RENATA DE BRITTO MARI

**Efeitos da alimentação com diferentes níveis calóricos nos
neurônios mioentéricos do cólon de ratos wistar durante
o processo de envelhecimento**

São Paulo
2009

RENATA DE BRITTO MARI

**Efeitos da alimentação com diferentes níveis calóricos nos
neurônios mioentéricos do cólon de ratos Wistar durante o
processo de envelhecimento**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza

SÃO PAULO
2009

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2208
FMVZ

Mari, Renata de Britto

Efeitos da alimentação com diferentes níveis calóricos nos neurônios mioentéricos do cólon de ratos Wistar durante o processo de envelhecimento / Renata de Britto Mari. – 2009.
83 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2009.

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. Intestino grosso. 3. Envelhecimento.
4. Restrição calórica. 5. Plasticidade neuronal. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Efeito da alimentação com diferentes níveis calóricos nos neurônios mioentéricos do colo de ratos Wistar durante o processo de envelhecimento”, protocolado sob o nº1132/2007, utilizando 60 (sessenta) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza (ICB), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/07.

We certify that the Research “effect of the feeding with different caloric levels in the myenteric neurons of the colon of Wistar rats during the aging process”, protocol number 1132/2007, utilizing 60 (sixty) rats, under the responsibility Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza (ICB), agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/07.

São Paulo, 19 de outubro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARI, Renata de Britto

Título: Efeitos da alimentação com diferentes níveis calóricos nos neurônios mioentéricos do cólon de ratos Wistar durante o processo de envelhecimento

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais Hêlio e Fátima e o meu irmão Fernando...

*À concluir este trabalho me passa um filme à mente...
É avaliando minha trajetória vejo o quanto foram imprescindíveis,
pois se hoje estou comemorando mais esta conquista, devo isto a vocês. que
estiveram ao meu lado em todos os momentos enfrentando quaisquer dificuldades
e que sempre fizeram dos meus sonhos seus próprios objetivos...
Palavras não são suficientes para traduzir o quanto são importantes para mim,
mais não poderia deixar de agradecer e registrar o amor que sinto por vocês...*

A Vocês, Dedico Este Trabalho!

Aos Mestres...

Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza, que depositou em mim confiança, desde o mestrado, agradeço pela ajuda prestada em todos estes anos em que trabalhamos juntos.

Muito Obrigada!

Prof. Dr. Haroldo Garcia de Faria inicialmente agradeço pela proposta e tempo dedicado a esta pesquisa. Gostaria também de lhe agradecer pela "paciência", pela disponibilidade em me ajudar, por compreender minhas limitações e em especial pelos ensinamentos que foram indispensáveis para execução deste trabalho.

A Profa. Dra. Sandra Regina Stabille pela atenção prestada durante todos estes anos. É um privilégio muito grande poder trabalhar com você e ter a oportunidade de compartilhar dos seus conhecimentos. Obrigada por tudo que tenho conquistado desde que te conheci, você é responsável por grande parte de todas as minhas conquistas! Pela sua paciência, confiança, dedicação e principalmente por sua amizade serei eternamente grata.

À final deste trabalho não poderia deixar de agradecer a pessoas tão especiais, que não pouparam esforços para que a concretização desta etapa fosse possível...

*A minha Amiga e irmã de coração **Juliana Plácido Guimarães**, que nesta caminhada se fez presente em todos os momentos...*

Agradeço por me oferecer sempre o melhor que podia me dar, através de seu olhar de apoio, de suas palavras de incentivo, de seu gesto de compreensão, de sua atitude de segurança, mesmo quando me veio o desânimo.

Mesmo que o tempo passe e que a distância aumente saibas que terás sempre uma amiga que te admira e te adora!

Muito Obrigada por tudo!

*Não podia deixar de agradecer ao "meu" grupo de pesquisa: **Joice Naiara Bertaglia Pereira, Evana Lemes de Toledo, Gisele Porto, Vanessa Tibúrcio, Juliana Scoz, Ricardo de Melo Germano, e Sandra Regina Stabille.***

É muito bom conviver com pessoas como vocês... que buscam na humildade e no trabalho em equipe o crescimento e fortalecimento do grupo.

Desta forma, nada mais justo que compartilhar com vocês os méritos deste trabalho, pois a ajuda de vocês foi muito importante para que eu pudesse executar e concluir este trabalho.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela contribuição na minha formação acadêmica.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo apoio financeiro.

A todos os professores e funcionários do Programa de pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela atenção e ajuda prestada.

As funcionárias da Biblioteca da Faculdade de medicina veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial a Helena e Elza, pela atenção prestada nestes anos de pós-graduação.

À Departamento de Ciências Morfofisiológicas e ao Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá pelo espaço disponibilizado para realização de parte desta pesquisa.

Aos meus familiares agradeço pelo apoio e carinho.

Aos Amigos Fernanda de Araújo Quevedo, Thaís Thucrí, Jean Hernsdorff Fancelli, Janaina Munuera Monteiro, , Ana Paula Vidotti, Karina Martinez Gagliardo, Naianne Kelly Clebis e Rosemary Viola Bosch, agradeço pela torcida e amizade.

À minha família "santista" Claudemiro e Sueli Guimarães pelo carinho que sempre me dedicaram durante este período que estive longe de casa.

Aos colegas Jaqueline Dias, Geraldo Emílio Vicentini, Fátima Machado pela compreensão durante o período de realização deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação do curso de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pelos conhecimentos compartilhados.

*A todos que de alguma forma contribuíram para conclusão deste trabalho.
Muito Obrigada!*

“A verdadeira vida não é constituída apenas de currículos, homenagens ou mesmo de conquistas que aumentam nosso intelecto, mas sim de essência humana. A maior mensagem que se pode deixar gravada em nossas vidas é a maneira pela qual vamos vivê-la.”

(Autor desconhecido)

RESUMO

MARI, R. B. **Efeitos da alimentação com diferentes níveis calóricos nos neurônios mioentéricos do cólon de ratos Wistar durante o processo de envelhecimento.** [Effects of food with different caloric levels in myenteric neurons of the colon of rats during the aging process]. 2009. 83f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os últimos anos se caracterizaram pelo aumento significativo da população idosa mundial. Por esta razão, a preocupação com o idoso está se tornando uma constante em nossa sociedade, uma vez que o envelhecimento resulta em comprometimento das funções fisiológicas, acompanhado ou não de alterações estruturais. No trato gastrointestinal (TGI), o processo de envelhecimento pode provocar alterações morfofuncionais significativas. A regulação da motilidade do TGI é controlada principalmente pelos neurônios mioentéricos do sistema nervoso entérico. A diminuição na densidade destes neurônios no cólon pode levar à redução na frequência e na amplitude da contração colônica manifestada como constipação. As ações que visam diminuir os efeitos do envelhecimento no TGI incluem aquelas relacionadas à dieta alimentar, entre as quais se destaca a restrição calórica. A restrição calórica, além de apresentar efeito protetor nos neurônios mioentéricos durante o envelhecimento, também é responsável pela diminuição da morte neuronal por apoptose, processo este acentuado com o envelhecimento. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de diferentes níveis de restrição calórica sobre a plasticidade dos neurônios mioentéricos NADPH e acetilcolinesterase positivos do cólon de ratos Wistar durante o processo de envelhecimento por meio das análises ultraestrutural (microscopia eletrônica de transmissão) e morfoquantitativa. Para tanto foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, distribuídos em quatro grupos (n= 10/grupo): CI- animais de seis meses; SR- animais de 18 meses alimentados com dieta normal; RCI- animais de 18 meses alimentados com dieta com 12% de restrição calórica; RCII- animais de 18 meses submetidos à restrição calórica de 30%. Aos seis meses de idade, os animais foram transferidos para o biotério setorial, onde permaneceram até aos 18 meses sob condições ambientais controladas de temperatura e de iluminação e água *ad libitum*. Foi possível observar que a RC em

nível de 30% minimizou de forma eficaz os efeitos deletérios do envelhecimento nos neurônios mioentéricos, podendo ser adotada como alternativa contra os distúrbios gastrointestinais comuns em indivíduos idosos.

Palavras-chave: Plexo mioentérico. Intestino grosso. Envelhecimento. Restrição calórica. Plasticidade neuronal.

ABSTRACT

MARI, R. B. **Effects of food with different caloric levels in myenteric neurons of the colon of rats during the aging process.** [Efeitos da alimentação com diferentes níveis calóricos nos neurônios mioentéricos do cólon de ratos Wistar durante o processo de envelhecimento]. 2009. 83f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The last years were characterized by a significant increase in the elderly population. For this reason, concern for the elderly is becoming a constant in our society, since the aging results in impairment of bodily function, or not accompanied by structural changes. In the gastrointestinal tract (GI), the aging process can cause significant morphological changes. The regulation of motility of the gut is controlled mainly by myenteric neurons of the enteric nervous system. The decrease in the density of neurons in the colon can lead to a reduction in the frequency and amplitude of contraction expressed as colonic constipation. The actions aimed at reducing the effects of aging on the GI system include those related to diet, among which stands out caloric restriction. Caloric restriction, and have a protective effect on the myenteric neurons during aging, is also responsible for the decrease of neuronal death by apoptosis, a process accentuated with aging. Thus, this study was to evaluate the effects of different levels of calorie restriction on the plasticity of myenteric neurons NADPH and acetylcholinesterase positive of the colon of rats during the aging process by means of ultrastructural (transmission electron microscopy) and morphoquantitative analysis. Therefore, we used 40 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), divided into four groups (n = 10): CI- animals six months; SR- animals 18 month fed a normal diet; RCI - animals 18 months fed a diet with 12% caloric restriction; RCII- animals 18 months fed a diet with 30% caloric restriction. At six months, the animals were transferred to the vivarium sector, where they remained up to 18 months under controlled conditions of temperature and light and water *ad libitum*. It was observed that the RC level of 30% effectively minimized the deleterious effects of aging on myenteric neurons, which may be adopted as an alternative against the common gastrointestinal disorders in the elderly.

Keywords: Myenteric plexus. Intestine. Aging. Caloric restriction. Neuronal plasticity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3 OBJETIVOS.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 MATERIAL.....	31
4.2 MÉTODOS.....	31
4.2.1 Período Experimental.....	32
4.2.1.1 Formulação da Dieta.....	32
4.2.1.2 Ensaio de Digestibilidade.....	33
4.2.1.3 Análise de Desempenho.....	34
4.2.2 Eutanásia dos Animais.....	35
4.2.3 Mensurações do Segmento Intestinal.....	35
4.2.3.1 Morfometria do Comprimento e da Área Intestinal.....	35
4.2.3.2 Morfometria da Túnica Muscular.....	36
4.2.4 Microscopia de Eletrônica de Transmissão.....	37
4.2.5 Técnica Histoquímica de NADPH-diaforase (SCHERER-SINGLER et al., 1983)	38
4.2.6 Detecção dos neurônios mioentéricos colinérgicos (KARNOVSKY; ROOTS, 1964).....	38
4.2.7 Análise Morfoquantitativa dos Neurônios Mioentéricos.....	39
4.2.7.1 Densidade Neuronal.....	39
4.2.7.2 Área do perfil do Corpo Celular dos Neurônios Mioentéricos.....	40
4.2.8 Análise Estatística.....	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 PERÍODO EXPERIMENTAL.....	41
5.1.1 Ensaio de Digestibilidade.....	41
5.1.2 Análise de Desempenho.....	43
5.2 MENSURAÇÕES DO SEGMENTO INTESTINAL.....	45
5.2.1 Morfometria do Comprimento e da Área Intestinal.....	45
5.2.2 Morfometria da Túnica Muscular.....	46
5.3 MICROSCOPIA DE ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	47

5.4 ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS.....	52
5.4.1 Densidade Neuronal.....	52
5.4.2 Área do perfil do Corpo Celular dos Neurônios Mioentéricos.....	56
6 DISCUSSÃO.....	59
6.1 ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE.....	59
6.2 ANÁLISE DE DESEMPENHO.....	61
6.3 MENSURAÇÕES DO SEGMENTO INTESTINAL.....	62
6.4 MICROSCOPIA DE ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	64
6.5 ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DO PLEXO MIOENTÉRICO.....	66
7 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas é notável o crescimento da população mundial de idosos (CARVALHO; GARCIA, 2003). Segundo o IBGE (2000), a população Brasileira está envelhecendo em ritmo acelerado acompanhado pelo declínio da taxa de fecundidade. Projeções populacionais demonstram que em 2020 os idosos chegarão a 25 milhões de pessoas, representando 11,4% da população e, em 2030, 40% dos brasileiros deverão ter entre 30 a 60 anos.

O envelhecimento é um processo progressivo e inevitável que ocorre com o avanço da idade, independentemente de doença, estilo de vida ou fatores ambientais e que acarreta alterações morfofisiológicas, propiciando maior incidência de processos patológicos (HOLLOSZY; FONTANA, 2007).

Tentativas para aumentar a longevidade e a qualidade de vida desta população têm sido indicadas, dentre elas têm-se destacado a atividade física e a restrição calórica. A maior parte das doenças crônicas relacionadas com a idade (arteriosclerose, câncer, doença de Alzheimer, diabetes, osteoporose, etc.) compartilha fatores de risco comuns como o excesso de calorias, dietas ricas em gorduras saturadas e sedentarismo, sugerindo que tais doenças, provavelmente, também compartilhem mecanismos celulares e moleculares comuns (CUTLER; MATTSON, 2006).

A restrição calórica (RC) quando não acompanhada de desnutrição apresenta benefícios para saúde, estendendo a sobrevivência e a qualidade de vida de diversas espécies animais (ANTEBI, 2007; HOLLOSZY; FONTANA, 2007). Algumas hipóteses têm sido propostas para compreender os efeitos da RC sobre as alterações no metabolismo celular decorrentes do envelhecimento. É relatado que a RC pode melhorar o sistema de reparação do DNA celular e a preservação do sistema de membranas celulares (MERRY, 2002).

No trato gastrintestinal (TGI), o processo de envelhecimento pode comprometer os plexos nervosos, provocando mudanças morfofuncionais manifestadas como retardo na motilidade esofágica (WADE, 2002) e no esvaziamento gástrico (CLARKSTON et al., 1996), aceleração do trânsito intestinal (WADE, 2002), assim como, diminuição da função absortiva (SANTER; BAKER, 1993). No intestino grosso, observam-se alterações funcionais que incluem atrofia da

mucosa, aumento do tecido conjuntivo e atrofia da camada muscular (CARVALHO-FILHO, 2007) que resultam em constipação intestinal (FIRTH; PRATHER, 2002).

Desnecessário é enfatizar a importância do aparelho digestório em sua atuação no suprimento contínuo de água, eletrólitos e nutrientes para a manutenção dos demais órgãos do corpo. Entretanto, para que esta função seja desempenhada a contento, são necessárias: motilidade eficiente para promover o trânsito do alimento pelo TGI, a estimulação da secreção de sucos digestivos, digestão e absorção dos produtos digestivos e a circulação eficiente do sangue pelos órgãos que compõe o aparelho digestório.

A regulação nervosa do TGI é mediada pelo sistema nervoso entérico (SNE) com seus plexos submucoso e mioentérico (GABELLA, 1989). Os neurônios mioentéricos estão relacionados com o controle da motilidade para o transporte do conteúdo luminal no TGI (PHILLIPS; POWLEY, 2007). Por meio das conexões com os demais componentes do sistema nervoso autônomo, o SNE permite que a função digestiva se integre harmoniosamente com as demais funções do organismo (FURNESS; COSTA, 1987).

Alterações no plexo mioentérico representadas por mudanças morfológicas e quantitativas dos neurônios comprometem a função desse sistema. Assim, por exemplo, durante o envelhecimento foi verificada significativa diminuição da densidade neuronal nas diferentes regiões do TGI em diversas espécies animais (GABELLA, 1989; SOUZA et al., 1993; GOMES et al., 1997; SANTER; BAKER, 1998; EL-SALLY et al., 1999; PHILLIPS; POWLEY, 2001).

Tendo em vista o comprometimento do cólon e as alterações causadas nos neurônios mioentéricos durante o envelhecimento e os efeitos benéficos relatados na literatura da RC sobre este processo, se faz necessário avaliar os efeitos da RC na plasticidade dos neurônios mioentéricos de animais em envelhecimento para subsidiar medidas preventivas que minimizem os efeitos deletérios do envelhecimento, preservando a qualidade de vida dos animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O século XX foi caracterizado pelo aumento mundial na longevidade do ser humano, cuja expectativa de vida passou a equivaler a quase o dobro da idade alcançada no início do século (CARVALHO; GARCIA, 2003). Em anos mais recentes, esse processo ganha maior importância nos países em desenvolvimento, com o aumento quantitativo acelerado da população da faixa etária de 60 anos ou mais em relação à população geral. Aumentos de até 300% da população idosa são esperados nesses países, especialmente na América Latina (TRUELSEN et al., 2001).

O Brasil apresenta um dos mais agudos processos de envelhecimento populacional entre os países mais populosos. A proporção de pessoas com idade de 60 anos ou mais, aumentou de 6,1% (7.204.517 habitantes), em 1980, para 8,6% (14.536.029 habitantes) em 2000, correspondendo ao aumento absoluto de 7,3 milhões de indivíduos (IBGE, 2000).

Nos países desenvolvidos, o envelhecimento vem acontecendo de forma gradual e harmoniosa com o desenvolvimento socioeconômico e com as condições de saúde (GRAZALLE et al., 2004). No Brasil, assim como nos outros países em desenvolvimento, o crescimento populacional acontece em um cenário marcado pela pobreza e pela falta de recursos socioeconômicos (JACOB FILHO, 2006).

A velocidade com que se processam as mudanças demográficas no Brasil, em decorrência do rápido declínio das taxas de fecundidade, difere muito dos países industrializados. Estimativas apontam que na França e Estados Unidos serão necessários 115 e 66 anos, respectivamente, para que a proporção de idosos se duplique (BUTLER et al., 1993). No Brasil, este mesmo fenômeno deverá ocorrer em apenas 30 anos, onde em 2020 a proporção de jovens será reduzida de 42,6% para 20,6% e a de idosos passará de 2,7% para 14,7% (CARVALHO, 1993). Estas mudanças no perfil demográfico farão com que o Brasil passe, entre 1960 e 2025, da 16ª para a 6ª posição mundial em termos de número absoluto de indivíduos com 60 anos ou mais (ONU, 2000).

Desta maneira, torna-se imprescindível a adaptação da sociedade a essa nova realidade, possibilitando melhor qualidade de vida para os idosos, atendendo,

principalmente, suas necessidades na área de saúde, uma vez que os últimos anos de vida são os mais onerosos no âmbito da saúde (WICK et al., 2000).

O atendimento da população brasileira com 60 anos ou mais corresponde a 23% dos gastos públicos com internações hospitalares, variando pouco entre regiões do país. Além disso, o custo com internações públicas em idosos aumenta progressivamente com a idade. Desta forma, o Estado enfrenta grandes dificuldades para lidar com o novo perfil epidemiológico que aos poucos se sobrepõe, sem substituir completamente o perfil anteriormente predominante (LIMA; COSTA et al., 2003).

O envelhecimento é um processo progressivo e inevitável que ocorre com o avanço da idade, independentemente de doença, estilo de vida ou fatores ambientais (HOLLOSZY; FONTANA; 2007). Caracteriza-se pela diminuição da eficácia dos mecanismos envolvidos na manutenção da homeostase, resultando em déficits progressivos nas funções celulares que causam alterações nos diferentes tecidos corpóreos (TIMIRAS, 1994; RUTTEN et al., 2003; CUTLER; MATTSON, 2006). Entre as atividades corporais comprometidas com a idade ressaltam-se as funções neuroendócrinas, hepáticas, gastrointestinais, renais dentre outras (TIMIRAS, 1994; CUTLER; MATTSON, 2006).

Em estudos sobre envelhecimento, os modelos experimentais mais utilizados têm sido os roedores. A longevidade máxima de ratos e camundongos depende muito das raças de cada espécie e gira em torno de três anos. Estudos mostram que animais senis apresentam uma série de alterações morfofisiológicas que tornam difícil acreditar que estes animais tenham atingido a sua longevidade máxima (ITO et al., 1993). Assim, torna-se evidente a necessidade de um modelo que permita que os animais envelheçam de maneira mais saudável possível para que as alterações do processo de envelhecimento não sejam mascaradas por doenças (ITO et al., 1993).

Muito se tem estudado acerca das formas de melhorar a qualidade de vida dos indivíduos idosos. Além da baixa funcionalidade e da diminuição da resistência do organismo ao estresse, diversos outros fatores são responsabilizados pelas alterações que caracterizam o envelhecimento, inclusive o comportamento alimentar que envolve tanto a quantidade de calorias ingeridas quanto a composição da dieta (SHEPHARD, 1998).

O desenvolvimento de intervenções terapêuticas não tem demonstrado grande impacto na expectativa de vida da população idosa, entretanto, tentativas bastante eficazes para aumentar a longevidade e a qualidade de vida desta população têm sido indicadas, dentre elas têm-se destaque a atividade física e a restrição calórica. A maior parte das doenças relacionadas com a idade (arteriosclerose, câncer, doença de Alzheimer, diabetes, osteoporose, etc) compartilha fatores de risco comuns como, por exemplo, o excesso de calorias, dietas ricas em gorduras saturadas e sedentarismo, sugerindo que tais doenças, provavelmente, também compartilhem mecanismos celulares e moleculares comuns (CUTLER; MATTSON, 2006).

A idéia de que cada doença relacionada ao envelhecimento é independentemente influenciada por fatores individuais ou por seleção genética tem sido descartada por evidências de que intervenções genéticas e dietéticas, como a restrição calórica (RC), retardam os efeitos do envelhecimento e reduzem a velocidade de progressão de várias doenças, aumentando o tempo de vida (PERLS, 2006).

A restrição dietética não acompanhada de desnutrição apresenta notáveis benefícios para saúde e para a expectativa de vida, estendendo a sobrevivência de diversas espécies de invertebrados e vertebrados como, por exemplo, leveduras, vermes, moscas, roedores, peixes e, possivelmente, até primatas (ANTEBI, 2007; HOLLOSZY; FONTANA, 2007). Entretanto, em humanos os efeitos da RC ainda não foram suficientemente estabelecidos (HEILBRONN; RAVUSSIN, 2003; INGRAM et al., 2006).

Desta forma, animais submetidos à RC poderiam se tornar modelos experimentais para estudos sobre o envelhecimento, uma vez que a ausência de patologias auxilia na identificação dos reais fatores envolvidos no processo de envelhecimento. Apesar de muitas doenças estarem associadas à idade, elas não são responsáveis pelas modificações que ocorrem com o tempo e que constituem o envelhecimento “normal” ou “fisiológico” (JECKEL-NETO et al., 1994).

A RC é definida como a dieta em que a quantidade diária de alimento ingerido é menor do que a que o animal seria capaz de ingerir até ficar completamente saciado. Animais que têm comida disponível em quantidade suficiente ou maior para saciar completamente o desejo de comer são chamados de animais alimentados *ad libitum*. A restrição pode ser feita tanto controlando a quantidade de alimento

fornecido, quanto através da manipulação dos componentes da dieta. As pesquisas conduzidas com RC têm utilizado diminuição da quantidade de alimento sem manipulação da quantidade e qualidade calórica das dietas. Entretanto, vale ressaltar que a restrição dietária não deve vir acompanhada de nenhum grau de desnutrição (MASORO et al., 1992), assim como, se a dieta for manipulada deve manter os componentes nutricionais necessários para manutenção do animal (WEIHE, 1987).

As proteínas da dieta são fontes de aminoácidos que o animal requer para produzir suas próprias proteínas corporais. Assim à deficiência de um aminoácido pode comprometer a síntese de proteínas importante para os processos celulares, ressaltando a necessidade do conteúdo protéico da dieta conter todos os aminoácidos essenciais nas proporções adequadas (LANE-PETTER, 1970).

Ao se determinar o conteúdo de proteína na dieta, deve-se levar em consideração a proporção energia/proteína. Se a energia for muito elevada em detrimento da proteína, o animal não pode satisfazer as suas necessidades de aminoácidos e não alcançará todo seu potencial de crescimento, independentemente da restrição de comida. Pelo contrário, se na proporção a energia for muito baixa os aminoácidos serão utilizados como uma fonte não econômica de energia (PAYNE, 1970).

A obtenção de estimativas de digestibilidade dos alimentos constitui aspecto básico para o conhecimento de seu valor energético permitindo o balanceamento adequado de dietas que propiciem o atendimento das demandas para manutenção e produção dos animais (DETMANN et al., 2006). Assim, o consumo e a digestibilidade são parâmetros essenciais em vários sistemas de formulação de dietas, devendo ser mensurados uma vez que possuem alta correlação com a ingestão e eficiência na absorção e aproveitamento dos nutrientes (MACEDO JÚNIOR et al., 2006).

Digestibilidade é característica do alimento e indica a porcentagem de cada nutriente de um alimento que o animal pode utilizar (COELHO DA SILVA; LEÃO, 1979).

Medidas de digestibilidade dos nutrientes servem para qualificá-los quanto ao seu valor nutritivo e são importantes para quantificar a absorção dos nutrientes e avaliar as dietas, bem como, a eficiência de uso da dieta pelo animal (VAN SOEST, 1994).

O coeficiente de digestibilidade pode ser calculado por métodos direto e indireto. No primeiro caso, a coleta de excretas é parcial, utilizando-se indicadores como substância referência. Já, no método direto a quantificação do alimento ingerido e a coleta de excretas são totais (NOÛE; CHOUBERT, 1986).

O retardo na taxa de envelhecimento celular preconizado pela RC se dá devido à diminuição no metabolismo celular (MASORO, 2005). Assim, entre os mecanismos envolvidos neste processo temos a regulação dos genes de reparo celular ou mediadores da inflamação, a resistência do organismo ao estresse e a proteção contra o estresse oxidativo (ALEXEYEV et al., 2004).

Algumas hipóteses têm sido propostas para compreender os efeitos da RC sobre as alterações ocorridas com o envelhecimento sobre o metabolismo celular. Uma das hipóteses sugere a redução da gordura corporal e da sinalização da insulina, e outra que avalia a redução da produção de espécies reativas de oxigênio responsáveis pelos danos oxidativos nos tecidos e órgãos (MASORO, 2005).

A redução na concentração de glicose decorrente da diminuição da ingestão de energia leva a redução da produção de insulina pelas células β pancreáticas e, em consequência, diminuição do depósito de tecido adiposo (KOUBOVA, 2003).

Pesquisas demonstram que o tecido adiposo apresenta função endócrina, produzindo os hormônios fator de necrose tumoral e adiponectina (BJORNTORP, 1991). A adiponectina é uma proteína de produção específica pelos adipócitos, com predominância na gordura visceral (HOTTA et al., 1998). Sua produção depende do estado nutricional e seus níveis séricos encontram-se diminuídos na obesidade e na insulino-resistência (PRINS, 2002; GREGOIRE, 2003; XU et al., 2003; DREVON, 2005).

Muitas são as funções atribuídas as adiponectinas, dentre elas a regulação da homeostasia dos lipídios e da glicose, potencialização da insulina em nível hepático, indução da oxidação de gorduras, além da ação antiinflamatória resultante da diminuição da produção dos fatores de necrose tumoral. Estudos com ratos revelam reversão da insulino-resistência com a administração de adiponectina, em situações de lipodistrofia e obesidade (PRINS, 2002; HAVEL, 2004).

Com o envelhecimento é relatado diminuição dos níveis séricos de adiponectina e aumento de citocinas, como os fatores de necrose tumoral. Assim, alterações decorrentes da RC poderiam levar ao aumento na concentração de

adiponectina e diminuição do fator de necrose tumoral, aumentando a expectativa de vida (COMBS et al., 2003).

De todo o oxigênio utilizado pelas células na respiração, cerca de 2% dos átomos ficarão apenas parcialmente reduzidos por aceitar um só elétron, formando as espécies reativas de oxigênio que, livres, acabam por oxidar macromoléculas celulares como lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos e ainda podem levar a ativação de genes pró inflamatórios. Os danos causados pelo estresse oxidativo podem ser removidos ou acumulam-se irreversivelmente (SOHAL; WEINDRUCH, 1996).

Estudos demonstram a intensificação do estresse oxidativo em animais senis quando comparados com animais jovens. Tal alteração desencadeia patogêneses de diversas doenças crônicas não transmissíveis como aterosclerose, diabetes, artrite reumatoide, desordens neurodegenerativas e câncer (MERRY, 2002; RAHA; ROBINSON, 2000).

Os mecanismos pelo qual a RC diminui a formação das espécies reativas de oxigênio ainda não estão estabelecidos, entretanto é relatado que a redução calórica pode promover supressão dos genes pró-inflamatórios, melhorar o sistema de reparação do DNA celular e a preservação do sistema de membranas celulares (MERRY, 2002).

Estudos relatam que a RC quando utilizada para roedores, desde o nascimento, é capaz de prolongar o tempo de vida (HOLLOSZY, 1992; MASORO, 1992; WEINDRUCH; SOHAL, 1997; ROTH et al., 2001), impedindo ou retardando as severidades de doenças crônicas (WANG et al., 2007). Quando iniciada após a puberdade ou fase adulta (seis meses de idade) pode aumentar de 30 a 60% a expectativa de vida (WEINDRUCH; WALFORD, 1982).

Ratos e camundongos idosos que ingerem dieta restrita em calorias apresentam longevidade de 20 a 50% maior do que animais que recebem alimentação sem restrição (WEINDRUCH; WALFORD, 1988). Bailey et al. (1993) demonstraram que a quantidade de gordura corporal de ratos submetidos à RC durante toda a vida diferiu de ratos com alimentação *ad libitum* aos 12, 16, 24 e 28 meses de idade.

Em ratos Wistar de meia idade (12 meses), 50% de RC durante quatro semanas resultou em diminuição de 20% do peso corporal, redução do conteúdo de gordura corporal e melhorou o quadro de resistência periférica à insulina que se

encontra aumentado com a idade (MACHADO et al., 1992; SERAFHIN, 1996; MACHADO, 1997).

Estudo realizado em primatas induzidos à doença de Parkinson demonstrou menor déficit motor naqueles com RC de 30% quando comparados a primatas que ingeriram uma dieta normal. Em camundongos com doença de Alzheimer, verificou-se que a RC promoveu diminuição substancial de 50% na imunorreatividade da β -amiloide, peptídeo que se acumula no tecido cerebral nesta doença (MASWOOD et al., 2004; PATEL et al., 2005).

A restrição alimentar parece exercer ação protetora do sistema nervoso central frente às alterações causadas pelo envelhecimento (ECKLES-SMITH et al., 2000; PROLLA; MATTSON, 2001).

Muitos pesquisadores relatam diminuição quantitativa progressiva das células nervosas durante o processo de envelhecimento (MORA; PORRAS, 1998) que pode estar ou não acompanhada de alterações nos tamanhos dos neurônios. Este processo de redução da densidade neuronal e do perfil celular pode ocorrer em todo o córtex cerebral, porém com variações de intensidade e tempo. Em neurônios do hipocampo a perda neuronal pode ser de 3 a 9% por década. No cerebelo a perda se dá em torno de 2,5% das células de Purkinje por década, e na substância negra a diminuição é de 11% entre os 65 e 85 anos (MORA; PORRAS, 1998; CANÇADO; HORTA, 2002).

Uma das principais consequências destas alterações morfológicas dos neurônios é o declínio significativo na produção e atividade de neurotransmissores. Como a síntese de proteínas é afetada com o passar da idade, e a ação dos neurotransmissores se dá através de enzimas e receptores de membranas, as alterações em neurotransmissores podem gerar mudanças funcionais (BERNHARDI, 2005). É relatada, principalmente, diminuição dos níveis de acetilcolina, dopamina e serotonina, ácido gama-aminobutírico (GABA) e das endorfinas (CANÇADO; HORTA, 2002).

A RC é sugerida para retardar o envelhecimento por atrasar o cronômetro hipotalâmico do cérebro. Estudos indicam que uma dieta baixa em calorias pode modular a extensão dos danos oxidativos no cérebro, diminuir a neurodegeneração, aumentar a produção de fatores neurotróficos, estimular a plasticidade cerebral e a capacidade de auto-reparação das células nervosas (BERNHARDI, 2005).

No TGI, o processo de envelhecimento pode provocar mudanças em certos aspectos morfofuncionais que são manifestados como retardo na motilidade esofágica e colônica (MADSEN, 1992; SANTER; BAKER, 1993; WADE, 2002), retardo no esvaziamento gástrico (MOORE et al., 1983; CLARKSTON et al., 1996; BROGNA et al., 1999), aceleração do trânsito intestinal (ANURAS; LEONING-BAUCKE, 1984; McDOUGLAS, 1984; WADE, 2002), assim como, diminuição da função absorptiva (SANTER; BAKER, 1993) e aumento da produção fecal (SMITS; LEFEBVRE, 1996).

A regulação nervosa do TGI é mediada pelo sistema nervoso entérico, componente do sistema nervoso autônomo, juntamente com o sistema nervoso simpático e parassimpático (POWLEY, 1999).

O sistema nervoso entérico é formado pelo conjunto de neurônios e células de suportes intramurais presentes no TGI, vesícula biliar e pâncreas (FURNES, 2000), caracterizando plexos ganglionados, ou não, relativamente independentes do sistema nervoso central (FURNESS; COSTA, 1987; HANSEN, 2003). Na parede do TGI, os plexos submucoso e mioentérico localizam-se na tela submucosa e entre as camadas da túnica muscular, respectivamente (GABELLA, 1987).

Os neurônios mioentéricos estão relacionados com o controle da motilidade para o transporte do conteúdo luminal e os neurônios submucosos são responsáveis pelo controle da secreção glandular e absorção no TGI (PHILLIPS; POWLEY, 2007). Por meio das conexões com os demais componentes do sistema nervoso autônomo, o sistema nervoso entérico permite que a função digestiva se integre harmoniosamente com as demais funções do organismo (FURNESS; COSTA, 1987; COSTA; SIMON; BROOKS, 1994).

Sabe-se que as alterações morfológicas e ou quantitativas nos neurônios mioentéricos são responsáveis por disfunções significativas no aparelho digestório. Durante o envelhecimento, por exemplo, verifica-se diminuição de 30 a 60% na densidade destes neurônios em ratos, camundongos, cobaias e humanos (SANTER; BAKER, 1988; GABELLA, 1989; SOUZA et al., 1993; MECIANO FILHO et al., 1995; GOMES et al., 1997; EL-SALLY et al., 1999; PHILLIPS; POWLEY, 2001).

O intestino grosso constitui a última porção do TGI e desempenha importante função no controle hidroeletrolítico, além de controlar a velocidade de formação e eliminação das fezes (CHRISTENSEN, 1989). O intestino grosso do rato é dividido em ceco, cólon proximal, cólon distal e reto. Diferenças funcionais são descritas

entre as duas porções do cólon, sendo o cólon proximal responsável pela estocagem do bolo fecal e o cólon distal por eliminar as fezes (TAKAHASHI; OWYANG, 1998).

Tais diferenças funcionais entre as regiões do cólon estão relacionadas ao peristaltismo o qual inclui eventos coordenados de contração e relaxamento da musculatura longitudinal e circular da túnica muscular (HASLER; KUROSAWA; OWYANG, 1990). No cólon proximal é encontrada a retropropulsão, enquanto que no cólon distal é observada intensa contração peristáltica para propulsão das fezes (MESSENGER et al., 1994).

Wade e Cowen (2004) observaram que indivíduos com idade entre 55 e 74 anos apresentam trânsito colônico mais lento do que pessoas jovens (21-27 anos). Em ratos, a redução no trânsito colônico (aproximadamente de 45%) também é verificada quando se comparam animais de cinco meses com os de 28 meses de idade (MC DOUGLAS et al., 1984).

No cólon, o óxido nítrico (NO) promove o relaxamento da musculatura intestinal, propiciando o aumento da capacidade absorptiva (SANDERS; WARD, 1992) e permitindo mais tempo de contato para a absorção de fluídos e eletrólitos através do epitélio intestinal (MIZUTA et al., 1999).

O NO é formado a partir do aminoácido L-arginina, pela ação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), um mecanismo NADPH, Ca^{+2} ou calmodulina dependente (WADE, 2002). Os neurônios nitrérgicos podem ser identificados imunohistoquimicamente com a utilização de anticorpo para a enzima NOS, ou com a utilização da técnica histoquímica da NADPH-diaforase, uma vez que a enzima NOS co-existe com a NADPH-diaforase (FURNESS et al., 1994; SAFFREY, 2004). Desta maneira, a NOS pode, na presença de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), reduzir o NBT, formando os grânulos de formazana, permitindo a marcação de neurônio NOS reativo (SCHERER-SINGER et al., 1983).

Takahashi et al. (2000) relatam a diminuição na expressão de NOS durante o envelhecimento nos neurônios do plexo mioentérico no cólon de ratos. No estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (cólon e reto). Phillips et al. (2001) não referem perda da subpopulação neuronal que expressa NO com o envelhecimento.

A constatação de que os neurônios nitrérgicos não apresentam alterações quantitativas é consistente com a função protetora do NO, sendo que Cowen et al.

(2000) sugerem que os neurônios que utilizam cNOS devem aumentar o mecanismo de defesa contra os radicais livres.

Um dos principais neurotransmissores excitatórios expressados pelos neurônios entéricos é a acetilcolina (NAKAJIMA et al., 2000). A acetilcolina é sintetizada pela enzima acetilcoltransferase e sua degradação é efetuada por ação da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela quebra da acetilcolina após sua liberação na fenda sináptica (OSINSKY; BASS, 1995) podendo, assim, ser utilizada como um marcador da atividade colinérgica (GABELLA, 1994).

A diminuição na densidade neuronal no cólon pode levar a dificuldade de defecação, devido à redução na frequência e amplitude da contração colônica (DONALD et al., 1985; SARNA, 1991), processo este manifestado como constipação. Tais sintomas são comumente reportados em indivíduos idosos e podem, ainda, resultar em complicações mais severas como: compactação fecal, megacólon e incontinência fecal (DAPOIGNY; SARNA, 1991).

Thrasivoulou et al. (2006) verificaram que a RC pode apresentar efeitos protetores nos neurônios mioentéricos ao longo do envelhecimento e ainda é responsável pela diminuição da apoptose neuronal, processo este que se acentua com a idade.

Tendo em vista o comprometimento do cólon e as alterações causadas nos neurônios mioentéricos durante o envelhecimento e as ações benéficas relatadas na literatura da RC sobre este processo, se faz necessário avaliar os efeitos da RC na plasticidade dos neurônios mioentéricos de animais em envelhecimento para que ela possa ser adotada na prevenção dos efeitos deletérios do envelhecimento, preservando a qualidade de vida dos animais.

3 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da restrição calórica na plasticidade dos neurônios mioentéricos do cólon de ratos Wistar durante o processo de envelhecimento, por meio das seguintes análises:

- Desempenho de ratos alimentados com as diferentes dietas;
- Capacidade de utilização digestiva da matéria seca, proteína e energia bruta das dietas;
- Análise morfométrica do segmento intestinal;
- Análise morfológica em microscopia eletrônica de transmissão dos neurônios mioentéricos;
- Quantificação dos neurônios mioentéricos identificados pelas técnicas de NADPH-diaforase e Acetilcolinesterase em preparados de membrana analisados em microscopia de luz;
- Mensuração da área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos identificados pelas técnicas de NADPH-diaforase e Acetilcolinesterase em preparados de membrana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Abaixo seguem descritos o material e os diferentes métodos utilizados neste trabalho.

4.1 MATERIAL

Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar. Os animais foram distribuídos em quatro grupos, com 10 animais em cada grupo:

- Grupo CI: animais de 06 meses alimentados com dieta normal (A);
- Grupo SR: animais de 18 meses alimentados dieta normal (A);
- Grupo RCI: animais de 18 meses submetidos à restrição calórica alimentados com dieta B;
- Grupo RCII: animais de 18 meses submetidos à restrição calórica alimentados com dieta C.

4.2 MÉTODOS

Após aprovação do comitê de Bioética da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo 1132/2007), os animais de todos os grupos, a exceção dos animais do grupo CI, aos seis meses de idade foram transferidos para o Biotério Setorial, onde permaneceram até aos 18 meses. Todos foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas providas de bebedouro e comedouro, mantidas em condições ambientais controladas de temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e de iluminação (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro) e água *ad libitum*.

Para determinar a quantidade de dieta diária fornecida durante o experimento, os animais de todos os grupos passaram por um período de sete dias de adaptação,

durante o qual foram fornecidas dieta normal (A) e água *ad libitum*. A média de consumo diário de dieta normal obtida na fase de adaptação foi a quantidade diária de dieta administrada ao longo de toda a fase experimental. Esse procedimento se fez necessário para evitar que animais tratados com dieta de nível calórico inferior (dietas B e C) ao da dieta normal (dieta A) compensassem o menor fornecimento de calorias com o aumento da ingestão.

Após o período de adaptação, os animais foram distribuídos aleatoriamente nos três grupos (15 animais por grupo). Para os animais do grupo SR foi administrada dieta normal produzida com base na composição química de dietas referências para animais de laboratório e necessidades estabelecidas pelo NRC (1995) para ratos em período de manutenção. Os animais dos grupos RCI e RCII receberam dietas com diferentes níveis calóricos, conforme determinado para cada grupo (Tabela 1).

No início do experimento e mensalmente os animais foram pesados e o consumo da dieta foi mensurado pela diferença entre a dieta oferecida e a dieta ingerida.

4.2.1 Período experimental

O período experimental compreendeu as seguintes etapas: formulação da dieta, ensaio de digestibilidade e análise do desempenho.

4.2.1.1 Formulação da dieta

Foram elaboradas três dietas isoprotéicas (Tabela 1). A dieta A foi considerada a dieta normal referência fornecida aos animais do grupo SR. As dietas B e C foram fornecidas aos animais dos grupos RCI e RCII, respectivamente.

As dietas B e C tiveram, respectivamente, a energia bruta reduzida em 12,5% (3500 kcal/EB/kg) e 31% (2700 kcal/EB/kg) em relação à energia bruta calculada para a dieta normal (3900 kcal/EB/kg).

Durante o período do protocolo experimental foram avaliados o desempenho dos animais e a capacidade de utilização digestiva da matéria seca, proteína bruta e energia bruta das dietas experimentais com os diferentes níveis de energia.

Tabela 1 - Composição percentual e química das dietas experimentais de acordo com os níveis de energia

Ingredientes	Unidade	Dieta A	Dieta B	Dieta C
Milho	Kg	42,711	37,308	-
Soja	Kg	36,101	34,310	46,200
Trigo	Kg	11,482	12,512	3,200
Fosfato Bicálcico	Kg	2,035	2,054	2,700
Inerte	Kg	-	7,900	23,750
Calcário	Kg	0,136	0,117	0,300
Amido	Kg	-	-	19,050
Óleo de soja	Kg	2,735	1,000	-
Sal comum	Kg	0,300	0,300	0,300
Premix Vitamínico ¹	Kg	1,000	1,000	1,000
Premix mineral ²	Kg	3,500	3,500	3,550
Composição analisada				
Energia bruta	Kcal/kg	3900	3500	2700
Proteína bruta	%	22,0	22,0	22,0
Fibra bruta	%	4,0	4,0	3,0
Cálcio	%	0,70	0,70	0,9
Fósforo Total	%	0,80	0,80	0,8

¹ Composição por kg do produto: Vit. A, 400.000 UI; Vit. D3, 100.000 UI; Vit. E, 7500mg; Vit. K1, 75mg; Vit. B12, 2500mcg; Ac. fólico, 200mg; Ac. nicotínico, 3000mg; biotina, 20mg; pantotenato de cálcio 1600mg; pirodoxina-Hcl, 700mg; riboflavina, 600mg; tiamina Hcl, 600mg.

² Composição por kg do produto: boro, 14,26mg; cálcio, 142,94; cloro, 44,9; cobre, 172,41; cromo, 28,65; enxofre, 8,60; ferro, 1000mg; flúor, 28,72mg; fósforo, 44,61mg; iodo, 5,93mg; lítio, 2,85mg; magnésio, 14,48mg; manganês, 300mg; molibdênio, 4,32mg; níquel, 14,31; potássio, 102,81mg; selênio, 4,28mg; silício, 143,26mg; sódio, 29,38mg; vanádio, 2,87mg; zinco, 860mg

4.2.1.2 Ensaio de digestibilidade

Para o ensaio de digestibilidade, 30 ratos foram distribuídos individualmente em gaiolas metabólicas providas de bebedouros tipo mamadeira, comedouros semi-automáticos e dispositivo para coleta de fezes. As gaiolas foram alojadas em sala com temperatura controlada com média de 21°C, fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro e umidade relativa de 70%.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com três tratamentos (dietas A, B e C) e dez repetições. As dietas eram fornecidas diariamente respeitando o valor médio de consumo estabelecido previamente no período de dois meses utilizando o consumo da dieta A como referência.

O experimento para o ensaio de digestibilidade teve a duração de 15 dias sendo dez dias de adaptação às gaiolas e dietas e cinco dias para a coleta de fezes, utilizando-se a metodologia padronizada para ensaios de digestibilidade *in vivo* (PEREZ et al., 1995). As fezes de cada rato foram coletadas diariamente pela manhã e acondicionadas em sacos plásticos identificados e hermeticamente fechados e conservados a -18°C. Posteriormente, ao final do experimento, as fezes de cada animal foram pesadas, homogeneizadas e colocadas em estufa de ventilação forçada à 60°C, durante 72 horas. Em seguida, foram moídas e acondicionadas em vidros identificados para análises laboratoriais da matéria seca (MS), da proteína bruta (PB) e energia bruta (EB) (SILVA; QUEIROZ, 2002), e determinação dos respectivos coeficientes de digestibilidade (CDa). Para o cálculo dos coeficientes de digestibilidade aparente foi utilizada a fórmula apresentada a seguir.

$$CDa = \left(\frac{\text{Nutriente (ingerido)} - \text{Nutriente (excretado)}}{\text{Nutriente (ingerido)}} \right) \times 100$$

4.2.1.3 Análise de desempenho

Para o experimento de desempenho, foram utilizados 30 dos ratos, sendo 10 animais de cada grupo (SR, RCI e RCII) dos seis aos 18 meses de idade, distribuídos individualmente em gaiolas metabólicas providas de bebedouros tipo mamadeira e comedouros semi-automáticos. As gaiolas foram alojadas em sala com temperatura controlada com média de 21°C, fotoperíodo de 12 horas claro/ 12 horas escuro e umidade relativa de 70%.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com três tratamentos (dietas A, B e C) e dez repetições. As dietas eram fornecidas diariamente respeitando um valor médio de consumo estabelecido por um período de seis a oito meses de idade utilizando o consumo da dieta A como referência.

Os ratos foram pesados semanalmente no período experimental de seis a 18 meses de idade. Os parâmetros de desempenho analisados foram o ganho de peso médio diário (GPMD) e a conversão alimentar (CA).

Outro parâmetro analisado em relação ao desempenho dos animais foi o peso (g) da gordura periepididimal e retroperitoneal em conjunto. Para tanto, após a eutanásia dos animais e retirada do segmento intestinal (cólon), as gorduras foram coletadas e tiveram seu peso mensurado.

Os dados dos coeficientes de digestibilidade e do desempenho dos ratos foram submetidos à análise de variância, utilizando o programa SAEG (1997). O modelo para análise dos dados é apresentado abaixo.

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}.$$

Em que:

Y_{ij} = e o valor observado da variável estudada relativa ao indivíduo j , recebendo a dieta i ,

μ = constante geral

T_i = efeito da dieta i sendo $i = 1, 2$ e 3 (i_1 = dieta A , i_2 = dieta B e i_3 = dieta C)

e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação.

Para comparação das médias foi utilizado o teste SNK (Student-Newman Keuls) a 5%.

4.2.2 Eutanásia dos animais

Após período experimental (12 meses) os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e eutanasiados com dose letal de anestésico (Tiopental® 40mg/kg de peso corpóreo) via intravenosa. Posteriormente, foram laparatomizados, por meio de incisão mediana na parede abdominal, para retirada do cólon (limite cranial - junção ceco-cólica e limite caudal - esfíncter anal).

De cada segmento (CP e CD) foi obtido um fragmento proximal destinado à microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. O restante de cada segmento foi submetido às técnicas histoquímicas da NADPH-diaforase (cinco animais de cada grupo) e Acetilcolinesterase (cinco animais de cada grupo) para evidenciar neurônios.

4.2.3 Mensurações do segmento intestinal

As mensurações segmento intestinal (cólon) foi realizada através da obtenção das medidas do comprimento, área e espessura da túnica muscular.

4.2.3.1 Morfometria do comprimento e da área intestinal

Segundo Gabella (1989), ao longo do desenvolvimento é verificado um aumento na área dos segmentos do TGI, provocando uma diluição da densidade neuronal que levaria a redução aparente no número dos neurônios entéricos. Assim, optamos por mensurar o comprimento (cm) e a área dos segmentos intestinais a fim de eliminar erros na interpretação dos resultados morfoquantitativos. Para tanto, o cólon foi dividido em parte proximal (CP) e distal (CD) e, posteriormente, mensurados e decalcados em papel branco. Os decalques foram escaneados para

determinação da área do segmento intestinal (mm²) por meio do analisador de imagem Image Pro-Plus 3.0.1[®].

4.2.3.2 Morfometria da túnica Muscular

Para mensuração de espessura da túnica muscular (camadas longitudinal e circular), foram utilizados os cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina. Para tanto os fragmentos destinados a microscopia de luz foram lavados com solução salina para a remoção das fezes e fixados por imersão em solução de formol a 10%. Após fixação de 72 horas, foram lavados em álcool etílico a 70%, desidratados em série crescente de alcoóis até o absoluto e diafanizados em xilol. Após inclusão em Paraplast (Sigma[®]), foram obtidos cortes transversais de cinco micrômetros de espessura corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina e montados entre lâmina e lamínula de vidro com resina Permount (Synth[®]).

As mensurações se deram através do analisador de imagem Image-Pro-Plus 3.0.1[®]. As imagens foram capturadas com o auxílio do microscópio Olympus BX60[®] (objetiva 20X) acoplado a uma câmera digital Axio Cam HRc - Zeiss[®] e transferidas para o computador.

Considerando a forma tubular dos segmentos intestinais, o CP e CD foram divididos em quadrantes, considerando a borda mesocólica como 0° (Figura 1). Em cada corte histológico foram capturados quatro diferentes campos (0°, 90°, 180°, 270°). Cada lâmina continha dois cortes histológicos totalizando, assim, oito campos capturados por região do cólon (CP e CD). Dentro de cada campo, a maior espessura foi mensurada.

Figura 1 - Esquema de corte transversal do cólon, indicando as regiões mesocólica (M), e antimesocólica (A). A indicação de 0° corresponde à inserção do mesocólon

4.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após então fixados, os segmentos intestinais obtidos foram seccionados em fragmentos menores que foram lavados em solução tampão de cacodilato de sódio a 0,125 M e pH 7,4 e imersos em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 2%. As amostras permaneceram nesta solução por 60 minutos no escuro e sob agitação constante. Posteriormente, foram lavadas na mesma solução tampão de cacodilato anteriormente referida e, após, em água destilada, para serem contrastadas em blocos com a solução aquosa saturada de acetato de uranila durante 60 minutos sob agitação constante e em recipiente escuro. Os fragmentos foram novamente lavados com água destilada e desidratados em série crescente de álcoois de 50% ao absoluto, sendo depois desidratados em óxido de propileno por dez minutos. As amostras foram embebidas com solução de óxido de propileno e resina Araldite, sempre em constante agitação. Após estas etapas, os fragmentos foram inclusos em resina Araldite pura e mantidos em estufa (60°C) por um período mínimo de dois dias. Os blocos de resina formados foram trimados e seccionados com 70-90 nm de espessura por navalha de diamante. As secções foram colocadas em placas de

cobre e coradas com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo e, posteriormente, analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão.

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

Os cólons foram lavados e preenchidos com PBS (pH 7,4). Para o preenchimento, as extremidades dos segmentos foram fechadas com fio de sutura. A seguir, os segmentos foram submetidos a duas lavagens em solução de PBS (10 minutos cada) seguidas de permeabilização em PBS contendo Triton X-100 a 0,3% diluído em tampão fosfato de sódio (pH 7,3) por 10 minutos. Depois, mais duas lavagens em PBS durante 10 minutos cada foram necessárias. Para evidenciar os neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos, após as lavagens, os segmentos foram incubados em meio de reação constituído por 50 mg de NBT, 100 mg de β -NADPH e 0,3% de Triton X-100 em tampão Tris-HCl (0,1M pH 7,6) por 2 horas. Posteriormente os cólons tiveram suas extremidades liberadas e foram imersos em solução de paraformaldeído a 4% para a fixação e armazenagem.

4.2.6 Detecção dos neurônios mioentéricos colinérgicos (KARNOVSKY; ROOTS, 1964)

Após a laparotomia, os cólons foram retirados e perfundidos com solução salina e, posteriormente, com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato. Os segmentos intestinais permaneceram imersos neste fixador pelo período de 1 hora a 4°C, sendo, em seguida, lavados durante 12 horas em solução de Krebs contendo hialuronidase (2000 UTR) e tetraisopropil pirofosforamida (isso-OMPA). A incubação foi realizada por período de 24 horas a 4°C em meio contendo 0,17 M de acetilcolina, 6,5 mL de tampão fosfato (0,1M, pH 7,1), 0,5 mL de citrato de sódio (100 mM), 1 mL de sulfato de cobre (30 mM), 1 mL de água destilada e 1 mL de ferricianeto de potássio (5 mM), acrescentando-se tetraisopropil pirofosforamida e hialuronidase.

4.2.7 Análise morfoquantitativa dos neurônios mioentéricos

Os segmentos intestinais após submetidos a evidenciação neuronal permaneceram por um período de 48 horas de fixação.

Posteriormente, de cada cólon (CP e CD) foram obtidos preparados de membrana, através da microdissecção, ao estereomicroscópio, para retirada das túnicas mucosa e submucosa e preservação das túnicas muscular e serosa. Estes preparados de membrana assim obtidos foram montados entre lâmina e lamínula de vidro com resina Permunt (Synth®) e destinados as análises quantitativas e morfométricas.

4.2.7.1 Densidade neuronal (mm²)

Para a quantificação neuronal foram utilizados os preparados de membrana obtidos de cada cólon. A densidade neuronal foi verificada com o auxílio do microscópio de luz OLYMPUS BX60 acoplado a câmera digital de alta resolução (Axio Cam HRc-Zeiss®), com aumento de 400X, para captura de imagens que foram transferidas para o computador.

Para a captura de imagens, em cada preparado de membrana foi adaptado um sistema teste constituído por 56 campos equidistantes, distribuídos em oito colunas com sete linhas cada, amostrando todas as regiões do cólon (mesocólica e antimesocólica).

A imagem capturada de cada campo do microscópio, quando analisada na tela do computador, teve o campo delimitado por um sistema teste constituído por linhas de inclusão (margem superior e margem direita) e de exclusão (margem inferior e margem esquerda). Desta maneira, os neurônios contidos dentro dos limites da área teste e os que tocaram as margens superior e direita foram contados e os neurônios que tocaram as margens inferior e esquerda do campo foram excluídos.

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

A mensuração da área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos do cólon foi realizada pelo programa de análise de imagem computadorizado Image-Pro-Plus 3.0.1. (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, EUA). Para tanto, as imagens dos neurônios capturadas para a análise quantitativa foram utilizadas na análise morfométrica. Todos os neurônios quantificados foram mensurados. Posteriormente, os resultados foram distribuídos em histogramas de frequência de acordo com seu tamanho, com intervalo de 150 μm^2 .

4.2.8 Análise estatística

Os dados referentes ao desempenho e digestibilidade foram analisados pelos testes de Tukey e Student-Newman Keuls (SNK), respectivamente. A análise quantitativa e morfométrica dos neurônios mioentéricos NADPH-dp e acetilcolinesterase reativos e a espessura da túnica muscular foram analisados pelo teste Scott Knott. Os resultados serão descritos como média $\pm$ desvio padrão. Para todas as análises o nível de significância adotado foi $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta pesquisa encontram-se apresentados e sistematizados nas seguintes etapas: período experimental,

5.1 PERÍODO EXPERIMENTAL

Os resultados obtidos no período experimental encontram-se apresentados a seguir:

5.1.1 Ensaio de digestibilidade

Devido o fornecimento das dietas ser padronizado, não houve diferença no consumo das mesmas entre os grupos. Entretanto, pode-se observar diferença significativa ($p < 0,05$) na ingestão de energia bruta pelos animais que consumiram a dieta C (grupo RCII) comparados aos animais que consumiram as dietas A (grupo SR) e B (grupo RCI), em função da diferença na composição química entre as dietas (Tabela 2).

Em relação à excreção de fezes, os animais que receberam dieta C (grupo RCII) apresentaram excreção menor ($p < 0,05$) em relação aos animais que consumiram dietas A (grupo SR) e B (grupo RCI).

Tabela 2 - Valores médios de nutrientes ingeridos e quantidade de fezes excretada de acordo com os níveis de energia das dietas

Nutrientes	DIETAS		
	A (3900 kcal/EB)	B (3500 kcal/EB)	C (2700 Kcal/EB)
Matéria Seca (g/dia)	23,36	23,53	23,55
Proteína Bruta (g/dia)	5,19	5,08	5,43
Energia Bruta (kcal/dia)	101,40a	91a	70,2b
Fezes (g/dia)	5,52a	5,49a	4,68b

* Médias com letras diferentes no sentido de linha diferem ($P < 0,05$) pelo teste Student-Newman Keuls (SNK)

O coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca não diferiu ($p > 0,05$) entre os grupos de animais, entretanto a análise da digestibilidade aparente da proteína bruta e energia bruta dos animais do grupo RCII (dieta C) revelou diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos (SR e RCI) (Tabela 3).

Tabela 3 - Coeficientes de digestibilidade aparente (CDa) da matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e energia bruta (EB) de acordo com os níveis de energia das dietas

Nutrientes	DIETAS		
	A (3900 kcal/EB)	B (3500 kcal/EB)	C (2700 Kcal/EB)
CDa matéria seca (%)	75,40a	75,76a	77,6a
CDa Proteína bruta (%)	87,69b	87,37b	90,04a
CDa Energia bruta (%)	85,65b	84,92b	88,86a

* Médias com letras diferentes no sentido de linha diferem ($P < 0,05$) pelo teste Student-Newman Keuls (SNK)

5.1.2 Análise de Desempenho

Os dados referentes ao desempenho dos animais durante todo o período experimental (12 meses) estão apresentados na tabela 4.

No primeiro mês (julho) do experimento onde as dietas foram fornecidas a vontade para estabelecer o padrão de consumo, não houve diferença ($p>0,05$) no desempenho dos animais nos diferentes tratamentos. A partir do segundo mês de experimento (agosto), quando as dietas passaram a ser fornecidas de forma controlada, verificou-se ganho de peso contínuo nos animais que receberam a dieta A (grupo SR) em relação aos animais que receberam as dietas B (grupo RCI) e C (grupo RCII). Por outro lado, a partir do controle de fornecimento das dietas, foi verificada pequena perda de peso nos animais que consumiram as dietas contendo níveis menores de energia (dietas B e C), seguida de recuperação e estabilização ao longo de todo experimento (Figura 2).

Tabela 4 – Média de peso (gramas) dos animais dos grupos SR, RCI e RCII durante o período experimental de 12 meses

Meses	SR (dieta A)	RCI (dieta B)	RCII (dieta C)
Julho	398a	397a	396a
Agosto	495a	493a	482a
Setembro	523a	483a	463b
Outubro	535a	484a	471b
Novembro	544a	490b	483b
Dezembro	550a	490b	486b
Janeiro	554a	497b	506b
Fevereiro	553a	501b	510b
Março	553a	503b	512b
Abril	554a	504b	514b
Maio	563a	518b	512b
Junho	570a	517b	514b

* Médias com letras diferentes no sentido de linha diferem ($p<0,05$) pelo teste Tukey

Figura 2 - Peso dos animais (g) dos grupos SR (dieta A), RCI (dieta B) e RCII (dieta C) durante período experimental de 12 meses

O peso das gorduras retroperitoneal e periepididimal em conjunto foi maior em animais que receberam dieta com 3900 Kcal/EB ($12,3 \pm 1,2$ gramas) comparado aos animais que receberam dietas com níveis calóricos de 3500 Kcal/EB ($9,02 \pm 1,8$ gramas) e 2700 kcal/EB ($9,1 \pm 1,5$ gramas). Entretanto esta diferença não se mostrou significativa ($p > 0,05$) (Figura 3).

Figura 3 - Peso (g) das gorduras retroperitoneal e periepididimal, consideradas em conjunto, dos animais dos grupos SR (dieta A), RCI (dieta B) e RCII (dieta C)

5. 2 MENSURAÇÕES DO SEGMENTO INTESTINAL

As mensurações do segmento intestinal obtidas estão sendo apresentadas em comprimento e área intestinal e espessura da túnica muscular do cólon

5.2.1 Mensuração do comprimento (cm) e da área intestinal (mm²)

O comprimento (cm) e a área (mm²) dos segmentos intestinais não diferiram ($p > 0,05$) entre os grupos ao longo do envelhecimento quando comparados ao grupo CI (seis meses) (Tabelas 5 e 6). Também não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) no comprimento e a área intestinal entre os grupos SR (dieta A), RCI (dieta B) e RCII (dieta C).

Tabela 5 – Média das mensurações (cm) do comprimento do cólon proximal (CP) e distal (CD) dos animais dos grupos CI (seis meses), SR (dieta A), RCI (dieta B) e RCII (dieta C)

	Comprimento intestinal/cm			
	NADPH - diaforase		Acetilcolinesterase	
	CP	CD	CP	CD
CI	8,3±0,77 _a	6,3±0,55 _a	8,4±0,61 _a	6,5±0,64 _a
SR	9,2±1,1 _a	7,1±0,71 _a	9,1±1,2 _a	7,3±0,72 _a
RCI	9,1±0,83 _a	7±0,94 _a	8,9±0,87 _a	7,6±0,92 _a
RCII	8,7±0,91 _a	6,9±0,87 _a	8,8±0,97 _a	6,9±0,84 _a

* Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem pelo teste de Scott Knott

Tabela 6 – Média das mensurações (mm²) da área do cólon proximal (CP) e distal (CD) dos animais dos grupos CI (seis meses), SR (dieta A), RCI (dieta B) e RCII (dieta C)

	Área colônica/mm ²			
	NADPH - diaforase		Acetilcolinesterase	
	CP	CD	CP	CD
CI	2051,2±274 _a	1919±210,9 _a	2103,4±197,7 _a	2120,6±257,5 _a
SR	2131,6±309 _a	2033,8±140,6 _a	2175±129,6 _a	2098,6±204,7 _a
RCI	2179,6±214 _a	2132±303,2 _a	2162,4±150,6 _a	2174,2±223,8 _a
RCII	2035,6±153,8 _a	2053,2±178 _a	2097,2±117,2 _a	2022,4±138 _a

* Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem pelo teste de Scott Knott

5.2.2 Morfometria da túnica muscular

A espessura da túnica muscular compreendida pelas camadas musculares longitudinal e circular do cólon proximal e distal foi mensurada (μm) nos quatro grupos de animais (Figura 4).

Figura 4 – Fotomicrografias de cortes transversais do cólon evidenciando a túnica muscular (cabeça de seta) dos animais dos grupos CI, SR, RCI e RCII. Hematoxilina-eosina (Barra: 100 μm)

Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) na espessura da túnica muscular com o envelhecimento e entre os diferentes níveis de restrição calórica (12,5 e 31%) no cólon proximal e distal (Tabela 7).

Tabela 7 - Média da espessura da túnica muscular (μm) do cólon proximal e distal dos animais dos grupos CI, SR, RCI e RCII

Grupos animais	Espessura da túnica muscular (μm)	
	Cólon Proximal	Cólon Distal
CI	135,7 $\pm$ 35,2 _a	143,7 $\pm$ 24,6 _a
SR	148,2 $\pm$ 24,5 _a	152,9 $\pm$ 26,7 _a
RCI	147,8 $\pm$ 19,3 _a	151,1 $\pm$ 19,5 _a
RCII	146,9 $\pm$ 24,2 _a	150,2 $\pm$ 16,8 _a

*Médias com letras iguais não diferem pelo teste de Scott Knott

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Não foram observadas diferenças expressivas com o envelhecimento e a RC na análise ultraestrutural dos gânglios mioentéricos entre os quatros grupos estudados (CI, SR, RCI e RCII). Os gânglios mioentéricos estavam localizados no espaço periganglionar (EPG) compreendido entre as túnicas circular e longitudinal da camada muscular (Figura 5).

O EPG apresentou-se constituído por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas com diferentes orientações espaciais, assim como fibroblastos e capilares sanguíneos também foram observados. Não foram visualizadas projeções deste envoltório de tecido conjuntivo para o interior dos gânglios nos grupos estudados (CI, SR, RCI e RCII) (Figura 6).

Figura 5 - Eletrofotomicrografias dos gânglios mioentéricos do cólon dos animais dos grupos CI, SR, RCI e RCII, localizado espaço periganglionar (seta) entre as túnicas musculares (M). No interior do gânglio evidencia-se neurônios (Ne) e o nerurópilo constituído pelas células da glia (Gl) e terminações nervosas (*)

Figura 6 - Eletrofotomicrografias dos gânglios mioentéricos do cólon dos animais dos grupos CI, SR, RCI e RCII. Espaço periganglionar (seta) evidenciando a presença de fibras colágenas (*), fibroblastos (f) e vasos sanguíneos (★)

Nos animais que envelheceram sem RC (grupo SR), as fibras colágenas se mostraram mais difusas, entretanto, nos animais senis alimentados com dieta hipocalórica (grupos RCI e RCII) tais alterações não foram observadas (Figura 7).

Figura 7 - Eletrofotomicrografias dos gânglios mioentéricos do cólon evidenciando a disposição das fibras colágenas (*) no espaço periganglionar (seta) nos grupos CI, SR, RCI e RCII

No interior do gânglio, as células da glia se mostraram mais abundantes em relação aos neurônios. Ambos os tipos celulares apresentaram membranas citoplasmáticas e nuclear íntegras em todos os grupos estudados. Regiões de comunicação entre as membranas citoplasmáticas destes neurônios (sinapses) foram visualizadas (Figura 8).

Em relação ao núcleo, foi possível a distinção entre células da glia entérica e neurônios. As células da glia apresentaram a membrana nuclear bastante irregular com aspecto “amebóide”, já os neurônios apresentaram núcleo arredondado, de contorno regular e nucléolo bastante evidente (Figura 5 e 6).

Figura 8 - Eletrofotomicrografias dos gânglios mioentéricos do cólon dos animais dos grupos CI, SR, RCI e RCII. No interior do gânglio observa-se os neurônios (Ne) e células da glia (Gl) com suas membranas plasmáticas (cabeça de seta) e nucleares (setas) preservadas

No citoplasma de ambos os tipos celulares evidenciaram-se várias organelas, dentre elas, complexo de Golgi, agregados de retículo endoplasmático rugoso, ribossomos livres ou aderidos às cisternas do retículo endoplasmático e numerosas mitocôndrias (Figura 9).

No nucleoplasma das células gliais, a cromatina estava predominantemente dispersa (eucromatina), porém, junto à superfície interna da membrana nuclear observou-se cromatina mais densa (heterocromatina). Nos neurônios predominou a eucromatina em todos os grupos estudados (Figura 8).

Em todos os grupos estudados, o interior dos gânglios mioentéricos continha neurônios e denso neurópilo (processos neuronais e células da glia). Vesículas sinápticas agranulares (colinérgicas) e granulares (adrenérgicas), arredondadas ou ovóides, foram observadas nas terminações nervosas do neurópilo (Figura 10).

Figura 9 - Eletrofotomicrografias dos gânglios mioentéricos do cólon dos animais dos grupos CI, SR, RCI e RCII. Nota-se no citoplasma dos neurônios (Ne) e células da glia, organelas citoplasmáticas: complexo de Golgi (CG), retículo endoplasmático rugoso (seta), ribossomos livres (*) e mitocôndrias (m)

Figura 10 - Eletrofotomicrografias dos gânglios mioentéricos do cólon dos animais dos grupos CI, SR, RCI e RCII. evidenciando neuropilo com presença de vesículas granulares (setas) e agranulares (*)

5. 4 ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS

Os resultados resultantes da análise morfoquantitativa dos neurônios mioentéricos do cólon serão apresentados separadamente como densidade neuronal e morfometria da área do corpo celular neuronal

5.4.1 Densidade Neuronal

Os resultados referentes à análise quantitativa dos neurônios mioentéricos obtidos nos preparados de membrana marcados pela NADPH-dp e Acetilcolinesterase (Figuras 11 e 12) foram expressos por meio da média e desvio padrão de neurônios por mm² dos cólons proximal e distal dos grupos estudados.

Como não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) com o envelhecimento na área (mm²) do cólon próxima e distal, a densidade neuronal (mm²) apresentada não foi alterada pela diluição neuronal decorrente de aumento da área intestinal relatada no processo de envelhecimento (Tabela 6).

Figura 11 – Fotomicrografia de preparados de membrana do cólon evidenciando gânglios com neurônios marcados pela NADPH-dp dos grupos CI, SR, RCI e RCII (Barra: 100 μ m)

Figura 12 – Fotomicrografia de preparados de membrana do cólon evidenciando gânglios com neurônios marcados pela Acetilcolinesterase nos grupos CI, SR, RCI e RCII (Barra: 100 μ m)

Ao compararmos os grupos CI e SR, observa-se que a densidade dos neurônios NADPH-dp aumentou significativamente ($p < 0,05$) com o envelhecimento nas duas regiões estudadas do cólon (CP e CD). Entretanto, este aumento mostrou-

se minimizado nos animais dos grupos RCI e RCII que receberam as dietas hipocalóricas B e C, respectivamente (Tabela 8 e Figura 13). Não houve diferenças significativas ($p>0,05$) na densidade entre os grupos RCI e RCII que receberam as dietas experimentais.

Tabela 8 – Média da densidade de neurônios NADPH-dp por mm^2 de cólon dos animais dos grupos CI (seis meses), SR (dieta A), RCI (dieta B) e RCII (dieta C)

Grupos animais	Densidade neuronal/ mm^2	
	Cólon Proximal	Cólon Distal
CI	$107,12 \pm 2,2a$	$93,95 \pm 1,9a$
SR	$117,76 \pm 1,9b$	$115,2 \pm 1,2b$
RCI	$105,4 \pm 6,6a$	$91,4 \pm 2,2a$
RCII	$105,5 \pm 3,5a$	$94,4 \pm 1,7a$

*Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem ($p>0,05$) pelo teste de Scott Knott

Figura 13 – Média da densidade de neurônios NADPH-dp (mm^2) do cólon proximal (CP) e distal (CD) dos animais dos grupos CI (6 meses), SR (dieta A), RCI (dieta B) e RCII (dieta C)

Contatou-se que para os neurônios acetilcolinesterase positivos o envelhecimento promoveu diminuição na densidade neuronal nas duas regiões estudadas (CP e CD), sendo esta diferença significativa ($p>0,05$) no CP. A

diminuição neuronal em decorrência do envelhecimento não foi observada nos grupos RCI e RCII que receberam as dietas experimentais B e C, respectivamente. No CP a redução na densidade neuronal se mostrou significativa ($p < 0,05$) com o envelhecimento nos animais do grupo RCI.

Em relação aos níveis de restrição calórica (dietas B e C), apenas no CP foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) na densidade de neurônios (grupos RCI e RCII) sem diferença entre os dois níveis de restrição calórica (Tabela 9 e figura 14).

Tabela 9 – Média da densidade de neurônios Acetilcolinesterase (mm^2) dos animais dos grupos CI (6 meses), SR (dieta A), RCI (dieta B) e RCII (dieta C)

Grupos animais	Densidade neuronal/ mm^2	
	Cólon Proximal	Cólon Distal
CI	$166,6 \pm 6,24a$	$160,95 \pm 8,27a$
SR	$138,62 \pm 4,57b$	$146,92 \pm 13,74a$
RCI	$152,5 \pm 5,6c$	$154,5 \pm 10,2a$
RCII	$161,92 \pm 3,2a$	$163,0 \pm 0,7a$

*Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem pelo teste de Scott Knott

Figura 14 – Média da densidade de neurônios acetilcolinesterase positivos/ mm^2 de cólon proximal (CP) e distal (CD) dos animais dos grupos CI (6 meses), SR (dieta A), RCI (dieta B) e RCII (dieta C)

5.4.2 Análise morfométrica

Todos os neurônios acetilcolinesterase e NADPH-diaforase positivos quantificados no cólon dos animais dos quatro grupos estudados (CI, SR, RCI e RCII) tiveram a área do perfil celular (PC) mensurada em μm^2 . Os resultados obtidos foram distribuídos em histograma de frequência de acordo com a dimensão das mensurações utilizando-se intervalos de classe de $150 \mu\text{m}^2$.

Foi possível observar aumento na área do PC dos neurônios NADPH-diaforase positivos com o envelhecimento, ao compararmos os animais do grupo CI (seis meses) com o grupo SR (18 meses), sendo este aumento significativo ($p < 0,05$) no cólon proximal. Entretanto o aumento foi minimizado nos animais que envelheceram com RC em sua dieta (12,5 e 31% de RC). No cólon distal do grupo RCII ocorreu redução significativa na área do perfil celular ($p < 0,05$) (Tabela 10).

No grupo CI (seis meses) a média do PC variou de 94,65 a 612,18 μm^2 no CP e de 113,56 a 676,8 μm^2 no CD. Para o grupo SR (dieta A) a variação foi de 85,75 a 612,3 μm^2 e 118,6 a 679,2 μm^2 nos CP e CD, respectivamente. Nos grupos RCI (dieta B) e RCII (dieta C) a variação no PC no CP foi de 98,5 a 564,42 μm^2 e no CD de 115,7 a 668,52 μm^2 , respectivamente.

Tabela 10 - Médias da área do perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios NADPH-diaforase positivos do cólon proximal e distal dos animais dos grupos CI (seis meses), SR (dieta A), RCI (dieta B) e RCII (dieta C)

Grupos animais	Área do perfil celular (μm^2)	
	Cólon Proximal	Cólon Distal
CI	261,82 $\pm$ 92,54a	269,63 $\pm$ 94,97a
SR	330,20 $\pm$ 115,95b	294,5 $\pm$ 97,45a
RCI	273,76 $\pm$ 96,34a	286,38 $\pm$ 98,63a
RCII	230,34 $\pm$ 72,79a	235,69 $\pm$ 73,8a

*Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem pelo teste de Scott Knott

Em todos os grupos (CI, SR, RCI e RCII) predominaram neurônios NADPH-diaforase positivos com área do PC incluída no intervalo entre 150 e 300 μm^2 (Figura 15).

Figura 15 - Histograma de distribuição de frequência (%) da área do perfil celular (μm^2) dos neurônios mioentéricos NADPH-dp do cólon dos animais dos grupos CI (seis meses), SR (dieta A), RCI (dieta B) e RCII (dieta C)

Em relação à média da área do PC dos neurônios acetilcolinesterase positivos foi possível observar diminuição, ainda que não significativa ($p > 0,05$), na dimensão do PC com o envelhecimento e restrição calórica (Tabela 11)

A média do PC do grupo CI (seis meses) variou de 113,93 a 666,54 μm^2 no CP e de 150,75 a 690,16 μm^2 no CD. Para o grupo SR (dieta A), a variação foi de 113,5 a 686,7 μm^2 e 103,5 a 653,7 μm^2 no CP e CD, respectivamente. Para o PC dos grupos RCI (dieta B) e RCII (dieta C) a variação foi de 287,8 a 277,3 μm^2 no CP e no CD foi de 299,1 a 270,2 μm^2 , respectivamente.

Tabela 11 - Média da área do perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios acetilcolinesterase positivos do cólon proximal e distal dos animais dos grupos CI (seis meses), SR (dieta A), RCI (dieta B) e RCII (dieta C)

Grupos animais	Área do perfil celular (μm^2)	
	Cólon Proximal	Cólon Distal
CI	294,39 $\pm$ 94,84a	318,21 $\pm$ 108,24a
SR	293,4 $\pm$ 98,1a	299,06 $\pm$ 113,45a
RCI	287,8 $\pm$ 93,94a	299,1 $\pm$ 106,5a
RCII	277,31 $\pm$ 98,95a	270,16 $\pm$ 93,18a

*Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem pelo teste de Scott Knott

Em todos os grupos (CI, SR, RCI e RCII) predominaram neurônios acetilcolinesterase positivos com área do PC incluída no intervalo entre 150 e 300 μm^2 (Figura 16).

Figura 16 - Histograma de distribuição de frequência (%) da área do perfil celular (μm^2) dos neurônios mioentéricos acetilcolinesterase positivos do cólon dos animais dos grupos CI (seis meses), SR (dieta A), RCI (dieta B) e RCII (dieta C)

6 DISCUSSÃO

Uma das formas de intervenção nutricional mais amplamente discutidas para se estender o tempo de vida de uma variedade de espécies animais, inclusive os mamíferos, tem sido a RC (WEINDRUCH; SOHAL, 1997; ANTEBI, 2007). Devido a sua atuação sobre o metabolismo celular, a RC tem sido indicada por apresentar redução da incidência e progressão de doenças crônicas relacionadas com o avanço da idade (BISHOP; GUARENTE, 2007).

A restrição de calorias de uma dieta pode ser feita pela diminuição da quantidade de alimento fornecido (restrição alimentar) ou por manipulação dos componentes da dieta (restrição calórica). No primeiro caso, a restrição alimentar restringe a disponibilidade não apenas do conteúdo calórico da dieta, mais diminui também a oferta de outros componentes, como proteínas, minerais e aminoácidos. No segundo caso é possível formular rações que altere apenas o fornecimento de calorias, mantendo os outros componentes em concentrações ideais e necessárias para manutenção e reprodução dos animais.

Em nosso trabalho utilizamos dieta manipulada, a fim de assegurarmos que os demais componentes da mesma fossem mantidos em proporções adequadas para a manutenção do animal sem induzir a mínima desnutrição. Entretanto, a maioria das pesquisas conduzidas com RC tem utilizado diminuição da quantidade de alimento sem manipulação da quantidade e qualidade calórica das dietas (SANTER; BAKER, 1988; GABELA, 1989; KARAOSMANOGLU et al., 1996; COWEN et al., 2006).

6.1 ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE

A obtenção de estimativas de digestibilidade é importante para determinar o valor energético das dietas, possibilitando o balanceamento adequado que propicie o atendimento das demandas do animal para manutenção e produção (DETMANN et al., 2006). Medidas de digestibilidade dos nutrientes servem para qualificá-los quanto ao seu valor nutritivo e são importantes para quantificar a absorção dos

nutrientes e avaliar as dietas, bem como, a eficiência de uso da dieta pelo animal (VAN SOEST, 1994). Assim, conduzimos ensaios de digestibilidade das rações formuladas nesta pesquisa para assegurar a RC sem o risco de induzir qualquer nível de desnutrição aos animais.

Como o fornecimento das dietas era padronizado, o consumo entre as dietas A, B e C não diferiu entre os grupos, contudo, a diferença na composição química das dietas promoveu maior ingestão ($p < 0,05$) de energia bruta pelos animais que receberam a dieta contendo 3900 Kcal/EB (grupo SR).

Em relação à excreção de fezes, os animais do grupo RCII que receberam dieta contendo 2700 Kcal/EB (dieta C) apresentaram excreção menor de fezes ($p < 0,05$) em relação aos animais dos grupos SR e RCI que consumiram dietas contendo 3900 (dieta A) e 3500 Kcal/EB (dieta B), respectivamente.

Os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta e energia bruta apresentaram melhores resultados ($p < 0,05$) para os animais que consumiram dieta contendo 2700 Kcal/EB (grupo RCII).

Os resultados verificados com a digestibilidade são justificados primeiro pelo fato de que animais submetidos à RC desenvolvem adaptações morfofuncionais que resultam em melhores coeficientes de digestibilidade como os ocorridos para a dieta contendo 2700 Kcal/EB (dieta C, grupo RCII). Entre estas adaptações encontra-se a lentificação do esvaziamento gástrico (LIMA et al., 2000). Associado a este fato, tem que ser considerado o teor de fibra na dieta que, devido a sua correlação negativa com a energia, ficou um ponto percentual menor na dieta contendo 2700 Kcal/EB (grupo RCII). O intestino grosso (ceco e cólon) participa da regulação da taxa de passagem da digesta alimentar através do TGI, desta forma rações contendo menor nível de ingredientes fibrosos favorecem a menor velocidade da taxa de passagem da digesta pelo TGI em resposta ao estímulo mecânico de distensão diminuído em decorrência do menor teor de fibra.

Assim, a melhora na digestibilidade dos componentes dietéticos estudados na dieta C estaria associada ao maior do tempo de digestão enzimática e microbiana nos intestinos delgado e grosso, respectivamente, fato facilmente evidenciado pela menor quantidade de fezes excretada (4,68 gramas/dia) pelos animais do grupo RCII que receberam a dieta C (2700 Kcal/EB). Em suínos, Kass et al. (1980) e Ravidran et al. (1984) verificaram que rações contendo ingredientes

fibrosos aceleram a taxa de passagem da digesta pelo TGI com redução da digestibilidade dos componentes dietéticos das rações.

6.2 ANÁLISE DE DESEMPENHO

Em relação à análise de desempenho, no primeiro mês (julho) do experimento quando as dietas foram fornecidas a vontade para estabelecer o padrão de consumo, não houve diferença ($p>0,05$) no desempenho dos animais nos diferentes tratamentos (grupos SR, RCI e RCII). A partir do segundo mês de experimento (agosto), quando as dietas passaram a ser fornecida de forma controlada, verificou-se ganho de peso contínuo nos animais do grupo SR que receberam dieta contendo 3900 Kcal/EB/kg em relação aos animais que receberam as demais dietas (grupos RCI e RCII). Por outro lado, a partir do controle de fornecimento das dietas, foi verificada perda de peso nos animais consumindo dietas com níveis menores de energia (dietas B e C), seguida de recuperação e estabilização ao longo de todo experimento.

Os animais alimentam-se para satisfazer suas necessidades energéticas, cessando então o apetite. Desta forma, é fundamental conhecer as necessidades energéticas de cada classe animal. As necessidades energéticas dos ratos estão ligadas primeiramente ao seu peso metabólico, isto é, o peso físico elevado a potência 0,75 e que multiplicado por um fator constante (112 em ratos) (NRC, 1995) define as necessidades energéticas para manutenção. Assim, considerando o peso final dos animais, verificou-se que as necessidades energéticas para manutenção eram de 73,2 Kcal/dia, 68,32 Kcal/dia e 67,76 Kcal/dia para os tratamentos de 3900 (grupo SR), 3500 (grupo RCI) e 2700 Kcal/EB (grupo RCII), respectivamente. Estes valores foram facilmente supridos pelas dietas experimentais A, B e C contendo os três níveis de energia onde o consumo diário de energia, considerando o fornecimento de ração, foram, respectivamente, 109,2 Kcal, 98 Kcal e 76 Kcal de energia bruta para animais recebendo dietas contendo 3900, 3500 e 2700 Kcal/EB, respectivamente.

O peso da gordura retroperitoneal e periepididimal, consideradas em conjunto, foi maior ($p<0,05$) nos animais do grupo SR que receberam dieta com 3900 Kcal/EB

(12,3±1,2 g) comparado aos animais que receberam dietas com níveis calóricos de 3500 Kcal/EB (9,02±1,8g) e 2700 Kcal/EB (9,11±1,5 g), respectivamente. Resultados semelhantes com redução na gordura corporal foram observados em vários experimentos com animais de outras espécies. Pekas (1993) trabalhando com restrição alimentar para suínos também observou redução na gordura corporal dos animais. Em aves, Fontana et al. (1993) e Palo et al. (1995) relataram redução na gordura da carcaça quando os animais foram submetidos à restrição alimentar.

A gordura retroperitoneal e perididimal reduzida é consequência da RC imposta aos animais, demonstrando que ocorre uma mobilização desta reserva de energia. Embora de modo menos intenso, este efeito também ocorreu em relação à massa muscular dos animais, percebido pelo menor peso dos animais submetidos à RC (grupos RCI e RCII), principalmente no início do experimento. Em camundongos submetidos à restrição alimentar, Viola et al. (1998) constataram efeitos semelhantes como diminuição da gordura corporal e da massa muscular.

6.3 MENSURAÇÕES DO SEGMENTO INTESTINAL

Como entre as alterações decorrentes do envelhecimento há relatos de aumento nas dimensões do intestino e atrofia da camada muscular (GABELLA, 1986; CARVALHO-FILHO, 2007), procedemos a averiguação destes parâmetros no cólon para evitar que as variações nas dimensões deste segmento intestinal interferisse nas análises da densidade e morfometria neuronal pretendidas.

Como ressaltado por Gabella (1989), alterações na área intestinal devem ser verificadas em estudos quantitativos, para se evitar a diluição neuronal que levaria a redução aparente na densidade de neurônios (GABELLA, 1989). Entretanto, muitos estudos ainda reportam dados quantitativos, sem mensurar as dimensões intestinais (PECK et al., 2009).

Para que as variações na área intestinal não interfiram nas análises quantitativas e morfométricas induzindo interpretações errôneas, é descrito na literatura a utilização de um fator de correção. Este fator é obtido pela razão entre a área do intestino do animal jovem pela área do animal senil (GABELLA, 1989; JOHNSON et al., 1998; PHILLIPS; POWLEY, 2001; PECK et al., 2009).

A área colônica (CP e CD) não diferiu ao longo do envelhecimento e não foi alterada pelas dietas contendo diferentes níveis de caloria (Tabela 6), permitindo a comparação direta de nossos resultados entre os grupos sem a necessidade da utilização do fator de correção.

Assim como em nossa pesquisa, Gagliardo et al. (2008) também não verificaram alterações na área (comprimento x largura) do colo de animais durante o envelhecimento. Entretanto, variações no comprimento do intestino delgado são mencionadas em ratos, com aumento nesta dimensão do desmame até os 60 dias de idade, manutenção até os 210 dias e redução significativa após os 345 dias (MARESE et al., 2007). Do mesmo modo, Johnson et al. (1998) e Phillips et al. (2003) verificaram aumento gradual do comprimento intestinal durante o envelhecimento. Contudo nesses relatos, apenas o comprimento intestinal foi considerado, não nos permitindo estimar a área intestinal para compararmos com nossos resultados. Devemos ressaltar que entre os grupos estudados (CI, SR, RCI e RCII) não ocorreram variações significativas no comprimento do cólon.

O fato da área do cólon não ter diferido entre os grupos analisados pode estar relacionado ao período de vida considerado (de 6 a 18 meses), ao segmento intestinal escolhido e também à qualidade nutricional das dietas que, embora com diferentes níveis calóricos, não teve constituição modificada para proteína. Dieta hipoprotéica promove redução 17,6% no comprimento do jejuno-íleo de ratos com 90 dias de idade (MOREIRA et al., 2008).

A diminuição do tamanho do intestino, quando ocorre, pode ser considerada uma resposta adaptativa a redução na quantidade da dieta ingerida ou a diminuição do metabolismo (ARAÚJO et al., 2006). Alterações no órgão podem ser repercutidas em diferentes níveis na estrutura e organização celular (TORREJAIS et al., 1995).

Em relação à espessura da túnica muscular não foram verificadas alterações morfológicas com o envelhecimento e os diferentes níveis de RC. No intestino delgado de ratos a espessura da túnica muscular também não foi alterada durante o desenvolvimento compreendido entre 21 a 428 dias (MARESE et al., 2007), contudo Nowak et al. (1990) verificaram redução na espessura da musculatura lisa do cólon de ratos jovens.

Também, a manutenção da espessura da túnica muscular relatada em nosso trabalho e por outras pesquisas (HERNANDES et al., 2000; NATALI et al., 2005; MARESE et al., 2007) pode ser justificada pela ausência de desnutrição protéica ou

calórica decorrente das dietas utilizadas, uma vez que dietas hipoprotéicas são responsáveis pela redução na espessura da túnica muscular em roedores (TORREJAIS et al., 1995; NATALI et al., 2005).

6.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Em relação à ultraestrutura dos gânglios mioentéricos, não observamos alterações morfológicas com o envelhecimento e a RC entre os grupos estudados (CI, SR, RCI e RCII). Em animais de meia idade (12 meses) também não foram descritas alterações ultraestruturais com o envelhecimento nos gânglios (MARI et al., 2008).

Os gânglios mioentéricos foram evidenciados entre as camadas circular e longitudinal da túnica muscular, sendo esta localização bem descrita em mamíferos (GABELA, 1972; 1989; NATALI et al., 2000; FURNESS, 2009).

O espaço periganglionar (EPG) apresentou-se constituído por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, estando este tecido limitado à periferia do gânglio sem emissões de projeções para o interior do mesmo. Não foi observada em todos os grupos estudados a presença de vasos sanguíneos no interior dos gânglios mioentéricos.

A presença de tecido conjuntivo com seus feixes colágenos circundando os gânglios confere sustentação e proteção aos neurônios e células gliais. Importante ressaltar que a disposição e a função protetora deste envoltório de tecido conjuntivo se assemelham com o sistema nervoso central (STERNINI, 1988; NATALI, 2000).

Septos de tecido conjuntivo no interior do gânglio mioentérico em gatos e carneiros foram descritos (GABELLA, 1982, 1990). Devido à localização entre as camadas da túnica muscular, o plexo mioentérico é afetado pela contração muscular, contudo o envoltório de tecido conjuntivo confere proteção aos glânglios. Assim, a presença de septos conjuntivos no interior dos gânglios em vertebrados de grande porte, e ausente em outros animais como os roedores, representa um reforço de proteção ao gânglio contra os vigorosos movimentos peristálticos realizados pelo intestino dos grandes mamíferos (GABELLA, 1982).

Ainda, em virtude dos gânglios apresentarem-se avasculares, a vascularização do tecido conjuntivo assume a função de nutrição do tecido nervoso através da difusão dos nutrientes (GABELLA; HALASY, 1987; MOLINARI et al., 1994). Inclusive, Gabella (1982) sugere a constituição de barreira sanguínea mioentérica à semelhança da barreira hematoencefálica do sistema nervoso central, a qual promoveria maior proteção para os neurônios mioentéricos.

Apesar de não termos quantificado fibras colágenas, observamos que as fibras colágenas constituintes do envoltório ganglionar se apresentaram mais dispersas nos animais de 18 meses alimentados com dieta normal (grupo SR), em relação aos animais de mesma idade (grupos RCI e RCII) que receberam as dietas hipocalóricas (12,5 e 30% de restrição). Tais alterações foram relatadas por Mari et al. (2008) em ratos com 12 meses de idade. Desta forma, podemos inferir que a desorganização estrutural no envoltório conjuntivo ganglionar se inicia a partir da meia idade se tornando mais pronunciada com o envelhecimento.

Apesar da ausência de alterações morfológicas evidentes, deve-se ressaltar que a RC se mostrou eficaz na preservação da organização do tecido conjuntivo quando as amostras dos grupos RCI e RCII foram comparadas com as dos animais do grupo CI (seis meses). Outro fator responsabilizado por minimizar os efeitos do envelhecimento sobre as fibras colágenas é a atividade física relatada por Mari et al. (2008) ao constatarem que animais que iniciaram o envelhecimento praticando exercícios regulares apresentaram envoltório ganglionar com características morfológicas semelhantes as de animais adultos (seis meses).

Não visualizamos alterações nas células mioentéricas e gliais com o envelhecimento e RC. As características morfológicas dos neurônios e células da glia entérica, por nós observadas, foram descritas no intestino grosso de cobaias, macacos e humanos (BAUMGARTEN et al., 1970; NATALI et al., 2000) e no intestino delgado de ratos (MARI et al., 2008).

Natali et al. (2000) relatam que, independente da espécie animal ou do segmento intestinal, os núcleos dos neurônios mioentéricos possuem características ultraestruturais peculiares que permitem distingui-los das células gliais entéricas.

Em todos os grupos estudados constatamos prevalência de células da glia em relação ao número de neurônios. Corroborando nossos resultados, é relatado que em ratos a proporção de células gliais normalmente é de duas ou três para cada

neurônio, sendo que as células gliais aumentam em número com o tamanho da espécie animal (GABELLA, 1990).

As terminações nervosas constituintes do neurópilo apresentaram vesículas sinápticas granulares e agranulares de diferentes tamanhos como também descritas na literatura (GABELLA, 1990; NATALLI, 1999; SAFREY, 2004; LIBERTI et al., 2007; MARI et al., 2008).

A presença das vesículas sinápticas é de fundamental importância para a transmissão de impulsos nervosos no interior do gânglio, uma vez que estas podem armazenar diferentes tipos de neurotransmissores os quais determinam a função neuronal a ser desempenhada. No plexo mioentérico há predominância de vesículas agranulares, especialmente no intestino grosso, uma vez que a acetilcolina é responsável pela contração da musculatura necessária para o peristaltismo intestinal (GABELLA, 1982).

Distribuídas pelo citoplasma, as organelas citoplasmáticas como mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e ribossomos apresentaram-se íntegras nos grupos estudados, sugerindo que as células estavam metabolicamente ativas e viáveis, o que pode ser comprovado pela presença de eucromatina nos núcleos dos neurônios e de células da glia dos grupos analisados (CI, SR, RCI e RCII). Ressalta-se que, quando em atividade de síntese protéica, o DNA nucléico encontra-se mais descompactado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

6.5 ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS

A análise quantitativa realizada neste trabalho se deu em preparados de membrana do cólon (CP e CD). A utilização de preparados de membrana é uma maneira eficiente para estudo da população neuronal, assim como torna possível uma amostragem do grande número de gânglios em apenas um único preparado de tecido (SAFFREY, 2004).

Para tanto, foram evidenciados populações de neurônios mioentéricos por meio das técnicas histoquímicas da NADPH-diaforase (SCHERER-SINGER et al., 1983) e Acetilcolinesterase (KARNOVSKY; ROOTS, 1964). A NADPH-diaforase

evidencia neurônios que também expressam óxido nítrico (NO), assim como, a acetilcolinesterase evidencia neurônios colinérgicos.

Alterações na densidade de diferentes populações neuronais mioentéricas durante o envelhecimento em várias regiões do TGI são relatadas na literatura, indicando diminuição, manutenção ou aumento na quantidade de neurônios conforme a subpopulação neuronal analisada.

Perda neuronal com o envelhecimento (6-24 meses) no intestino delgado e grosso foi relatada por Santer e Baker (1988) que reportaram diminuição de 40% da população neuronal NADH reativos no jejuno, 43% no íleo, 64% no cólon e 42% no reto de ratos. Redução quantitativa, com diferentes populações neuronais, também foi verificada no intestino delgado de cobaias (GABELLA, 1989) e no cólon de ratos (PHILLIPS; POWLEY, 2001; PHILLIPS et al., 2003). Em humanos, é relatada diminuição de 34% no número de neurônios mioentéricos do intestino delgado, sendo que no duodeno a redução na densidade mostrou-se mais intensa do que nos demais segmentos intestinais (SOUZA et al., 1993)

Quando comparados os animais de 18 meses de idade (grupo SR) aos animais de seis meses de idade (grupo CI), observamos aumento significativo ($p < 0,05$) de 8,9% e 18,4% na densidade de neurônios NADPH-diaforase positivos (NADPH-dp) com o envelhecimento no CP e CD, respectivamente. Corroborando com nossos resultados, estudos realizados por Belai et al. (1995) e Cowen et al. (2000) relatam aumento de 24% e 6% na densidade de neurônios que expressam NO para o cólon de ratos durante o envelhecimento. O aumento na população nitrérgica com o envelhecimento sugere que estes neurônios se mantêm mais invulneráveis a morte celular do que outras populações neuronais, sendo assim poupados durante o processo de envelhecimento (SANTER, 1994).

A densidade neuronal no grupo SR (18 meses sem RC) também foi superior ($p < 0,05$) à dos grupos CRI e CRII (18 meses com RC), os quais mantiveram a densidade neuronal equiparada às dos animais do grupo CI (seis meses). Cowen et al. (2000) relataram aumento não significativo de 13,3% na densidade de neurônios mioentéricos nitrérgicos em animais submetidos a restrição alimentar ao longo do envelhecimento em relação a animais de mesma idade alimentados com dieta normal.

Outros autores constataram diminuição significativa no número de neurônios que expressam NO no cólon de ratos durante o processo de envelhecimento

(TAKAHASHI et al., 2000; GAGLIARDO et al., 2008). Contudo, alterações na densidade com diminuição de neurônios nitrérgicos não foram verificadas por Phillips et al. (2003) no cólon e no reto ao compararem ratos jovens (três meses) com ratos velhos (24 meses).

O fato do grupo SR apresentar maior densidade neuronal, em vez de diminuição, pode estar relacionado ao tempo de envelhecimento analisado (18 meses) que foi superior e, assim, diferiu da idade dos animais analisados pelos pesquisadores que relataram diminuição na densidade neuronal.

A perda neuronal ocorre ao longo da vida, assim seria plausível supor que aos 18 meses ou mais de idade os neurônios mioentéricos remanescentes passem a assumir as funções dos neurônios perdidos, refletindo em aumento compensatório de subpopulações neuronais, tendo em vista a plasticidade neuronal. Neurônios entéricos podem liberar mais de um tipo de neurotransmissor (FURNESS, 2006). Além disso, no reto de suínos, Cserni et al. (2007) e Beck et al. (2009) evidenciaram colocalização de atividade nitrérgica e colinérgica em neurônios entéricos de intensidade que diminui com a idade. Também alterações no código químico para expressão de neurotransmissores têm sido observadas em casos de colite ulcerativa (NEUNLIST et al., 2003) e colocalização nitrérgica e colinérgica foi descrita no reto de sujeitos portadores de doença de Crohn assintomática, indicando uma resposta regenerativa do plexo mioentérico nesses casos (SCHNEIDER et al., 2001).

Cserni et al. (2007) sugerem que a colocalização de NO e acetilcolina pode representar neurônios imaturos que, com o tempo, assumem um neurotransmissor como seu principal conteúdo. Assim, sendo tais evidências reforçam nossas suposições para justificar aumento na população de neurônios NADPH-dp no cólon dos animais do grupo SR.

Com o envelhecimento, no grupo SR observou-se nos CP e CD redução de 16,8% e 8,7% na população de neurônios colinérgicos, respectivamente, sendo que no CP esta diferença se mostrou significativa ($p < 0,05$). Análises do plexo mioentérico do cólon entre ratos jovens (4-8 meses) e senis (22-24 meses) também revelaram redução na população neuronal colinérgica (ROBERTS et al., 1994). Phillips et al. (2003) relatam diminuição dos neurônios que expressam acetilcolina no intestino delgado e grosso de ratos da linhagem Fisher 344. Cowen et al. (2000) também constataram diminuição (62%) desta população neuronal com o envelhecimento no íleo de ratos entre os 16 e 24 meses.

Nos grupos RCI e RCII, a RC minimizou a redução na densidade de neurônios colinérgicos com o envelhecimento nas duas regiões estudadas do cólon (CP e CD), uma vez que a densidade neuronal não diminuiu nas mesmas proporções observadas no grupo SR. Entretanto, a redução se mostrou menos acentuada no grupo RCII do que no grupo RCI, mantendo a densidade neuronal do grupo RCII equiparada à dos animais adultos jovens do grupo CI (seis meses).

Resultados de pesquisas têm sugerido que os neurônios mioentéricos que expressam acetilcolina são mais vulneráveis ao envelhecimento e também à restrição calórica induzida por meio de restrição alimentar, refletindo na redução da população total de neurônios observada com o avanço da idade (SCHEMANN et al., 1993; COWEN et al., 2000). Contudo, em nosso experimento constatamos que tal vulnerabilidade se torna diminuída quando animais passam a ser tratados com restrição calórica sem restrição alimentar, permitindo que a população de neurônios colinérgicos seja preservada no decorrer do envelhecimento (18 meses).

Com o envelhecimento, é relatada hipertrofia compensatória da musculatura lisa intestinal decorrente da diminuição da inervação dos músculos do TGI (SOUZA et al., 1993). Assim, a redução na densidade de neurônios mioentéricos que expressam acetilcolina, e que são os responsáveis pela contração das fibras musculares, resultaria em diminuição nas funções colônicas (XIONG et al., 1995). Entretanto, mesmo que nossos resultados não tenham demonstrado aumento significativo na espessura da túnica muscular, poderíamos sugerir que, em animais com idades mais avançadas, tais efeitos passariam já a ser observados.

Vários fatores são responsabilizados pela perda neuronal que acompanha o envelhecimento. A morte de neurônios com a idade pode ser atribuída ao aumento de espécies reativas ao oxigênio (ROS), desencadeando desordens neurodegenerativas no sistema nervoso central (RAHA; ROBINSON, 2000; MERRY, 2002). Segundo Thrasivoulou et al. (2000), o estresse oxidativo apresenta-se intensificado na população neuronal mioentérica durante o envelhecimento e a vasta superfície absorptiva do intestino contribuiria para aumentar o nível de exposição às ROS neste órgão (DE GIORGIO et al., 2001).

Também com o envelhecimento, além da morte de neurônios, é relatada diminuição quantitativa na população da glia entérica, que desempenha importante função na manutenção do sistema nervoso entérico (PHILLIPS et al., 2004). Desta forma, a morte das células gliais levaria a redução de fatores neurotróficos durante o

envelhecimento (DOLATSHAD et al., 2001), contribuindo, ao nosso ver, para a perda neuronal mioentérica.

Tendo em vista que o envelhecimento é responsável por alterações quantitativas significativas nos neurônios mioentéricos, buscamos analisar as alterações também na área do perfil do corpo celular (PP) destes neurônios e os possíveis efeitos da RC sobre este parâmetro.

Foi possível observar que nos animais do grupo SR que envelheceram e foram alimentados com dieta normal (dieta A) a dimensão do PP dos neurônios NADPH-dp aumentou quando comparados aos animais de seis meses (grupo CI) e aos animais idosos dos grupos RCI e RCII alimentados com dieta hipocalórica (dietas B e C). Este aumento foi de 20,70% no CP e se mostrou significativo ($p < 0,05$) em relação ao grupo CI.

Em estudo com a população total de neurônios (Hu-imunoreativos), Peck (2009) evidenciou aumentos de 4,6% e 4,9% na área do PP em animais em desenvolvimento (14-180 dias de idade) e com o envelhecimento (seis aos 24 meses), respectivamente. Contudo, aumento nas dimensões do PP não foi evidenciado em neurônios NADPH-dp no cólon de ratos de meia idade (12 meses) com o envelhecimento (GAGLIARDO et al., 2008). Nossos resultados, portanto, são indicativos de que as alterações referentes ao tamanho do PP dos neurônios mioentéricos do cólon são evidenciadas em idades mais avançadas e são postergadas por dietas hipocalóricas.

Como ressaltado, as RCs às quais foram submetidos os grupos RCI e RCII (dietas B e C) promoveram redução na área do PP dos neurônios NADPH-dp, minimizando os efeitos do envelhecimento. Contudo, no grupo SR cujos animais não foram submetidos à RC, tanto o PP como a densidade neuronal aumentaram com o envelhecimento, reforçando a suposição de que nesta condição os neurônios remanescentes tiveram que aumentar sua atividade metabólica a fim de suprir as funções intestinais. Já, em virtude da RC ter minimizado a perda de neurônios NADPH-dp com o envelhecimento, o aumento no PP não foi observado nos animais dos grupos RCI e RCII que envelheceram ingerindo as dietas hipocalóricas (dietas B e C), sendo desnecessária a hipertrofia compensatória, mantendo, assim, o PP desses neurônios equiparado ao PP dos animais do grupo CI (seis meses).

Para os neurônios que expressam acetilcolina não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) na área do PP entre os grupos analisados, fato este que não

invalida a vulnerabilidade destes neurônios em resposta ao envelhecimento tendo em vista a diminuição na densidade neuronal colinérgica constatada para os animais do grupo SR.

Os neurônios NADPH-dp e Acetilcolinesterase reativos apresentaram PP predominando entre 150 e 300 μm^2 em todos os grupos estudados (CI, SR, RCI e RCII). Contudo, nos animais do grupo RCII a incidência de neurônios NADPH-dp com dimensões inseridas no intervalo entre 150 e 300 μm^2 equiparou-se à do grupo CI (seis meses).

Gabella (1971) relata que durante o crescimento, existe um aumento no tamanho neuronal e que a população predominante nos animais recém-nascidos é a de neurônios pequenos e os neurônios maiores predominando nos animais adultos. Contudo, os animais do grupo RCII apresentaram incidência de neurônios NADPH-dp com dimensões inseridas no intervalo entre 150 e 300 μm^2 equiparada aos do grupo CI (seis meses).

Por meio das análises realizadas em nossa pesquisa, percebemos que a RC quando efetivada através do consumo de dieta corretamente formulada e balanceada para atender as necessidades nutricionais do indivíduo é benéfica por minimizar as alterações decorrentes do envelhecimento sobre o plexo mioentérico do cólon, podendo ser uma ação adjuvante na prevenção dos distúrbios intestinais que surgem a medida que se envelhece, contribuindo, assim, para melhor qualidade de vida.

Como a RC se mostrou benéfica sobre os parâmetros por nós analisados, mais estudos sobre seus efeitos no sistema nervoso entérico e demais sistemas orgânicos devem ser conduzidos e estimulados com intuito de contribuir para a compreensão holística do RC no organismo.

7 CONCLUSÃO

Nas condições em que este experimento foi conduzido podemos concluir que a restrição calórica em até 30% minimiza os efeitos do envelhecimento por:

- não comprometer o desempenho do animal em fase de manutenção;
- não interferir na área do cólon e nem na espessura da túnica muscular;
- minimizar a desorganização das fibras colágenas do envoltório ganglionar;
- manter equiparada aos animais adultos (seis meses) a densidade de neurônios NADPH-dp e colinérgicos;
- impedir a hipertrofia dos neurônios mioentéricos NADPH-dp mantendo a área do perfil celular equiparada aos animais adultos (seis meses);
- manter a área do perfil celular dos neurônios colinérgicos com dimensões semelhantes aos animais adultos (seis meses).

REFERÊNCIAS

ALEXEYEV, M. F.; LEDOUX, S.P.; WILSON, G. L. Mitochondrial DNA and aging. **Annals of clinical and laboratory science**. v.107, n.4, p. 355-64, 2004.

ANURAS, S.; LEONING-BAUCKE, V. Gastrointestinal motility in the elderly. **The Journal of the American Society for Geriatric Dentistry**, v. 32, p. 386-390, 1984

ANTEBI, A. When less is more. **Nature**, v. 447, p. 536-537, 2007.

ARAÚJO, A.E.J.; SANT'ANA, D. M. G.; MOLINARI, S. L.; MIRANDA NETO, M. H. Quantitative study of the myenteric plexus of the descending colon of young rats subjected to intense protein deficiency. **International Journal of Morphology**, v. 24,n. 4, p. 591-597, 2006.

ARITA, Y.; KIHARA, S.; OUCHI, N.; TAKAHASHI, M.; MAEDA, K.; MIYAGAWA, J.; HOTTA, K.; SHIMOMURA, I.; NAKAMURA, T.; MIYAOKA, K.; KURIYAMA, H.; NISHIDA, M.; YAMASHITA, S.; OKUBO, K.; MATSUBARA, K.; MURAGUCHI, M.; OHMOTO, Y.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 257, p. 79–83, 1999.

BAUMGARTEN, H. G.; HOLSTEIN, A. F.; OWMAN, C. H. Auerbach's plexus of mammals and man: Electron microscopic identification of three different types of neuronal processes in myenteric ganglia of the large intestine from rhesus monkeys, guinea-pigs and man. **Cell and Tissue Research**, v. 106, n. 3, 1970.

BECK, M.; SCHLABRAKOWSKI, A.; SCHRÖDL, F.; NEUHUBER, W.; BREHMER, A. ChAT and NOS in human myenteric neurons: co-existence and co-absence. **Cell Tissue Research**. In press, DOI 10.1007/s00441-009-0852-4, 2009.

BELAI, A.; BURNSTOCK, G. Distribution and colocalization of nitric oxide synthase and calretin in myenteric neurons of developing, aging, and Crohn's disease human small intestine. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 44, p. 1579-1587, 1999.

BERNHARDI, M. R. Envejecimiento: cambios bioquímicos y funcionales del sistema nervioso central. **Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría**. v. 43, n. 4, p. 297-304, 2005.

BISHOP, N. A.; GUARENTE, L. Two neurons mediate diet-restriction induced longevity in *C. elegans*. **Nature**, v. 447, n. 31, p. 545-550, 2007.

BJORNTORP P. Metabolic implications of body fat distribution. **Diabetes Care**. v.14, n.12, p.1132-43, 1991

- BUTLER, R. N.; HYER, K.; SCHECHTER, M. The elderly in society – an international perspective. In: **Textbook of geriatric medicine and gerontology**. 4th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1993. p. 980-92.
- BROGNA, A.; FERRARA, R.; BUCCERI, A. M.; LANTERI, E.; CATALANO, F. Influence of aging on gastrointestinal transit time. **Investigative radiology**, v. 34, p. 357-359, 1999.
- CANÇADO, F. A. X.; HORTA, M. L. Envelhecimento Cerebral In. **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p.112-127.
- CARVALHO, J. A. M. Crescimento populacional e estrutura demográfica no Brasil. Belo Horizonte, CEDEPLAR/UFMG, 1993.
- CARVALHO, J.A.M.; GARCIA, R.A. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. **Caderno de Saúde Pública**, v.19, n. 3, p.725-733, 2003.
- CLARKSTON, W. K.; PANTANO, M. M.; MORLY, J. E.; HOROWITZ, M.; LITTLEFIELD, J. M.; BURTON, F.R. Evidence for anorexia of aging: Gastrointestinal transit and hunger in healthy elderly vs. Young adults. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. 243-248, 1996.
- COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Livroceres, 1979. 380 p.
- COMBS, T. P.; BERG, A.H.; RAJALA, M.W.; KLEBANOV, S.; IYENGAR, P.; JIMENEZ-CHILLARON, J.C. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. **Diabetes**. v. 52, n.2, p.268-76, 2003.
- COSTA, M.; SIMON, F. A. A.; BROOKS, J. H. The enteric nervous system. **The American Journal of Gastroenterology**. v. 89, n. 8, p. 125-137, 1994.
- COWEN, T.; JOHNSON, R.J.R.; SOUBEYRE, V. SANTER, R.M. Restricted diet rescues rat enteric motor neurons from age related cell death. **Gut**. v.47, p.653-660, 2000.
- CHRISTENSEN, J. Colonic motility. In: **Handbook of Physiology - The Gastrointestinal System**. Maryland: American Physiological Society, 1989. p. 939-973.
- PARAN, S.; PURI, P. The effect of age on colocalization of acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase staining in enteric neurons in an experimental model. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 42, n. 2, p. 300-304.
- CUTLER, R. G.; MATTSO, M. P. Introduction: The adversities of aging. **Ageing Research Reviews**. v. 5, p. 221-238, 2006.
- DAPOIGNY, M.; SARNA, S. K. Effects of physical exercise on colonic motor activity. **American Journal of Physiology**, v. 260, p. G646-G652, 1991.

- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; HENRIQUES, L. T.; PINA, D. S.; PAULINO, M. F.; VALADARES, R. F. D.; CHIZZOTTI, M. L.; MAGALHÃES, K. A. Estimação da digestibilidade dos carboidratos não fibrosos em bovinos utilizando-se o conceito de entidade nutricional em condições brasileiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1479-1486, 2006.
- DOLATSHAD, N. F.; SILVA, A.T.; SOUBEYRE, V.; HOYLE, C. H. V.; COWEN, T.; SAFFREY, M. J. Expression of the GDNF and its receptors in the aging gut. **Soc. Neuroscience. Abstr.**, v. 27, p. 861-864, 2001.
- DONALD, I. P.; SMITH, R. G.; CRUIKSHANK, J. G; ELTON, R. A.; STODDART, M. E. A study of constipation in the elderly living at home. **Gerontology**, v. 31, p. 112-118, 1985.
- DREVON C.A. Fatty acids and expression of adipokines. **Acta Biochimica and biophysica**, v.1740, n.2, p.287-292, 2005.
- ECKLES-SMITH K.; CLAYTON D.; BICKFORD P.; BROWNING M. D. Caloric restriction prevents age-related deficits in LTP and in NMDA receptor expression. **Molecular brain research**, v.78, p.154–162, 2000.
- EL-SALHY, M; SANDSTRÖM, O.; HOLMLUND, F. Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 107, p. 93-103, 1999.
- FIRTH, M.; PRATHER, C. Gastrointestinal motility problems in the elderly patient. **Gastroenterology**, v. 122, n. 6, p. 1688-1700, 2002.
- FONTANA, E. A.; WEAVER Jr., W. D.; DENBOW, D. M. e WATKINS, B. A. Early feed restriction of broilers: Effects on abdominal fat pad, liver, and gizzard weights, fat deposition, and carcass composition. **Poultry Science**, v. 72, p. 243-250. 1993.
- FURNESS, J. B.; LI, Z. S.; YOUNG, H. M.; FORSTERMANN, U. Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. **Cell Tissue Research**, v. 277, p. 139-149, 1994.
- FURNESS, J. B.; COSTA, M.; MORRIS, J. L.; GIBBINS, I. L. Novel neurotransmitters and the chemical coding of neurons. **Advances in Physiological Research**, p. 143-165, 1987.
- FURNESS, J. B.; COSTA, M. **The enteric nervous system**. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1987.
- GABELLA, G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. **Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 737-752, 1987.
- GABELLA, G. Fall in the number of myenteric neurons in agian guinea-pigs. **Gastroenterology**, v. 96, p.1487-1493, 1989.

GABELLA, G. Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract. In: JOHSON, L. R. **Physiology of the gastrointestinal tract**, v. 1, p. 751-793, 1994.

GAGLIARDO, K. M.; CLEBIS, N. K.; STABILLE, S. R.; MARI, R. B.; SOUZA, J. M. A.; SOUZA, R. R. Exercise reduces inhibitory neuroactivity and protects myenteric neurons from age-related neurodegeneration. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v.141, p. 31-37, 2008.

GAZALLE F. K, LIMA MS, TAVARES BF, HALLAL PC. Sintomas Depressivos e Fatores Associados em População Idosa no Sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 3, p. 365-71, 2004.

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

GREGOIRE F. M. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 226, n. 11, p.997-1002, 2001.

HAIYAN XU, GLENN T. BARNES, QING YANG, GUO TAN, DASENG YANG, CHIEH J. CHOU, JASON SOLE, ANDREW NICHOLS, JEFFREY S. ROSS, LOUIS A. TARTAGLIA AND HONG CHEN. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v.112, n.12, p. 1821-30, 2003.

HANSEN, M.B. The Enteric Nervous System II: Gastrointestinal functions. **Pharmacology and Toxicology**, v.92, p. 249-257, 2003.

HASLER, W. L.; KUROSAWA, S.; OWYANG, C. Regional cholinergic differences between distal and proximal colonic myenteric plexus. **American Journal of Physiology**, v. 21, p. G404-G410, 1990.

HAVEL, P.J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. **Diabetes**, v. 53, n.1, p. S143-S151, 2004.

MORA, F.; PORRAS, A. Cap. 36 - Procesos Involutivos Del Sistema Nervioso. In DELGADO, J.M.; FERRÚS, A.; MORA, F.; RUBIA, F.J. **Manual de Neurociência**, Madri: Sintesis, 1998 p. 915-927.

HEILBRONN, L.K.; RAVUSSIN, E. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 361-9, 2003.

HOLLOSZY, J.O. Exercise and food restriction in rats. **Journal of Nutrition**, v.122, p.774-7, 1992.

HOLLOSZY, J.O.; FONTANA, L. Caloric restriction in humans. **Experimental Gerontology**, v. 42, p. 709-712, 2007.

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

INGRAM, D.K.; ROTH, G.S.; LANE, M.A.; OTTINGER, M.A.; ZOU, S.; DE CABO, R. The potential for dietary restriction to increase longevity in humans: extrapolation from monkey studies. **Biogerontology**, v.7, n. 3, p. 143-8, 2006.

ITO, Y., JECKEL-NETO, E.A., MIYAISCHI, O. Influence of nutritional conditions on age changes of the organs and cells of experimental rats fed with restricted diet. 2. Micrometrical studies on liver and submandibular gland. **Biomedical Gerontology**, v.17, n. 2, p.44-45, 1993.

JACOB FILHOW. Atividade Física e envelhecimento Saudável. **Revista Brasileira de Educação Física do Esporte**, v.20, n.5, p.73-77, 2006.

JECKEL-NETO, E.A. Aging and dietary protein: effects on the rat diaphragm. **Archives of International Medicine**, v. 22, n. 5, p.593-612, 1994.

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

JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 10.Ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2004, p.533.

KASS, M. L.; VAN SOEST, P. J.; POND, W. G. Utilization of dietary fiber from alfafa by growing swine. I. Apparent digestibility of diet contents in specific segments of the gastrointestinal tract. **Journal Animal Science**, v. 50, p. 175-191, 1980.

KOUBOVA J, GUARENTE L. How does calorie restriction work? **Genes Developement**, v.17, n.3, p. 313-21, 2003.

LANE-PETTER, W. The formulation of laboratory animal diets: some practical considerations. In: Tavernor WD, ed. **Nutrition and disease in experimental animals**, London: Bailliere, Tindal & Cassel, 1970. p.64-71.

LIBERT, E. A. I.; FONTES, R. B. V.; FUGGI, V. M.; MAIFRINO, L. B. M.; SOUZA, R. R. Effects of combined pre- and post-natal protein deprivation on the myenteric plexus of the esophagus of weanling rats: A histochemical, quantitative and ultrastructural study. **World Journal Gastroenterology**, v.13, n. 26, p. 3598-3604, 2007.

LIMA-COSTA M. F., BARRETOS SM, GIATTI L. Condições de Saúde, Capacidade Funcional, Uso de Medicções da População Idosa Brasileira: um estudo descritivo baseado na Pesquisa Nacional por amostra de domicílios. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n. 3, p735-43, 2003.

MACEDO JÚNIOR, G. L.; PÉREZ, J. R. O.; ALMEIDA, T. R. V.; PAULA, O. J.; FRANÇA, P. M. de; ASSIS, R. M. de. Influencia de diferentes níveis de FDN dietético

no consumo e digestibilidade aparente de ovelhas santa Inês. **Ciência Agrotecnologia**, v. 30, n. 3, p. 547-553, 2006.

MACHADO, U.F.; NOGUEIRA, C.R.; CARPINELLI, A.R. Obesity is the major cause of alterations in insulin secretion and calcium fluxes by isolated islets from aged rats. **Physiology and Behavior**, v.52, n. 4, p.717-21, 1992.

MACHADO, U. F. **Alterações no conteúdo tecidual de transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4 na obesidade**: papel da resistência insulínica. 1997. 93 p. Tese (Livre Docência) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

MADSEN, J. L.: Effect of gender, age and body mass index on gastrointestinal transit. **Digestive diseases and sciences**, v. 37, p. 1548-1553, 1992.

MAREASE, A. C. M.; FREITAS, P.; NATALI, M. R. M. Alterations of the number and the profile of myenteric neurons of Wistar rats promoted by age. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 137, n. 1, p:10-18, 2007.

MARI, R. B.; CLEBIS, N. K.; GAGLIARDO, K. M, GUIMARÃES, J. P.; STABILLE, S. R.; GERMANO, R. MELLO; SOUZA, R. R. Effects of Exercise on the Morphology of the Myenteric Neurons of the Duodenum of Wistar Rats during the Ageing Process. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 37, p. 289–295, 2008.

MASORO, E.J. Potential role of the modulation of fuel use in the antiaging action of dietary restriction. **Annals of the New York academy of Sciences**, v.663, n.21, p.403-11, 1992.

MASORO, E.J. Overview of caloric restriction and ageing. **Mech Ageing. Dev.** v.126, n. 9, p. 913-22, 2005.

MASWOOD N, YOUNG J, TILMONT E, ZHANG Z, GASH DM, GERHARDT GA, ET AL. Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.52, p. 18171-6, 2004.

McDOUGLAS, J. N.; MILLER, M. S.; BURKS, T. F.; KREULEN, D. L. Age-related changes in colonic function in rats. **American Journal of Physiology**. v. 247, p. 542-546, 1984.

MECIANO-FILHO J.; CARVALHO, V.C.; de SOUZA, R.R. Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age: a preliminary investigation. **Gerontology**, v.41, p. 18-21, 1995.

MESSENGER, J.P.; BORNSTEIN, J.C.; FURNESS, J.B. Electrophysiological and morphological classification of myenteric neurons in the proximal colon of guinea-pig. **Neuroscience**, v. 60, p. 227-244, 1994.

- MERRY, B.J. Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. The international. **Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.34, p. 1340-1354, 2002.
- MIZUTA, Y.; TAKAHASHI, T.; OWYANG, C. Nitrgic regulation of cólonnic transit in rats. **American Journal of Physiology**, v. 277, p. G275-G279, 1999.
- MOLINARI, S. L.; PEREIRA, M. S.; SOUZA, R. R.; MIRANDA-NETO, M. H. Estudo morfológico do plexo mientérico do estômago glandular do rato. **Revista UNIMAR**, v.16, p.419-426, 1994.
- MOORE, J. G.; TWEEDY, C.; CHRISTIAN, P. E. Effect of age on gastric emptying of liquid-solid meals in man. **Digestive diseases and sciences**, v. 28, p. 340-340, 1983.
- MORA, F.; PORRAS, A. Procesos involutivos del sistema nervioso. In DELGADO, J. M.; FERRÚS, A.; MORA, F.; RUBIA, F. J. **Manual de neurociência**. Madri: Sintesis, 1998. Cap. 36, p. 915-927.
- NRC (National research council) **Nutrient requirements of laboratory animals**. 4^a ed. Washington: Academic Press, 1995. p.11-79.
- NAKAJIMA, K.; TOOYAMA, I.; YASUMARA, O.; AIMI, Y.; KIMURA, H. Im unohitochemical desmontration of choline acetyltransferase of a peripheral type (pChAT)in the enteric nervous system. **Journal of. Chemical. Neroanatomy**, v.18, p. 31-40, 2000.
- NATALI, M. R. M.; MIRANDA NETO, M. H.; ORSI, A. M. Ultrastructural features of myenteric ganglia of adult wistar rats (*Rattus norvegicus*) **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 29, n. 6, , p. 393-397, 2000.
- NEUNLIST, M.; AUBERT, P.; TOQUET, C.; ORESHKOVA, T.; BAROUK, J.; LEHUR, P. A.; SCHEMANN, M.; GALMICHE, J. P. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. **Gut**, v. 52, p. 84- 90, 2003.
- NOÛE, J.; CHOUBERT, G. Digestibility in rainbow trout: comparison of the direct and indirect methods of measurement. **Progressive Fish-culturist**, v.48, p.190-195, 1986.
- ONU – Organização das Nações Unidas. **Relatório sobre o desenvolvimento humano no Brasil (1996): O novo padrão demográfico**, 2000.
- OSINSKI, M.A.; BASS, P. Chronic dernevation of rat jejunum results in cholinergic supersensitivity due to reduction of cholinesterase activity. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 266, p. 287-297, 1995.
- PALO, P. E.; SELL, J. L.; PIQUER, J.; VILASECA, L., SOTO-SALANOVA, F. Effect of nutrient restriction on broiler chickens. 2. Performance and dibestivew enzyme activities. **Poultry Science**, v, 74, p. 1470-1483, 1995.

PATEL, N.V.; GORDON, M.N., CONNOR, K.E.; GOOD, R.A.; ENGELMAN, R.W.; MASON, J. Caloric restriction attenuates Ab-deposition in Alzheimer transgenic models. **Neurobiology of Aging**, v.26, n.7, p.995-1000. 2005.

PAYNE, P.R. Protein and amino acid requirement of experimental animals. In: Tavernor WD, ed. **Nutrition and disease in experimental animals**. London: Bailliere, Tindal & Cassel, p. 9-16, 1970.

PERLS, T.T. The different paths to 100. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.83, p. 484S–487S, February. 2006.

PECK, M. A.; CONRAD, M., F.; KWOLEK, C. J.; LAMURAGLIA, G.; PARUCHURI, V.; CAMBRIA, R. P. Intermediate-term outcomes of endovascular treatment for symptomatic chronic mesenteric ischemia. **Journal of Vascular Surgery**, in press, doi:10.1016/j.jvs.2009.06.064, 2009.

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

PHILLIPS, R. J.; POWLEY, T. L. Innervation of the gastrointestinal tract: Patterns of aging. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 136, n. 1-2, p. 1-19, 2007.

POWLEY, T. L. Nitric oxide synthase-containing neurons in the myenteric plexus of the rat gastrointestinal tract: distribution and regional density. **Anatomy Embryology**, v. 199, p. 99-112, 1999.

PRINS J. B. Adipose tissue as an endocrine organ. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v.16, n. 4, p. 639-651, 2002.

PROLLA, T. A.; MATTSON, M. P. Molecular mechanisms of brain aging and neurodegenerative disorders: Lessons from dietary restriction. **Trends Neuroscience**, v. 24, p. S21–S31, 2001.

RAHA S, ROBINSON BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends Biochemical Science**, v.25, n. 10, p.502-8. 2000.

RAVIDRAN, V.; KORNEGAY, E. T.; EBB JUNIOR, K. E. Effects of fiber and virgiamycin on nutrient absorption, nutrient retention and rate of passage in growing swine. **Journal Animal. Science**, v. 59, p.400-459, 1984.

ROBERTS, B. L.; MASLAM, S.; LOS, I.; VAN DER JAGT, B. Coexistence of calcitonin gene-related peptide and choline acetyltransferase in eel efferent neurons. **Hearing Research**. v. 74, n. 1-2, p. 231-7, 1994.

ROTH, G.S.; INGRAM, D.K.; LANE, M.A. Caloric restriction in primates and relevance to humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 928, p. 305-315, 2001.

RUTTEN, B. P. F.; KORR, H.; STEINBUSCH, H. W. M.; SCHMITZ, C. the aging brain: less neurons could be better. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 124, p. 349-355, 2003.

SAEG – Sistema de análise estatística e genética. **Manual de utilização do programa SAEG**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997.

SARNA, S. K. Physiology and pathophysiology of colonic motor activity. Part II. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 36, p. 998-1018, 1991.

SAFFREY, M. J. Ageing of the enteric nervous system. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, p. 899-906, 2004.

SANDERS, K. M.; WARD, S. M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. **American Journal of Physiology**, v. 262, p. G379-G392, 1992.

SANTER, R.M.; BAKER, D.M. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. **Journal of Autonomic Nervous System**, v. 25, p. 59-67, 1988.

SANTER, R. M. Survival of the population of the NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. **Journal of Autonomic Nervous System**, v. 49, p. 115-12, 1994.

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

SCHNEIDER, J.; JEHLE, E.C.; STARLINGER, M. J.; NEUNLIST, M.; MICHEL, K.; HOPPE, S.; SCHEMANN, M. Neurotransmitter coding of enteric neurons in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. **Neurogastroenterology and Motility**, v.13, p.255–264, 2001.

SERAPHIM, P. M. **Quantificação do transportador de glicose (GLUT4) em ratos wistar espontaneamente obesos**. 1996. 80 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

SHELKE, R.R.; LEEUWENBURGH, C. Lifelong caloric restriction increases expression of apoptosis repressor with a caspase recruitment domain (ARC) in the brain. **FASEB Journal**, v. 17, p.494-496, 2003.

SHEPHARD, R. J. **Envelhecimento, atividade física e saúde**. São Paulo - SP: editora Phorte, 2003.

SHEPHARD, R.J. Aging and Exercise. In: Encyclopedia of sports medicine and science. Internet Society for sport science, 1998.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos** – métodos químicos e biológicos. 3.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002.

SMITS, G.J.; LEFEBVRE, R.A. Influence of aging on gastric emptying of liquids, small intestine transit and fecal output in rats. **Experimental. Gerontology**, v.31,n.5, p. 589-596, 1996.

SOHAL RS, WEINDRUCH R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**. v.273, n.5271, p.59-63, 1996.

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

STERNINI, C. Strutural and chemical organization of the myenteric plexus. **Annual review of Physiology**., v. 50, p.81-93, 1988.

TAKAHASHI, T.; QOUBAITARY, A.; OWYANG, C.; WILEY, J.W. Decreased expression of nitric oxide synthase in the colonic myenteric plexus of aged rats. **Brain Research**, v. 883, p. 15-21, 2000.

TAKAHASHI, T.; OWYANG, C. Regional differences in the nitregic innervation between the proximal and the distal cólonn in rats. **Gastroenterology**, v. 115, p.1504-1512, 1998.

THRASIVOULOU, C.; SOUBEYRE, V.; RIDHA, H.; GIULIANI, D.; GIARONI, C.; MICHAEL, G. J.; SAFFREY, M.J.; COWEN, T. Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. **Aging cell**, v.5, p. 247-257, 2006.

TIMIRAS, P.S. **Physiological basis of aging and geriatrics**. Boca Raton, CRC press, 1994. 2 ed.

TORREJAIS, M. M., NATALI, M. R. M., CONEGERO, C. I., MIRANDA NETO, M. H. Effects of proteic malnutrition after breast-feeding on the morphology of the intestinal wall and myenteric neurons of the ileum of rats. **Revista Unimar**, v.17, p.315-327, 1995.

TRUELSEN, T.; BONITA, R. & JAMROZIK, K. Surveillance of stroke: A global perspective. **International Journal of Epidemiology**, v.30, p.S11-S12, 2001.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. London: Comstock Publishing Associates. 476 p.

XIONG, Z.; SPERELAKIS, N.; NOFFSINGER, A.; FENOGLIO-PREISER, C. Ca²⁺ currents in human colonic smooth muscle cells. **American Journal of Physiology**, v.269, n.3, p. G378-85, 1995.

WADE, P.R. Aging and neural control of the GI tract: I age-related changes in the enteric nervous system. **American Journal of Physiology**, v. 283, p. G489-G495, 2002.

WADE, P. R.; COWEN, T. Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. **Neurogastroenterology & Motility**, p.19-23, v.16, 2004.

WEINDRUCH, R.; SOHAL, R.S. Caloric intake and aging. **The New England Journal of Medicine**, v.337, p. 986-94, 1997.

WEINDRUCH R, WALFORD RL. Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. **Science**, v.15, n. 4538, p.1415-8, 1982.

WEIHE, W.H. The laboratory rat. In: Poole, T. B. **The UFAW handbook of the care and management of laboratory animals**. 6 ed. Essex: Longman, 1987: 309-330.

WICH, G.; JANSEN-DURR, P.; BERGER, P.; BLASCO, I.; GRUBECK-LOEBSTIN, B. Diseases of aging. **Vaccine**, v.18, p.1567-83, 2000.