CARLOS EDUARDO SEYFERT

Densidade e área do perfil celular dos neurônios mioentéricos reativos a
acetilcolinesterase, NADH e NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos

(*Rattus norvegicus*) adultos

São Paulo
2003

CARLOS EDUARDO SEYFERT

DEDALUS - Acervo - FMVZ

11300025796

Densidade e área do perfil celular dos neurônios mioentéricos reativos a acetilcolinesterase, NADH e NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos

(*Rattus norvegicus*) adultos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza

FMVZ - 022888

São Paulo
2003

ID 2921

N.º CLASSIFICAÇÃO
T. 1293
FMVZ
N.º TOMBO
022888

SAB 281

Sysno: 1363937

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1293
FMVZ

Seyfert, Carlos Eduardo

Densidade e área do perfil celular dos neurônios mioentéricos reativos a acetilcolinesterase, NADH e NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos / Carlos Eduardo Seyfert -- São Paulo : C. E. Seyfert, 2003.

77 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2003.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza.

1. Plexo mioentérico. 2. Neurônio mioentérico. 3. Ceco. 4. Ratos.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão de Bioética

ERRATA

Na página 07 onde está escrito "AGRADECINETOS", lê-se AGRADECIMENTOS.

Nas figuras 4, 7, 15 e 18 os esquemas corretos para a região Apical Mesentérica (AM) são:

Nas figuras 6, 9, 11, 13, 17 e 19 os esquemas corretos para a região Apical Antimesentérica (AA) são:

Na página 64, no terceiro parágrafo, na quinta linha, onde se lê, "Barbosa", lê-se Zanoni.

Na tabela 6 da página 65, na quinta linha, quarta coluna, onde se lê, 92920, lê-se 9300.

São Paulo, 13 de agosto de 2003

Prof. Dr. Julia Maria Massaro
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Densidade e área do perfil celular dos neurônios mioentéricos reativos Acetilcolinesterase, NADH e NADPH-Diaforase positivos do ceco de ratos (*Ratus norvegicus*) adultos", Protocolo nº 213/2002, utilizando 21 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 sendo aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Density and area of the cellular outline of the myoenteric plexus neurons reactive to Acetylcholinesterase, NADH and NADPH diaphorase positives of the cecum of adult (*Rattus norvegicus*) rats" protocol number 213/2002, utilizing 21 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 referendum".

São Paulo, 13 de agosto de 2003

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: SEYFERT, Carlos Eduardo

Título: Densidade e área do perfil celular dos neurônios mioentéricos reativos a acetilcolinesterase, NADH e NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: 16/12/03

Banca Examinadora

Prof. Dr. Romero Rodrigues de Souza

Instituição: ICB - USP

Julgamento: Aprovado

Assinatura: Romero Rodrigues de Souza

Prof. Dr. Sônia Lucy Melman

Instituição: UEM

Julgamento: Aprovado

Assinatura: Sônia Lucy Melman

Prof. Dr. Juênia S.S. Prada

Instituição: FMVZ - USP

Julgamento: aprovado

Assinatura: Juênia S.S. Prada

A minha **OMA** querida que o tempo levou!!

E um dia me disse: “Du bist ein liebe und ein schöner junge? Ja? Arosmuter Iris hat Gesagt?!!”

A minha família, meus pais **Bruno** grande herói da minha vida e **Helena** Seyfert, minhas irmãs **Ana** e **Alessandra**, meus sobrinhos **Guilherme** e **Nathalia** e ao **José Roberto** dos Santos (Zé) que mesmo distantes **sempre** estiveram presentes me incentivando e apoiando em tudo o que precisei.

A **Patricia** Marega minha anjinha, fonte infinda de coragem para eu pudesse realizar este trabalho, sempre caminhando ao meu lado nesta etapa da minha vida.

A mestre **Sonia Lucy Molinari** que aceitou o desafio de mostrar o caminho correto dentro do mundo científico e me ensinou que às vezes a boca foi feita para ficar fechada. A você não tenho como expressar em palavras a gratidão pela oportunidade que tive de realizar este trabalho, com seus conhecimentos e sua paciência, me guiando sempre da melhor maneira possível.

Ao professor **Romeu Rodrigues de Souza** que depositou em mim confiança e sempre esteve pronto a me ajudar quando foi preciso.

AGRADECIMENTOS

A quase irmã e colega de Pós-graduação **Naianne** Kely Clebis pelo companheirismo antes e durante todo o curso.

Aos grandes amigos **Marcelo** Domingues de Farias, **Karina** Martines Gagliardo, **Ana Paula** Vidotti e **Jaqueline** de Carvalho que estiveram sempre presentes durante a minha vida de “paulista” e em todas as etapas do curso de Pós-graduação, proporcionando pequenos e grandes momentos inesquecíveis.

A professora Sonia Lucy Molinari, a “**Soninha**” que dedicou grande parte do seu tempo a mim para que este trabalho fosse realizado. Sempre me auxiliando e ensinando todos os processos para a elaboração de um trabalho científico. Além dos bons conselhos e puxões de orelha que me deu mesmo antes da Pós-graduação.

Aos professores **Marcílio** Hubner de Miranda Neto, **Celso** Ivan Conegero e **Edson** Liberti, os quais tenho como referencia pela competência e grande caráter.

Aos mestres de Pós-Graduação **José Roberto** Kfoury Junior, **Francisco** Javier H. Blasquez, **Wilson** Machado de Souza, Maria **Angélica** Miglino, **Paula** Pappa e Pedro Primo **Bombonato** que durante todo o processo estiveram sempre presentes.

Ao professor Sebastião **Gazola** que esteve pronto a me auxiliar com as análises estatística deste trabalho.

Ao professor José **Hiran** Sallée que realizou a correção ortográfica e gramatical deste trabalho.

Ao professor **Horacio** Ferreira Julio Junior pelo auxílio e paciência com a confecção das fotografias que compões este trabalho.

As professoras **Sandra** Regina Stabile, Maria **Raquel** Marçal Natali, **Jaqueline** Nelisis Zandoni, **Célia** de Godoy Gomes e **Isaura** Maria Mesquita Prado que me receberam na Universidade Estadual de Maringá onde toda a pesquisa foi realizada e sempre estiveram prontas a sanar minhas dúvidas.

A professora Dra. **Jussara** Rocha Ferreira da Universidade Federal de Goiás pela amizade e pelo grande carisma que teve sempre que estivemos trabalhando em eventos e em aula.

Aos Amigos do Laboratório de Análises Clínicas Santo Antonio, **Agenor** Storti Filho, **Ione** Cristina Jorge, **Evandro** Campiteli e **Dr. Robson** José da Silva Souza que sempre estiveram prontos a me ajudar, cedendo os equipamentos de microscopia para que as análises fossem realizadas.

Aos colegas, estagiários, técnicos e funcionários do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá, **Paulo** Alexandre Galvani, **Renata** Brito Mari, **Pricila** de Freitas, Luiz **Cristiano** Valentini, **Cláudia** Batista Evangelista, **Kleber** Fernando Pereira, e aos técnicos e funcionários **Antônio** Paulo Merceno, **Ângela** Cristina Benedito Mercena, **Cleonira** Sarro, **José** Antonio de Souza, Maria **Euride** Carlos Cansino, **Liana** Ribeiro Zanzarine, **Marcelo** Vladimir Piloto, **João** Batista Alves de Assis, Maria **Vilma** Moraes de Sarro, **Maria** Aparecida Pantoja Agostinho, **Waldir** Trombeti, **Waldmer** Facina e **Elizete** Rosa dos Santos Silva que sempre me auxiliaram junto às coletas de material.

Aos Funcionários e técnicos do Departamento de Cirurgia da FMVZ – USP, **Kazue** Takiishi, **Jaqueline** Martins de Santana, Ana **Paula** Coppi Maciel Ribeiro, Edinaldo Ribas Farias (Índio), **Lilian** de Jesus Oliveira, por todo o apoio prestado e pelos bons momentos de convivência.

Meus colegas de Pós-graduação que me proporcionaram grandes momentos, **Karina** Martines Gagliardo, **Marcelo** Domingues de Farias, **Naianne** Kely Clebis, **André** Luís Filadelpho, **Helder** Pereira, **Arlei** José Birk, **Hildebrando** Gomes Benedicto, **Ana Paula** Vidotti, **Emerson** Ticona Fioretto, **Patricia** Orlandini Gonzales, **Eduardo** Mauricio Mendes de Lima, **Lucas** Alécio Gomes, **Lilian** Kamikawa, **Danila** Barreiro Campos e **Dulcineia** Gonçalves Teixeira.

Aos Pós-graduandos da Anatomia Humana do ICB – USP **Patricia** Marega, **Sílvia** de Campos Boldrini, **Adriano** Mattienze, **Luciana** Senna Simões, **Flávia** de Oliveira, **Sônia** Trannin de Melo Zannin, **Cintia** Bovi Binotti, **Dorival** Martini, **Kátia** Simone Kietzer, **Lilian** Alves Gonçalves e **Thelma** Parada que me proporcionaram bons momentos de convivência.

As “meninas” Maria Tereza Jordão (**Plu**), **Solange** Franzói de Moraes, **Marcia** Sanae Mizuno, **Célia** de Godoy Gomes e **Larissa** Renata de Oliveira que sempre me receberam com muito carinho e paciência.

Aos meus grandes amigos de Maringá **Renato** Tadei, **Fabio** José Canovas e **Karina** Aguila de Goes, João Fábio **Bertonha** e **Luciane** M. Marroco, **Agenor** Stroti Filho e **Monalisa** Wolski e seu **Eduardo** Storti Wolski, **Mateus** Seigo Sagai, **Renato** Moscateli e **Eduardo** Barbosa Lensi que jamais serão esquecidos por me aturarem, incentivarem e ajudarem sempre que precisei, e pelos inesquecíveis momentos que passamos juntos.

Aos pais da Patricia, **José** e **Maria** Marega que me acolheram tão bem.

Aos amigos e pessoas que com um simples gesto fizeram parte deste trabalho.

Enfim a **Deus** que fez tudo isso!

Eu me maravilho com tuas maravilhas.

RESUMO

SEYFERT, C. E. **Densidade e área do perfil celular dos neurônios mioentéricos reativos a acetilcolinesterase, NADH e NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos (*Rattus norvergicus*) adultos.** [Density and area of the cellular outline of the myoenteric plexus reactive to Acethylcholinesterase, NADH and NADPH diaphorase positives of the caecum of adult (*Rattus norvergicus*) rats]. 2003. 77 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Tendo seu início no íleo terminal onde se abre a papila ileal, o ceco é a porção inicial do intestino grosso onde ocorre parte da digestão da celulose proveniente da alimentação e a posterior absorção de seus produtos. O ceco de rato é uma estrutura sacciforme que apresenta partes distintas, tanto macroscópica quanto estruturalmente. O presente estudo teve como finalidade avaliar a densidade e a área do perfil celular dos neurônios mioentéricos em diferentes regiões do ceco de ratos adultos com sete meses de idade (384gr), utilizando as técnicas da Acetilcolinesterase, NADH e NADPH-diaforase. Para tanto o ceco foi dividido em quatro regiões: uma, próxima à ampola cecal (PA), uma, apical mesentérica (AM), uma, basal antimesentérica (BA) e outra apical antimesentérica (AA). Observou-se, que, no que diz respeito à densidade neuronal, existe diferença significativa para as regiões estudadas, sendo à região PA a que apresentou maior quantidade de neurônios com todas as técnicas utilizadas. Em média, nos 80 campos ($17,92\text{mm}^2$) microscópicos contados, foram encontrados 1479 ± 357 neurônios acetilcolinesterásicos positivos, 717 ± 142 neurônios que se coram pela técnica da NADH-d e 240 ± 26 células nervosas que se coram pela técnica da NADPH-d. Com relação ao perfil celular dos neurônios, o teste de variância mostrou não haver diferença significativa entre as regiões. O menor e o maior perfil celular foi observado junto à região BA, em neurônios corados com as técnicas da AChE e NADPH-d respectivamente, tendo o menor perfil, $77,94\mu\text{m}^2$ e o maior, $1579,64\mu\text{m}^2$. Conforme a área do perfil celular, os neurônios foram agrupados em três classes: pequenos, médios e grandes. A classe mais freqüente em todos as regiões estudadas para as três técnicas foi a dos neurônios médios, chegando a 72,4% corados pela técnica da AChE junto à região AA, 68% na região PA para a técnica da NADH-d e 77,6% com a técnica da NADPH-d na região PA. Concluiu-se que, existe diferença regional na distribuição dos neurônios da parede do ceco do rato.

Palavras - chave: Plexo miontérico. Neurônio mioentérico. Ceco. Ratos.

ABSTRACT

SEYFERT, C. E. **Density and area of the cellular outline of the myoenteric plexus reactive to Acetylcholinesterase, NADH and NADPH diaphorase positives of the caecum of adult (*Rattus norvegicus*) rats.** [Densidade e área do perfil celular dos neurônios mioentéricos reativos a acetilcolinesterase, NADH e NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos]. 2003. 77 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Beginning in the terminal ileum where the ileal papilla opens, the caecum is the initial portion of the large intestine, where part of the digestion of the cellulose coming from the food and the absorption of its products take place. This study had the purpose of evaluating the density and the cell profile area of the myoenteric neurons in different regions of the caecum of adult rats aging seven months (384 g body weight), using the techniques of acetylcholinesterase (AChE), NADH- and NADPH-diaphorase. For that, the caecum was divided into four regions: next to the caecal ampulla (PA), apical mesenteric (AM), basal antimesenteric (BA) and apical antimesenteric (AA). It was observed that, in what concerns the neuronal density, there is a significant difference for the regions studied, the PA region exhibiting the greatest amount of neurons with all the techniques employed. On average, in the 80 microscopic fields (17.92 mm^2) counted, $1,479 \pm 357$ neurons were found with AChE, 717 ± 142 with NADH-d and 240 ± 26 with NADPH-d. As for the cell profile of the neurons, the Variance Analysis showed that there is not a significant difference among the regions. The smallest and the largest cellular profiles were observed at the BA region with the techniques of AChE and NADPH-d, respectively, the smallest having $77.94 \mu\text{m}^2$ and the largest $1,579.64 \mu\text{m}^2$. According to the area of the cell profile, the neurons were grouped in three classes: small, medium and large. The most frequent class in all the regions studied and techniques employed was that of medium neurons, reaching 72.4% with AChE at the AA region, 68% in the PA region with NADH-d and 77.6% with NADPH-d in the PA region. Therefore, it was verified that there is a regional difference in the distribution of the neurons in the wall of the rat caecum.

Key words: Myoenteric plexus. Myoenteric neuron. Caecum. Rat.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	<i>Aspectos morfológicos do ceco.....</i>	16
1.2	<i>Sistema nervoso entérico.....</i>	17
1.3	<i>Objetivos.....</i>	20
2	LITERATURA.....	20
2.1	<i>Métodos utilizados para marcação neuronal.....</i>	21
2.1.1	<i>NADH-diaforase.....</i>	22
2.1.2	<i>NADPH-diaforase.....</i>	22
2.1.3	<i>Acetilcolinesterase.....</i>	24
2.2	<i>Estudos do plexo entérico no ceco.....</i>	27
2.3	<i>Estudos morfológicos e histológicos no ceco.....</i>	30
2.4	<i>Cecotomia.....</i>	31
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	<i>NADH-diaforase.....</i>	33
3.2	<i>NADPH-diaforase.....</i>	34
3.3	<i>Acetilcolinesterase.....</i>	35
3.4	<i>Análise quantitativa.....</i>	35
3.5	<i>Análise morfométrica.....</i>	37
3.6	<i>Tratamento estatístico.....</i>	38
4	RESULTADOS.....	39

4.1	<i>Reatividade do plexo mioentérico a acetilcolinesterase.....</i>	40
4.2	<i>Reatividade do plexo mioentérico à NADH-diaforase.....</i>	43
4.3	<i>Reatividade do plexo mioentérico à NADPH-diaforase.....</i>	46
4.4	<i>Características gerais do plexo mioentérico do ceco.....</i>	49
4.5	<i>Quantificação dos neurônios.....</i>	51
4.6	<i>Análise morfométrica.....</i>	52
4.6.1	<i>Análise do perfil celular.....</i>	52
4.6.2	<i>Classificação quanto ao tamanho do perfil celular.....</i>	53
5	DISCUSSÃO.....	59
6	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

Este capítulo foi dividido em 3 tópicos: Aspectos morfológicos do ceco, Sistema nervoso entérico e Objetivos.

1.1 *Aspectos morfológicos do ceco*

O intestino grosso é a porção terminal do canal alimentar, iniciando na junção íleo-cecal e terminando no ânus. Suas divisões anatômicas incluem o ceco, cólons, reto e ânus. Tanto o ceco quanto o colo são caracterizados em espécies domésticas por apresentarem diferenças macroscópicas significativas (BANKS, 1991).

Para os herbívoros não ruminantes que apresentam estômago monocavitário, o intestino grosso torna-se muito importante, pois a digestão da celulose é realizada no interior do mesmo (BANKS, 1991). Segundo Olds e Olds (1991), para os ratos, especificamente a digestão da celulose ocorre no ceco, com a posterior absorção dos produtos da digestão ocorrendo no ceco e no colo. O intestino grosso também absorve os ácidos graxos voláteis e o nitrogênio provenientes da digestão, provavelmente da amônia, produzidos pelo metabolismo anaeróbio da celulose e pela microflora cecal e do colo (BANKS, 1991; LOESCHE, 1968).

O ceco de rato é uma estrutura sacciforme, de paredes delgadas, com formato semelhante a uma vírgula, apresentando uma leve constrição no meio do órgão, dividindo-o em duas porções, uma apical e outra basal. A porção basal não contém tecido linfóide; por outro lado, a porção apical, possui em suas paredes laterais massa distinta de tecido linfóide, análogo ao apêndice vermiforme humano (BAKER; LINDSEY; WEISBROTH, 1979; BERRY, 1901; GETTY, 1986; GREENE, 1963; OLDS; OLDS, 1991).

No rato, o ceco está localizado ventralmente à esquerda do intestino delgado na cavidade abdominal. É caudal ao estômago, relacionando-se dorsalmente com o rim esquerdo e ventralmente com a parede abdominal. Acompanha medialmente a porção descendente do duodeno e a curvatura maior do estômago, porém, Lindström, Rosengren e Fork (1979), descreveram que, por ter uma grande mobilidade, a topografia e a posição anatômica do ceco, na cavidade abdominal, é variável. Possui três regiões distintas, um corpo, um ápice que é cranial e uma base caudal. Não apresenta saculações e tênias, sendo fixo ao íleo terminal pelo mesentério, junto à curvatura menor do ápice cecal. Apresenta ainda uma região denominada de ampola cecal, onde se encontram a desembocadura do íleo, a papila ileal, e o início do colo ascendente, região esta conhecida como válvula cecocólica (ROGER; MALBERT, 1991; SNIPS, 1981). Em seu formato de vírgula, possui duas curvaturas, uma menor que é côncava na região mesentérica, e uma curvatura maior convexa na região antimesentérica.

1.2 Sistema nervoso entérico

Para realizar suas funções, os órgãos que formam o trato gastrointestinal apresentam uma inervação extrínseca, representada pelos nervos simpáticos e parassimpáticos do sistema nervoso autônomo, e uma inervação intrínseca sob responsabilidade do sistema nervoso entérico. O sistema nervoso entérico consiste de um elevado número de neurônios, da mesma ordem e magnitude que o número de neurônios da medula espinhal, formados por neurônios sensitivos, interneurônios e neurônios motores, que são responsáveis pelo controle das funções do tubo digestório, incluindo motilidade, secreção, absorção e vasomotilidade (FURNESS; COSTA, 1980; GUYTON; HALL, 1997). Composto o sistema nervoso entérico existem dois plexos ganglionados (DOOD; ROLE, 1991), o plexo submucoso, localizado junto ao tecido conjuntivo da túnica submucosa, entre a camada muscular circular e a mucosa

(GUNN, 1968) e o plexo mioentérico (DOOD; ROLE, 1991), que se encontra entre as camadas longitudinal e circular da túnica muscular.

O plexo mioentérico, está distribuído desde o esôfago até o canal anal, podendo estar localizado entre os estratos longitudinal e circular da túnica muscular (GABELLA, 1979; GUNN, 1968; IRWIN, 1931; STERNINI, 1988), como também em meio às fibras dos estratos circular e longitudinal da túnica muscular, dependendo do segmento e da espécie analisada (GABELLA, 1971; IWANOW, 1930; MATSUO, 1934; MELLO; MIRANDA-NETO; NATALI, 1996; MOLINARI et al., 1994). Os neurônios do sistema nervoso mioentérico, geralmente, apresentam-se formando gânglios; entretanto neurônios isolados também são observados em roedores (GABELLA, 1987). Verifica-se também que os neurônios não se encontram distribuídos de forma homogênea em torno da parede do órgão. No estômago, há uma maior concentração de neurônios próxima à curvatura menor em relação à curvatura maior (FREGONESI; MIRANDA-NETO; MOLINARI, 1998; OLIVEIRA et al., 2000; MOLINARI et al., 2002). No íleo, junto à região mesentérica, verificou-se a maior densidade neuronal, em relação à região diametralmente oposta, a região antimesentérica (MIRANDA-NETO et al., 2001). No colo proximal do intestino grosso, a distribuição também é desigual, apresentando maior densidade dos neurônios mioentéricos na região antimesocólica em relação à região intermediária (FURLAN; MOLINARI; MIRANDA-NETO, 2002).

Os principais efeitos do plexo mioentérico quando estimulado são: o aumento da contração tônica, "tônus", da parede intestinal, maior intensidade das contrações rítmicas, ligeiro aumento na frequência do ritmo de contração e maior velocidade de condução das ondas excitatórias ao longo da parede intestinal, resultando em movimentos mais rápidos das ondas peristálticas (GUYTON; HALL, 1997).

O plexo mioentérico não deve ser considerado totalmente excitatório, visto que alguns dos seus neurônios são inibitórios; como foi observado através da presença de neurotransmissor polipeptídico intestinal vasoativo (VIP). Os sinais inibitórios resultantes são especialmente úteis para inibir músculos esfinterianos intestinais que impedem o movimento do alimento entre sucessivos segmentos do trato gastrointestinal. Por exemplo, o que ocorre na válvula íleo cecal, que controla o esvaziamento do intestino delgado no ceco (GUYTON; HALL, 1997).

Ao contrário do plexo mioentérico, o plexo submucoso está, principalmente, relacionado com o controle da função no interior da parede de cada segmento do intestino. Por exemplo, muitos sinais sensitivos originam-se do epitélio gastrointestinal e, a seguir, são integrados no plexo submucoso para ajudar a controlar a secreção intestinal local, a absorção local e a contração também local da muscular da mucosa, responsável pelos vários graus de pregueamento da mucosa gástrica (GUYTON; HALL, 1997).

A ampla e complexa diversidade de neurotransmissores foi constatada através de estudos farmacológicos e eletrofisiológicos em diferentes níveis do sistema nervoso entérico, o que demonstram a existência de neurônios motores inibitórios, excitatórios e interneurônios, neurônios vasomotores, secretores e sensoriais, além de células nervosas que foram identificadas de acordo com suas propriedades eletrofisiológicas (COSTA et al., 1985; FURNESS; COSTA, 1980; WOOD, 1987). Dessa forma, alguns perfis bioquímico-funcionais vêm sendo avaliados, com a proposição de detectar esses neurotransmissores. Alguns tipos de neurotransmissores liberados pelas terminações nervosas dos diferentes tipos de neurônios entéricos já foram identificados. Os dois mais conhecidos são a acetilcolina e a norepinefrina, os demais são: adenosina-trifosfato, serotonina, dopamina, colecistocinina, substância P, polipeptídio intestinal vasoativo, somatostatina, leu-encefalina, met-encefalina e bombesina (GUYTON; HALL, 1997).

1.3 Objetivos

Os estudos sobre o sistema nervoso mioentérico realizados em diferentes espécies representativas dos diversos grupos animais permitiram observar seu arranjo, localização, tamanho, formato e densidade dos neurônios. Contribuíram, amplamente, para entender aspectos relacionados ao comportamento da população neuronal frente a vários fatores como o envelhecimento, diabetes, desnutrição, alcoolismo e outros.

Por outro lado, investigações sobre o sistema nervoso entérico, abordando aspectos mais sutis de sua organização e funcionamento, podem desvendar adaptações neuronais específicas intimamente relacionadas à biologia de cada espécie animal (FURLAN, 2000).

O mapeamento da distribuição dos neurônios mioentéricos evidenciados por diferentes técnicas como as da Acetilcolinesterase (AChE), da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-diaforase (NADH-d), e da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fosfatase-diaforase (NADPH-d), tem contribuído e contribuirão com estudos experimentais. É preciso que o pesquisador esteja atento ao local de coleta das amostras dos vários segmentos, (DUPONT; JERVIS; SPRINZ, 1965; LIJIMA; HASEGAWA, 1985; ZANONI et al., 1997) quando o animal é submetido a condições experimentais (desnutrição, diabetes, alcoolismo).

Os neurônios mioentéricos não se distribuem uniformemente, ao redor da parede dos órgãos, como foi constatado em estudos realizados com o plexo mioentérico do estômago, íleo e intestino grosso. Como se verá na análise da literatura no caso do ceco, são registrados poucos trabalhos sobre este tema. Assim sendo, o objetivo do nosso estudo foi investigar a distribuição dos neurônios mioentéricos na parede do ceco do rato, considerando suas porções apical e basal, assim como as regiões mesentérica (curvatura menor), antimesentérica (curvatura maior) e aquela próxima à ampola cecal.

Literatura

2 LITERATURA

A literatura consultada permitiu dividir o capítulo em 4 tópicos, sendo estes: Métodos utilizados para marcação neuronal; Estudos do plexo entérico no ceco; Estudos morfológicos e histológicos no ceco e Cecotomia.

2.1 Métodos utilizados para marcação neuronal

As primeiras análises dos neurônios entéricos foram feitas a partir da impregnação pela prata e azul de metileno (DUPONT; JERVIS; SPRINZ, 1965; IRWIN, 1931; MATSUO, 1934). A primeira baseia-se na afinidade de elementos neuronais a metais pesados, e a ela seguiu-se à impregnação pelo ouro e pelo ósmio. Com o azul de metileno evidencia-se acúmulo de material ácido, como os corpúsculos de Nissl, região em que há agregação de material ribossômico. Da mesma maneira, utiliza-se também o azul de toluidina, o violeta de cresila (IRWIN, 1931; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995) e o azul cuprulínico (HEINICKE; KIERNAN; WISJSMAN, 1987).

Com o método de Giemsa (BARBOSA 1978) é possível distinguir neurônios com maior ou menor intensidade basofílica, parâmetro que pode ser empregado para avaliar a desintegração dos corpúsculos de Nissl nos processos de cromatólise neuronal, como descrito por Erhart (1974), Cormack (1995), Natali e Miranda-Neto (1996) e Sant'Ana et al. (1997b), assim como a intensidade de síntese protéica.

A estas técnicas de evidenciação de elementos neuronais somam-se outras como a histoquímica, a imunohistoquímica e a imunofluorescência (BENNET, 1973; BOR-SENG-SHU et al., 1994; GABELLA, 1969; SANTER, 1994; YOUNG et al., 1993).

2.1.1 NADH-diaforase

Dentre as técnicas histoquímicas, uma das mais utilizadas é a de evidênciação da enzima NADH-diaforase (GABELLA, 1969) que se baseia na reação de oxi-redução catalisada pela enzima mitocondrial NADH-diaforase. Para que ocorra a reação é fornecido, como substrato para mesma, o NADH e o aceptor artificial de elétrons o Nitro Blue Tetrazolium (NBT). Ao receber os elétrons, o NBT precipita-se formando grânulos de formazana de cor azul e insolúveis, evidenciando deste modo o corpo celular de neurônios com maior atividade da enzima NADH-diaforase positivos, que representam aqueles com maior atividade daquela enzima. De acordo, porém, com a literatura, esta técnica permite evidenciar parte da densidade neuronal, o número de neurônios observados é menor que o encontrado pelo método de Giemsa (FURLAN et al., 1999; MIRANDA-NETO et al., 2000; SANT'ANA et al., 1997a) e com a coloração pelo azul cuprulínico (HEINICKE; KIERNAN; WISJSMAN, 1987).

2.1.2 NADPH-diaforase

No plexo mioentérico evidencia-se uma riqueza de neurotransmissores, dentre eles o óxido nítrico, que é um potente neurotransmissor inibitório, não-adrenérgico não-colinérgico, (BULT et al., 1990), que produz o relaxamento da musculatura lisa do trato gastrointestinal (SHIMAMURA et al., 1993). A literatura tem demonstrado a validade do uso de técnicas histoquímicas para evidênciação de óxido nítrico (NO), já que a enzima NO sintase (NOS) co-existe com a NADPH-diaforase (SHERER-SINGLER, 1983; SANTER, 1994; KENAREN et al., 1995). Estudos têm demonstrado a presença do NO no plexo mioentérico da cobaia (FURNESS et al., 1994), no íleo de ratos adultos (MIRANDA-NETO et al., 2001); no colo ascendente de ratos desnutridos e com deficiência de vitaminas do complexo B (SANT'ANA;

MOLINARI; MIRANDA-NETO, 2001); no íleo de ratos diabéticos suplementados com ácido ascórbico (ZANONI et al., 2003).

O NO é um radical livre instável e atua como uma molécula mensageira em uma variedade de tecidos neurais e não neurais (MONCADA et al., 1991). Ele é sintetizado como um produto da conversão do precursor fisiológico L-arginina para citrulina, em uma reação catalisada por uma NO sintase (NOS) constitutiva dependente de cálcio (MONCADA et al., 1991). O NO, assim que é produzido por ser lipofílico, atravessa as membranas celulares das células efetoras. Nas células efetoras interage com a guanilato ciclase solúvel, ligando-se ao ferro da porção heme da enzima, resultando na mudança da guanosina monofosfato cíclico (cGMP) (BURKS, 1994). Este mensageiro secundário, produz uma variedade de efeitos nas células alvo.

Os neurônios que produzem óxido nítrico (NO) podem ser identificados, através de técnicas imunohistoquímicas para óxido nítrico sintase (NOS) (FABRICIUS et al., 1996) ou através de técnicas histoquímicas onde ocorre a redução do Nitro Blue Tetrazolium (NBT), formando uma formazana insolúvel (azul escuro) na presença de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) (SCHERER-SINGLER et al., 1983). A distribuição dos neurônios NADPH-diaforase positivos é idêntica daqueles imunomarcados para NOS (BELAI et al., 1992; SANTER, 1994).

Segundo Moncada et al. (1991) existem duas grandes classes de enzimas sintetizadoras de óxido nítrico que são a NOS construtivas e a NOS induzida cada uma codificada por genes diferentes (NORRIS et al., 1994). A óxido nítrico sintase construtiva (cNOS) é responsável pela rápida biossíntese do NO, e pode ser subdividida em NOS neuronal (nNOS) encontrada nos neurônios centrais e periféricos e NOS endotelial (eNOS) encontrada nos neurônios endoteliais. A óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é responsável

pela síntese de NO em resposta a um agente indutor após horas ou dias em condições protetoras ou fisiopatológicas e está presente em macrófagos, epitélio e diferentes tipos de células hepáticas e pancreáticas (CHAKDER; BANDYOPADHYAY; RATTAN, 1997).

A NOS pode ser sintetizada tanto no corpo celular neuronal, quanto no terminal do axônio, tendo efeito direto pós-juncional sobre as células musculares lisas. Existindo também, neurônios entéricos nitrérgicos nos sistemas: respiratório, digestório, urinário, genital bem como no coração de diferentes espécies animais (GRAZDANOVIC; BAUNGARTEN; BRUNING, 1994)

O NO não é considerado um transmissor convencional, pois não é armazenado em vesículas e devido à sua natureza gasosa, atravessa facilmente as membranas biológicas alcançando as células vizinhas logo que é produzida. Nos neurônios do plexo mioentérico do colo, o NO desempenha importante função inibitória (AIMI et al., 1993; MACKLOUF; GRIDER, 1993; MONCADA et al., 1991; STARK; SZURZEWSKI, 1992) participando do controle da motilidade do intestino (AIMI et al., 1993).

2.1.3 *Acetilcolinesterase*

Um dos principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso entérico é a acetilcolina (OSINSKI; BASS, 1993; GUYTON; HALL, 1997; NAKAJIMA et al., 2000). A acetilcolina é sintetizada pela enzima acetiltransferase e sua degradação é efetuada por ação enzimática (DOOD; ROLE, 1991; GUYTON; HALL, 1997). A acetilcolinesterase é a enzima responsável pela quebra da acetilcolina após sua liberação na fenda sináptica (OSINSKI; BASS, 1993; GUYTON; HALL, 1997) podendo ser utilizada como um marcador de atividade

colinérgica (GABELLA, 1994), visto que, para a marcação da acetilcolina, não existe um método histoquímico (NAKAJIMA et al., 2000).

A acetilcolina foi isolada no intestino de mamíferos por Feldberg e Lin (1949). Segundo, Palmer e Koch (1995), a maioria dos neurônios do intestino é colinérgica. A inervação colinérgica excitatória é importante na sinalização interneuronal, assim como para a função adequada da musculatura lisa e das glândulas (DAVIS; MASELLA; BLENNERHASSETT, 1998). A AChE é sintetizada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) e sua inativação na fenda sináptica ocorre, principalmente, de forma responsável pela quebra da AChE após sua liberação (OSINSKI; BASS, 1993) e pode ser utilizada como marcador de atividade colinérgica (GABELLA, 1994).

A perfeita função das sinapses exige que o neurotransmissor seja rapidamente removido da fenda sináptica, do contrário ocorreria excitação ou inibição do elemento pós-sináptico por tempo prolongado. A remoção do neurotransmissor pode ser feita por ação enzimática. É o caso da acetilcolina, que é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase em acetato de colina. A colina é imediatamente captada pela terminação nervosa colinérgica servindo como substrato para síntese de nova acetilcolina pela própria terminação (GUYTON; HALL, 1997).

A acetilcolina é sintetizada no citoplasma do terminal axônico, sendo rapidamente absorvida por muitas vesículas sinápticas pequenas. Cerca de 300.000 vesículas encontram-se normalmente presentes nos terminais de uma só placa motora. Presa na matriz da lâmina basal existe grande quantidade de enzima acetiltransferase, capaz de destruir a acetilcolina (GUYTON; HALL, 1997).

O trato gastrointestinal dos mamíferos possui funções em comum, assim sendo, muitos neurônios entéricos desempenham funções equivalentes em todas as espécies. Desta

forma, suprimindo os músculos do trato gastrointestinal, existem motoneurônios excitatórios e inibitórios. Podemos assim, presumir que neurônios de diferentes regiões e em diferentes animais apresentem o mesmo procedimento químico (FURNESS et al., 1992).

Na literatura, é comum se encontrarem divergências sobre os neurônios entéricos, quanto à densidade dos corpos celulares verificada pelos autores, em um mesmo segmento ou em diferentes porções do aparelho digestório de animais da mesma espécie ou de espécies distintas (IRWIN, 1931; MATSUO, 1934; GABELLA, 1971). Em uma mesma espécie, diversas densidades neuronais são encontradas quando se comparam segmentos do tubo digestório de animais de diferentes idades (ALI; MACLELLAND, 1979; ANARUMA, 1994; DE SOUZA et al., 1993; SANTER; BAKER, 1988; SANTER, 1994), ou de animais submetidos a variadas condições experimentais (NATALI et al., 1995; MAREGA, 2002; ROMANO et al., 1996; SANT'ANA et al., 1997a). As diferenças são ainda mais ressaltadas quando as técnicas de evidenciação neuronal são distintas (HEINICKE; KIERNAN; WISISMAN, 1987; KARAOSMANOGLU et al., 1996; MAREGA, 2002; MIRANDA-NETO et al., 1999; MOLINARI et al., 2002; SANT'ANA et al., 1997b; WILHELM et al., 1998).

A distribuição dos neurônios mioentéricos ao redor da parede intestinal, segundo estudos quantitativos, não é homogênea. Leaming e Cauna (1961) observaram diferenças entre as regiões mesentérica e antimesentérica do jejuno de gato. Saffrey e Burnstock (1994) relatam que o número de neurônios do plexo mioentérico é maior em áreas onde as camadas de musculatura lisa são mais espessas. Como foi observado por Snips (1981) na região da ampola cecal onde a musculatura é mais densa, e por Roger, Cabanie e Ferre, (1991) que descrevem uma maior quantidade de feixes de fibras nervosas nesta região em relação às demais áreas do ceco de ratos. Em ratos adultos, foi verificada uma maior densidade de neurônios NADH-diaforase positivos na região antimesocólica do que na intermediária do colo ascendente (SANT'ANA et al., 1997b); maior número de neurônios na curvatura menor

de que na curvatura maior do estômago de ratos (FREGONESI; MIRANDA-NETO; MOLINARI, 1998) maior quantidade de gânglios foi observada por Oliveira (2000) junto curvatura gástrica menor da região glandular do estômago de ratos, onde a parede do órgão é mais espessa; maior densidade neuronal na região mesentérica do que na antimesentérica do íleo de ratos (MIRANDA-NETO et al., 2001). Para o estômago de humanos, Souza, Carvalho e Fujimura (1988) encontraram, menor número de neurônios na porção superior do esôfago, quando comparada com os níveis inferiores do segmento.

2.2 Estudos do plexo entérico no ceco

No que diz respeito ao ceco, há registros de diferentes estudos que relatam o número, a forma, a função e trabalhos com os neurônios do plexo mioentérico.

Irwin (1931) analisando o plexo mioentérico de diferentes espécies de mamíferos (cão, gato, coelho, cobaia e rato), descreve que o plexo do ceco vem em continuidade com o plexo do intestino delgado sem interrupção, possuindo gânglios compactos e esféricos, como o que ocorre no piloro, e estes estão conectados por longas fibras interganglionares. Distingue ainda, o plexo mioentérico na região da tênia onde os gânglios estão distantes uns dos outros, sendo unidos por longas fibras nervosas, tendo esta região em média 12.000 neurônios por cm^2 . Na região desprovida de tênia, os gânglios são grandes com formato circular, sendo estes unidos por feixes curtos e grossos de fibras nervosas. Quanto à densidade neuronal desta região, descreveu que, em média, existem 4.500 neurônios/ cm^2 .

Ohkobo (1937a) através do azul de metileno verificou o plexo mioentérico no ceco de cobaia, na região das tênias e entre as mesmas. Na região das tênias os gânglios são

maiores quando comparados com a região entre as mesmas. O ceco apresenta 3.300 neurônios/ cm^2 .

Ohkobo (1937b) descreveu o plexo de macaco, relatando que este possui malhas maiores que a do intestino delgado, apresentando o formato poligonal, contendo em média 1.300 neurônios/ cm^2 .

Tafari (1958) estudando o íleo, o ceco e o colo da cobaia observou que os neurônios do ceco são maiores em relação aos do colo porém, estes estão em menor número.

Dupont, Jervis e Sprinz (1965) trabalharam com o ceco de ratos da linhagem Fischer (152,4gr), empregando as técnicas de NADPH, AChE e azul de metileno para evidênciação do plexo mioentérico nas regiões mesentérica e antimesentérica do ceco. Para as técnicas da NADPH e AChE, porém, coletou amostras da região basal e para o azul de metileno, da região apical. Os gânglios na margem mesentérica, geralmente são gânglios mais numerosos e geralmente poligonais, compondo malhas com formato elíptico e quadrado. Na margem antimesentérica apresenta gânglios menores e mais espalhados formando malhas de aspecto retangular. Encontraram para o perfil do corpo celular de: 0 - 10 μ (6,8%); 10 - 20 μ (67,35%), 20 - 30 μ (25,28%) e 30 - 45 μ (0,68%).

Para Maslennikova (1962), o plexo mioentérico na região central do ceco, apresenta-se diferente em relação ao duodeno, jejuno, íleo colon e reto. Na região do haustro, consiste de uma rede com malhas largas. A malha tem formato de triângulos alongados ou retângulos irregulares. Seus tamanhos são menores nas regiões das tênias, os feixes do plexo são mais espessos em relação as demais regiões do intestino (duodeno, jejuno, íleo, colo e reto). O número de neurônios no ceco foi de 1.760 por cm^2 . O ceco apresenta menor densidade neuronal em relação ao duodeno, jejuno, íleo, colo e reto.

Gabella (1971) avaliando o tamanho dos neurônios do plexo mioentérico reativos a NADPH-d de ratos albinos (*Epimys norvergicus*) destacou que na vida pós-natal existe um aumento muito significativo do tamanho dos neurônios do plexo mioentérico do estômago, ceco e reto em relação ao intestino delgado. No ceco foram encontrados as maiores células neuronais do intestino, onde o tamanho dos neurônios variou de $75 \mu\text{m}^2$ a mais de $975 \mu\text{m}^2$, apenas 3,92% dos neurônios alcançaram tamanho maior que $975 \mu\text{m}^2$.

Em estudo quantitativo dos neurônios e dos gânglios mioentéricos no ceco de ratos, corados pelo método de giemsa, Barbosa (1973) encontrou em fragmentos coletados na região intermediária entre as bordas mesentérica e antimesentérica, 4.653 células nervosas em 347 gânglios, em uma área de $12,72 \text{ mm}^2$. Apresentou ainda, o tamanho da área citoplasmática dos neurônios, destacando que o tamanho celular variou de $80 \mu\text{m}^2$ a $1040 \mu\text{m}^2$, e comparando o tamanho dos mesmos, observou que 57,5% dos neurônios que compõem o plexo mioentérico do ceco são de tamanho médio ($180 \mu\text{m}^2$ a $520 \mu\text{m}^2$).

O plexo mioentérico de equinos jovens foi avaliado por Murray, Parker e White (1988) comparando o intestino de uma potra com megacolo e três potros normais. As observações ao microscópio mostraram que o potro doente comparado com os controles, apresentou uma redução das células dos gânglios mioentéricos do ceco, colo dorsal direito e moderada redução no colo transversal. Uma suave redução dos neurônios mioentéricos foi observada no colo ventral esquerdo. Avaliaram ainda que a população neuronal do intestino delgado estava dentro dos padrões normais. Em todos os segmentos examinados, a população neuronal secundária do plexo mucoso pareceu normal.

Burns e Cummings (1991) realizaram estudos com a região apical e basal do ceco de equinos, evidenciado maior densidade de neurônios, na região basal, em relação a apical evidenciados pela técnica do azul cuprulínico.

Belai et al. (1992) investigaram o padrão de distribuição e a coexistência de óxido nítrico sintase (NOS) e NADPH-diaforase, no antro gástrico, íleo, ceco, cólons proximal e distal de ratos. Revelaram que o tamanho dos neurônios NOS e NADPH-d variou entre as regiões estudadas e entre gânglios da mesma região do tubo digestório. Concluíram que a presença da atividade de NADPH-diaforase em todos os neurônios mioentéricos com imunoreatividade NOS confirma as sugestões de que os neurônios NOS e NADPH-diaforase são idênticos, confirmando o que foi sugerido por Dawson et al. (1991) e por Hope et al. (1991).

Zanoni et al. (1997) observaram que em ratos da linhagem Wistar, que os animais com dois meses de idade apresentavam em uma área de $6,92\text{mm}^2$ $331,80 \pm 100,50$ neurônios e para os animais com oito meses de idade, $237,40 \pm 75,62$ neurônios.

2.3 Estudos morfológicos e histológicos no ceco

Comparando a anatomia do ceco de rato e de camundongo, Snipes (1981) destacou que a mucosa do ceco de camundongo apresenta um contorno suave em forma de curva nas quais os espaços se abrem formando criptas, observadas na microscopia de luz, a do rato tem aparência similar, exceto pelas configurações que são arranjadas mais densamente e as criptas mais estreitas. O epitélio cecal de ambos os animais apresenta uma configuração típica, que é característica das células intestinais de absorção.

Zanoni e Miranda-Neto (1997) descreveram a morfologia do ceco de ratos da linhagem Wistar, onde o segmento se apresentou sacciforme semelhante ao estômago do próprio rato e de humanos, possuindo uma curvatura maior livre e uma curvatura menor presa à parede, pelo mesocolo. A parede do ceco é constituída pela túnica mucosa, tela

submucosa, túnica muscular composta por dois estratos, o mais interno com fibras no sentido circular e o externo com fibras no sentido longitudinal e pela túnica serosa. Relataram, ainda, que os neurônios do plexo mioentérico do ceco estavam dispostos formando gânglios, e a maioria localizava-se entre os estratos circular e longitudinal da túnica muscular, porém descrevem que foram encontrados com grande frequência em meio às fibras musculares dos estratos circular e longitudinal. Quando observados em preparados de membrana, os gânglios do plexo apresentam-se sob as formas triangulares, poligonal e em maior quantidade com formato alongado.

2.4 Cecotomia

Lloyd, Dale e Crampton (1958) realizaram a cecotomia em suínos e observaram participação do ceco no aproveitamento de nutrientes oriundos da alimentação. Seus experimentos apontaram que o ceco, por si só, não contribui muito para a quebra geral das partículas alimentares, destacando que esta é sua função fisiológica, porém, este tem papel mais importante na síntese de vitamina B, como descrito por Taylor; Pennington e Thacker (1942) e Bernard et al. (1946) em ratos, e por Couch et al. (1942) em aves e Nasr (1950) para porcos.

Com relação à cecotomia, Ambuhl, Williams e Senior (1979) e Williams e Senior (1982) estudaram a ausência do ceco na digestibilidade de comida em ratos, onde concluíram que a cecotomia causa um aumento no comprimento do colo e conseqüente aumento da mucosa, mostrando uma adaptação. A ausência do ceco provoca a diminuição aparente na digestibilidade de matéria orgânica (celulose e hemicelulose), carboidratos, proteínas, e absorção de água. Um outro aspecto observado foi a redução do tempo de trânsito do alimento no trato digestório.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 15 ratos albinos (*Rattus norvergicus*) da linhagem Wistar machos, com sete meses de idade pesando em média 384 gr, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá.

Os 15 animais foram divididos em três grupos, sendo 5 animais utilizados para cada técnica: (AChE), NADH- e NADPH-diaforase positivos.

Os ratos foram anestesiados com éter etílico e sacrificados, seguindo-se imediatamente a laparotomia. Os cecos após serem retirados, foram submetidos às técnicas supracitadas.

3.1 NADH-diaforase

Os cecos foram lavados e distendidos em solução de Krebs pH 7,3 contendo: 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 e, imediatamente, submetidos aos procedimentos para evidênciação neuronal. Estes constam de duas lavagens de 10 minutos em solução de Krebs pH 7,3; permeabilização em Krebs contendo Triton X-100[®](Sigma) a 0,3% por cinco minutos; mais duas lavagens de 10 minutos em Krebs; e incubação por 45 minutos em meio de reação consistindo de: 25 ml de solução estoque de Nitro Blue Tetrazolium^(Sigma) (NBT, solução estoque na concentração de 0,5 mg/ml), 25 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M, 50 ml de água destilada e 0,05 g de $\beta\text{-NADH}^{(\text{Sigma})}$. Em seguida, foram fixados em formol a 10% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 para interromper a reação e, submetidos à elaboração de preparados de membrana e montados entre lâmina e lamínula.

Para a realização dos preparados de membranas, o ceco foi seccionado, separando-se as faces ventral e dorsal. Ambas as faces foram divididas em duas partes: apical e basal. Nestes, as camadas mucosa e submucosa foram removidas com auxílio de instrumental cirúrgico sob microscópio estereoscópio com transiluminação; a seguir, as membranas foram desidratadas em álcool 90°, 95° e absoluto, sendo repetida três vezes neste último, durante cinco minutos. A diafanização foi promovida imergindo-se as lâminas em três cubas sequenciais contendo xilol também por cinco minutos. Em seguida, a lamínula foi fixada sobre o material com Permount. Para assegurar a correta aderência do material ao laminário e impedir a formação de bolhas, as lâminas foram mantidas sob peso por no mínimo 48 horas.

3.2 NADPH-diaforase

Os cecos de 5 animais foram lavados e preenchidos com tampão fosfato (PB; pH 7,4), fixados com paraformoldeído a 4% preparado em tampão fosfato 0,1M (PB; pH 7,4) por 30 min, imersos em Triton X-100® 0,3%, dissolvido em tampão fosfato salinado (PBS, pH 7,4) por 10 minutos e posteriormente lavados 10 vezes (10 minutos cada) em PBS e em seguida imersos no meio de incubação para a evidênciação neuronal da NADPH-diaforase, durante 2 horas. Este meio foi composto de 50 mg de NBT, 100 mg de β -NADPH^(Sigma), 0,3% de Triton X-100® em tampão Tris-HCl^(Gibco BRL) 0,1M (pH 7,6). Depois da incubação, os cecos foram abertos, através das curvaturas, e lavados 3 vezes em PBS por 5 minutos, e então imersos em solução de paraformoldeído a 4%. Os preparados de membrana foram montados entre lâmina e lamínula como descrito no item anterior.

3.3 Acetilcolinesterase

Cinco animais foram utilizados para a realização desta técnica. Após a laparotomia os cecos foram retirados e lavados com solução salina e posteriormente preenchidos com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato, sendo suas extremidades fechadas com cordonê, formando uma "bexiga". Os cecos permaneceram preenchidos e imersos neste fixador por um período de 1 hora a 4°C, sendo em seguida lavados durante 12 horas em solução de Krebs contendo hialuronidase^(2000 UTR Apsen) e tetraisopropil pirofosforamida (isso-OMPA)^(Sigma). A incubação foi realizada por um período de 24 horas a 4°C, em meio contendo 0,17M de acetilcolina^(Sigma), 6,5ml de tampão fosfato (0,1M, pH 7,1), 0,5ml de citrato de sódio (100mM), 1ml de sulfato de cobre (30mM), 1ml de água destilada e 1ml de ferricianeto de potássio (5mM), acrescentando-se tetraisopropil pirofosforamida e hialuronidase.

Após o período de incubação, os preparados de membrana foram dissecados, removendo-se as camadas mucosa e submucosa, como foi descrito nos itens anteriores. Os preparados de membrana foram então desidratados em álcool absoluto por duas vezes, durante três minutos, diafanizados em xilol por três minutos em duas passagens e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética^(Fisher Chemical).

3.4 Análise quantitativa

A análise quantitativa dos neurônios mioentéricos foi efetuada com auxílio de microscópio^(Olympus BX40) com objetiva de 40x, nos preparados de membrana submetidos à técnica da acetilcolinesterase, NADH e NADPH-diaforase. Foram quantificados 80 campos microscópicos (17,92mm²) em ambas as faces (dorsal e ventral) das seguintes regiões: apical mesentérica (AM), apical antimesentérica (AA), próxima à ampola cecal (PA) e região basal

antimesentérica (BA) (Figuras 1 e 2). Todos os neurônios de cada campo foram contados, considerando-se os meios neurônios de um campo e desprezando-se os de outro. A área do campo microscópico foi calculada através de uma régua micrometrada^(Zeiss) acoplada à ocular. A documentação fotográfica foi realizada com câmara fotográfica acoplada ao microscópio^(Nikon, Zeiss), utilizando filme PB^(Fuji SS 135-ASA 100).

Figura 1 - Fotografia demonstrando posição do ceco no abdome (*), colo ascendente (CA) e íleo (I)

Figura 2 - Esquema do ceco visto por sua face ventral. Regiões: apical antimesentérica (AA), basal antimesentérica (BA), apical mesentérica (AM), próximo à ampola cecal (PA), íleo (I), colo ascendente (C) ampola cecal (AC).

3.5 Análise morfométrica

Para a análise dos perfis dos corpos celulares foi utilizado analisador de imagens computadorizado^(Image Pro Plus 3.0.1), acoplado ao microscópio^(Olympus BX40). Baseado no contorno, o programa calcula a área do perfil neuronal (MIRANDA-NETO, 2000). Sendo que este valor não corresponde à área superficial total do corpo celular do neurônio, uma vez que a imagem é apenas bidimensional. Foram mensurados 50 neurônios de cada região de todos os preparados de membrana. Com base na média e desvio padrão do tamanho do perfil neuronal (em μm^2), os neurônios foram categorizados como pequenos, médios e grandes (TAFURI, 1958; BARBOSA, 1973).

3.6 Tratamento estatístico

Para a análise da densidade neuronal das diferentes regiões do ceco, foi aplicado o teste " χ^2 " de homogeneidade. O estudo da área do perfil celular dos neurônios mioentéricos nas diferentes regiões do ceco, foi realizado através da ferramenta ANOVA. A significância utilizada em todas as análises foi de 5%.

Resultados

4 RESULTADOS

Para uma melhor organização dos resultados, estes estão divididos em 6 diferentes tópicos.

4.1 *Reatividade do plexo mioentérico a acetilcolinesterase*

A reatividade dos neurônios mioentéricos a acetilcolinesterase (AChE) foi bastante intensa em todas as regiões estudadas, apresentando gânglios interligados por feixes de fibras nervosas e gânglios com continuidade com formato alongado, triangular e irregular, que acompanham o sentido das fibras da camada circular da túnica muscular (Figura 3). Pôde-se distinguir feixes primários, por serem espessos, formando uma ampla malha, feixes secundários compostos por um número menor de fibras e os terciários que conectam elementos do plexo mioentérico (Figura 4).

Nas regiões apical antimesentérica (AA), basal antimesentérica (BA) e próxima à ampola cecal (PA) os gânglios são mais volumosos e próximos entre si (Figura 3), porém na região apical mesentérica (AM) a quantidade de gânglios é menor, existindo entre eles um espaçamento maior onde os feixes de fibras nervosas são mais longos (Figura 4).

Quanto à reatividade dos neurônios observou-se que dentro de um mesmo gânglio existem diferentes intensidades de marcação, no entanto, as células nervosas fortemente reativas estão em quantidade maior que os neurônios fracamente reativos (Figuras 5 e 6). A reatividade permitiu verificar que na população há neurônios de diferentes tamanhos (Figura 6).

Figura 3 - Fotomicrografia da região próxima a ampola cecal (PA), evidenciado o arranjo do plexo mioentérico. Gânglios triangular (▲), alongado (→) e irregulares (▲). Preparado de membrana da técnica da AChE (barra 400 μ m)

Figura 4 - Fotomicrografia da região apical mesentérica (AM) do ceco, evidenciando arranjo do plexo mioentérico, feixes primários (▲), secundários (→) e terciários (▲). Preparado de membrana da técnica da AChE (barra 400 μ m)

Figura 5 - Fotomicrografia da região próxima à ampola cecal (PA) destacando plexo com gânglio composto por neurônios com diferentes intensidades de reatividade. Preparado de membrana da técnica da AChE (barra 200 μ m)

Figura 6 - Fotomicrografia da região apical antimesentérica (AA) do ceco evidenciado neurônios de diferentes tamanhos, pequeno (P), médio (M) e grande (G) com diferentes intensidades de reatividade. Preparado de membrana da técnica da AChE (barra 200 μ m)

4.2 Reatividade do plexo mioentérico à NADH-diaforase

Ao analisar os neurônios do plexo mioentérico reativos a NADH-d, observou-se que os gânglios estavam dispostos paralelamente à camada circular da túnica muscular. Estes gânglios estavam constituídos por uma quantidade variável de células nervosas, tendo formato alongado, triangular e irregular. Nas regiões apical mesentérica e basal antimesentérica predominaram os gânglios alongados (Figuras 7 e 8) e na região apical antimesentérica e próxima à ampola cecal, gânglios com formato triangular e irregular (Figuras 9 e 10) na sua grande maioria e em poucos casos apresentam o formato alongado. Raros neurônios isolados foram evidenciados na região apical antimesentérica (Figura 11).

Uma característica observada na técnica da NADH-d foi a marcação intensa do citoplasma de quase todos os neurônios, com exceção de algumas células de tamanho pequeno (Figura 8).

Figura 7 - Fotomicrografia de preparado de membrana da região apical mesentérica (AM) evidenciado gânglio alongado apresentando neurônios NADH-d positivos (barra 200 μ m)

Figura 8 - Fotomicrografia de preparado de membrana da região basal antimesentérica (BA) evidenciado gânglio alongado apresentando neurônios NADH-d positivos, com espaços entre as células (*) (barra 100 μ m)

Figura 9 - Fotomicrografia da região apical antimesentérica (AA) evidenciado gânglio com formato irregular apresentando neurônios NADH-d em preparado de membrana (barra 200 μ m)

Figura 10 - Fotomicrografia de preparado de membrana da região próximo a ampola cecal (PA) destacando gânglio irregular apresentando neurônios NADH-d positivos, com espaços em seu interior (*) (barra 200 μ m)

Figura 11 Fotomicrografia da região apical antimesentérica (AA) apresentando vista geral do plexo mioentérico com poucos gânglios irregulares (▲) e neurônios isolados (○). Preparado de membrana da técnica a NADH-d (barra 400 μ m)

4.3 Reatividade do plexo mioentérico à NADPH-diaforase

Na técnica NADPH-d, juntamente com os gânglios, foram evidenciados os feixes de fibras nervosas que compõe o plexo mioentérico. Estes feixes apresentaram diferentes espessuras, de acordo com a quantidade de fibras nervosas contidas em seu interior, formando as malhas primária, secundária e terciária que apresentam diferentes conformações nas regiões estudadas (Figuras 12 e 13).

Os gânglios nervosos das regiões próxima à ampola cecal, apical mesentérica e basal antimesentérica apresentam formatos alongado, triangular e irregular, sendo compostos por neurônios esparsos em seu interior (Figuras 14, 15 e 16), poucas células nervosas isoladas foram encontradas.

A região AA possui gânglios pequenos e irregulares, sendo compostos por poucos neurônios, além de existir uma grande quantidade de células nervosas isoladas (Figuras 13 e 17).

Figura 12 - Fotomicrografia da região próxima a ampola cecal (PA), apresentando gânglios alongados (➡) e com formato irregular (➡➡) além de feixes de fibras primárias (➡), secundárias (➡) e terciárias (V), do plexo mioentérico. Observar espaços no interior dos gânglios (★). Preparado de membrana da técnica da NADPH-d (barra 400 μm)

Figura 13 - Fotomicrografia da região apical antimesentérica (AA) do ceco, apresentando gânglios esparsos compostos por poucos neurônios (▴) além de células isoladas (○); feixes de fibras primários (▴), secundários (▴) e terciários (→) com trajeto irregular. Preparado de membrana da técnica da NADPH-d (barra 400 μ m)

Figura 14 - Fotomicrografia da região próxima a ampola cecal (PA), apresentando gânglio irregular composto por poucos neurônios pequenos (P), médios (M) e grandes (G) com amplo espaço em seu interior (*) além de vários feixes de fibras nervosas em suas extremidades (▴). Preparado de membrana da técnica da NADPH-d (barra 100 μ m)

Figura 15 - Fotomicrografia da região apical mesentérica (AM) do ceco, apresentando gânglio alongado composto por neurônios alongados (➡) e ovalados (➤) com espaços em seu interior (*). Preparado de membrana da técnica da NADPH-d (barra 100 μ m)

Figura 16 - Fotomicrografia da região basal antimesentérica (BA) do ceco, evidenciado gânglio triangular, com a presença de espaços em seu interior (*), interligado por espesso feixe de fibras nervosas da malha primária (➤). Preparado de membrana da técnica da NADPH-d (barra 50 μ m)

Figura 17 - Fotomicrografia da região apical antimesentérica (AA) do ceco, apresentando um grande neurônio alongado isolado, conectando-se a um feixe de fibras nervosas primário. Preparado de membrana da técnica da NADPH-d (barra 50 μ m)

4.4 Características gerais do plexo mioentérico do ceco

Em todas as técnicas realizadas observou-se haver para a região PA um arranjo hexagonal das malhas do plexo mioentérico. Os gânglios, geralmente, acompanham o sentido das fibras musculares da camada circular, na região próxima à ampola cecal tem a sua distribuição divergente, em direção as regiões apical e basal, tendo a conformação semelhante a um leque. Para as demais regiões (AA, AM e BA), observou-se que as malhas do plexo mioentérico possuem formato alongado, semelhante a um retângulo longitudinal, seguindo o sentido das fibras da camada circular.

O formato dos neurônios marcados com as três técnicas variou de acordo com o tamanho celular. As células de tamanho pequeno, geralmente, possuem formato arredondado, as médias apresentam-se ovaladas ou levemente alongada e as grandes são em sua grande maioria alongadas. O núcleo geralmente é excêntrico para os neurônios médios e grandes (Figuras 6, 18 e 19).

18

Figura 18 - Fotomicrografia da região apical mesentérica (AM) do ceco, apresentando neurônios pequenos (P) arredondados e médios (M) ovalados com núcleo excêntrico.. Preparado de membrana da técnica da NADH-d (barra 50 μ m)

19

Figura 19 - Fotomicrografia da região apical antimesentérica (AA) do ceco, mostrando gânglio alongado composto por neurônios alongados (▲) e ovalados (◆) com espaços em seu interior (★). Preparado de membrana da técnica da NADPH-d (barra 200 μ m)

Nas técnicas da NADH e NADPH-d podem ser observados espaços no interior dos gânglios, mostrando a não marcação de alguns neurônios (Figuras 8, 10, 12, 14, 15, 16 e 19).

4.5 Quantificação dos neurônios

A tabela 1 apresenta as médias $\pm$ DP do número de neurônios mioentéricos reativos a Acetilcolinesterase (AChE), NADH e NADPH-diaforase positivos presentes em $17,92\text{mm}^2$ em cada região estudada do ceco.

A análise quantitativa revelou que os neurônios do plexo mioentérico, distribuem-se na parede do ceco de maneira heterogênea, independente da técnica utilizada na evidenciação neuronal.

Aplicando o teste Qui Quadrado " χ^2 " de homogeneidade, observou-se que a porcentagem dos neurônios mioentéricos **não é a mesma** nas regiões estudadas, e a maior média foi encontrada na região próxima à ampola cecal em todos os grupos. Com 1479 ± 357 neurônios para a técnica da AChE, 717 ± 142 neurônios para a técnica da NADH-d e 240 ± 26 para a técnica da NADPH-d, fazendo com que a mesma apresente diferença estatística significativa comparada com as demais regiões.

Os menores valores foram encontrados nas regiões: apical antimesentérica 589 ± 57 neurônios para a técnica da AChE e basal antimesentérica 381 ± 91 e 173 ± 36 neurônios respectivamente nas técnicas NADH e NADPH-diaforase.

Tabela 1 - Número médio $\pm$ DP dos neurônios mioentéricos reativos a AChE, NADH e NADPH-d positivos em 17,92mm², nas diferentes regiões do ceco rato adulto (n=5)

Técnica/ Regiões	AA	AM	BA	PA
AChE	589 $\pm$ 57	690 $\pm$ 198	598 $\pm$ 173	1479 $\pm$ 357
NADH-d	457 $\pm$ 121	519 $\pm$ 131	381 $\pm$ 91	717 $\pm$ 142
NADPH-d	188 $\pm$ 33	219 $\pm$ 38	173 $\pm$ 36	240 $\pm$ 26

Regiões - apical antimesentérica (AA), apical mesentérica (AM), basal antimesentérica (BA) e próxima à ampola cecal (PA) (P < 0,05).

4.6 Análise morfométrica

A análise morfométrica permitiu agrupar os resultados em 2 subitens: Análise do perfil celular e Classificação quanto ao tamanho perfil celular.

4.6.1 Análise do perfil celular

A tabela 2 mostra o perfil médio do corpo celular dos neurônios nas diferentes regiões e em relação às 3 técnicas estudadas. A análise de Variância mostrou **não haver** diferença significativa quanto ao tamanho do perfil dos neurônios entre as regiões estudadas em relação às técnicas empregadas.

Tabela 2 – Média (μm^2) do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos reativos a AChE, NADH e BADPH-d (n=5)

Técnica/ Regiões	AA	AM	BA	PA
AChE	381,21	376,82	330,95	302,54
NADH-d	569,27	516,83	492,65	450,76
NADPH-d	530,41	485,53	475,28	394,48

Regiões - apical antimesentérica (AA), apical mesentérica (AM), basal antimesentérica (BA) e próxima à ampola cecal (PA) ($P > 0,05$).

4.6.2 Classificação quanto ao tamanho perfil celular

Os dados morfométricos evidenciaram que o plexo apresenta neurônios de diferentes tamanhos permitindo agrupá-los em três classes: pequenos, médios e grandes. Os neurônios inferiores à média subtraída de seu desvio padrão foram considerados pequenos, os superiores à média somada a seu desvio padrão foram considerados grandes, e os intermediários, ou seja, entre a média – desvio padrão e a média + desvio padrão foram considerados médios. Havendo em todas as regiões estudadas para todas as técnicas o predomínio do perfil do corpo celular médio.

O perfil do corpo celular dos neurônios reativos a AChE variaram de $77,94\mu\text{m}^2$ a $1164,15\mu\text{m}^2$. A tabela 3 mostra os perfis dos corpos celulares dos neurônios agrupados nas 3 classes pequeno, médio e grande.

Tabela 3 - Perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios mioentéricos reativos a AChE nas diferentes regiões do ceco de rato adulto (n=5)

Tipos de neurônios/ Regiões	AA	AM	BA	PA
pequeno	94,33 a 217,32	92,19 a 225,46	77,94 a 174,61	86,60 a 187,69
médio	218,33 a 542,16	226,23 a 526,05	174,81 a 486,13	189,06 a 416,26
grande	550,99 a 1164,15	528,15 a 801,66	487,31 a 1068,61	416,78 a 681,39

Regiões - apical antimesentérica (AA), apical mesentérica (AM), basal antimesentérica (BA) e próxima à ampola cecal (PA).

Na técnica da AChE, a região apical mesentérica (AM) apresentou a maior porcentagem de neurônios pequenos e grandes, 17,6% e a menor porcentagem para o grupo das células médias, 64,8%. A região apical antimesentérica (AA) teve a maior frequência na classe dos neurônios médios (72,4%), a menor nos grupos dos neurônios pequenos e grandes, 14,8% e 12,8% respectivamente. A frequência de neurônios pequenos, médios e grandes reativos a AChE está demonstrada na figura 20.

Figura 20 - Porcentagem dos tipos de neurônios mioentéricos AChE positivos quanto à área do perfil celular nas regiões estudadas do ceco. Regiões: apical antimesentérica (AA), apical mesentérica (AM), basal antimesentérica (BA) e próxima à ampola cecal (PA)

Para os neurônios reativos a NADH-d o perfil do corpo celular dos neurônios variou de 90,12 μm^2 a 1427,16 μm^2 . As 3 classes de neurônios NADH-d estão demonstradas na tabela 4.

Tabela 4 - Perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios mioentéricos reativos a NADH-d nas diferentes regiões do ceco de rato adulto (n=5)

Tipo de neurônios/ Região	AA	AM	BA	PA
Pequeno	101,32 a 364,56	90,12 a 327,12	103,04 a 235,04	100,04 a 352
Médio	361,24 a 774,52	317,08 a 738,44	226,12 a 751,24	211,84 a 451,24
Grande	780,56 a 1250,04	697,32 a 1248,96	759,56 a 1427,16	734,12 a 1324,80

Regiões - apical antimesentérica (AA), apical mesentérica (AM), basal antimesentérica (BA) e próxima à ampola cecal (PA).

Para os neurônios mioentéricos NADH-d, na região próxima à ampola cecal (PA) foi observada maior quantidade de neurônios da classe média, 68% e a menor de neurônios pequenos, 14,4%. A região apical mesentérica (AM) apresentou a menor porcentagem de neurônios com tamanhos médios e grandes com 65% e 16,2% respectivamente e, maior quantidade de células pequenas, 18,8%. Junto à área basal antimesentérica (BA) foi encontrada a maior porcentagem de neurônios grandes, 18,4%, como mostra a figura 21.

Figura 21 - Porcentagem dos tipos de neurônios mioentéricos NADH-d positivos quanto ao perfil celular nas regiões estudadas do ceco. Regiões: apical antimesentérica (AA), apical mesentérica (AM), basal antimesentérica (BA) e próxima à ampola cecal (PA)

Quanto ao perfil do corpo celular dos neurônios reativos a NADPH-d, este variou de $96,88 \mu\text{m}^2$ a $1579,64 \mu\text{m}^2$, como demonstra a tabela 5.

Tabela 5 - Perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios mioentéricos reativos a NADPH-d nas diferentes regiões do ceco de rato adulto (n=5)

Tipo de neurônio/ regiões	AA	AM	BA	PA
Pequeno	124,90 a 244,89	108,941 a 246,913	134,20 a 248,02	96,88 a 202,38
Médio	245,53 a 810,89	249,035 a 722,876	250,03 a 700,30	203,80 a 584,91
Grande	817,26 a 1568,50	732,755 a 1513,764	701,40 a 1579,64	587,42 a 1422,51

Regiões - apical antimesentérica (AA), apical mesentérica (AM), basal antimesentérica (BA) e próxima à ampola cecal (PA).

Na técnica da NADPH-d as menores porcentagens de neurônios pequenos e grandes foram verificadas na região próxima à ampola cecal 9% e 13,4%, respectivamente. A maior porcentagem dos neurônios pequenos, 14,6% e grandes, 19,2% foram verificadas na região basal antimesentérica. A porcentagem de neurônios de tamanho médio variou de 66,2% na região basal antimesentérica a 77,6% para região próxima à ampola cecal, como mostra a figura 22.

Figura 22 - Porcentagem dos tipos de neurônios mioentéricos NADPH-d positivos nas regiões estudadas do ceco. Regiões: apical antimesentérica (AA), apical mesentérica (AM), basal antimesentérica (BA) e próxima à ampola cecal (PA)

5 DISCUSSÃO

Estudos quantitativos sobre o plexo mioentérico demonstraram que o número de corpos celulares, gânglios e de fibra nervosas, variam ao longo do tubo digestório, bem como em um mesmo segmento.

Os feixes nervosos identificados através da reatividade à acetilcolinesterase e NADPH-d estão compostos por diferentes quantidades de fibras interligando os gânglios que acompanham as fibras da camada circular da túnica muscular, permitindo a formação de feixes primários, secundários e terciários com malhas de diferentes características em relação à região analisada. Esta malha que compõe o plexo mioentérico se apresenta hexagonal na região próxima à ampola cecal, e conforme se afasta desta em direção às demais áreas, toma uma conformação mais quadrada ou retangular sendo estas bem maiores nas regiões apical e basal antimesentérica. Apenas o arranjo do plexo mioentérico evidenciado através da reatividade a NADPH-d que foi observado na região próxima à ampola cecal é semelhante ao encontrado por Dupont, Jervis e Sprinz (1965) em região análoga para o ceco de ratos da linhagem Fischer. Não se pode comparar, porém, as demais regiões estudadas, no presente trabalhos, pois, os autores dividem o ceco de forma diferente, em região mesentérica e antimesentérica e ainda em 4 segmentos da região basal para apical, e os submete a diferentes técnicas, não permitindo uma visualização do plexo mioentérico reativo a NADPH-d ao longo de toda a parede do órgão, fato este realizado no presente trabalho. As malhas do plexo mioentérico das regiões apical e basal antimesentérica são semelhantes às encontradas por Dupont e colaboradores junto a região antimesentérica marcada pelo azul de metileno.

Os presentes achados para as regiões apical e basal antimesentérica são condizentes aos relatados por Irwin (1931) em estudos realizados com o ceco de cobaia onde, foram verificadas as características do plexo mioentérico disposto abaixo da ténia e entre as

mesmas, assim como com os achados de Maslenikova (1962) junto à região central do ceco de coelhos.

Embora o ceco do rato adulto quando, comparado ao ceco do equino guarda características morfológicas discrepantes entre si, observaram-se semelhanças entre as espécies no tocante ao arranjo dos feixes primários evidenciados pelo azul cuprulínico. Nos equinos, observa-se proximidade dos gânglios apresentando feixes primários curtos (BURNS; CUMMINGS, 1991) semelhantes achados em relação à região próxima à ampola cecal.

Belai et al. (1992) ressaltam apenas, que no rato, os feixes de fibras nervosas do ceco e do colo distal diferem das encontradas no estômago, duodeno e íleo sem pormenorizar a morfologia do plexo.

A morfologia do plexo mioentérico varia de acordo com a região estudada, independente da metodologia empregada. Foi observado maior número de gânglios na região próxima à ampola cecal, sendo estes ainda mais volumosos e apresentando formatos irregulares, triangulares e alongados. Nas demais regiões, estes gânglios aparecem mais esparsos e geralmente alongados, no entanto ocorrem também gânglios triangulares e irregulares. Já, Dupont, Jervis e Sprinz (1965) descrevem em ratos a presença de gânglios triangulares e mais densos destacando um maior número de gânglios junto à junção íleo-cecal (região mesentérica). Morfologias ganglionares semelhantes aos achados deste trabalho foram registrados por Zanoni et al. (1997) no ceco de ratos com 2 e 8 meses de idade. Gânglios de formato triangular, foram observados por Burns e Commings (1991) no ceco de equinos.

As observações de Irwin (1931) não se assemelham às deste trabalho, visto que, o autor relata gânglios esféricos e compactos para o ceco de ratos. Acredita-se que tais fatos se devam à nomenclatura adotada pelo referido autor.

A presença de gânglios com diferentes formatos (alongado, triangular e irregular) foram também constatados em outros segmentos do trato gastrointestinal de ratos, Fregonesi, Miranda-Neto e Molinari, (1998), Gabella (1971), Marega (2002) e Natali e Miranda-Neto (1996).

O perfil do corpo celular dos neurônios do ceco de rato adulto variou de $77,94\mu\text{m}^2$ (AChE) à $1579,64\mu\text{m}^2$ (NADPH-d), mostrando uma grande amplitude de tamanho.

Isto também é evidenciado quando se analisam os dados obtidos por Dupont, Jervis e Sprinz (1965) que descreveram o tamanho médio das células do plexo mioentérico do ceco de rato que variou de $8,67\mu$ a 45μ , empregando outras técnicas de evidenciação neuronal e outra forma de mensuração.

Dados semelhantes aos nossos foram evidenciados por Gabella (1971) com populações de neurônios nitrérgicos, variando de 75 a 975μ , em ratos da espécie *Epimys norvergicus*.

Barbosa (1973) encontrou para o perfil celular neuronal valores semelhantes aos aqui relatados, onde o menor perfil celular foi de $80\mu^2$ e o maior era de $1040\mu^2$. Os valores apresentados, porém, referem-se à população total de neurônios ao passo que nossos achados são pertinentes às subpopulações colinérgicas e nitrérgicas.

De acordo com a média obtida para a área do perfil do corpo celular, foi possível classificar os neurônios em: pequeno, médio e grande. Para todas as regiões estudadas os

neurônios de tamanho médio foram os mais freqüentes, variando de 64,8% (AChE) a 77,6% (NADPH-d). Maior quantidade de neurônios médios foram também evidenciados no ceco de ratos Wistar por Barbosa (1973) e Zaroni et al. (1997). Este dado foi observado por Dupont, Jervis e Sprinz (1965) onde o perfil celular médio também foi evidenciado para o ceco de ratos da linhagem Fischer.

Constatou-se maior número de neurônios AChE (1479 ± 357), NADH-d (717 ± 142) e NADPH-d (240 ± 26) na região próxima à ampola cecal. É provável que, por ser uma região de transição, a motilidade das fibras musculares da parede do segmento neste local seja maior, necessitando portanto de uma inervação mais expressiva. Verificou-se um maior predomínio de neurônios AChE positivos em relação aos nitrérgicos, indicando que nesta região, provavelmente, haja maior atividade peristáltica. Controlando a entrada do conteúdo do intestino delgado para o ceco e deste para o colo proximal.

De acordo com a estudos prévios, a diferença na densidade neuronal pode estar relacionada à espessura da túnica muscular. Saffrey e Burnstock (1994) citam que o número de neurônios do plexo mioentérico é maior em áreas onde as camadas de musculatura lisa são mais espessas. Isto é reforçado pelos estudos realizados em ceco de rato que verifica que a musculatura da região da ampola cecal é mais espessa (SNIPS, 1981) e rica em feixes de fibras nervosas mioentéricas e vasos sanguíneos (ROGER; CABANIE; FERRE, 1991). No rato, verificou-se predomínio de maior número de neurônios em locais onde a camada muscular é mais espessa, como foi mencionado para o estômago por Fregonesi, Miranda-Neto e Molinari, (1998) e Oliveira et al. (2000).

Irwin (1931) encontrou diferentes quantidades de neurônios para o ceco de diferentes animais, inclusive para o do rato, utilizando o azul de metileno como marcador. Relata que na região da tênia a quantidade de células nervosas é menor ($4.500/\text{cm}^2$), e na região desprovida

de tal estrutura a densidade é maior ($12.000/\text{cm}^2$). No entanto, o valor médio dos neurônios encontrados foi $8.250/\text{cm}^2$ são semelhantes aos observados neste estudo junto à região próxima à ampola marcada com a técnica da AChE com $8.218,75$ neurônios/ cm^2 .

Diferença na densidade dos neurônios do plexo mioentérico do ceco de rato, de acordo com a região estudada foi verificado também por Dupont, Jervis e Sprinz (1965). Através da técnica da NADPH-d evidenciou maior quantidade de neurônios na região mesentérica em relação a antimesentérica, como o que foi observado no presente estudo onde as regiões apical e basal antimesentérica apresentaram menor densidade neuronal em relação às regiões apical mesentérica e próximo à ampola cecal.

Utilizando o método de Giemsa, Barbosa (1973) verificou a presença de 3656 neurônios/ cm^2 , na região intermediária entre as margens mesentérica e antimesentérica e Ohkubo (1937a, b) encontrou 3.000 neuronios/ cm^2 e 1.300 neurônios/ cm^2 com o mesmo método de marcação junto ao ceco de cobaia e macaco, respectivamente. Este valor é muito parecido ao observado junto à região próxima à ampola para os neurônios NADH-d.

Zanoni et al. (1997) estudando os neurônios mioentéricos reativos ao método de Giemsa no ceco de ratos Wistar com 2 e 8 meses de idade, observou em $6,92\text{mm}^2$ que, os animais com 2 meses possuíam mais neurônios ($331,80 \pm 100,50$) que os animais com 8 meses de idade ($237,40 \pm 75,62$). Embora neste trabalho não se empregue o método de Giemsa, os valores obtidos por Barbosa se assemelham aos observados na área antimesentérica para a técnica da AChE.

Conforme a literatura compulsada há uma variedade na diversidade do número de neurônios conforme a metodologia e a espécie analisada, como demonstrado na tabela 6.

Tabela 6 – Número de neurônios/ cm^2 observado no ceco de diferentes animais marcados com técnicas distintas

Referência	Espécie	Método/ Técnica	nº de células/ cm^2
Irwin (1931)	Cobaia	Azul de Metileno	12000 entre a tência 4500 fora da tência
Matsuo (1934)	Cobaia	Azul de Metileno	4100
Ohkubo (1936a)	Macaco	Azul de Metileno	1300
Ohkubo (1936b)	Cobaia	Azul de Metileno	12500
Tafari (1957)	Cobaia	Azul de Toluidina	92920
Maslennikova (1962)	Coelho	Azul de Metileno	1760
Barbosa (1973)	Rato	Giemsa	3656
Zanoni et al.,(1997)	Rato	Giemsa/ NADH	4784 (2meses) 3430 (8meses)
Seyfert (presente Estudo)	Rato	AChE	4673
		NADH	3141
		NADPH	1141

Diferenças regionais quanto ao número de neurônios são descritos em outros trabalhos. Molinari et al. (2002) descrevem que no estômago aglandular de rato, existe diferença regional na densidade de neurônios NADH-d. quando comparando a região central próxima à prega limitante com a região próxima à curvatura gástrica maior. Comparando a densidade neuronal ao redor da circunferência intestinal do íleo de ratos, Miranda-Neto et al. (2001) observaram que próxima à raiz do mesentério a densidade neuronal é maior, enquanto na região diametralmente oposta, a antimesentérica, verificou a menor densidade. Diferenças na densidade neuronal do plexo mioentérico em regiões distintas da circunferência de um mesmo segmento intestinal foram também encontradas no intestino grosso de cobaias

(IRWIN, 1931), no íleo de galinha (ALI; MCLELLAND, 1979) e na região média do intestino de ratos (SANTER, 1994). Souza, Carvalho e Fujimura (1988) observaram, em humanos, menor número de neurônios nos níveis mais altos do esôfago, se comparados com os níveis mais baixos.

O fato de se analisar a densidade dos neurônios ao longo da parede do segmento é muito importante, pois, de acordo com os argumentos de Miranda-Neto et al. (2001), quando se utilizam grupos controle e experimental, a inobservância desse aspecto, quanto à distribuição dos neurônios pode comprometer os resultados da pesquisa. Os autores propõem uma situação hipotética em que um grupo de animais recebeu um tratamento que poderia alterar o número de neurônios mas não o fez, se o pesquisador durante a obtenção das amostras ou contagens privilegiasse, no grupo controle, quantificações na região mesentérica, e no grupo experimental, na região antimesentérica, possivelmente, concluiria erroneamente que a condição imposta levou a uma redução significativa no número de neurônios.

A fim de se obter dados mais precisos, faz-se necessário delimitar a área do órgão a ser estudada, uma vez que a distribuição dos neurônios mioentéricos não é homogênea ao redor da parede do órgão.

Se se levar em consideração no ceco do rato as regiões apical e basal, o número médio de neurônios fez-se mais presente na região basal. E se se compararem as regiões mesentérica e antimesentérica da região, a inervação mioentérica é mais expressiva na região mesentérica. Se se compararem, porém, as médias obtidas quanto ao número de neurônios em $17,92\text{mm}^2$ entre as regiões estudadas, a região próxima à ampola cecal difere estatisticamente ($P > 0,05$) das demais regiões.

Conclusão

6 CONCLUSÕES

Analisando o plexo mioentérico do ceco do rato, utilizando diferentes técnicas, podemos concluir que:

- Existe diferença regional na distribuição dos neurônios mioentérico reativos a Acetilcolinesterase, NADH e NADPH-diaforase no ceco do rato.
- A região próxima à ampola do ceco possui maior quantidade de neurônios nas 3 técnicas empregadas.
- Não há diferença estatística quanto ao tamanho do perfil celular dos neurônios entre as regiões estudadas.
- Os neurônios de tamanho médio predominaram em todas as regiões estudadas.
- Estudos como este, evidenciam que quando na realização de estudos morfoquantitativos dos neurônios entéricos é necessário ater-se a região a ser coletada pois existe diferença na distribuição dos mesmos ao longo do segmento em estudo.

Referências

REFERÊNCIAS

- AIMI, Y.; KIMIRA, H.; KINOSHITA, T.; MINAMI, Y.; FUJIMURA, M.; VINCENT, S. R. Histochemical localization of nitric oxide synthase in rat enteric nervous system. *Neuroscience*, v. 53, p. 553-560, 1993.
- ALI H. A.; MCLELLAND, J. Neuron number in the intestinal myenteric plexus of the domestic fowl (*Gallus gallus*). *Zbl. Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryol.*, v. 8, p. 277-283, 1979.
- AMBUHL, S.; WILLIAMS, V. J.; SENIOR, W. Effects of caecectomy in the young adult female rat on digestibility of food offered *ad libitum* and in restricted amounts. *Aust. J. Biol. Sci.*, v. 32, p. 205-213, 1979.
- ANARUMA, C. A. **Estudos morfoquantitativos do plexo mientérico do estômago humano em indivíduos jovens e idosos**. 1994. - f. 124 Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- BAKER, H. J.; LINDSEY, J. R.; WEISBROTH, S. H. **The laboratory rat**. London: Academic Press, 1979, 435 p.
- BALUK, P.; GABELLA, G. Innervation of guinea-pig trachea: A quantitative morphological study intrinsic neurons and extrinsic nerves. *J. Comp. Neurol.*, v. 285, p.117-132, 1989.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1991.
- BARBOSA, A. J. A. Auerbach's plexus of the albino rat. I quantitative study of the ganglia and nerve cells in the caecum and colon. *Rer. Bras. Pesq. Méd. e Biol.*, v. 6, n. 5, p. 253-262, 1973.
- _____. Técnica Histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. *Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol.*, v. 11, p. 95-97, 1978.
- BELAI, A.; SCHMIDT, H. H. H. W.; HOYLE, C. H. V.; HASSALL, C. J. S.; SAFFREY, M. J.; MOSS, J.; FORSTERMANN, U.; MURAD, F.; BURNSTOK, G. Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in the myenteric plexus of the rat gut. *Neuroscience Letters*, v. 143, p. 60-64, 1992.
- BENNET, T. Fluorescence histochemical observations on catecholamine-containing cell bodies in Auerbach's Plexus. *Z. Zellforsch.*, Springer – Verlag, v. 139, p. 69-81, 1973.
- BÉNARD, H.; BUSNEL, R. G.; CHAUCHARD, P.; MAZOUÉ, H.; POLONOVSKI, M. Actions vitaminiques B1 et B2 des pternes et de l'acide folique sur les rats ceocumectomisés. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, p. 223-226, 1946.
- BERRY, R. J. A. The thue caecal apex, or the vemiform appendix: it's minute and comparative anatomy. *J. Anat. Phys.*, v. 35, p. 92, 1901.

BOR-SENG-SHU, E.; CHADI, G.; BOR-JIUN-SHU, F.; FERRAZ-DE-CARVALHO, C. A.; DE SOUZA, R. R. Myenteric neurons of the mouse small intestine. Morphometry and acetylcholinesterase activity. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 101-108, 1994.

BULT, H.; BOECKXSTAENS, G. E.; PELCKMANS, P. A.; JORDANS, F. H.; VAN MAERCKE, Y. M.; HERMAN, A. G. Nitric oxide as an inhibitor of non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. **Nature**, v. 345, p. 345-347, 1990.

BURKS, T. F. Neurotransmitters. In: **Physiology of the gastrointestinal tract**. Raven Press, 1994, p. 2211-2242.

BURNS, G. A.; CUMMINGS, J. F. Equine myenteric plexus with reference to the flexure pacemaker. **The Anat. Rec.**, v. 230, p. 417-424, 1991.

CHAKDER, S.; BANDYOPADHYAY, A.; RATTAN, S. Neuronal NOS gene expression in gastrointestinal myenteric neurons and smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. 1868-1875, 1997.

COSTA, M.; FURNESS, J. B.; PULLIN, C. O.; BORNSTEIN, J. Substance P enteric neurons mediate non-cholinergic transmission to the circular muscle of the guinea-pig intestine. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 328, p. 446-453, 1985.

CORMACK, D. H. **Ham histologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

COUCH, J. R.; KNIGHT, D. R.; GERMAN, H.; PEARSON, P. B. Function of the ceca in the domestic fowl. **Fed. Proc.**, p. 8-380, 1949.

DAVIS, K. A.; MASELLA, J.; BLENNERHASSETT, M. G. Acetylcholine metabolism in the inflamed rat intestine. **Exp. Neurol.** v. 152, p. 251-258, 1998.

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

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

DOOD, J.; ROLE, L. W. The autonomic nervous system. In: KANDEL, E. R. **Principles of neural science**. 3 ed., Edito Appleton Chenge, 1991.

DUPONT, J. R.; JERVIS, H. R.; SPRINZ, H. Auerbach's plexus of the rat cecum in relation to the germfree state. **J. Comp. Neur.**, v. 125, p. 11-18, 1965.

ERHART, E. **A neuroanatomia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1974.

- FABRICIUS, M.; RUBIN, I.; BUNDGAARD, M.; LAURITZEN, M. NOS activity in brain and endothelium: relation to hypercapnic rise of cerebral blood flow in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. H2035-2044, 1996.
- FELDBERG, W.; LIN, R. Acetylcholine release and synthesis the wall of the small intestine. **J. Physiol. London**, v. 109, p. 3-4, 1949.
- FREGONESI, C. E. P. T.; MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L. Estudo morfológico e quantitativo dos neurônios do plexo mientérico do corpo do estômago de *Rattus norvegicus*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 20, n. 2, p. 221-224, 1998.
- FURLAN, M. M. D. P.; MIRANDA-NETO, M. H.; SANT'ANA, D. M. G.; MOLINARI, S. L. Number and size of myenteric neurons of the duodenum of adult rats with acute diabetes. **Arq Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 5, p. 740-745, 1999.
- FURLAN, M. M. P. Ontogenia e filogenia do sistema nervoso entérico. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v. 4, n. 2, p. 149-157, 2000.
- FURLAN, M. M. D. P.; MOLINARI, S. L.; MIRANDA-NETO, M. H. Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 60, n. 3A, p. 576-581, 2002.
- FURNESS, J. B.; COSTA, M. Types of nerves in the enteric nervous system. **Neuroscience**, v. 5, p. 1-20, 1980.
- FURNESS, J. B.; BORNSTEIN, J. C.; MURPHY, R.; POMPOLO, S. Roles of peptides in transmission in the enteric nervous system. **Trends Pharmac. Sci.**, v. 15, p. 66-71, 1992.
- FURNESS, J. B.; LI, Z. S.; YOUNG, H. M.; FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of guinea-pig: a quantitative description. **Cell Tissue Res.**, v. 277, p. 139-149, 1994.
- GABELLA, G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. **Experientia**, v. 25, p. 218-219, 1969.
- _____. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. **J. Anat.**, London, v. 109, p. 81-94, 1971.
- _____. Innervation of the gastrointestinal tract. **Intern. Ver. Cytol.**, New York, v. 59, p. 129-193, 1979.
- _____. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. **Neuroscience**, Washington, v. 22, n. 2, p. 737-752, 1987.
- _____. Structure of mesocles and nerves in the gastrointetinal tract. In: JOHNSON, L. R. **Physiology of the gastrointestinal tract**, v. 1, p. 751-793, 1994.
- GETTY, R. D. V. M. **Sisson e Grossman anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986.

- GROZDANOVIC, Z.; BAUMGARTEN, H. G.; BRUNING, G. Histochemistry of NADPH-diaphorase, a marker for neuronal nitric oxide synthase, in the peripheral autonomic nervous system of the mouse. **Neuroscience**, v. 48, p. 225-235, 1994.
- GREENE, E. D. **Anatomy of the rat**. London: Hafner Publishing Company, 1963, 370 p.
- GUNN, M. Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. **J. Anat.**, London, v. 102, p. 223-239, 1968.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- HEINICKE, E. A.; KIERNAN, J. A.; WISJSMAN, J. Specific, selective, and complete staining of neurons of the myenteric plexus, using Cuprolinic blue. **J. Neurosci. Methods.**, v. 21, p. 45-54, 1987.
- HERNANDES, L. **Estudo morfológico da mucosa e do corpo celular dos neurônios do plexo mientérico do íleo de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina**. 1994. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1994.
- HOPE, B. T.; MICHAEL, G. J.; KNIGGE, K. M.; VINCENT, S. R. Neural NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 88, p. 2811-2814, 1991.
- IRWIN, D. A. The anatomy of Auerbach's plexus. **J. Am. Anat.**, Baltimore, v. 49, p. 141-166, 1931.
- IWANOW, I. F. Die sympatitischs innervation des verdaungstraktes einiger vogelarten. **Z. Mikrosk. Anat. Forsch.**, v. 22, p. 469-492, 1930.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.
- KARAOSMANOGLU, T.; AYGUN, B.; WADE, P. R.; GERSHON, M. D. Regional differences in the number of neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine and colon; an evaluation of markers used to count neurons. **Anat. Rec.**, v. 244, p. 470-480, 1996.
- KARNOVSKI, M. J.; ROOTS, L. A. "Direct-coloring" Thiocholine method for cholinesterases. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 12, p. 219-221, 1964.
- KENAREN, V.; VANHATALOS, S.; KILUOTO, T.; KIVILAAKSO, E.; SOINILA, S. Co-localization of NADPH-diaphorase reactivity and vasoactive intestinal polypeptide in human colon. **J. Auton. Nerv. Syst.**, London, v. 54, p. 177-183, 1995.
- LEAMING, D. B.; CAUNA, N. A qualitative and quantitative study of the myenteric plexus of the small intestine of the cat. **J. Anat.**, London, v. 95, p. 160-169, 1961.
- LIJIMA, T.; HASEGAWA, K. Quinacrine-induced dilatation of the rat cecum and degeneration of large granular vesicle-containing neurons in the myenteric plexus. **Cell Tissue Res.**, v. 241, p. 383-389, 1985.

- LINDSTRÖM, C. G.; ROSENGREN, J. E.; FORK, F. T. Colon of the rat an anatomic, histologic and radiographic investigation. **Acta Radiol. Diagnos.**, v. 20, n. 3, p. 523-536, 1979.
- LLOYD, L. E.; DALE, D. G.; CRAMPTON, E. W. The role of the caecum in nutrient utilization by the pig. **J. Anim. Sci.**, v. 17, p. 684-692, 1958.
- LOESCHE, W. J. Accumulation of endogenous protein in the caecum of the germfree rat. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 129, p. 380-384, 1968.
- MACKLOUF, G.; GRIDER, J. R. Non-adrenergic non-colinergic inhibitory neurotransmitters of the gut. **News Physiol. Sci.**, v. 8, p. 195-199, 1993.
- MAREGA, P. **Características estruturais do plexo mioentérico do intestino delgado de ratos portadores do tumor de Walker-256: uma análise morfoquantitativa**. 2002. – f. 60 Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- MASLENNIKOVA, L. D. On the relation between the motor function of the intestine and the gradient of it's nervous elements. **Bull. Exp. Biol. Med.** v. 82, p. 972-976, 1962.
- MATSUO, H. A contribution on the anatomy of Auerbach's plexus. **Jap. T. Med. Sci. Anat.**, Tokyo, v. 4, p. 417-428, 1934.
- MELLO, E. V. S.; MIRANDA NETO, M. H.; NATALI, M. R. M. Estudo da parede do colo proximal de ratos. **Unimar**, Maringá, v. 18, n. 2, p. 369-386, 1996.
- MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L.; STABILLE, S. R.; SANT'ANA, D. M. G.; NATALI, M. R. M. Morphologic and quantitative study of the myenteric neurons of the jejunum of malnourished rats (*Rattus norvegicus*). **Arq Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 57, n. 2B, p. 387-391, 1999.
- MIRANDA NETO, M. H.; FURLAN, M. M. D. P.; SANT'ANA, D. M. G.; MOLINARI, S. L. Evaluation of the areas of neuronal cell bodies and nuclei in the myenteric plexus of the duodenum of adult rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 58, n. 2A, 2000.
- MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L.; NATALI, M. R. M.; SANT'ANA, D. M. G. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 59, n. 1, p. 54-59, 2001.
- MOLINARI, S. L.; PEREIRA, M. S.; DE SOUZA, R. R.; MIRANDA NETO, M. H. Estudos morfológicos do plexo mientérico do estômago glandular do pato (*Anas sp.*). **Unimar**, Maringá, v. 16, n. 2, p. 419-426, 1994.
- MOLINARI, S. L.; FERNANDES, C. A.; OLIVEIRA, L. R.; SANT'ANA, D. M. G.; MIRANDA-NETO, M. H. NADH-diaphorase positive myenteric neurons of the aglandular region of stomach of rats (*Rattus norvegicus*) subjected to desnutrition. **Rev. Chil. Anat.**, v. 20, n. 1, p. 19-23, 2002.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MURRAY, J. M.; PARKER, G. A.; WHITE, N. A. Magacolon with myenteric hipoganglionosis in a foal. **Clin. Rep.**, v. 192, n. 7, p. 917-919, 1988.

NAKAJIMA, K.; TOOYAMA, I.; YASUHARA, O.; AIMI, Y.; KIMURA, H. Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase of a peripheral type (pChAT) in the enteric nervous system of rats. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 18, p. 31-40, 2000.

NASR, H. The nutritional significance of microbial dogestion of starch in the pig caecum. **Brit. J. Nutr.**, v. 4, 1950.

NATALI, M. R. M.; MIRANDA-NETO, M. H.; BALHS, A. S.; WATANABE, L. S. Effacts of material protein malnutrition on the duodenal mucus layer of rats. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 12, n. 1, p. 71-76, jan./jul. 1995.

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

NORRIS, P. J.; CHARLES, I. G.; SCORER, C. A.; EMSON, P. C. Studies on the localization and expression of nitric oxide synthase using histochemical techniques. **Histochem J.**, v. 27, p. 745-756, 1995.

OHKOBO, K. Studie das intramurale nervensystem des verdauungskanals. III – Affe um mensch. **Jap. J. Méd. Sci. Nant.**, v. 6, p. 219-247, 1936a.

_____. Studie über das intramurale nervensystem des verdauungskanals. II – Die plexus myentericus und plexus subserosus des meerschweinchens. **Jap. J. Méd. Sci. Nant.**, v. 6, p. 21-37, 1937b.

OLDS, R.; OLDS, J. R. **A color atlas of the rat**. London: Wolfe Medical Publications, 1991, p. 46-51.

OLIVEIRA, L. R.; MOLINATI, S. L.; PEREIRA, M. A. S.; MIRANDA-NETO, M. H.; SANT'ANA, D. M. G. Localização dos neurônios mietéricos no estômago agladular e gladular de ratos (*Rattus norvergicus*). **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR.**, v. 4, n. 3, p. 215-220, 2002.

OSINSKI, M. A.; BASS, P. Chronic denervation of rat jejunum results in cholinergic supersensitivity due to reduction of cholinesterase activity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 266, p. 287-297, 1995.

PALMER, J. M.; KOCH, T. R. Altered neuropeptide content and cholinergic enzymatic activity in inflamed guinea pig jejunum during parasitism. **Neuropeptides**, v. 28, p. 287-297, 1995.

ROGER, T.; CABANIE, P.; FERRE, J. P. Microscopic and functional anatomy of the ileal papilla and caecocolonic valve in the rat. **Acta Anat.**, v. 142, p. 299-305, 1991.

ROGER, T.; MALBERT, C. H. Caractéristiques anatomo-fonctionnelles de la jonction iléocaecale du poney. **Revue Méd. Vét.**, v. 140, p. 851-855, 1991.

ROMANO, E. B.; MIRANDA-NETO, M. H.; CARDOSO, R. C. S. Preliminary investigation about the effects of streptozotocin-induced chronic diabetes on the nerve cell number and size of myenteric ganglia in rat colon. **Rev. Chil. Anat.**, Temuco, v. 14, p. 139-145, 1996.

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

SANT'ANA, D. M. G.; MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L.; SANT'ANA, M. A. Neuron number in the myenteric plexus of the ascending colon of rats; a comparative study using two staining techniques. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v.55, p.460-466, 1997a.

SANT'ANA, D. M. G.; MIRANDA-NETO, M. H.; SOUZA, R. R.; MOLINARI, S. L. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon of rats subjected to proteic desnutrition. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v.55, p.687-695, 1997b.

SANT'ANA, D. M. G.; MOLINARI, S. L.; MIRANDA-NETO, M. H. Effects of protein and vitamin B deficiency on blood parameters and myenteric neurons of the colon of rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 59, n. 3A, p. 493-498, 2001.

SANTER, R. M.; BAKER, D. M. Enteric neuron number and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, London, v. 25, p. 59-67, 1988.

SANTER, R. M. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 49, p. 115-121, 1994.

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

SHIMAMURA, K.; FUJISAWA, A.; TODA, N.; SUNANO, S. Effects of N^G -nitro-L-arginine on electrical and mechanical responses to stimulation of non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory nerves in circular muscle of the gastric fundus. **Eup. J. Pharmacol.**, v. 231, p. 103-202, 1993.

SNIPES, R. L. Anatomy of the cecum of the laboratory mouse and rat. **Anat. Embriol.**, v. 162, p. 455-474, 1981.

SOUZA, R. R.; CARVALHO, C. A. F.; FUJIMURA, I. Plexo mientérico do esôfago humano em preparados de membrana. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 81-83, 1988.

STARK, M. E.; SZURZEWSKI, J. H. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. **Gastroenterol.**, v. 103, p. 1928-1949, 1992.

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

TAFURI, W. L. II plesso di Auerbach (minteric) nella cavia. II - Studio morfologico e istochimico. **Riv. Istoch. norm. pat.**, v. 4, n. 1, p. 1-18, 1958.

TAYLOR, A.; PENNINGTON, D.; THACKER, J. The vitamin requirements of caecectomized rats. **Univ. Texas Pub.**, n. 4237, 1942.

WILHELM, M.; BÁTORI, Z.; PÁSZTOR, I.; GÁBRIEL, R. NADPH-Diaphorase positive myenteric neurons in the ileum of guinea-pig, rat, rabbit and cat: a comparative study. **Eur. J. of Morphol.**, v. 36, n. 3, p. 143-152, 1998.

WILLIAMS, V. J.; SENIOR, W. Effects of caecectomy on the digestibility of food and rate of passage of digesta in the rat. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 35, p. 373-379, 1982.

WOOD, J. D. Physiology of the enteric nervous system. **See Ref.**, v. 42, p. 67-109, 1987.

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

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

ZANONI, J. N.; MIRANDA-NETO, M. H., **Estudo morfológico e dos neurônios do plexo mientérico do ceco de ratos**. 1997. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1997.

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