NAIANNE KELLY CLEBIS

**Influência da atividade física sobre o envelhecimento inicial do
plexo mioentérico do jejuno em rato Wistar**

SÃO PAULO

2006

NAIANNE KELLY CLEBIS

**Influência da atividade física sobre o envelhecimento inicial do
plexo mioentérico do jejuno em rato Wistar**

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza

SÃO PAULO

2006

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1650
FMVZ

Clebis, Naianne Kelly

Influência da atividade física sobre o envelhecimento inicial do plexo mioentérico do jejuno em rato Wistar / Naianne Kelly Clebis. -- São Paulo: N. K. Clebis, 2006.
96 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza.

1. Sistema nervoso entérico. 2. Plexo mioentérico. 3. Atividade física. 4. Envelhecimento. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo quantitativo, morfométrico e ultraestrutural dos neurônios do plexo mioentérico do jejuno e análise morfológica dos neurônios do plexo cardíaco intrínseco de ratos de meia idade submetidos a programa de atividade física (corrida em esteira)", Protocolo nº416/2004, utilizando 50 ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Quantitative, morphometrical and ultrastructural study of the neurons of myenteric plexus of the jejunum and morphologic analysis of the intrinsic cardiac neurons of middle-aged rats submitted to regular physical activity (treadmill workout)" protocol number 416/2004, utilizing 50 rats, under the responsibility of Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting.

São Paulo, 25 de outubro de 2005

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CLEBIS, Naianne Kelly.

Título: Influência da atividade física sobre o envelhecimento inicial do plexo
mioentérico em rato Wistar

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutor em ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Deus

*Passei tanto tempo te procurando
Não sabia onde estavas, olhava para o infinito, e não te via.
E pensava comigo mesmo, será que tu existes?*

*Não me contentava com a busca e prosseguia,
Tentava te encontrar nas religiões e nos templos.
Tu também não estavas.*

*Te busquei através dos sacerdotes e pastores,
Também não te encontrei.
Senti-me só, vazio, desesperado e descri.*

*E na descrença te ofendi,
E na ofensa tropecei,
E no tropeço cai,*

*E na queda senti-me fraco
Fraco procurei socorro
No socorro encontrei amigos*

*Nos amigos encontrei carinho
No carinho eu vi nascer o amor
Com amor eu vi um mundo novo.*

*E no mundo novo resolvi viver...
O que recebi, resolvi doar
Doando alguma coisa muito recebi.*

*E em recebendo senti-me feliz
E ao ser feliz, encontrei a paz
E tendo a paz foi que enxerguei.*

*Que dentro de mim é que tu estavas
E sem procurar-te
Foi que te encontrei.*

(Deus - Autor Desconhecido)

A minha mãe Iracema Clebis

MÃE...

*que na presença constante me ensinou
na pureza do seu coração a vislumbrar
caminhos...*

MÃE...

*dos primeiros passos, das primeiras
palavras...*

MÃE...

*do amor sem dimensão, de cada momento,
dos atos de cada capítulo de minha vida
não ensaiados, mas vividos em cada
emoção...*

MÃE...

*da conversa no quintal, do acalanto do
meu sono aquecido de amor, aninhada
em seu coração...*

MÃE ...

*do abraço, do beijo que levo na
lembrança...*

MÃE...

é você que me inspira a caminhar...

MÃE...

*a presença de cada passo que o
tempo não apaga: por mais longo
e escuro que seja o caminho, haverá
sempre um horizonte...*

(Eternamente Mãe – Autor Desconhecido)

Aos familiares

*Agradeço a paciência, atenção e o carinho que tivestes comigo em todos os momentos de minha vida, em especial durante estes últimos quatro anos. Agradeço pelas palavras de incentivo, e por acreditarem em meu sonho. A todos e em especial ao meu irmão **Wilkerson Williams Clebis**.*

Ao Professor Orientador **Romeu Rodrigues de Souza** agradeço pela atenção e dedicação durante este período de minha vida.

Aos Professores **Sônia Luci Molinari, Marcílio Hübner de Miranda Neto, Maria Raquel Marçal Natali, Irvênia Luiza Santis Prada, José Roberto Kfoury Júnior, Eduardo Farias, Pedro Primo Bombonato e Francisco Javier Hernandez Blazquez** agradeço pela amizade e pelos ensinamentos.

A Amiga **Sandra Regina Stabille** que me acolheu desde o mestrado, não medindo esforços para me ajudar tanto na vida acadêmica quanto profissional. Te agradeço por ser um exemplo maravilhoso de pessoa e de profissional. Saiba que estarás sempre em meu coração.

Aos amigos que caminharam comigo por todos estes anos **Karina Martinez Gagliardo, Sandra Regina Matinez Gagliardo, Irena Fateeva, Maria da Glória dos Santos, Fábio Linares Silva, Renata de Britto Mari, Carlos Eduardo Seyfert, Patrícia Orlandini Gonzalez, Juliana Plácido Guimarães, Janaína Morueira, Carlos Eduardo Bezerra de Moura, Lilian de Jesus Oliveira, Priscilla Teixeira de Barros Moraes e Lucas Alécio Gomes.**

*Amizade é ter você aqui perto de mim,
sabendo que à distância possa ser
enorme, mas pequena para o coração.
Amizade é ter o seu sorriso a cada manhã,
como o Sol que nasce belo sem
distinguir quem é quem.*

*Amizade é o seu abraço forte,
que nos momentos mais difíceis vêm me
consolar e emprestar seu ombro para chorar.
Amizade é caminharmos juntos por toda vida,
não encontrando fronteiras
que nos faça desistir.*

*Amizade é poder dar um pouco de si mesmo
aos que mais necessitam de suas
palavras de conforto pleno.
Amizade é atravessar o mar de corações alheios,
transmitindo-lhes às boas
novas da vida;
Porque amizade é o que diz sermos amigos para uma
eternidade.*

*Amizade é uma dádiva divina que nasce com
a vida e morre deixando as
melhores lembranças.
Amizade é um bem comum entre as pessoas
de bom coração que desejam
o melhor ao próximo.*

*Amizade é poder a cada dia,
através do tempo sentir seu abraço forte e
repleto de ternura.*

*Pois uma amizade dura mesmo
que à distância nos separe e nos faça sofrer, mas ela
não morre, ela sobrevive nas más e boas recordações.*

(Amizade - Daniel Lucas dos Santos de Carvalho)

*Ao amigos que me auxiliaram na realização desta pesquisa **Karina Martinez**
Gagliardo, Diogo Nader Palermo, Renata de Britto Mari, Juliana Plácido
Guimarães, Priscilla Teixeira de Barros Moraes, Hildebrando Lilian de Jesus
Oliveira, Priscilla Teixeira de Barros Moraes, Lucas Alécio Gomes, Hildebrando
Benedicto, Janaina Morueira, e Rosimary Bosch, agradeço.*

*Agradeço a minha irmã de alma **Karina Martinez Gagliardo (Kaká)** que esteve sempre comigo durante a pós-graduação (nos bons e maus momentos) e que se tornou (ela e seus familiares) a minha família em São Paulo. Kaká você sempre estará em meu coração.*

Amigo é coisa para se guardar
Debaixo de sete chaves,
Dentro do coração,
assim falava a canção que na América ouvi,
mas quem cantava chorou ao ver o seu amigo partir,
mas quem ficou, no pensamento voou,
o seu canto que o outro lembrou
E quem voou no pensamento ficou,
uma lembrança que o outro cantou.
Amigo é coisa para se guardar
No lado esquerdo do peito,
mesmo que o tempo e a distância digam não,
mesmo esquecendo a canção.
O que importa é ouvir a voz que vem do coração.
Seja o que vier,
venha o que vier
Qualquer dia amigo eu volto pra te encontrar
Qualquer dia amigo, a gente vai se encontrar.

(Canção da América – Milton Nascimento)

A meu pai Luiz Darci Clebis (Desencarnado)

*Pai, semente fértil
Implantada no solo fecundo da mãe
Que pela graça divina
Germinou um fruto belo e forte.*

*Sustentáculo incólume a nos proteger
De porte magestoso como um carvalho
Nada nem ninguém é capaz de fazê-lo curvar
Seus braços são como tentáculos a nos enlaçar
Na ânsia de nos ver crescer.*

*Às vezes o cansaço baila querendo envolvê-lo
Mas ele parece inabalável
Às vezes parece-nos insensível e inacessível
Mas seu amor fala mais alto e ele se torna
Meigo, carinhoso e amigo
Torna-se nosso herói.*

*Hoje, Pai, vim render-lhe um tributo de amor
Você merece essa exaltação
Comovidos neste dia, pedíamos a sua benção
E queremos redimir-nos de todas as nossas faltas
Faltas levadas muitas vezes na ânsia de tornarmos livres
No afã de expressarmos nossos sentimentos.*

Peço a Deus que te abençoe e te ilumine onde quer que estejas

Pois tenho o orgulho de disser neste dia:

Um dia quero ser como o meu Pai.

(Pai – Luiz Darci Clebis)

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Aos Professores do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres do Departamento de Cirurgia da FMVZ - USP.

Aos funcionarios da Faculade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Aos Professores da Universidade Estadual de Maringá (Departamento de Ciências Morfofisiológicas).

Aos funcionários Cleonira Sarro, Maria Eurides Carlos e Maria dos Anjos Moreira Fortunato na Universidade Estadual de Maringá.

RESUMO

CLEBIS, N. K. Influência da atividade física sobre o envelhecimento inicial do plexo mioentérico do jejuno de rato Wistar. **[Influence of the physical activity on the initial aging of myenteric plexus of jejunum in Wistar rat]**. 2006. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Embora diversos trabalhos relatem as alterações fisiológicas que ocorrem no trato gastrointestinal com a senescência e com o exercício físico, poucos são os relatos morfológicos a respeito destas duas variantes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar qual a influência da atividade física (corrida em esteira) na ultraestrutura, na densidade neuronal (neurônios/mm²) e na área do perfil do corpo celular (μm²) dos neurônios mioentéricos do jejuno de ratos com a idade. Para tanto, foram utilizados 45 ratos Wistar divididos em três grupos: C (controle com seis meses), S (sedentário com 12 meses) e T (treinado com 12 meses) sendo utilizado 5 animais para cada técnica/grupo. Os preparados de membrana do jejuno foram corados com as técnicas histoquímicas de NADH e NADPH para estimar o número de neurônios e a área do perfil neuronal. Os resultados alcançados nos testes de esforço (TEMs) foram sempre maiores no grupo T do que no grupo S. O peso dos animais do grupo T foi menor que os do grupo S. A área do jejuno-íleo foi mensurada e não apresentou diferença significativa ($P>0,05$) entre os animais dos grupos C, S e T. Com exceção da membrana basal que apresentou-se menos definida e da região periganglionar que encontrava-se mais espessada nos animais do grupo S, não foram identificadas alterações ultraestruturais e no arranjo do plexo mioentéricos entre os grupos. A densidade dos neurônios reativos a NADH-diaforase foi menor ($P<0,05$) nos animais do grupo S ($67,76\pm3,7$) em relação aos animais dos grupos C ($104,8\pm5,86$) e T ($95,18\pm7,18$). Para os neurônios NADPH-diaforase, observou-se menor densidade neuronal nos grupos S ($32,32\pm1,7$) e T ($27,39\pm1,2$) comparado

com o grupo C ($44,53 \pm 4,5$), mas diferenças significativas não foram evidenciadas entre os grupos S e T. A área do perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios NADH-diaforase positivos diminuiu no grupo S ($103,4 \pm 8,68$) e aumento no grupo T ($198,4 \pm 8,22$) em relação ao grupo C ($167 \pm 6,93$). A área neuronal mensurada nos neurônios NADPH-diaforase positivos foi estatisticamente menor entre os grupos T ($129,9 \pm 9,55$) e C ($186,8 \pm 9,34$), mas não foram observadas diferenças entre estes grupos com o grupo S ($157,3 \pm 3,64$). Contudo, as alterações observadas indicam poucas são as influências do envelhecimento em animais com 12 meses de idade.

Palavras-chave: Sistema nervoso entérico. Plexo mioentérico. Atividade física.

Envelhecimento.

ABSTRACT

CLEBIS, N. K. Influence of the physical activity on the initial aging of myenteric plexus of jejunum in Wistar rat. **[Influência da atividade física sobre o envelhecimento inicial do plexo mioentérico do jejuno de rato Wistar]**. 2006. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Although several works tell the physiologic alterations that they happen in the treatment gastrointestinal with the aging and with the physical exercise, few are the morphologic reports regarding these two variants. Therefore, the objective of this work was to verify which the influence of the physical activity (treadmill workout) in the ultrastructural, in the neuronal density (neurons/mm²) and in the profile area of the cellular body (μm²) of the myenteric neurons of the jejunum of rats with aging. For so much, 45 Wistar rats were used and they were divided in three groups: C (controls with six months), S (sedentary with 12 months) and T (trained with 12 months) being used 5 animals for each technique/group. The whole mounts of the jejunum were stained with the NADH and NADPH histochemistry techniques to estimate the density and the profile area of the myenteric neurons. The results of the maximal exercise test (METs) they always bigger in the T group than S group. The weight of the animals of the T group was smaller than S group. The jejunum-ileum area was measured and it didn't present significant difference (P>0.05) among the animals of the C, s and T groups. Except for the basal membrane that it came less defined and of the periganglionic area that was more scattered in the animals of the S group, they were not identified ultrastructural alterations and in the arrangement of the myenteric plexus among the groups. The density of the NADH-diaphorase neurons was smaller (P<0.05) in the animals of the S group (67.76±3.7) in relation to the animals of the C (104.8±5.86) and T (95.18±7.18) groups. For the NADPH-

diaphorase neurons, smaller neuronal density was observed in the S (32.32 ± 1.7) and T (27.39 ± 1.2) groups compared with the C group (44.53 ± 4.5), but the significant difference didn't evidence among the S and T groups. The profile area (μm^2) of the NADH-diaphorase neurons decreased in the S group (103.4 ± 8.68) and increase in the T group (198.4 ± 8.22) in relation to the C group (167 ± 6.93). The profile area of the NADPH-diaphorase neurons was smaller statically among the T (129.9 ± 9.55) and C (186.8 ± 9.34) groups, but differences were not observed among these groups with the S group (157.3 ± 3.64). However, the observed alterations indicate little are the influences of the aging in animals with 12 months age.

Key-words: Enteric nervous system. Myenteric plexus. Physical activity. Aging.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	23
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 MATERIAL.....	31
4.2 MÉTODOS.....	32
4.2.1 Protocolo Experimental (Exercício Físico).....	32
4.2.2 Procedimentos Gerais.....	33
4.2.3 Área do Jejuno-íleo.....	34
4.2.4 Fator de Correção.....	35
4.2.5 Espessura da Túnica Muscular.....	35
4.2.6 Ultraestrutura dos neurônios mioentéricos.....	36
4.2.7 Marcação dos Neurônios Mioentéricos NADH-diaforase positivos.....	37
4.2.8 Marcação dos Neurônios Mioentéricos NADPH-diaforase positivos.....	38
4.2.9 Obtenção dos Preparados de Membrana.....	39
4.2.10 Estimativa do Número de Neurônios Mioentéricos por Área.....	39
4.2.11 Área do perfil do Corpo Celular dos Neurônios Mioentéricos.....	40
4.2.12 Análise Estatística.....	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 TESTE DE ESFORÇO.....	43
5.2 PESO.....	44
5.3 ÁREA DA SUPERFÍCIE INTESTINAL (JEJUNO-ÍLEO)	45
5.4 ESPESSURA DA TÚNICA MUSCULAR.....	46
5.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	47
5.6 NÚMERO DE NEURÔNIOS.....	59

5.7 ÁREA DO PERFIL NEURONAL.....	61
6 DISCUSSÃO.....	66
6.1 PERFORMANCE DOS ANIMAIS.....	67
6.2 PESO CORPORAL.....	69
6.3 ÁREA DA SUPERFÍCIE INTESTINAL (JEJUNO-ÍLEO).....	70
6.4 ESPESSURA DA TÚNICA MUSCULAR.....	71
6.5 MORFOLOGIA DO PLEXO MIOENTÉRICO.....	73
6.6 QUANTIFICAÇÃO E MORFOMETRIA DO PERFIL DO CORPO CELULAR DE NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS.....	76
7 CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	87

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

No Brasil o número de pessoas idosas tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. De acordo com Carvalho e Garcia (2003), nos países de terceiro mundo, entre as décadas de 30 e 60 no século passado, houve sensível diminuição da mortalidade, enquanto que os níveis de fecundidade permaneceram elevados. Porém, tal fato não foi verificado no Brasil, onde a diminuição da taxa de mortalidade foi acompanhada por uma sensível diminuição da taxa de fecundidade, o que deu início ao envelhecimento da população brasileira.

Conforme dados do último censo demográfico brasileiro realizado em 2000, a taxa de fecundidade por mulher diminuiu de 5,8 filhos em 1970 para 2,3 filhos em 2000, fazendo com que a população idosa passasse a representar 8,6% da população total do país (IBGE, 2000).

Porém esse “comportamento populacional” não é exclusivo de países de terceiro mundo, estando presente também em países desenvolvidos como, por exemplo, na Inglaterra, onde a taxa de fecundidade caiu de 2,3 filhos por mulher em 1970 para 1,6 filhos em 2000, fazendo com que a população idosa nesse país representasse 20,4% do número total de habitantes (CARVALHO; GARCIA, 2003).

Devido ao aumento da população idosa no mundo, diversas convenções têm se preocupado em garantir condições adequadas de vida para essas pessoas. Em 2000, por exemplo, foi realizada a XXVI Conferência Pan-Americana da Saúde que, por meio da resolução CSP26.R20, resolveu instar aos Estados Membros que:

- adotem prioridades de promoção da saúde apropriadas para as pessoas idosas e fixem metas com enfoque de gênero e etnia, bem como estratégias de vigilância nas áreas de saúde nutricional, atividade física, lesões acidentais, inclusive a prevenção das quedas, saúde mental e prevenção de agressões contra pessoas idosas;

- elaborem um plano para a capacitação pré e pós-graduação dos agentes de atenção primária e outros profissionais da saúde nos fundamentos da promoção da saúde e nos aspectos essenciais da atenção de saúde apropriada às pessoas idosas e à medicina geriátrica (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2000).

Desta forma, é evidente a preocupação mundial com os idosos, pois o envelhecimento tem como características principais a perda da capacidade de adaptação (física e social) e a menor expectativa de vida (AMANCIO; CAVALCANTI, 1975).

O envelhecimento pode provocar diversas alterações morfofisiológicas nos diferentes sistemas orgânicos, podendo ser definido como uma deteriorização progressiva das funções biológicas após o organismo ter atingido à máxima capacidade reprodutiva.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve por intuito analisar os efeitos do envelhecimento e da atividade física sobre os neurônios mioentéricos do jejuno de ratos de meia idade.

Desta forma, os objetivos foram:

Analisar a morfologia dos neurônios mioentéricos por meios de preparados de membrana e de ultraestrutura;

analisar a espessura da camada muscular intestinal (jejuno);

quantificar os neurônios reativos a NADH-diaforase e NADPH-diaforase;

mensurar a área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase e NADPH-diaforase positivos.

LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

O trato gastrointestinal é formado a partir do intestino primitivo (endoderma). Durante o desenvolvimento do trato gastrointestinal, os precursores dos neurônios derivados do ectoderma (crista neural) seguem para o intestino onde se distribuem em plexos intrínsecos na parede intestinal formando o sistema nervoso entérico (SNE) (BURNS; LE DOUARIN, 2001).

Os neurônios do SNE podem ser considerados como um sistema independente que controla e coordena a motilidade, o fluxo sangüíneo e as secreções necessárias para a digestão (GABELLA, 1979; GRUNDY; SCHEMANN, 2005; SCHEMANN; NEUNLIST, 2004).

Os principais componentes do SNE são os plexos mioentérico e submucoso (GRUNDY; SCHEMANN, 2005). O plexo mioentérico é o primeiro a se desenvolver, e segue do intestino anterior, então para o intestino médio e finalmente para o intestino posterior. O plexo submucoso desenvolve-se cerca de duas a três semanas após o desenvolvimento do plexo mioentérico (WALLACE ; BURNS, 2005).

Os neurônios do plexo mioentérico estão localizados entre as camadas circular e longitudinal da túnica muscular (IRWIN, 1931; STERNINI, 1988) e podem ser classificados levando-se em consideração diversos fatores como os aspectos morfológicos, elétricos, químicos (neurotransmissores) e funcionais (BREHMER; SCHRODL; NEUHUBER, 1999 GABELLA, 1979;BROOKES, 2001;; FURNESS, 2000; GALLIGAN et al., 2000; LOMAX; HANSEN, 2003; SCHEMANN; NEUNLIST, 2004).

Entre os diferentes tipos de neurônios do plexo mioentérico estão os neurônios inibitórios da musculatura circular (BREDT; SNYDER, 1992; LECCI; SANTICIOLI; MAGGI, 2002; VAN GELDRE et al., 2004). Esses neurônios promovem o relaxamento da camada muscular circular do trato gastrointestinal pela ação de seu neurotransmissor, o óxido nítrico (WARNER et al., 1994).

Em muitos casos, a localização de neurônios NADPH-diaforase reativos é idêntica a do NOS (óxido nítrico sintetase), cuja catálise e produção de óxido nítrico (NO) e citrulina ocorre a partir da L-arginina (CHO, 1993; CRACCO; DAWSON et al., 1991; FILOMANO, 1994; HOPE et al., 1991; SANDERS; WARD, 1992).

Com o envelhecimento, desordens na motilidade do trato gastrointestinal têm sido amplamente descritas, sendo a alteração do número de neurônios mioentéricos um dos fatores mais importantes para essas desordens (EL-SALHY; SANDSTRÖM; HOLMLUND, 1999; GABELLA, 1989; GOMES; SOUZA; LIBERTI, 1997; SANTER; BAKER, 1988; SOUZA et al., 1993;).

A degeneração do sistema nervoso periférico relacionada com a idade tem sido amplamente discutida, porém suas causas ainda não estão completamente elucidadas (GAVAZZI; COWEN, 1996). Acredita-se que com o envelhecimento ocorre maior perda da função do sistema nervoso parassimpático que do simpático, resultando em sintomas típicos da senescência como a taquicardia, constipação, insônia, disfunção erétil, retenção de fluídos, entre outros (ANDERSON; HEDLUND, 2002; LEE; YUN; BAZAR, 2004; PHILLIPS; POWLEY, 2001;).

O efeito do envelhecimento sobre o trato gastrointestinal e sobre o plexo mioentérico tem sido estudado por diversos autores (COWEN et al., 2000; FIRTH;

PRATHER, 2002; GRAFF; BRINCH; MADSEN, 2001; LILO; ROSE, 2000; MADSEN; GRAFF, 2004; O'MAHONY; O'LEARY; QUIGLEY, 2002; ORR; CHEN, 2002; PHILLIPS; KIEFFER; POWLEY, 2004; PHILLIPS; POWLEY, 2001; SANTER; BAKER, 1998; WADE, 2002). Sabe-se, porém, que com a idade ocorre diminuição na motilidade esofágica (HOLLINS; CASTELL, 1974; KHAN et al., 1977; SOERGEL; ZBORALSKE; AMBERG, 1964) e colônica (BUTT et al., 1993; MADSEN, 1992), retardo do esvaziamento gástrico (BROGNA et al., 1999; CLARKSTON et al., 1996; HOROWITZ et al., 1984; MOORE et al., 1983; SMITS; LEFEBVRE, 1996) e o aumento no trânsito intestinal (ANURAS; LEONING-BAUCKE, 1984).

As alterações relatadas com a senescência no trato gastrointestinal correlacionam-se intimamente com a deterioração da função autonômica. Por outro lado, acredita-se que a atividade física associada à dieta rica em fibras poderia ter alguma influência sobre o trato gastrointestinal (DAPOIGNY; SARNA, 1991). Contudo os resultados ainda não são conclusivos (CAMMACK et al., 1982; FORDTRAN; SALTIN, 1967; MOORE; DATZ; CHRISTIAN, 1990; ROBERTSON et al., 1993).

De maneira geral, o treinamento diminui a atividade simpática (KRIEGER; BRUM; NEGRÃO, 1999; LIU; KULAKOFSKY; ZUCKER, 2002) e aumenta o tônus parassimpático nos intervalos e durante o exercício (KRIEGER; BRUM; NEGRÃO, 1999; LIU; KULAKOFSKY; ZUCKER, 2002; NEGRÃO et al., 1992). Além disso, no sistema nervoso central, mais especificamente, no hipocampo, a atividade física pode aumentar o número de novas células devido a neurogênese (VAN PRAAG et al., 1999).

Desta forma, será que a atividade física poderia alterar morfológica e quantitativamente os neurônios mioentéricos NADH-diaforase e NADPH-diaforase reativos do jejuno de ratos que envelhecem realizando exercício (corrida em esteira)?

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo será descrito o material e os diferentes métodos utilizados neste trabalho.

4.1 MATERIAL

Foram utilizados neste estudo 45 ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, com seis meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram separados em três grupos: controle (C), sedentário (S) e treinado (T). Em cada grupo foram analisados cinco animais para as técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, cinco animais para a técnica da NADH-diaforase e cinco para a NADPH-diaforase. Os animais permaneceram alojados em caixas de polipropileno providas de bebedouro e comedouro, e mantidas em condições ambientais controladas de temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e de iluminação (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro) e receberam ração (Nuvital®) e água *ad libitum*.

4.2 MÉTODOS

Os métodos serão descritos nas seguintes etapas: protocolo experimental (exercício físico), procedimentos gerais, área do jejuno-íleo, fator de correção, espessura da túnica muscular, ultraestrutura dos neurônios mioentéricos, detecção dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase e NADPH-diaforase, obtenção dos preparados de membrana, estimativa do número de neurônios mioentéricos por área, área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos e análise estatísticas.

4.2.1 Protocolo Experimental (exercício físico)

Os animais foram submetidos a duas semanas de adaptação ao exercício físico e após este período os grupos foram separados de forma homogênea e somente os animais que possuíam a habilidade de correr foram mantidos no experimento. Os animais foram classificados conforme a performance na esteira em: (1) animais que se recusaram a correr, (2) corredores esporádicos, (3) corredores médio, (4) corredor consistente, e (5) excelentes corredores (DISHMAN et al., 1988). Apenas os animais classificados entre 3 e 5 participaram deste experimento.

No último dia da semana de adaptação os animais dos grupos S e T realizaram o teste de esforço máximo (TEM) em esteira elétrica a velocidade de

0,3Km/h (ou 5m/min). A cada 4 minutos a velocidade da esteira foi aumentada na mesma proporção (0,3Km/h) conforme protocolo de Silva et al. (1997).

Após o primeiro TEM, os animais do grupo T foram submetidos a seis meses de treinamento em esteira, cinco dias por semana, com carga progressiva até 60% daquela conseguida pelo grupo no teste de esforço. O tempo de atividade física variou 10 minutos por semana. Assim, na primeira semana o tempo de exercício foi de 30 minutos chegando a 60 minutos na quarta semana, onde ao final, outro TEM foi realizado para ajustar a intensidade do exercício pelas próximas quatro semanas. Ao todo, foram realizados sete TEM.

Os animais do grupo S realizaram atividade física apenas uma vez por semana à velocidade de 0,3km/h pelo período de 10 minutos apenas para manterem a habilidade de correr na esteira.

4.2.2 Procedimentos Gerais

Nos dias de aplicação do TEM os animais dos grupos S e T foram pesados antes de realizarem atividade física.

Ao final do experimento, após 12 horas de jejum, os animais com seis meses de idade (grupo C) e 12 meses de idade (grupo S e T) foram pesados, anestesiados com injeção letal endovenosa de tiopental (40mg/kg de peso corpóreo) e laparotomizados, sendo retirado o intestino delgado de cada animal. Na sequência

foi isolado o jejuno para os procedimentos referentes às técnicas da NADH-diaforase e da NADPH-diaforase.

Os animais destinados aos estudos de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão tiveram o sistema circulatório lavado e fixado anteriormente a retirada do intestino delgado do abdome. A lavagem procedeu-se por meio da inserção de uma cânula no ventrículo esquerdo, onde uma solução contendo salina tamponada fosfatada (PBS) a 0,1 M e pH 7.4 e heparina a 2% foi perfundida. As veias jugulares foram seccionadas previamente para permitir a completa lavagem do sistema. Após a lavagem, uma solução fixadora constituída por glutaraldeído a 5% e formoldeído a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,125M e pH 7.4 (solução fixadora de Karnovsky modificada) foi perfundida nos animais. A perfusão se deu por meio do mesmo orifício já utilizado para a lavagem do sistema circulatório. Contudo, para a perfusão das soluções fixadoras, as veias jugulares foram laqueadas.

4.2.3 Área do jejuno-íleo (cm²)

O comprimento e o diâmetro do jejuno-íleo foram mensurados e a área total (cm²) foi estimada nos animais dos grupos C, S e T. Este procedimento serviu para indicar possíveis alterações na área intestinal provocadas pelo envelhecimento e atividade física que poderiam interferir nos dados da quantificação neuronal.

4.2.4 Fator de correção

Para eliminar as diferenças que ocorrem no diâmetro dos fragmentos intestinais provocadas durante o processamento do material (distensão ou retração da parede intestinal) e pelo próprio desenvolvimento (envelhecimento), aplicou-se o fator de correção segundo Gabella (1971) e De Souza et al. (1993). Para tanto, a área intestinal (jejuno) foi mensurada antes e após o processamento (preparados de membrana). Desta forma, foi possível observar quanto a área do segmento processado se diferenciou em relação ao segmento a fresco, permitindo assim, a correção dos resultados.

4.2.5 Espessura da túnica muscular

O segmento inicial do intestino delgado subsequente ao duodeno (jejuno) de cada animal dos grupos C, S e T submetido à técnica para estudo em microscopia eletrônica de transmissão foi também utilizado para a análise morfométrica da espessura da túnica muscular à microscopia de luz. Depois de 72 horas na solução fixadora, as amostras foram reduzidas a fragmentos de 1 cm. Após permanecerem por mais 24 horas na solução fixadora, foram lavadas em álcool etílico a 70% e, em seguida, desidratadas em uma série crescente de álcoois. Após a desidratação, as amostras foram diafanizadas em xilol e incluídas em paraplast, para se obterem

cortes transversais de 5 μ m da parede intestinal, sendo, posteriormente, corados pela técnica de Hematoxilina- Eosina. Para as análises morfométricas da túnica muscular do jejuno, foram realizadas 15 medidas por animal e utilizando-se o programa analisador de imagem (ImagePro Plus), versão 3.0.1.

A escolha do campo para a mensuração se deu por meio de quadrantes. Uma vez que o jejuno apresenta um formato tubular, quatro diferentes campos foram amostrados ($0^\circ - 90^\circ$, $90^\circ - 180^\circ$, $180^\circ - 270^\circ$ e $270^\circ - 0^\circ$). Dentro de cada campo, a maior espessura foi mensurada.

4.2.6 Ultraestrutura dos neurônios mioentéricos

Após perfusão e laparotomia dos animais, o jejuno foi retirado do abdome, lavado com solução salina para a remoção das fezes, seccionado e imerso na mesma solução fixadora perfundida, por um período mínimo de 72 horas. Para o estudo microscópico, pequenos fragmentos do jejuno foram seccionados, lavados em solução tampão de cacodilato de sódio a 0,125M e pH 7,4 e imersos em uma solução aquosa de tetróxido de ósmio a 2%. As amostras permaneceram nesta solução durante 60 minutos, no escuro e sob agitação constante. Em seguida, foram lavados na mesma solução de tampão de cacodilato anteriormente referida, seguido de água destilada, para serem contrastados em blocos com a solução aquosa saturada de acetato de uranila durante 60 minutos sob agitação constante e em

recipiente escuro. Os fragmentos foram lavados com água destilada e desidratados em série crescente de etanóis (50% em 10 minutos, 70% em 10 minutos, 90% em 10 minutos e 100% em 20 minutos), sendo depois desidratados em óxido de propileno por 10 minutos. As amostras foram embebidas com uma solução de óxido de propileno e resina araldite, em constante agitação e em diferentes proporções. Após estas etapas, os espécimes foram transferidos para resina araldite pura e levados à estufa (60°C), permanecendo durante um período mínimo de dois dias. Os blocos de resina formados foram trimados e posteriormente seccionados com 70-90 nm de espessura por navalha de diamante. As secções foram colocadas em placas de cobre e coradas com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo. As secções assim obtidas foram analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão.

4.2.7 Detecção dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos (GABELLA,1969)

Os jejunos foram lavados e preenchidos com a solução de Krebs (pH 7,3), constituída por 1,3g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 0,24 g de cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,44 g de cloreto de potássio (KCl), 0,165g de hipofosfato de sódio (NaH_2PO_2), 7,05 g de cloreto de sódio (NaCl) e 0,27 g de cloreto de cálcio (CaCl_2) em 1 litro de água destilada. Para o preenchimento as extremidades do segmento foram laqueadas com fio de sutura. A seguir, foram imediatamente submetidos ao procedimento para evidenciar os neurônios NADH-diaforase. Para tanto, foram realizadas duas lavagens de 10 minutos cada em solução de Krebs,

seguida da permeabilização em Krebs contendo Triton X-100 a 0,3% durante 5 minutos. Após, foram realizadas mais duas lavagens de 10 minutos cada em Krebs. Posteriormente, o material foi incubado em meio de reação constituído por 25ml de solução estoque de Nitro Blue Tetrazolium (NBT, solução estoque na concentração de 0,5 mg/ml), 25 ml de tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7,3), 50ml de água destilada e 0,05 g de β -NADH por 45 minutos. Após este período, os jejunos foram liberados das laqueaduras e fixados em solução de formoldeído a 10% em tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7,3).

4.2.8 Detecção dos neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos (SCHERER-SINGLER et al., 1983)

Os jejunos foram lavados e preenchidos com a solução de Krebs pH 7,3 (1,3 g de NaHCO_3 , 0,24 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,44 g de KCl, 0,165 g de NaH_2PO_2 , 7,05 g de NaCl e 0,27 g de CaCl_2 em 1 litro de água destilada). Para o preenchimento as extremidades do segmento foram laqueadas com fio de sutura. A seguir, para a evidenciar os neurônios mioentéricos, os jejunos foram submetidos a duas lavagens em solução de Krebs (10 minutos cada) seguidas de permeabilização em Krebs contendo Triton X-100 a 0,3% dissolvido em tampão fosfato de sódio (pH 7,3) durante 10 minutos. Depois, mais duas lavagens em PBS durante 10 minutos cada foram necessárias para posterior incubação em meio de reação constituído por 50mg de NBT, 100 mg de β -NADPH e 0,3% de Triton X-100 em tampão Tris-HCl (0,1M pH 7,6) por 2 horas. Posteriormente os jejunos foram liberados das

laqueaduras e imersos em solução de paraformaldeído a 4% para a fixação e armazenagem.

4.2.9 Obtenção dos preparados de membrana

Os jejunos foram seccionados ao longo da extensão da borda mesentérica. Em seguida, cada jejuno foi microdissecado em placa de vidro, com auxílio de micro pinça e micro tesoura, sob estereomicroscópio com transiluminação, para a retirada da túnica mucosa e da tela submucosa, com preservação das túnicas muscular e serosa. Cada preparado de membrana assim obtido foi montado entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada.

4.2.10 Estimativa do número de neurônios mioentéricos por área (mm²)

A densidade neuronal foi verificada por meio do microscópio Olympus BX40, com objetiva de 40X. A imagem observada no microscópio foi capturada por câmera digital de alta resolução e transferida para o computador. Um sistema teste adaptado para cada preparado de membrana constituído por 40 campos baseados na largura e no comprimento dos preparados de membranas foi utilizado para padronizar a captura das imagens. Desta forma, os 40 campos foram distribuídos como oito colunas com cinco linhas cada, amostrando todas as regiões (mesentérica,

intermediária e antimesentérica). Em virtude do jejuno, assim como todo o intestino, variar em sua circunferência, um sistema teste de amostragem retangular com dimensões fixadas não pôde ser adequado neste material. Assim um ajuste para cada coluna dentro do preparado de membrana foi necessário. Contudo, os pontos das colunas foram ajustados de maneira a manter a mesma distância entre si (JARVINEN et al., 1999).

Após a captura das imagens, os neurônios foram quantificados e o fator de correção foi utilizado para corrigir as variações da área jejunal decorrentes do processamento do material e do próprio desenvolvimento. Para tanto um sistema teste com linhas de inclusão e exclusão foi utilizado. Desta forma, os neurônios que tocavam as margens superior e direita do sistema teste foram contados enquanto que os que tocavam as margens inferior e esquerda foram excluídos. A área do sistema teste utilizado para a quantificação foi $0,15\text{mm}^2$ e a área total analisada por animal foi 6mm^2 .

4.2.11 Área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos (μm^2)

A mensuração da área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos foi realizada pelo programa de análise de imagem computadorizado ImagePro Plus, versão 3.0.1. Para tanto, os campos utilizados para a quantificação neuronal foram novamente analisados. Desta forma, foram analisados 42 campos por jejuno.

O fator de correção para corrigir as variações da área jejunal decorrentes do processamento do material e do próprio desenvolvimento foi utilizado para impedir alterações na área neuronal provocadas pela retração ou distensão da parede intestinal (GABELLA, 1971; DE SOUZA et al., 1993).

4.2.12 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 4. Os dados referentes a quantificação, mensuração da área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase e NADPH-diaforase, área do jejuno-íleo e espessura da túnica muscular foram analisados pelo teste Tukey. Para a análise do peso e do TEM foi utilizado o teste t de Student. Os resultados foram descritos como (média $\pm$ erro padrão). Diferenças significativas foram consideradas se $P < 0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos serão descritos a seguir.

5.1 TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO (TEM)

Os resultados do TEM para os animais dos grupos T e S encontram-se apresentados na tabela 1. O TEM para os animais do grupo T aumentou significativamente ($P < 0,05$) após o primeiro mês de treinamento (Teste 1) em relação aos animais do grupo S.

Tabela 1- Média da velocidade máxima (km/h) alcançada nos testes de esforço pelos animais dos grupos sedentário (S) e treinado (T)

Teste de Esforço Máximo (km/h) (n=15)							
	1	2	3	4	5	6	7
S	0,86±0,03 ^a	0,81±0,04 ^a	0,81±0,03 ^a	0,73±0,04 ^a	0,69±0,04 ^a	0,66±0,04 ^a	0,6±0,04 ^a
T	0,9±0,03 ^a	1,14±0,04 ^b	1,2±0,05 ^b	1,3±0,05 ^b	1,2±0,05 ^b	1,2±0,05 ^b	1,0±0,05 ^b

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey.

A comparação entre as médias da velocidade máxima alcançada no teste de esforço dos animais dos grupos S e T estão demonstradas na figura 1.

Figura 1 - Média da velocidade máxima (Km/h) alcançada pelos animais dos grupos sedentário (S) e treinado (T) nos testes de esforço máximo

5.2 PESO CORPÓREO

A pesagem dos animais foi realizada um vez por mês, antes do TEM. Os animais do grupo C foram pesados antes do sacrifício e o peso corporal médio foi 406g.

Entre os grupos S e T houve na quarta e quinta pesagem diferença significativa ($P < 0,05$). Nas demais pesagens, não ocorreram diferenças significativas entre os animais dos grupos S e T, embora a média do peso corporal dos animais do primeiro grupo tenha sido maior do que as do segundo grupo. Ao final do experimento, os

animais dos grupos S e T apresentaram médias estatisticamente maiores ($P < 0,05$) do que os animais do grupo C (Tabela 2).

Tabela 2 - Média do peso corporal (g) dos animais dos grupos controle (C*), sedentário (S) e treinado (T)

	Peso (g) (n=15)						
	1	2	3	4	5	6	7
C	-	-	-	-	-	-	406±14,26 ^a
S	421±9,1 ^a	446,2±9,2 ^a	465,4±8,9 ^a	483,4±9,5 ^a	497,2±9,6 ^a	505,4±10,28 ^a	488±11,64 ^b
T	421,3±7,9 ^a	431,9±7,0 ^a	449,7±7,7 ^a	461,2±7,7 ^a	472,2±7,6 ^b	478,5±8,8 ^b	468,5±9,9 ^b

C* - Os animais do grupo C foram pesados apenas na última pesagem. Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) pelo teste t de Student.

A comparação entre as médias do peso corporal (g) dos animais dos grupos C, S e T está demonstrada na figura 2.

Figura 2 - Média do peso corporal (g) dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

5.3 ÁREA DA SUPERFÍCIE INTESTINAL (JEJUNO-ÍLEO) (cm²)

Os resultados da mensuração da área da superfície do jejuno-íleo estão apresentados na tabela 3.

Os dados obtidos demonstram que em todas as mensurações a área do jejuno-íleo dos animais do grupo S foi maior do que as dos animais dos grupos C e T. Na mensuração dos segmentos a fresco este aumento da área intestinal do grupo S em relação aos grupos C e T não foi significativo ($P > 0,05$) tanto para as amostras utilizadas na técnica da NADH-diaforase quanto para na da NADPH-diaforase. Contudo, quando analisada a área do jejuno-íleo após o processamento do material pode-se observar que nos animais do grupo T esta se apresentou significativamente menor ($P < 0,05$) em relação ao grupo S e semelhante ao grupo C ($P > 0,05$) para a técnica da NADH-diaforase. Para a técnica da NADPH-diaforase os segmentos intestinais dos grupos S e T foram estatisticamente maiores ($P < 0,05$) do que aqueles do grupo C e semelhantes entre si ($P > 0,05$).

Tabela 3 - Área média e respectivo fator de correção da superfície do jejuno-íleo (cm²) a fresco e após processamento do material dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

	NADH-d			NADPH-d		
	Área média do jejuno-íleo (cm ²)			Área média do jejuno-íleo (cm ²)		
	Fresco	Processado	Fator de correção (%)	Fresco	Processado	Fator de correção (%)
C (n = 5)	113±5,3 ^a	132,6±5,95 ^a	17,34	115,4±3,8 ^a	140,7±5,8 ^a	21,92
S (n = 5)	123±2,8 ^a	179,5±14,46 ^b	45,93	124,2±2,5 ^a	176,2±9,47 ^b	41,86
T (n = 5)	118±4,06 ^a	129±8,08 ^a	8,92	116,8±1,98 ^a	175,6±8,5 ^b	50,34

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($P>0.05$) pelo teste de Tukey.

5.4 ESPESSURA DA TÚNICA MUSCULAR

A espessura da túnica muscular (Figuras 3 A-C) (camada muscular longitudinal + camada muscular circular) apresentou-se maior nos animais do grupo T e menor nos animais do grupo S, contudo, esta diferença não foi significativa ($P>0,05$). Os resultados desta análise morfométrica estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Média da espessura da túnica muscular externa (μm) dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

Grupo	Média $\pm$ erro padrão (μm) (n=5)
C (n=5)	100,5 $\pm$ 3,87 ^a
S (n=5)	93,36 $\pm$ 7,48 ^a
T (n=5)	105,8 $\pm$ 26,63 ^a

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($P>0.05$) pelo teste de Tukey.

Figura 3 - Corte transversal do jejuno corado com a técnica da Hematoxilina-Eosina (H-E). A) animais do grupo controle. B) animais do grupo sedentário. C) animais do grupo treinado. Camada muscular longitudinal (seta); camada muscular circular (seta cheia). (Objetiva 20x. – barra, 100 μm)

5.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Não foram evidenciadas alterações morfológicas nos neurônios mioentéricos NADH-diaforase e NADPH-diaforase positivos, bem como no arranjo do plexo mioentérico nos animais dos grupos C, S e T. A disposição preferencial das malhas do plexo seguiu o sentido da camada muscular (Figuras 4-6). Neurônios grandes foram evidenciados com forte intensidade de coloração pelas técnicas da NADH- e NADPH-diaforase (Figura 4), porém foi também possível observar neurônios corados com menor intensidade por ambas as técnicas (Figuras 4-5). Feixes de fibras nervosas interganglionares foram evidenciados pela técnica da NADPH-diaforase (Figuras 5-6).

A maioria dos neurônios mioentéricos apresentou formato alongado (Figura 6); os neurônios encontravam-se dispostos no interior de gânglios (Figuras 4-6), contudo, neurônios isolados também foram evidenciados (Figura 6).

Ultraestruturalmente, os gânglios mioentéricos, localizados entre as camadas circular e longitudinal da túnica muscular (Figura 7), delas separados pelo denominado espaço periganglionar. Neste espaço, estavam presentes tecido conjuntivo denso (Figuras 7, 8A-C), representado especialmente por feixes de fibrilas colágenas, seccionadas transversalmente ou longitudinalmente e por uma delgada membrana basal (Figuras 8A-C), intimamente juxtaposta à membrana plasmática (Figuras 8D-E). No espaço periganglionar pôde-se observar a presença de partes de células semelhantes a fibroblastos (Figura 7).

Não foram evidenciadas alterações morfológicas nos neurônios mioentéricos NADH-diaforase e NADPH-diaforase positivos, bem como no arranjo do plexo mioentérico nos animais dos grupos C, S e T. A disposição do plexo seguiu o sentido da camada muscular (Figuras 4-6). Neurônios grandes foram evidenciados com forte intensidade pelas técnicas da NADH e NADPH-diaforase (Figura 4), porém foi possível observar neurônios corados com menor intensidade para ambas as técnicas (Figuras 4-5). Feixes de fibras nervosas conectando os gânglios mioentéricos foram evidenciados pela técnica da NADPH-diaforase (Figuras 5-6).

A maioria dos neurônios mioentéricos apresentou formato alongado (Figura 6) e encontrava-se disposto dentro de gânglios (Figuras 4-6), contudo, neurônios isolados também foram evidenciados (Figura 6).

Ultraestruturalmente, não foram observadas alterações nos neurônios mioentéricos dos animais dos grupos C, S e T.

Os gânglios mioentéricos estavam localizados entre as camadas circular e longitudinal da túnica muscular (Figura 7) envolvidos por tecido conjuntivo denso (Figuras 7, 8A-C) e por uma membrana basal (Figuras 8A-C), sendo a região entre as camadas musculares denominada espaço periganglionar (Figuras 8D-E). No espaço periganglionar pôde-se observar a presença de células da glia (Figura 7).

Figura 4 - Neurônios mioentéricos corados com a técnica histoquímica de NADH-diaforase no jejuno de ratos dos grupos controle (9-A), sedentário (9-B) e treinado (9-C). Os neurônios encontravam-se dentro de gânglios (A-C). Neurônios grandes apresentavam citoplasma fortemente corado (seta cheia). Neurônios fracamente corados foram evidenciados nos grupos C, S e T (seta). (Objetiva de 40X, barra, 50 μ m)

Figura 5 - Neurônios mioentéricos corados com a técnica histoquímica de NADPH-diaforase no jejuno de ratos dos grupos controle (10-A), sedentário (10-B) e treinado (10-C). Os neurônios encontravam-se, normalmente, dentro de gânglios (A-C). Neurônios com citoplasma fortemente corado (seta cheia) e neurônios fracamente corados (seta) foram evidenciados nos grupos C, S e T. Fibras interganglionares foram identificadas em todos os grupos (cabeça de seta). (Objetiva de 40X, barra, 50 μ m)

Figura 6 - Neurônios mioentéricos corados com a técnica histoquímica de NADPH-diaforase no jejuno de ratos com formato alongado (seta) e encontrados, normalmente, dentro de gânglios (11-A-B). Neurônios isolados foram identificados no plexo mioentérico (cabeça de seta) (11 C-E). (Objetiva de 40X, barra, 50 μ m)

Figura 7 – Eletrofotomicrografia do jejuno de rato evidenciando gânglios mioentéricos (g) localizados no espaço periganglionar (EPG). Presença de fibras colágenas (Co) e fibroblasto (F)

A espessura do espaço periganglionar foi maior (Figuras 8D-F) e as fibrilas colágenas apresentaram-se mais esparsas nos animais do grupo S do que nos animais dos grupos C e T (Figuras 8A-C).

A membrana basal apresentou-se mais bem evidente nos grupos C e T do que nos animais do grupo S (Figuras 8A-C). Em todos os grupos foi evidenciada a presença de fibroblastos conforme demonstrado na Figura 8A.

No neurópilo foi possível observar a presença numerosos de processos neuronais em todos os grupos. Terminações nervosas com vesículas granulares e agranulares foram evidenciadas (Figuras 9D-F).

A membrana citoplasmática dos neurônios dos animais dos grupos C, S e T, bem como, as regiões de comunicação entre os neurônios (SINAPSES) puderam ser observadas (Figuras 9A-C).

No interior dos neurônios mioentéricos foram observados, em todos os grupos, grande quantidade de mitocôndrias (Figuras 10 A-C) e de retículo endoplasmático rugoso (Figuras 10 D-F). Complexo de Golgi também foi evidenciado. (Figuras 10A).

Os neurônios mioentéricos apresentaram, em todos os grupos, núcleos grandes (Figuras 11A-C), com membrana nuclear dupla (Figuras 11D-F). Os núcleos eram ovóides (Figuras 11 A-C) e apresentavam nucléolo bem desenvolvido e cromatina dispersa (Figuras 11 B-C).

Figura 8 - Eletrofotomicrografias do jejuno de ratos dos grupos controle (C-A e C-D), sedentário (S-B e S-E) e treinado (T-C e T-F) evidenciando as fibras musculares circulares (Mu), os gânglios mioentéricos (g), o espaço periganglionar (EPG), as fibras colágenas (Co), a membrana basal (MB) e fibroblasto (F)

Figura 8 - Eletrofotomicrografias do jejuno de ratos dos grupos controle (C-A e C-D), sedentário (S-B e S-E) e treinado (T-C e T-F) evidenciando as fibras musculares circulares (Mu), os gânglios mioentéricos (g), o espaço periganglionar (EPG), as fibras colágenas (Co), a membrana basal (MB) e fibroblasto (F)

Figura 9 - Eletrofotomicrografias do jejuno de ratos dos grupos controle (C-A e C-D), sedentário (S-B e S-E) e treinado (T-C e T-F) evidenciando neurópilo (Np) com vesículas granulares (cheias) e agranulares (vasias) (D-F). Em A-C estão evidenciadas a membrana citoplasmática dos neurônios mioentéricos do jejuno (Mc) e as sinapses (Si)

Figura 10 - Eletrofotomicrografias do jejuno de ratos dos grupos controle (C-A e C-D), sedentário (S-B e S-E) e treinado (T-C e T-F) evidenciando as organelas celulares. Mitocôndria (M) (A-C), complexo de Golgi (G) (A) e retículo endoplasmático rugoso (RE) (D-F)

Figura 11 - Eletrofotomicrografias do jejuno de ratos dos grupos controle (C-A e C-D), sedentário (S-B e S-E) e treinado (T-C e T-F) evidenciando núcleo (N) (A-C), nucléolo (Nu) (B-C) e membrana nuclear (Mn) (D-F)

5.6 NÚMERO DE NEURÔNIOS

Os resultados referentes ao número médio de neurônios e ao número de neurônios/ mm² (densidade neuronal) reativos a NADH-diaforase e NADPH-diaforase estão apresentados na tabela 5 e na figura 12. O número médio de neurônios bem como a densidade neuronal (NADH-diaforase positivos) diminuiu significativamente ($P < 0,05$) com a idade (grupo S). Também foi constatada diminuição do número médio de neurônios NADH-diaforase positivos e da respectiva densidade neuronal no grupo T, contudo esta não foi significativa quando comparada com o grupo C ($P > 0,05$).

Para os neurônios NADPH-diaforase positivos observou-se que tanto nos animais do grupo S quanto nos do grupo T houve diminuição significativa ($P < 0,05$) do número médio de neurônios e da densidade neuronal em relação ao grupo C. Embora não tenham ocorrido diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos S e T ($P > 0,05$), os resultados demonstram que no grupo T houve diminuição do número médio e da densidade neuronal em relação ao grupo S.

Tabela 5 - Número médio de neurônios mioentéricos NADH-diaforase e NADPH-diaforase positivos do jejuno por área dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T) e respectivos fatores de correção (F)

	NADH-D (n=5)			NADPH-D (n=5)		
	Número de neurônios/6mm ²	Número de neurônios/mm ²	Fator de correção (%)	Número de neurônios/6mm ²	Número de neurônios/mm ²	F (%)
C	629±35,17 ^a	104,8±5,86 ^a	17,34	267,2±27,29 ^a	44,53±4,5 ^a	21,92
S	406,6±22,26 ^b	67,76±3,7 ^b	45,96	194±10,29 ^b	32,32±1,7 ^b	41,86
T	571,1±43,1 ^a	95,18±7,18 ^a	8,92	164,4±7,27 ^b	27,39±1,2 ^b	50,34

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($P>0.05$) pelo teste de Tukey.

O número médio de neurônios NADH-diaforase positivos e a densidade neuronal (neurônios/mm²) foram maiores cerca de 2,35 vezes no grupo C, 2,09 vezes no grupo S e 3,47 no grupo T do que o número médio de neurônios NADPH-diaforase positivos e respectivas densidades neuronais (Tabela 5 e Figura 12).

Figura 12 - Número médio de neurônios NADH-diaforase e NADPH-diaforase positivos e densidade neuronal (neurônios/mm²) no jejuno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

5.7 ÁREA DO PERFIL NEURONAL (μm²)

A área (μm²) do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos e NADPH-diaforase positivos foi mensurada com o programa de análise de imagem ImagePro Plus, versão 3.0.1 e os resultados estão demonstrados na tabela 6 e na figura 13.

Na técnica da NADH-diaforase, observou-se que os neurônios eram significativamente menores ($P < 0,05$) no grupo S em relação aos grupos C e T. Nos animais do grupo T, os neurônios NADH-diaforase positivos foram maiores ($P < 0,05$) quando comparados aos neurônios dos animais do grupo C.

Os neurônios NADPH-diaforase positivos eram estatisticamente semelhantes ($P>0,05$) entre os animais dos grupos C e S, embora diminuição na área do perfil do corpo celular dos neurônios NADPH-diaforase positivos dos animais do grupo S tenha sido observada. Entre os grupos S e T também foram verificadas áreas semelhantes ($P>0,05$), porém a média da área neuronal foi menor no grupo T. Diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$) foi observada entre os neurônios dos animais dos grupos C e T, sendo que o último grupo apresentou média menor do que aquela verificada para o grupo C.

Tabela 6 - Média da área do perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase e NADPH-diaforase positivos do jejuno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

	NADH-diaforase (n=5)	NADPH-diaforase (n=5)
	Média $\pm$ erro padrão	Média $\pm$ erro padrão
C	167 $\pm$ 6,93 ^a	186,8 $\pm$ 9,34 ^a
S	103,4 $\pm$ 8,68 ^b	157,3 $\pm$ 3,64 ^{ab}
T	198,4 $\pm$ 8,22 ^c	129,9 $\pm$ 9,55 ^b

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($P>0,05$) pelo teste de Tukey.

Os neurônios NADPH-diaforase positivos apresentaram-se, em média, maiores que os neurônios NADH-diaforase positivos, sendo 11,85% maiores no grupo C e 52,12% no grupo S. Porém, no grupo T os neurônios NADPH-diaforase positivos foram 52,73% menores do que os neurônios NADH-diaforase positivos do mesmo grupo.

Figura 13 - Média da área do perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase e NADPH-diaforase positivos do jejuno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

A distribuição neuronal de acordo com a área do perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase e NADPH-diaforase positivos do jejuno dos animais dos grupos C, S e T está apresentada nas tabela 7 e 8 e figuras 14-15.

Para todos os grupos foram mais freqüentes neurônios NADH-diaforase positivos com área do perfil do corpo celular variando entre 100-200 μm^2 (Tabela 7 e Figura 14).

Tabela 7 - Frequência relativa (%) dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos do jejuno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T) quanto a área do perfil do corpo celular (μm^2)

Área (μm^2)	C (n=5)	S (n=5)	T (n=5)
0 100	23,76	56,32	12,31
100 200	45,41	38,35	49,28
200 300	21,77	4,52	27,95
300 400	8,02	0,7	8,34
400 500	1,04	0,11	1,32
500	0	0	0,8

Figura 14 - Frequência relativa conforme a área do perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos do jejuno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

Os resultados da análise morfométrica dos neurônios NADPH-diaforase positivos demonstraram que a maioria dos neurônios apresentou área média do

perfil do corpo celular entre 100-200 (μm^2) em todos os grupos estudados (Tabela 8 e Figura 15).

Tabela 8 - Frequência relativa (%) dos neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos do jejuno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T) quanto a área do perfil do corpo celular (μm^2)

Área (μm^2)	C (n = 5)	S (n = 5)	T (n = 5)
0 100	14,25	9,15	34,11
100 200	50,3	70,86	57,13
200 300	25,89	18	8,18
300 400	7,94	1,14	0,58
400 500	1,42	0,85	0
500	0,2	0	0

Figura 15 - Frequência relativa conforme a área do perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos do jejuno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

6 DISCUSSÃO

As alterações morfológicas e funcionais no trato gastrointestinal descritas com o envelhecimento (FIRTH; PRATHER, 2002; GRAFF et al., 2001; O'MAHONY et al., 2002; ORR; CHEN, 2002) têm sido atribuídas às mudanças do sistema nervoso autônomo, com comprometimento do sistema nervoso entérico que resulta em constipação, disfagia, aumento do trânsito gastrointestinal, entre outros sintomas (GABELLA, 1989; GAVAZZI; COWEN, 1996; SANTER; BAKER, 1988).

Muitas são as terapêuticas indicadas para minimizar os efeitos deletérios da idade sobre o organismo, entre elas, a prática de atividade física, pois promove o melhor funcionamento do organismo e bem-estar aos indivíduos (DAPONGY; SARNA, 1991; VAN DER BIJ; LAURENT; WESING, 2002). Por esta razão, buscamos neste estudo analisar os efeitos do envelhecimento e da corrida em esteira em alguns parâmetros constitucionais, morfológicos e quantitativos do jejuno e do plexo mioentérico em animais de meia-idade (dos seis aos 12 meses de idade).

6.1 PERFORMANCE DOS ANIMAIS

Para estabelecer o programa de atividade física utilizou-se um protocolo experimental monitorado por TEMs periódicos para determinar e ajustar a intensidade do exercício (SILVA et al., 1997), que no presente experimento foi de

60% da intensidade máxima obtida no TEM, por 30-60 minutos, durante seis meses, na frequência de cinco vezes por semana.

Os resultados obtidos ao final do período experimental demonstraram que, à exceção do primeiro TEM quando os animais foram separados de forma homogênea em grupos S (sedentário) e T (treinado), nos demais TEMs a intensidade (carga) de exercício alcançada pelos animais do grupo T foi estatisticamente superior ($P < 0,05$) àquelas atingidas pelos animais do grupo S.

Os valores alcançados nos TEMs pelos animais do grupo T aumentaram em 40,7% (2° TEM), 48,1% (3° TEM), 78% (4° TEM), 73,9% (5° TEM), 81,8% (6° TEM) e 66,6% (7° TEM) em relação aos animais do grupo S.

Desde o primeiro TEM foi verificado declínio progressivo da carga máxima obtida pelos animais do grupo S. Do primeiro ($0,86 \pm 0,03$ km/h) ao último teste ($0,6 \pm 0,04$ km/h) houve diminuição de 43,3% da intensidade de máxima alcançada.

Já no grupo T observamos aumento progressivo do primeiro ($0,9 \pm 0,03$ km/h) ao quarto ($1,3 \pm 0,05$ km/h) teste. A partir daí, houve declínio da carga máxima, chegando esta até $1,0 \pm 0,5$ km/h no último teste.

Com o envelhecimento ocorre limitação da performance em atividades físicas (McARDLE, 1998; PENNATHUR et al., 2003), explicando, assim, o declínio no resultado do TEM nos animais do grupo T ao final do experimento. Contudo, o valor alcançado ($1,0 \pm 0,05$ km/h) pelo grupo T foi ainda superior àquele obtido no primeiro TEM ($0,9 \pm 0,03$ km/h), indicando um efeito benéfico da atividade física para a “manutenção” da performance quando comparado com o resultado obtido no mesmo teste pelos animais do grupo S ($0,6 \pm 0,04$ km/h).

6.2 PESO CORPORAL

Em relação ao peso corporal dos animais, nossos resultados demonstraram que até a quarta pesagem (terceiro mês de treinamento) a média do peso corporal entre os animais dos grupos S e T manteve-se estatisticamente semelhante ($P>0,05$), embora tenha sido observado aumento de peso no grupo S.

Na quinta e sexta pesagens (quarto e quinto meses de treinamento, respectivamente) constatamos que o peso corporal dos animais do grupo S foi maior ($P<0,05$) do que o dos animais do grupo T. Contudo, ao final do período experimental, o peso corporal não diferiu estatisticamente ($P>0,05$) entre os grupos S e T, mas em ambos os grupos foi aproximadamente 17% maior ($P<0,05$) do que o peso apresentado pelo grupo C. Embora o peso corpóreo tenha diminuído ao final do período experimental nos grupos S e T, a perda foi ligeiramente maior para o grupo S (3,48%) do que para o grupo T (2,1%). Porém, perdas significativas causadas pelo envelhecimento não foram identificadas em nosso estudo, contradizendo o preconizado pela literatura científica. Tal fato é sugestivo de que 12 meses é idade insuficiente para verificações estatisticamente significativas dos efeitos do envelhecimento sobre o peso corpóreo de ratos.

Conforme McArdle (1988), após os 60 anos de idade, há diminuição do peso corporal em humanos. A variabilidade do peso corporal poderia ocorrer por mudanças na taxa metabólica dos indivíduos idosos (LISSNER et al., 1990). Para Seidell e Visscher (2000), a contribuição do tecido adiposo na perda de peso

corporal com a idade é relativamente pequena, uma vez que com o envelhecimento pode ocorrer diminuição da lipólise, principalmente próximo às vísceras.

Por outro lado, a atividade física moderada poderia atenuar a perda de peso provocada pela idade (DZIURA et al., 2004). Durante o exercício físico há aumento do uso de lipídeos e após a atividade física ocorre rápida recuperação dos níveis de leptina (DESGORDE et al., 2004). A leptina plasmática, por sua vez, é fundamental para a lipólise da massa corporal gorda (STEINBERG et al., 2002). Desta forma, os efeitos do treinamento na reposta da leptina poderia induzir a maior eficiência na manutenção da homeostase pelo aumento do consumo de lipídeos após o exercício prolongado (DESGORDE et al., 2004; STICH et al., 2000), o que poderia justificar em nosso estudo a perda de peso corporal, embora nem sempre significativa, porém constante, encontrada nos animais do grupo T em relação aos do grupo S. Diminuição do peso corporal de indivíduos treinados em relação a indivíduos sedentários foi também verificada em humanos por Kyle et al. (2004).

6.3 ÁREA DA SUPERFÍCIE INTESTINAL (JEJUNO-ÍLEO)

Entre as alterações morfológicas que acompanham a senescência está o aumento da área da superfície dos segmentos que compõem o trato gastrointestinal. Com o avançar da idade, o comprimento e a largura do intestino delgado e do intestino grosso aumentam, produzindo redução da densidade neuronal total do sistema nervoso entérico (GABELLA, 1989; JOHNSON et al., 1998; PHILLIPS; KIEFFER; POWLEY, 2004; PHILLIPS; POWLEY, 2001). Assim, mensuramos a área

da superfície intestinal (jejuno-íleo) antes e após o processamento dos segmentos intestinais, mas não observamos diferenças significativas ($P>0,05$) decorrentes da idade e da atividade física (medidas a fresco) sobre essa variável.

O fato dos resultados das mensurações a fresco não diferirem entre os grupos estudados poderia ser explicado pela diferença de idade entre os animais não ter sido suficiente para detectar alterações na área intestinal decorrentes do envelhecimento, uma vez que os animais do grupo C apresentavam-se com seis meses de idade e aqueles dos grupos S e T, com 12 meses de idade. Talvez, as alterações promovidas pelo envelhecimento tenham início ou se tornem mais evidentes para serem detectadas em idade superior a 12 meses.

6.4 ESPESSURA DA TÚNICA MUSCULAR

A espessura da túnica muscular não diferiu ($P>0,05$) entre os três grupos estudados, embora esta tenha diminuído em 7,6% com a idade ($C= 100,5\pm3,87 \text{ mm}^2$, $S= 93,36\pm7,48 \text{ mm}^2$) e aumentado em 13,3% com a atividade física ($T= 105,8\pm26,63 \text{ mm}^2$).

Com o envelhecimento, é relatada hipertrofia muscular decorrente da diminuição da inervação dos músculos do trato gastrointestinal (DE SOUZA et al., 1993). Contudo, verificamos diminuição, embora não significativa, na espessura da túnica muscular nos animais do grupo S em relação ao grupo C. Nossos resultados reforçam a idéia de Xiong, Sperelakis e Noffsinger (1995) e Roberts, Gelperin e

Wiley (1994) que preconiza a diminuição da acetilcolina e, conseqüentemente, da contração muscular decorrentes da idade pela diminuição da concentração desse íon no interior das células musculares via membrana plasmática. Porém, como as alterações na espessura da túnica muscular não foram significativas poderíamos sugerir, novamente, que os efeitos do envelhecimento sobre o trato gastrointestinal devem ser melhores evidenciados em animais com idade mais avançada.

Já, no grupo T (treinado), também embora de modo não significativo ($P > 0,05$), a espessura da túnica muscular aumentou em relação ao grupo S (sedentário). Segundo Van Liere, Hess e Edwardas (1954), o aumento do trabalho do trato gastrointestinal poderia provocar a hipertrofia dos músculos viscerais à semelhança do que ocorre nos músculos estriados esqueléticos. Além disso, há evidências sugestivas de que os neurônios entéricos mantêm o fenótipo das células musculares lisas intestinais, atuando como efetivos reguladores do crescimento dessas células (BLENNERHASSETT; LOURENSSEN, 2000).

Como é sabido, o sistema nervoso autônomo parassimpático, por meio do neurotransmissor acetilcolina, promove a contração muscular intestinal (peristaltismo) enquanto que o sistema nervoso simpático, pela ação da noradrenalina (ou neurotransmissores inibitórios como o NO e o VIP), promove o relaxamento dos segmentos gastrointestinais. De maneira geral, o treinamento diminui a atividade simpática e aumenta o tônus parassimpático nos intervalos após o exercício (FOX; BOWERS; FOSS, 1991; KREGER; BRUM; NEGRÃO, 1999; LIU; KULAKOFSKY; ZUCKER, 2002; NEGRÃO et al., 1992).

Levando-se em consideração os resultados obtidos neste trabalho, onde o número médio e a densidade de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos

(neurônios inibitórios) diminuíram com o treinamento físico, e que o número e a densidade de neurônios ativos identificados pela técnica da NADH-diaforase mantiveram-se estatisticamente semelhantes no grupo T em relação ao grupo C, é plausível supor que com a atividade física há diminuição da atividade simpática e, conseqüentemente, aumento da motilidade intestinal decorrente da manutenção dos neurônios colinérgicos, o que acarretaria o aumento no tamanho das fibras musculares lisas e, assim, da espessura da túnica muscular. Como não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) na quantificação dos neurônios mioentéricos detectados pela técnica da NADH-diaforase entre os animais do grupo C e T, podemos inferir que a atividade física teve efeito neuroprotetor sobre o plexo mioentérico do grupo T, uma vez, que a quantidade de neurônios foi superior ($P < 0,05$) àquela observada no grupo S.

6.5 MORFOLOGIA DO PLEXO MIOENTÉRICO

Como as mudanças no sistema nervoso entérico têm sido relacionadas às alterações fisiológicas do trato gastrointestinal com a idade, buscamos neste estudo analisar se com o envelhecimento há alterações morfológicas dos neurônios mioentéricos e se a atividade física exerce influencia sobre essas alterações.

Os resultados obtidos demonstraram que não houve alterações no arranjo e na disposição do plexo mioentérico que foi observado paralelo às fibras musculares circular nos animais dos grupos C, S e T. Neurônios localizados em gânglios e neurônios isolados foram verificados, bem como, feixes de fibras interligando os

gânglios mioentéricos. Estes feixes apresentavam-se mais intensamente corados e definidos nos animais submetidos a técnica da NADPH-diaforase. De modo geral, os neurônios evidenciados pela técnica da NADH-diaforase quanto pela técnica da NADPH-diaforase apresentaram formato alongado.

Esses resultados são semelhantes aos constantes na literatura científica que descreve o SNE formado por plexos ganglionados e aganglionados, relativamente independentes do sistema nervoso central e possuindo funções complexas que incluem a regulação da motilidade, da secreção e do fluxo sangüíneo no trato gastrointestinal (COSTA; SIMON; BROOKS, 1994; STERNINI, 1988). Os gânglios entéricos têm localização intramural no trato gastrointestinal (FURNESS; COSTA, 1987; GABELLA, 1994) e formam uma malha (rede) irregular e delgada (IRWIN, 1931). Os gânglios estão interconectados de maneira a constituir um sistema nervoso onde ocorrem mecanismos reflexos, de integração e de processamento (FURNESS et al., 1992).

Na análise ultraestrutural, observamos que, nos animais de todos os grupos, os neurônios mioentéricos encontravam-se entre as camadas longitudinal e circular da túnica muscular envolvidos por tecido conjuntivo denso. A região periganglionar, preenchida por tecido conjuntivo denso e situada entre as fibras musculares e a membrana basal, apresentou-se aumentada e com fibras colágenas mais espessadas no grupo S do que nos grupos C e T. Natali (1999) também evidenciou fibras colágenas na região periganglionar e, como nós, Gomes, De Souza e Liberti (1997) constataram aumento de fibras colágenas e de elastina na região periganglionar com a senescência.

A integridade da membrana basal estava preservada nos grupos C e T, porém, no grupo S era pouco evidente, sugerindo o início do efeito degenerador provocado pela fase inicial do envelhecimento e a presença de efeito protetor da atividade física até aos 12 meses de idade.

Os gânglios mioentéricos são envolvidos por uma lâmina basal (GABELLA, 1990, 1995; SAFFREY, 2004). Em animais senis é possível observar degenerações ultraestruturais nos neurônios do plexo mioentérico, porém, estas ocorrem em neurônios isolados e não no gânglio (GABELLA, 1989).

Em todos os grupos observamos neurópilo com processos neuronais e terminações nervosas contendo vesículas como descrito também por Gabella (1990), Natali (1999) e Saffrey (2004). No neurópilo as vesículas eram granulares e agranulares, havia fibroblasto e, como relatado por Gabella (1995), muitas sinapses, as quais, em nosso estudo, estavam com integridade preservada nos grupos C, S e T.

Membrana plasmática íntegra, núcleos grandes e ovalados envoltos por membrana nuclear também íntegra, nucléolo e cromatina foram observados em todos os grupos estudados.

Presença de elevado número de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, como evidenciados por Natali (1999), também se apresentaram constantes nos grupos C, S e T, e caracterizam a grande atividade metabólica destas células.

6.6 QUANTIFICAÇÃO E MORFOMETRIA DO PERFIL DO CORPO CELULAR DE NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS

Além da microscopia eletrônica de transmissão que analisa as características ultraestruturais dos neurônios mioentéricos, outras técnicas podem ser empregadas para determinar alterações morfológicas e quantitativas neste plexo como as técnicas da NADH-diaforase descrita por Gabella (1969) e a da NADPH-diaforase (SCHERER-SINGLER et al., 1983) utilizadas por nós na obtenção de preparados de membrana dos segmentos intestinais.

Para não incorrer em erros na quantificação dos neurônios, uma vez que o diâmetro dos fragmentos intestinais pode ser alterado durante o processamento do material (distensão ou retração da parede intestinal) e pelo próprio desenvolvimento (envelhecimento), aplicou-se o fator de correção segundo Gabella, (1971) e De Souza et al. (1993), mensurando-se a área do jejuno-íleo antes (a fresco) e após o processamento (preparados de membrana).

Não foram verificadas diferenças ($P>0,05$) entre as amostras utilizadas para a técnica da NADH-diaforase mensuradas a fresco ($C= 113\pm5,3 \text{ cm}^2$, $S= 123\pm2,8 \text{ cm}^2$ e $T= 118\pm4,06 \text{ cm}^2$) e após o processamento ($C= 132,6\pm7\text{cm}^2$, $S= 179,5\pm18,67\text{cm}^2$, $T= 129\pm8,08 \text{ cm}^2$), embora a área tenha sido maior no grupo S pelos dois parâmetros analisados (a fresco e após o processamento).

O material utilizado para a técnica da NADPH-diaforase, ao contrário, apresentou diferença significativa ($P<0,05$) na área intestinal (jejuno-íleo) após processamento. A área do jejuno-íleo foi menor nos animais do grupo C ($140,7\pm5,8$

cm²) do que aquelas verificadas entre os animais dos grupos S ($176,2 \pm 12,2$ cm²) e T ($175,6 \pm 8,5$ cm²). Todavia, não houve evidência de diferença estatística significativa na comparação entre as áreas mensuradas a fresco e as amostra submetidas a técnica da NADPH-diaforase (C= $115,4 \pm 3,8$ cm², S= $124,2 \pm 2,5$ cm² e T= $116,8 \pm 1,98$ cm²).

As diferenças observadas após o processamento do material provavelmente ocorreram por influência da pressão interna exercida durante o preenchimento dos segmentos intestinais com a solução fixadora que, por não ter sido controlada, promoveu distensão dos segmentos em diferentes graus. Contudo, a aplicação do fator de correção nos permitiu eliminar a interferência decorrente do procedimento técnico na quantificação e mensuração dos neurônios.

A técnica da NADH-diaforase foi, por muito tempo, utilizada para estimar o número total de neurônios (GABELLA, 1989). Porém, sabe-se hoje, que tal técnica não é capaz de evidenciar a população neuronal total existente no plexo mioentérico. Conforme Young et al. (1993), esta técnica identifica cerca de 80% do número total de neurônios. Johnson et al. (1998) observaram com a NADH-diaforase 9490 ± 580 e 7950 ± 370 neurônios em ratos jovens e velhos, respectivamente, enquanto com a utilização do marcador PGP 9.5 os números encontrados foram 19600 ± 2030 para ratos jovens e 20700 ± 1290 para ratos velhos, comprovando que a detecção de neurônios pela atividade da NADH-diaforase não pode ser utilizada quando se objetiva quantificar o número total de neurônios.

Porém, esta pesquisa não pretendeu identificar o número total de neurônios do plexo mioentérico. Acreditamos que, embora todos neurônios sejam células metabolicamente ativas, em certos momentos o recrutamento de todos os neurônios

pelo organismo não seria necessário, bem como, a ação inibitória de uns sobre os outros poderia promover a “diminuição” do número de neurônios em atividade. Como a enzima NADH está relacionada com a respiração celular (GUYTON; HALL, 2000), hipoteticamente poderíamos afirmar que aqueles neurônios que se encontrassem com elevada atividade metabólica deveriam ser intensamente marcados pela técnica da NADH-diaforase. Assim, procuramos verificar se com o envelhecimento e com a atividade física há alterações na densidade neuronal (neurônios/mm²) e na área do perfil celular (μm²) de neurônios metabolicamente ativos (NADH-diaforase positivos).

Os resultados demonstraram que com o envelhecimento (grupo S) houve redução significativa ($P < 0,05$) da densidade neuronal ($67,76 \pm 7$) em comparação aos grupos C ($104,8 \pm 5,86$) e T ($95,18 \pm 7,18$). Diminuição da densidade neuronal foi também evidenciada no grupo T em relação ao grupo C (aproximadamente 10%), mas esta não foi significativa.

Nossos resultados sugerem que com a senescência ocorre redução no número de neurônios mioentéricos metabolicamente ativos (NADH-diaforase positivos). Contudo, não é possível afirmar que houve morte desses neurônios uma vez que a técnica utilizada não evidencia a população neuronal total e porque não foram observadas células nervosas com conformação anormal que sugerisse apoptose e/ou outro tipo de morte celular. Mas, poderíamos inferir que com o envelhecimento (grupo S), pelo menos em relação aos neurônios NADH-diaforase positivos, ocorre “falência” do SNE (plexo mioentérico) ou também aumento na atividade de neurônios inibitórios, que poderiam ser responsáveis pelas alterações funcionais do trato gastrointestinal decorrentes da idade.

Para analisarmos tal hipótese, procedemos a análise da subpopulação de neurônios NADPH-diaforase, que são considerados inibitórios.

Os neurônios NADPH-diaforase positivos agem na musculatura circular intestinal, inibindo contrações promovidas pelos neurônios colinérgicos. Além dos neurônios NADPH-diaforase positivos, os neurônios como os NOS- positivos e os vipérgicos também são considerados inibitórios da camada muscular circular (BELAI et al., 1992; SANTER; 1994; KERÄNEN et al., 1995; WILHEM et al., 1998; YUNKER; GALLIGAN, 1998; PHILLIPS; KIEFFER; POWLEY, 2003).

Em nosso estudo, a densidade dos neurônios NADPH-diaforase positivos foi significativamente menor ($P < 0,05$) nos animais dos grupos S ($32,322 \pm 1,7$) e T ($27,39 \pm 1,2$) quando comparados ao grupo C ($44,53 \pm 4,5$). Em primeira análise, ocorreu redução de 27,4% na densidade de neurônios inibitórios no grupo S e de 38,49% no grupo T em relação ao grupo C. Porém, ao compararmos as densidades de neurônios NADH-diaforase e NADPH-diaforase positivos, podemos verificar que na primeira técnica a densidade neuronal diminuiu em 35,3% no grupo S e em 9,1% no grupo T em relação aos animais do grupo C.

Os dados obtidos revelam que o envelhecimento promoveu redução significativa ($P < 0,05$) na densidade neuronal (neurônios NADH-d positivos), sendo a redução ainda mais intensa nos neurônios inibitórios em relação ao grupo C. Por outro lado, a atividade física impediu redução equivalente na densidade neuronal evidenciada pela NADH-diaforase, mantendo-a aproximada aos resultados observados no grupo C. Quanto aos neurônios inibitórios, a atividade física induziu diminuição, embora não significativa, na densidade neuronal em comparação ao grupo S, sugerindo um efeito neuroprotetor.

Segundo Furness (2000), os neurônios inibitórios da camada muscular circular possuem códigos químicos como o NOS (óxido nítrico sintetase), VIP (peptídeo intestinal vasoativo), ENK (encefalina) entre outros. Desta forma, neurônios inibitórios podem agir por influência de outros neurotransmissores que não o NO (óxido nítrico). Porém, estudos admitem a co-localização de neurônios NADPH-diaforase positivos e neurônios vipérgicos (KERÄNEN et al., 1995) e com neurônios reativos a NOS (BELAI et al., 1992).

Diminuição de 15% do número de neurônios NADPH-diaforase positivos foi verificada por Santer (1994) no intestino delgado de ratos de 24 e 30 meses em comparação a animais de quatro meses de idade. Phillips, Kieffer e Powley (2003) também relataram perda de neurônios reativos a NADPH-diaforase com o envelhecimento.

Para melhor analisar os efeitos da idade e da atividade física sobre os neurônios mioentéricos NADH-diaforase e NADPH-diaforase positivos realizamos por meio de software de análise de imagem (ImagePro Plus, versão 3.9.1.) a mensuração da área do perfil do corpo celular (μm^2).

Para a técnica da NADH-diaforase os resultados demonstraram diferenças significativas ($P < 0,05$) na área do corpo celular dos neurônios mioentéricos dos três grupos. Nos animais dos grupos C, S e T as médias da área do perfil do corpo celular foram $167 \pm 6,93 \mu\text{m}^2$, $198,4 \pm 8,22 \mu\text{m}^2$ e $103,4 \pm 8,68 \mu\text{m}^2$, respectivamente.

A área da maioria dos neurônios NADH-diaforase variou entre $100\text{-}200 \mu\text{m}^2$ no grupo C (45,41%) e no grupo T (49,28%). Já no grupo S, predominaram neurônios com área entre $0\text{-}100 \mu\text{m}^2$ (56,32%).

Desta forma, os neurônios NADH-diaforase do grupo T apresentaram densidade 9,1% menor e área 15,8% maior do que os neurônios do grupo C. Já os neurônios do grupo S tiveram densidade inferior (35,34%) e área inferior (38%) comparados aos neurônios analisados no grupo C. Assim, os neurônios do grupo T, mesmo com as alterações apresentadas referentes à densidade e à área do perfil do corpo celular, mantiveram-se mais próximos aos neurônios analisados no grupo C, comprovando que a atividade física pode ter influencia benéfica no plexo mioentérico (neurônios NADH-diaforase positivos) de ratos que envelhecem.

A análise morfométrica dos neurônios NADPH-diaforase positivos demonstrou que houve diminuição não significativa da área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos do grupo S ($157,3 \pm 3,64 \mu\text{m}^2$) em relação ao grupo C ($186,8 \pm 9,34 \mu\text{m}^2$). A área do perfil neuronal dos animais do grupo T ($129,9 \pm 9,55 \mu\text{m}^2$) foi estatisticamente menor que a do grupo C, porém, diminuição não significativa foi verificada na comparação com o grupo S.

A área da maioria dos neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos em todos os grupos analisados variou entre 100-200 μm^2 , e representou 50,6% no grupo C, 70,86 no grupo S e 57,13 no grupo T.

Desta forma, foi possível observar que mesmo ocorrendo diminuição da densidade neuronal (38,49%) e da área do corpo celular (30,4%) no grupo T em comparação ao grupo C, a distribuição de frequência no grupo treinado esteve mais próxima aquela apresentada pelo grupo C. Embora não tenham ocorrido diferenças significativas nestes dois parâmetros entre os grupos S e T, foi possível constatar que a atividade física promoveu pequena diminuição da densidade neuronal

(15,25%) e na área neuronal (17,4%) em comparação com animais de mesma idade que não realizaram atividade física.

Tais resultados, poderiam sugerir efeito benéfico da atividade física sobre o sistema digestório, pois alterações decorrentes da maior ativação simpática têm sido descritas no trato gastrointestinal.

Mudanças na área do perfil do corpo celular são pouco descritas na literatura científica. Sabe-se que no desenvolvimento de doenças, como o diabetes mellitus, pode ocorrer aumento da área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos (FURLAN et al., 1999). Todavia, nenhum relato foi encontrado quanto as alterações desta variável decorrentes do envelhecimento e da atividade física.

Acreditamos que, com o envelhecimento, possam ocorrer reduções no perfil celular neuronal que poderiam indicar processo de apoptose. Porém, com a atividade física, espera-se que a atividade intracelular esteja intensificada, provocando aumento na área do perfil celular ou, até mesmo, a divisão celular, ou seja, a neurogênese que foi evidenciada, por exemplo, no hipocampo de animais submetidos a atividade física (VAN PRAAG et al., 1999).

De maneira geral, podemos inferir, por meio dos resultados obtidos, que aos 12 meses de idade os animais não apresentam tão evidentes os efeitos do envelhecimento sobre o plexo mioentérico. Entretanto, alterações na membrana basal, no espaço perigangliornar, na densidade neuronal e na área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos em animais de 12 meses seriam os indícios do início do processo de envelhecimento no plexo. Já a realização de atividade física poderia contribuir para manter os parâmetros ultraestruturais, quantitativos e

morfométricos (neurônios NADH-diaforase positivos) equiparados àqueles apresentados pelos animais de seis meses de idade, bem como, impedir o aumento da densidade e da área dos neurônios NADPH-diaforase positivos que têm ação inibitória sobre a camada muscular circular.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Podemos por meio dos resultados obtidos concluir que:

- os animais do grupo treinado apresentaram melhor performance nos testes de esforço máximo do que os animais sedentários;
- em todas as mensurações o peso dos animais treinados foi menor do que os dos animais sedentários;
- não foram evidenciadas diferenças significativas no comprimento do jejuno-íleo e na espessura da túnica muscular com o a atividade física e com a idade;
- alterações ultraestruturais decorrentes do envelhecimento são observadas na membrana basal e no espaço periganglionar dos animais do grupo sedentário;
- não houve alteração da disposição do plexo mioentérico entre os grupos estudados;
- a densidade neuronal (neurônios NADH-diaforase positivos) diminui nos animais sedentários em relação aos animais controle;
- a densidade neuronal (neurônios NADH-diaforase positivos) nos animais treinados manteve-se equiparada aos animais do grupo controle;
- a densidade neuronal (NADPH-diaforase positivos) é menor nos animais dos grupos sedentário e treinado;

- a área do perfil celular dos neurônios NADH-diaforase positivos diminuiu com a idade e aumentou com o exercício físico;
- a área do perfil celular dos neurônios NADPH-diaforase positivos diminuiu significativamente nos animais do grupo treinado em relação aos animais do grupo controle, mas foi semelhante estatisticamente aos animais do grupo sedentário, embora tenha ocorrido diminuição de 17,4%.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, N. G. V.; CALLISTER, R.; JOHNSON, D. G.; SEALS, D. R. Endurance exercise training is associated with elevated basal sympathetic nerve activity in healthy older humans. **J. Appl. Physiol.**, v. 77, n. 3, p. 1366-1374, 1994.
- AMÂNCIO, A.; CAVALCANTI, P. C. U. **Clínica geriátrica**. São Paulo: Atheneu, 1975.
- ANDERSON, K. E.; HEDLUND, O. Pharmacologic perspective on the physiology of the lower urinary tract. **Urology**, v. 60, p. 13-20, 2002.
- ANURAS, S.; LEONING-BAUCKE, V. Gastrointestinal motility in the elderly. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v. 32, p. 386-390, 1984.
- BANISTER, E. W.; GRIFFITHS, J. Blood levels of adrenergic amines during exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 33, p. 674-676, 1972.
- BITAR, K. N. Aging and GI smooth muscle fecal incontinence: is bioengineering an option. **Exp. Gerontol.**, v. 40, p. 643-649, 2005.
- BITAR, K. N.; PATIL, S. B. Aging and gastrointestinal smooth muscle. **Mech. Ageing dev.**, v. 125, p. 907-910, 2004.
- BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**, v. 8, p. 1-20, 1992.
- BREHMER, A.; SCHRODL, F.; NEUHUBER, W. Morphological classifications of enteric neurons – 100 years after Dogiel. **Anat. Embryol.**, v. 200, p. 125-135, 1999.
- BROGNA, A.; FERRARA, R.; BUCCERI, A. M.; LANTERI, E.; CATALANO, F. Influence of aging on gastrointestinal transit time. **Invest. Radiol.**, v. 34, p. 357-359, 1999.
- BROOKES, S. J. H. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. **Anat. Rec.**, v. 262, p. 58-70, 2001.
- BURNS, A. J.; LE DOUARIN, N. M. Enteric nervous system development: Analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. **Anat. Rec.**, v. 262, p. 16-28, 2001.
- BUTT, W. G.; WANG, I. S.; KAUFMAN, S. T.; RYAN, J. P.; COHEN, S. Age-related changes in rat colon mechanics. **Gastrointest. Mot.**, v. 5, p. 123-128, 1993.
- CAMMACK, J.; READ, N. W.; CANN, P. A.; GREENWOOD, B.; HOLGATE, A. M. Effect of prolonged exercise on the passage of a solid meal through the stomach and small intestine. **Gut**, v. 23, p. 957-961, 1982.
- CARVALHO, J. A. M.; GARCIA, R. A. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. **Cad. Saúde Pública**, v.19, n. 3, p. 725-733, 2003.

CHO, C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **J. Physiol.**, v. 95, p. 253-256, 2001.

CLARKSTON, W. K.; PANTANO, M. M.; MORLY, J. E.; HOROWITZ, M.; LITTLEFIELD, J. M.; BURTON, F.R. Evidence for anorexia of aging. Gastrointestinal transit and hunger in healthy elderly vs. Young adults. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. 243-248, 1996.

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

COWEN, T.; JOHNSON, R. J. R.; SOUBEYRE, V.; SANTER, R. M. Restricted diet rescues rat enteric motor neurons from age related cell death. **Gut**, v. 47, p.653-660, 2000.

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

DAPOIGNY, M.; SARNA, S. K. Effects of physical exercise on colonic motor activity. **Am. J. Physiol.**, v. 260, p. 646-652, 1991.

DAWSON, T. M; BREDT, D. S.; FOTUHI, M.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH-diaphorase are indetical in brain and peripheral tissue. **Proc. Acad. Sci.**, v. 88, p. 7797-7801, 1991.

DESGORCES, F. D.; CHENNAOULI, M.; GOMEZ-MERINO, D.; DROGOU, C.; BONNEAU, D.; GUEZENNEC, C. Y. Leptin, catecholamines and free fatty acids related to reduced recovery delays after training. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 93, p. 153–158, 2004.

DISHMAN, R. K.; ARMSTRONG, R. B.; DELP, M. D.; GRAHAM, R. E.; DUNN, A. L. Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats. **Physiol. Behav.**, v. 43, p. 541-546, 1988.

DZIURA, J.; DE LEON, C. M.; KASL, S.; DIPIETRO, L. Can physical activity attenuate aging-related weight loss in older people? **Am. J. Epidemiol.**, v. 159, p. 759-764, 2004.

EL-SALHY, M; SANDSTRÖM, O.; HOLMLUND, F. Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. **Mech. Ageing and Dev.**, v. 107, p. 93-103, 1999.

FIRTH, M.; PRATHER, C. M. Gastrointestinal motility problems in the elderly patient. **Gastroenterol.**, v. 122, n. 6, p. 1688-1700, 2002.

FORDTRAN, J. S.; SALTIN, B. Gastric emptying and intestinal absorption during prolonges severe exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 23, p. 331-335, 1967.

FOX, E. L.; BOWERS, R. W.; FOSS, M. L. **Bases fisiológicas da educação física e dos desportos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 81, p. 87-96, 2000.

FURNESS, J. B.; BORNSTEIN, J. C.; MURPHY, R.; POMPOLO, S. Roles of peptides in transmission in the enteric nervous system. **TINS**, v. 15, p. 66-71, 1992.

FURNESS, J. B.; COSTA, N. **The enteric nervous system**. New York: Churchill Livingston, 1987. p. 87-96.

GABELLA, G. Autonomic nervous system. In: _____. **The rat nervous system**. 2. ed. London: Academic Press, 1995. p. 81-103.

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

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

GABELLA, G. Innervation of gastrointestinal tract. **Int. Rev. Cytol.**, v. 79, p.129-193, 1979.

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

GABELLA, G. On the plasticity of the form and structure of enteric ganglia. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 30, p. S59-S66, 1990.

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

GALLIGAN, J. J.; LePARD, K. J.; SCHNEIDER, D. A.; ZHOU, X. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 81, p. 97-103, 2000.

GAVAZZI, I.; COWEN, T. Can the neurotrophic hypothesis explain degeneration and loss plasticity in mature and ageing autonomic nerves? **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 58, p. 1-10, 1996.

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

GRAFF, J.; BRINCH, K.; MADSEN, J. L. Gastrointestinal mean transit times in young and middle-aged healthy subjects. **Clin. Physiol.**, v. 21, n. 2, p. 253-259, 2001.

GRUNDY, D.; SCHEMANN, M. Enteric nervous system. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 176-182, 2005.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Princípios gerais da função gastrointestinal - motilidade, controle nervoso e circulação. In: _____. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2002. p. 668-676.

HANSEN, B. The enteric nervous system I: organisation and classification. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v. 92, p. 105-113, 2003.

HOLLINS, J. B.; CASTELL, D. O. Esophageal function in elderly men. A new look at presbyoesophagus. **Ann. Intern. Med.** v. 80, p. 371, 1974.

HOPE, B. T.; MICHAEL, G. J.; KNIGGER, K. M.; VICENT, S. R. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p.2811-2814, 1991.

HOROWITZ, M.; MADDERN, G. J.; CHATTERTON, B. E.; COLLINS, P. J.; HARDING, P. E.; SHERMAN, D. J. Changes in gastric emptying with age. **Clin. Sci.**, v. 67, p. 213-218, 1984.

IBGE. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico: Brasil**, 2000. Rio de Janeiro: IBGE, 2000.

IRWIN, D.A. The anatomy of Auerbach's plexus. **Am. J. Anat.**, v. 49, p. 141-166, 1931.

JARVINEN, M. K.; WOLLMANN, W. J.; POWROZEK, T. A.; SCHULTZ, J. A.; POWLEY, T. L. Nitric oxide synthase-containing neurons in the myenteric plexus of the rat gastrointestinal tract: distribution and regional density. **Anat. Embryol.**, v. 199, p. 99-112, 1999.

JENNINGS, G. L.; NELSON, L.; NESTEL, P.; ESLER, M.; KORNER, P.; BURTON, D.; BAZELMANS, J. The effects of changes in physical activity on major cardiovascular risk factors, hemodynamics, sympathetic function, and glucose utilization in man: a controlled study of four levels of activity. **Circulation**, v. 73, p. 30-40, 1986.

JOHNSON, R. J. R.; SCHEMANN, M.; SANTER, R. M.; COWEN, T. The effects of age on the overall population and sub-population of myenteric neurons in the rat small intestine. **J. Anat.**, v. 192, p. 479-488, 1998.

KHAN, T. A.; SHARAGGE, B. W.; CRISPIN, J. S.; LIND, J. F. Esophageal motility in the elderly. **Dig. Dis. Sci.**, v. 20, p. 1049, 1977.

KRIEGER, E. M.; BRUM, P. C.; NEGRÃO, C. E. Influence of exercise training on neurogenic control of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, 34, p. 720-723, 1999.

KYLE, U. G.; GENTON, L.; GREMION, G.; SLOSMAN, D. O.; PICHARD, C. Aging, physical activity and height-normalized body composition parameters. **Clin. Nutr.**, v. 23, p. 79-88, 2004.

LECCI, A.; SANTICIOLI, P.; MAGGI, C. A. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 2, p. 630-641, 2002.

LEE, P. Y.; YUN, A. J.; BAZAR, K. A. Conditions of aging as manifestations of sympathetic bias unmasked by loss of parasympathetic function. **Med. Hypotheses**, v. 10, p. 1-3, 2004.

LILO, A. R.; ROSE, R. Functional bowel disorders in the geriatric patient: constipation, fecal impaction, and fecal incontinence. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 95, n. 4, p. 901-905, 2000.

LISSNER, L.; ANDRES, R.; MULLER, D.C.; SHIMOKATA, H. Body weight variability in men: metabolic rate, health and longevity. **Int. J. Obes.**, v. 14, n. 4, p. 373-383, 1990.

LIU, J.; KULAKOFSKY, J.; ZUCKER, I. H. Exercise training enhances baroreflex control of heart rate by a vagal mechanism in rabbits with heart failure. **J. Appl. Physiol.**, v. 92, p. 2403-2408, 2002.

LOMAX, A. E.; FURNESS, J. B. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. **Cell Tissue Res.**, v. 302, p. 59-72, 2000.

MADSEN, J. L.: Effect of gender, age and body mass index on gastrointestinal transit. **Times Dig. Dis. Sci.**, v. 37, p. 1548-1553, 1992.

MADSEN, J. L.; GRAFF, J. Effects of ageing on gastrointestinal motor function. **Age Ageing**, v. 33, p. 154-159, 2004.

McARDLE, W. D. Atividade física, saúde e envelhecimento. In: _____. **Fisiologia do exercício**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 1998. p. 605-633.

MOORE, J. G.; DATZ, F. L. CHRISTIAN, P. E. Exercise increases solid meal gastric emptying rates in men. **Dig. Dis. Sci.**, v. 35, p. 428-432, 1990.

MOORE, J. G.; TWEEDY, C.; CHRISTIAN, P. E. Effect of age on gastric emptying of liquid-solid meals in man. **Dig. Sci.**, v. 28, p. 340-340, 1983.

NATALI, M. R. M. **Estudo morfoquantitativo e ultra-estrutural do plexo mientérico do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos submetidos a carência protéica**. 1999. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Botucatu, 1999.

NEGRÃO, C. E.; MOREIRA, E. D.; BRUM, P. C.; SANTOS, M. C. L. M.; FARAH, V. M. A.; KRIEGER, E. M. Vagal function impairment after exercise training. **J. Appl. Physiol.**, v. 72, p. 1749-1753, 1992.

O'MAHONY, D.; O'LEARY, P.; QUIGLEY, E. M. Aging and intestinal motility: a review of factors that affect intestinal motility in the aged. **Drugs Aging**, v. 19, n. 7, p. 515-527, 2002.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **XXVI Conferência Sanitária Pan-Americana: A Saúde e o Envelhecimento**. 2002. Disponível em: <www.paho.org/portuguese/gov/csp/csp26r20-p.pdf>. Acesso em: 30 out. 2003.

ORR, W. C.; CHEN, C. L. Aging and neuronal control of the GI tract IV: Clinical and physiological aspects of gastrointestinal motility and aging. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 283, p.1226-1231, 2002.

PENNATHUR, A.; MAGHAM, R.; CONTRERAS, L. R.; DOWLING, W. Daily living activities in older adults: Part I – a review of physical activity and dietary intake assessment methods. **Int. J. Ind. Ergon.**, v. 32, p. 389-404, 2003.

PHILLIPS, R.J.; KIEFFER, E.J.; POWLEY, T.L. Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat. **Anat. Embriol.**, v.209, p. 19-30, 2004.

PHILLIPS, R. J.; POWLEY, T. L.: As the gut ages: Timetables for aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 434, p. 358-377, 2001.

RAO, S. S. C.; BEATY, J.; CHAMBERLAIN, M.; LAMBERT, P.; GISOLFI, C. Effects of acute graded exercise on human colonic motility. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. G1221-G1226, 1999.

ROBERTS, D.; GELPERIN, D.; WILEY, J. W. Evidence for age-associated reduction in acetylcholine release and smooth muscle response in the rat colon. **Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.**, v. 267, p. 515-522, 1994.

ROBERTSON, G.; MESHKINPOUR, H.; VANDENBERG, K.; JAMES, N.; COHEN, A.; WILSON, A. Effects of exercise on total and segmental colon transit. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 16, p. 300-303, 1993.

ROWE, J. W.; TROEN, B. R. Sympathetic nervous system and aging in man. **Endocr. Rev.**, v. 1, p. 167-179, 1980.

SAFFREY, M. J. Ageing of the enteric nervous system. **Mech. Ageing Dev.**, v. 125, p. 899-906, 2004.

SANDERS, K. M.; WARD, S. M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. 379-G392, 1992.

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.**, v. 25, p. 59-67, 1988.

SCHEDL, H. P.; MAUGHAN, R. J.; GISOLFI, C. V. Intestinal absorption during rest and exercise: implications for formulating and oral rehydration solution (ORS). **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 26, n. 3, p. 267-280, 1994.

SCHEMANN, M.; NEUNLIST, M. The human enteric nervous system. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 16, p. 55-59, 2004.

SCHERER-SINGLER, U.; VINCENT, S. R.; KIMURA, H.; McGEER, E. G. Demonstration of unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. **J. Neurosci. Method.**, v. 9, n. 3, p. 229-234, 1983.

SEIDELL, J. C.; VISSCHER, T. L.; Body weight and weight change and their health implications for the elderly. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 54, n. 3, p. 33-39, 2000.

SILVA, G. J. J.; BRUM, P. C.; NEGRÃO, C. E.; KRIEGER, E. M. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensives. **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 714-719, 1997.

SMITS, G. J. M.; LEFEBVRE, R. R. Influence of aging on gastric emptying of liquids, small intestine transit and fecal output in rats. **Exp. Gerontol.**, v. 31, p. 589-596, 1996.

SOERGEL, K. H.; ZBORALSKE, F. F.; AMBERG, J. R. Presbyesophageal motility in nongenarians. **J. Clin. Invest.**, v. 43, p. 1472, 1964.

SOFFER, E. E.; SUMMERS, R. W.; GISOLFI, C. Effect of exercise on intestinal motility and transit in trained athletes. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 206, p. 698-702, 1991.

SOUZA, R. R.; MORATELLI, H. B.; BORGES, N.; LIBERT, E. A. Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. **Int. J. Exp. Clin. Gerontol.**, v. 39, p. 183-188, 1993.

STEINBERG, G.R.; PAROLIN, M. L.; HEIGENHAUSER, G. J.; DYCK, D. J. Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence for peripheral leptin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 238, p. 87-92, 2002.

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

STICH, V; GLISEZINSKI, I; BERLAN, M; BULOW, J.; GALITZKY, J.; HARANT, I.; SULJKOVICOVA, H.; LAFONTAN, M.; RIVIÈRE, D.; CRAMPES, F. Adipose tissue lipolysis is increased during a repeated bout of aerobic exercise. **J. Appl. Physiol.**, v. 88, p. 1277-1283, 2000.

TEZUKA, A.; ISHIHATA, A.; AITA, T.; KATANO, Y. Aging-related alterations in the contractile responses to acetylcholine, muscarinic cholinergic receptors and cholinesterase activities in jejunum and colon of the male Fischer 344 rats. **Exp. Gerontol.**, v. 39, p. 91-100, 2004.

VAN DER BIJ, A. K.; LAURENT, M. G. G.; WENSING, M. Effectiveness of physical activity interventions for older adults: A review. **Am. J. Prev. Med.**, v. 22, n. 2, p. 120-133, 2002.

VAN GELDRE, L. A.; FRAEYMAN, N. H.; PEETERS, T. L.; TIMMERMANS, J.; LEFEBVRE, R. A. Further characterisation of particulate neuronal nitric oxide synthase in rat small intestine. **Auton. Neurosc.: Basic and Clin.**, v. 110, p. 8-18, 2004.

VAN LIERE, E. J.; HESS, H. H.; EDWARDS, J. E. Effect of physical training on the propulsive motility of the small intestine. **J. Appl. Physiol.**, v. 88, n. 4, p. 186-187, 1954.

VAN PRAAG, H.; CHRISTIE, B. R.; SEJNOWSKI, T. J.; GAGE, F. H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **PNAS**, v.96, n. 23, p. 13427-13431, 1999.

WADE, P. R. Aging and neuronal control of the GI tract I: Age-related changes in the enteric nervous system. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 283, p. 489-495, 2002.

WALLACE, A. S.; BURNS, A. J. Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. **Cell Tissue Res.**, v. 319, p. 367-382, 2005.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A.; SHENG, H.; MURAD, F. Effect of cyclic GMP on smooth muscle relation. **Adv. Pharmacol.**, v. 26, p. 171-194, 1994.

WILEY, J.W. Aging and neuronal control of the GI trac III: Senescent enteric nervous system – lessons from extraintestinal sites and nonmammalian species. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 46, p. 1020-1026, 2002.

XIONG, Z.; SPERELAKIS, N.; NOFFSINGER, A.; FENOGLIO-PREISER, C. Potassium currents in rat colonic smooth muscle cells and changes during development and aging. **Pflugers Arch.**, v. 430, p. 563-567, 1995.

YOUNG, V. R.; RICE, H. A.; STEINHAUS, A. H. Studies in the physiology of exercise - VII. The modifications of the colonic motility induced by exercise and some indications for a nervous mechanism. **Am. J. Physiol.**, v. 99, p. 52-63, 1932.