores nos animais diabéticos do que nos controles, em ambas as regiões da circunferência duodenal que foram avaliadas, embora a diferença só seja estatisticamente significativa para a região antimesentérica.

Uma análise morfométrica semelhante foi realizada por nosso grupo de pesquisa em preparados de membrana corados pela técnica de Giemsa (MIRANDA-NETO *et al.*, 2000). As áreas neuronais médias encontradas foram maiores que aquelas observadas no presente experimento, e isso permite supor que as sub-populações neuronais mioentéricas que são evidenciadas pela técnica da NADH-diaforase representam a fração neuronal de menor tamanho do plexo mioentérico.

As reduções nas áreas dos perfis dos neurônios mioentéricos dos animais diabéticos podem estar associadas à generalizada desidratação celular, a qual ocorre no diabetes em função do efeito osmótico exercido pela hiperglicemia (GUYTON & HALL, 1996). Um desgaste celular agudo em função da excessiva disponibilidade de glicose, a qual altera os aspectos metabólicos e vasculares do tecido nervoso (STEVENS *et al.*, 1995) também não pode ser descartado como causa da redução de tamanho dos neurônios mioentéricos nos animais diabéticos.

Os resultados quantitativos de animais submetidos ao mesmo tipo de tratamento experimental mostram também que o número de neurônios NADH-diaforase positivos nos ratos diabéticos está acentuadamente aumentado (FURLAN *et al.*, 1999) e isso pode estar relacionado à evidenciação de uma maior proporção de neurônios de pequeno tamanho. Como a coloração pela NADH-diaforase depende da atividade respiratória do neurônio, supõe-se que o quadro experimental aumenta o metabolismo neuronal, permitindo a evidenciação de neurônios de menor tamanho, os quais em condições normais não apresentam atividade metabólica suficiente para serem evidenciados com incubação de 45 minutos. O fato dos neurônios dos animais diabéticos mostrarem-se,

de um modo geral, corados mais intensamente, reforça esta suposição.

Verifica-se na literatura que para o estudo dos neurônios entéricos, várias técnicas foram empregadas, dentre elas a impregnação pela prata, a coloração por azul de metileno, técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas e microscopia eletrônica, entre outras (IRWIN, 1931; GABELLA, 1979; COSTA *et al.*, 1996; KARAOSMANOGLU *et al.*, 1996). Para a análise quantitativa, as colorações pelo método de Giemsa e a técnica de evidenciação de células nervosas através da atividade da enzima NADH-diaforase estão entre as mais empregadas. Alguns autores criticam a técnica empregando o azul de metileno (técnica de Giemsa) pelo fato desta corar células da glia entérica e outros elementos não neuronais.

Existe também críticas à técnica da NADH-diaforase, pois segundo alguns autores a evidenciação dos neurônios está diretamente relacionada com o tempo de exposição do material aos reagentes e pode variar desde a não coloração de neurônios pequenos até a coloração de parte dos mesmos e das células da glia, fibras musculares lisas e fibroblastos (GABELLA, 1971; SANT'ANA *et al.*, 1997). Entretanto, o tempo de exposição do material aos reagentes pode ser padronizado e adotado para todas as amostras, de forma que este fator não mais interfira nos resultados obtidos. Neste laboratório, a incubação foi padronizada em 45 minutos. Este tempo de exposição evidencia apenas corpos celulares neuronais, embora a sub-população corada represente entre 18,5% e 42% da população neuronal total (SANT'ANA *et al.*, 1997; FURLAN *et al.*, 1999) em ratos normais, dependendo do segmento intestinal observado.

Além das variações encontradas na densidade neuronal decorrentes das técnicas empregadas, são também relatadas diferenças numéricas de acordo com a região da circunferência intestinal de onde se obteve a amostra (SANT'ANA *et al.*, 1997; FREGONESI *et al.*, 1998). Em vista disso, o procedimento adotado nos trabalhos mais recentes tem sido o de considerar separadamente as populações neuronais das regiões antimesentérica e intermediária da circunferência intestinal. Alternativamente, os dados são coletados

equitativamente em cada região e posteriormente analisados em conjunto (FURLAN *et al.*, 1999; MIRANDA-NETO *et al.*, 2000).

De maneira geral, verifica-se que independente da região considera o número de neurônios encontrados com a técnica de Giemsa é maior que o encontrado com a técnica da NADH-diaforase. Na literatura são encontradas discussões sobre esta questão, ficando claro que ao quantificar neurônios, os autores devem considerar a espécie, segmento intestinal, as regiões da circunferência intestinal, a idade do animal, a condição experimental e a técnica de coloração empregada (GABELLA, 1979).

Os aspectos morfométricos dos neurônios mioentéricos também podem ser avaliados em preparados de membrana corados com Giemsa ou submetidos a técnica de NADH-diaforase. A primeira revela corpos celulares neuronais esféricos, de contornos suaves, permitindo avaliações morfométricas de maior ou menor fidelidade, como a mensuração computadorizada de área ou a mensuração de diâmetros. A técnica de NADH-diaforase, por outro lado, mostra neurônios de contorno irregular, em que, por vezes, até mesmo os segmentos iniciais dos prolongamentos celulares podem ser observados. Os neurônios mostram-se menos agrupados, e raramente aparecem sobrepostos, facilitando as avaliações morfológicas.

O método de análise de imagens utilizando câmaras digitais e programas de computador que analisam as fotos capturadas é na atualidade uma excelente ferramenta para o pesquisador conhecer a morfometria das células. Os primeiros estudos deste laboratório para avaliar o tamanho dos neurônios entéricos foram feitos utilizando-se a régua micrometrada: o material, geralmente corado pela técnica de Giemsa, era observado ao microscópio óptico utilizando uma escala, mensurava-se os diâmetros maior e menor do corpo celular e o tamanho era avaliado pela soma desses dois eixos (NATALI & MIRANDA-NETO, 1996; BUTTOW *et al.*, 1997;). Neste estudo utilizou-se equipamento digital computadorizado, que permite contornar o perímetro do corpo celular e calcular a área do perfil neuronal, obtendo-se assim uma medida mais exata do tamanho do corpo celular. Como o equipamento permite a determinação do contorno

do corpo celular de modo desde totalmente automático até completamente manual, é possível individualizar os perfis de neurônios agrupados, bem como considerar nas mensurações as irregularidades do contorno neuronal, as quais são comuns em neurônios corados pela técnica da NADH-diaforase. Sendo assim, as análises morfométricas de área de perfil neuronal são mais confiáveis do que as mensurações de diâmetro, quando se trata de material corado pela NADH-diaforase.

São encontrados na literatura trabalhos que avaliam o tamanho dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos em ratos em função da área do perfil do corpo celular (GABELLA, 1971; SANTER & BAKER, 1988). A observação dos histogramas do intestino delgado daqueles estudos mostra a semelhança de distribuição de porcentagens com aquela dos neurônios dos ratos controles do presente estudo, com os picos de porcentagem neuronal nos tamanhos entre 100 e 200 μm^2 .

Conclusões

1 - No duodeno de ratos diabéticos agudos, há maior evidência de neurônios mioentéricos com área de perfil inferior a 250 μm^2 do que no duodeno de animais controle.

2 - Nos ratos com diabetes agudo, os neurônios com área de perfil de corpo celular até 150 μm^2 são mais abundantes do que nos animais normais.

Referências

- BARBOSA, A. J. A. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.*, 11: 95-97, 1978.
- BELAI, A.; LINCOLN, J.; MILNER, P.; BURNSTOCK, G. Differential effect of streptozotocin-induced diabetes on the innervation of the ileum and distal colon. *Arq Gastroenterology*, 100: 1024-2032, 1991.
- BUTTOW, N. C.; MIRANDA-NETO, M. H.; BAZOTTE, R. B. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the duodenum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arq Gastroenterol*, 34: 34-42, 1997.
- COSTA, M. *et al.* Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience*, 75: 949-967, 1996.
- FURLAN, M. M. D. P. *et al.* Number and size of myenteric plexus of the duodenum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arq Neuropsiquiatr*, 57: 740-745, 1999.
- FURNESS, J.B.; COSTA, M. *The enteric nervous system*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987. 290p.

FREGONESI, C. E. P. T.; MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L. Estudo morfológico e quantitativo do corpo do estômago de *Rattus norvegicus*. *Acta Scientiarum*, 20: 221-224, 1998.

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

GABELLA, G. - Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J. Anat.*, 109: 81-95, 1971.

GABELLA, G. Innervation of the gastrointestinal tract. *Int. Rev.*, 59: 129-193, 1979.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. 1148 p.

IRWIN, D. A. The anatomy of Auerbach's plexus. *Am. J. Anat.*, 49: 141-165, 1931.

KARAOSMANOGLU, T. *et al.* Regional differences in the number of neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine and colon: an evaluation of markers used to count neurons. *Anat. Rec.*, 244: 470-480, 1996.

MIRANDA-NETO, M. H. *et al.* Evaluation of the areas of neuronal cell bodies and nuclei in the myenteric plexus of the duodenum of adult rats. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 58: 246-251, 2000.

NATALI, M. R. M.; MIRANDA-NETO, M. H. Effects of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of duodenum of rats. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 54: 273-279, 1996.

SANT'ANA, D. M. G. *et al.* Neuron number in the myenteric plexus of the ascending colon of rats; a comparative study using two staining techniques. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 55: 460-466, 1997.

SANTER, R. M.; BAKER, D. M. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 25: 59-97, 1988.

STERNINI, C. Structural and chemical organization of the myenteric plexus. *Ann. Rev. Physiol.*, 50: 81-93, 1988.

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

ZAUPA, C. *Diabetes Mellitus. Atividade complementar do bolsista do Programa Especial de Treinamento do Curso de Farmácia*. Universidade Estadual de Maringá, 1998. 43p.

Recebido em: 23/03/01

Aceito em: 18/07/01