Lynda Jhailú Tamayo Arango

Avaliação histoquímica, imuno-histoquímica e morfométrica do plexo mioentérico do jejuno e do colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

São Paulo

2010

Lynda Jhailú Tamayo Arango

Avaliação histoquímica, imuno-histoquímica e morfométrica do plexo mioentérico do jejuno e do colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

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 obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

São Paulo

2010

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2253
FMVZ

Tamayo, Lynda Jhailú Arango
Avaliação histoquímica, imuno-histoquímica e morfométrica do plexo mioentérico do jejuno e do colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal / Lynda Jhailú Tamayo Arango. -- 2010.
101 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti.

1. Desenvolvimento pós-natal. 2. Estereologia. 3. Plexo mioentérico. 4. Rato. 5. Sistema de informação geográfica. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação histoquímica, imunohistoquímica e morfoquantitativa do plexo mioentérico do jejuno e do colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal", protocolado sob o nº1446/2008, utilizando 20 (vinte) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "Histochemical, immunohistochemical and morphoquantitative evaluation of the jejunal and colonic myenteric plexus of Wistar rats during the post-natal development", utilizing 20 (twenty) rats, protocol number 1446/2008, under the responsibility Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, 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 "ad referendum" of the meeting.

São Paulo, 09 de outubro de 2008

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

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TAMAYO, Lynda Jhailú Arango

Título: Avaliação histoquímica, imuno-histoquímica e morfométrica do plexo mioentérico do jejuno e do colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

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 obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A Shri Mataji Nirmala Devi, Mestra e Mãe Espiritual, fonte de infinita sabedoria.

Ao meu marido Jaime e à minha filha Janine, sou eternamente grata por ter vocês na minha vida.

E ao nosso bebê que está a caminho, estamos esperando por você!

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem Ele nada é possível.

Ao meu esposo Jaime, por todo o amor e a dedicação. Muito obrigada pelo apoio na difícil decisão de vir para São Paulo, valeu a pena! Obrigada também pela ajuda valiosa durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, pelos bons exemplos e por estar sempre preocupados por nos dar a melhor educação.

Aos meus irmãos, sem a sua ajuda não estaria onde estou agora.

À Universidade de Antioquia (Colômbia), por me oferecer esta maravilhosa oportunidade de vir ao Brasil para estudar.

Ao Professor Edson Aparecido Liberti, que me recebeu com os braços abertos desde o primeiro dia que fui ao laboratório. Obrigada por todos os ensinamentos não apenas científicos, mas também os ensinamentos de vida. Sinto-me honrada por ter tido o senhor como orientador.

À Prof. Dra. Silvia de Campos Boldrini, obrigada pelo recebimento caloroso ao Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à Cirurgia (LAFFAC-ICB-USP) e por toda a ajuda.

Às minhas queridas amigas, Valquíria Barboza Mariotti e Regina de Sousa Bolina Matos, obrigada pela amizade incondicional e por todo o apoio nos momentos complicados que passamos.

À CAPES, pela bolsa de doutorado e à FAPESP, pelo financiamento desta pesquisa.

Aos professores Pedro Primo Bombonato e Prof. Dra. Maria Angélica Miglino, pelo apoio em momentos decisivos.

Aos Professores Hans G. Gundersen, Terry Mayhew, Benta Pakkenberg, Jens Nyengaard e Mathias Ochs, pelos ensinamentos dados no curso de estereologia.

Aos funcionários do biotério da FMVZ-USP: Claudia Madalena Cabrera Mori, Herculano, Idalina, Rosires, Mauro e Nelson.

Às técnicas de laboratório de histologia do ICB-USP: Marta Righetti e Sônia Yokomizo. Obrigada pela ajuda, especialmente nas fases iniciais da tese.

Ao pessoal do Laboratório de Técnicas Imunológicas Aplicadas à Morfofisiologia: Prof. José Roberto Kfouri Júnior, Ana Rita, Rose e Janaína, por toda a colaboração e a disponibilização do laboratório para a realização de testes.

Aos professores que constituíram a Banca do Exame de Qualificação: Profa. Dra. Laura Beatriz Mesiano Maifrino e Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior. Obrigada pelas sugestões para melhorar o trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à Cirurgia (LAFFAC-ICB-USP): Josemberg da Silva Baptista, William Mayer, Ricardo Fontes, Cibele Maciel de Miranda, Paulo Alexandre Galvanini, Flávia de Oliveira, Ricardo Eustáquio Silva, Bruna Caixeta, Aline Gonçalves, Lucilene F. Luiz, Diana A. de Oliveira, Marcelo Cavalli, Márcio Cristófaro, Mariana Pazos, Eduardo Beber, Paulo Henrique de Matos Alves, Flávio Tampelini, Sabrina Caixeta, Ana Paula Cordó, Maritza Coura, Karina do Valle Marques, Ricardo Bandeira, Thiago Habacuque, Leonardo Liberti, Carol, Fabiana, Nathália e Giovanna. Agradecimentos especiais a Carlos Eduardo Seyfert, pela ajuda constante em cada fase da tese com o desenvolvimento das diferentes técnicas.

A Maicon, Jaqueline, Ronaldo, Edinaldo (Índio), Fátima, Raimundo, Sandra, Diogo e Tatiana, funcionários da Anatomia da FMVZ, que sempre me ajudaram quando precisei.

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ-USP, especialmente Solange, Anderson e Elza, por toda a ajuda prestada.

A todos os colegas da pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP.

Às demais pessoas que de uma ou outra maneira colaboraram para a finalização deste trabalho. Muito obrigada a todos!

"A matemática foi o alfabeto com o qual Deus construiu o universo."

Galileu Galilei

"O sistema nervoso entérico, portanto, não é escravo do cérebro,
mas sim um espírito independente na organização nervosa do organismo.
É um rebelde, o único elemento do sistema nervoso periférico que pode optar por não seguir as ordens
do cérebro ou da medula espinhal".

Michael D. Gershon
Tirado do livro "O segundo cérebro"

RESUMO

TAMAYO, L. J. A. **Avaliação histoquímica, imuno-histoquímica e morfométrica do plexo mioentérico do jejuno e do colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal** [Histochemical, immunohistochemical and morphometric evaluation of the myenteric plexus of jejunum and colon in Wistar rats during postnatal development]. 2010. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O objetivo desta pesquisa foi quantificar os neurônios mioentéricos do jejuno e do colo durante o desenvolvimento pós-natal de ratos Wistar utilizando morfometria com enfoque estereológico e analisar as mudanças na área ocupada por neurônios e axônios mediante Sistemas de Informação Geográfica (SIG). Foram usadas 20 fêmeas de ratos da linhagem Wistar, divididas em grupos de acordo com a idade pós-natal em dias (G0, G7, G21 e G60). A análise morfométrica foi realizada em preparados totais de membrana usando azul cuprolínico, histoquímica para acetilcolinesterase (AChE) e NADPH-diaforase (NADPH-d), e imuno-histoquímicas para VIP e substância P. Foram estimadas a densidade numérica neuronal/área de superfície serosa, o número total de neurônios por segmento e a área neuronal média. A análise da área ocupada por neurônios e axônios foi realizada a partir de imagens de NADPH-d e AChE. Ocorreu uma diminuição significativa na densidade neuronal/área, nos neurônios totais e nos neurônios nitrérgicos a partir de G7 no jejuno e de G0 no colo, e nos neurônios colinérgicos entre G0 e G7 no jejuno e G0 e G21 no colo. O número total de neurônios corados com azul cuprolínico aumentou significativamente no colo a partir de G7; houve aumento dos neurônios nitrérgicos entre G7 e G21 e nos neurônios colinérgicos entre G21 e G60. No jejuno somente houve aumento do número total de neurônios nitrérgicos entre G0 e G7. Também foi percebido um aumento significativo na área dos neurônios nitrérgicos a partir de G7 no jejuno e de G0 no colo, e dos neurônios colinérgicos entre G7 e G21 no jejuno e G0 e G21 no colo. A área ocupada pelos axônios aumentou entre os grupos G0 e G7, diminuiu entre G7 e G21 e aumentou de novo entre G21 e G60. Estes resultados demonstraram que os neurônios e os axônios sofrem mudanças morfológicas e químicas durante o desenvolvimento pós-natal do sistema nervoso entérico, provavelmente devido a fatores microambientais como os fatores de crescimento e de replicação, a alimentação e o próprio crescimento do intestino. É possível que a completa maturidade do intestino somente seja completada quando este finaliza o seu processo de crescimento.

Palavras-chave: Desenvolvimento pós-natal. Estereologia. Plexo mioentérico. Rato. Morfometria. Sistema de informação geográfica.

ABSTRACT

TAMAYO, L. J. A. **Histochemical, immunohistochemical and morphometric evaluation of the myenteric plexus of jejunum and colon in Wistar rats during postnatal development.** [Avaliação histoquímica, imuno-histoquímica e morfométrica do plexo mioentérico do jejuno e do colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal]. 2010. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

The aim of this study was to quantify jejunum and colon myenteric neurons during postnatal development in Wistar rats using morphometry and to analyse the changes in the area occupied by neurons and axons using Geographic Information Sistem (GIS). Twenty female Wistar rats divided in groups according to the age in days (G0, G7, G21 e G60) were used. Whole mount preparations using cuprolinic blue (CB), histochemistry for acetyl-cholinesterase (AChE) and NADPH-diaphorase (NADPH-d) and immunohistochemistry for VIP and substance P were used for morphometric evaluation. Neuronal numerical density/area of serosal surface, total number of neurons for segment and mean neuronal area were estimated. Analyses of the area ocuppied by neurons and axons were performed using images of NADPH-d and AChE. This study showed a significant decrease in the neuronal numerical density/area in total and nitrergic neurons from G7 in jejunum and G0 in colon, and in cholinergic neurons from G0 and G7 in jejunum and G0 and G21 in colon. In colon, total number of neurons increased significantly in cuprolinic blue stain from G7, in NADPH-d between G7 and G21 and in AChE between G21 and G60. In jejunum, there was a significant increase in the same parameter between G0 and G7 in NADPH-d. There was also a significant increase in the mean area of nitrergic neurons from G7 in jejunum and from G0 in colon, and in cholinergic neurons between G7 and G21 in jejunum and between G0 and G21 in colon. The area occupied by axons increased between G0 and G7, between G7 and G21 decreased and increased again between G21 and G60. This results showed that neurons and axons suffer morphologic and chemical changes during postnatal development in the enteric nervous system, probably due to micro-environmental factors as growth and replication factors, nutrition and growing of the intestine. It is possible that complete maturity of the intestine is achieved when it finishes its growing process.

Key-words: Geographic Information System. Morphometry. Myenteric plexus. Postnatal development. Rat. Stereology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos de neurônios no intestino. LM, camada muscular longitudinal; MP, plexo mioentérico; CM, camada muscular circular; SM, plexo submucoso; Muc, mucosa. Interneurônios ascendentes (reflexos locais, 1), neurônios aferentes intrínsecos primários do plexo mioentérico (2) e submucoso (11), neurônios intestinofugais (3), neurônios excitatórios (4) e inibitórios (5) da camada muscular longitudinal, neurônios excitatórios (6) e inibitórios (7) da camada muscular circular, interneurônios descendentes (8, 9, 10), neurônios colinérgicos secretomotores (12, 13, 14) e neurônios uni-axonais (15) 26

Figura 2 - Dissecação do preparado de membrana mostrando a separação entre as camadas submucosa e muscular circular. Desta forma, o preparado de membrana usado para observar o plexo mioentérico, contém as camadas musculares (circular e longitudinal) e a serosa. As camadas submucosa e mucosa foram descartadas 36

Figura 3 - Estimativa da área da superfície da serosa do jejuno mediante a contagem de pontos que incidem sobre a estrutura 41

Figura 4 - Uso do marco de quantificação sem viés com linhas de inclusão (pontilhadas) e exclusão (contínuas) para a estimativa da densidade por área de neurônios no jejuno de ratos. Neste caso, foram quantificados os neurônios com o núcleo dentro do marco ou tocando a linha pontilhada (seta delgada), para um total de 5 neurônios. Os núcleos tocando a linha contínua (setas espessas) não foram quantificados. Na figura, neurônios nitrérgicos de jejuno do grupo G7 42

Figura 5 - Roteiro do processamento das imagens para a análise de áreas. No exemplo, imagem do grupo G21 para NADPH-d. O mesmo procedimento foi feito para o tratamento com AChE, nos segmentos jejuno e colo 45

Figura 6 - Disposição dos gânglios reativos para NADPH-d no jejuno (J) e no colo (C) nos grupos G0 e G60 de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Notar como no grupo G0 dificilmente podem ser diferenciados gânglios e como no grupo G60 os gânglios aparecem mais separados entre si 48

Figura 7 - Detalhe dos neurônios do jejuno (J) e no colo (C) reativos na histoquímica para NADPH-d em ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Podem ser observados os neurônios com escasso citoplasma e formato mais quadrangular (setas delgada), especialmente nos grupos G0 e G7, tanto no jejuno quanto no colo. Também são evidentes os processos neuronais (setas espessa), com exceção no grupo G0 50

Figura 8 - Coloração histoquímica NADPH-d do jejuno (J) e do colo (C) de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal.. Podem ser observadas as malhas primária (setas espessa) e secundária (setas delgda) com varicosidades (cabeça de seta) 52

Figura 9 - Marcação histoquímica para AChE no jejuno (A, B) e no colo (C, D) de um animal do grupo G0. Notar em B, um neurônio com uma alta intensidade de marcação. Notar as duas regiões diferenciadas no colo dos animais recém-nascidos, em C a região de neurônios densamente arrangados sem diferenciacião em gânglios e em D a região de gânglios bem conformados com malha primária bem diferenciada 59

Figura 10 - Marcação histoquímica para AChE no jejuno (A, B) e no colo (C, D) de um animal do grupo G7 59

Figura 11 - Marcação histoquímica para AChE no jejuno (A, B) e no colo (C, D) de um animal do grupo G21. Notar em A um gânglio intensamente marcado e em D um gânglio com poucos neurônios reativos 60

Figura 12 - Marcação histoquímica para AChE no jejuno (A, B) e no colo (C, D) de um animal do grupo G60. Notar em B e C a quantificação dos neurônios (*) em dois planos focais diferentes 60
Figura 13 - Neurônios do jejuno e do colo corados com o corante pan-neuronal azul cuprolínico em ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal.. J – Jejuno, C – Colo. Notar em G60 – J um nucléolo intensamente marcado (seta) 66
Figura 14 - Imuno-histoquímica para VIP. J – jejuno, C – colo. Podem ser observados os corpos neuronais apresentando imunoreatividade ao VIP, especialmente nos grupos G0 e G7 (setas delgadas). Também podem ser observadas as malhas primária e secundária (setas espessas) 70
Figura 15 - Imuno-histoquímica para Substância P. J – jejuno, C – colo. Pode ser observada a grande quantidade de corpos neuronais apresentando imunoreatividade à Substância P, especialmente na figura G0-C 71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Área superficial da serosa do jejuno e do colo em ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 47

Gráfico 2 - Percentagem de neurônios nitrérgicos com reação fraca (Nf) e com reação mais forte (NF) na histoquímica para NADPH-d no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 51

Gráfico 3 - Percentagem de neurônios nitrérgicos com reação fraca (Nf) e com reação mais forte (NF) na histoquímica para NADPH-d no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 51

Gráfico 4 - Densidade numérica/área de neurônios nitrérgicos no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Diminuição significativa na densidade numérica/área de neurônios positivos a NADPH-d a partir do sétimo dia após o nascimento ($p < 0,005$) no jejuno e a partir do nascimento no colo ($p < 0,01$) 53

Gráfico 5 - Densidade numérica/área entre regiões do colo no grupo G21. Diminuição significativa entre regiões C1 e C4 ($p = 0,0307$) 54

Gráfico 6 - Densidade numérica/área entre regiões do colo no grupo G60. Diminuição significativa a partir da região C2 no grupo G60 ($p < 0,0031$) 54

Gráfico 7 - Número total de neurônios nitrérgicos no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Aumento significativo no jejuno entre G0 e G7 ($p < 0,005$). No colo, aumento significativo entre G7 e G21 ($p = 0,0002$) e diminuição significativa entre G21 e G60 ($p = 0,028$) 55

Gráfico 8 - Área neuronal no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Aumento significativo no jejuno a partir de G7 ($p < 0,002$) e no colo a partir de G0 ($p < 0,001$) 56

Gráfico 9 - Área neuronal dos neurônios com intensidade de coloração forte e fraca na histoquímica de NADPH-d no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 57

Gráfico 10 - Percentagem de neurônios colinérgicos com reação fraca (Nf) e com reação mais forte (NF) na histoquímica para AChE no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 58

Gráfico 11 - Percentagem de neurônios colinérgicos com reação fraca (Nf) e com reação mais forte (NF) na histoquímica para AChE no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 58

Gráfico 12 - Densidade numérica/área de neurônios positivos a AChE no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Diminuição significativa entre G0 e G7 ($p < 0,002$) no jejuno e entre G0 e G21 ($p < 0,003$) no colo 61

Gráfico 13 - Número total neurônios colinérgicos no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Aumento significativo entre G21 e G60 no colo ($p = 0,02$) 63

Gráfico 14 - Área celular dos neurônios colinérgicos no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Aumento significativo entre G7 e G21 ($p = 0,045$) no jejuno e entre G0 e G21 ($p<0,02$) no colo 64

Gráfico 15 - Área neuronal dos neurônios com intensidade de coloração forte e fraca na histoquímica para AChE no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 64

Gráfico 16 - Área celular de neurônios nitrérgicos (NADPH-d) e colinérgicos (ACh) no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 65

Gráfico 17 - Densidade numérica/área de neurônios corados com o corante pan-neuronal azul cuprolínico no colo e no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Diferença significativa a partir do dia 7 (G7, $p < 0,02$) no jejuno e a partir do dia 0 (G0, $p < 0,0004$) 67
Gráfico 18 - Número total de neurônios corados com o corante pan-neuronal azul cuprolínico no colo e no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Diferença significativa a partir de G7 ($p<0,03$) no colo 69
Gráfico 19 - Frequência do espaço ocupado pelos neurônios e axônios nitrérgicos em relação ao espaço livre no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 72
Gráfico 20 - Frequência do espaço ocupado pelos neurônios e axônios nitrérgicos em relação ao espaço livre no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 73
Gráfico 21 - Frequência do espaço ocupado pelos neurônios e axônios colinérgicos em relação ao espaço livre no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 75
Gráfico 22 - Frequência do espaço ocupado pelos neurônios e axônios colinérgicos em relação ao espaço livre no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Área superficial da serosa, densidade e número total de neurônios NADPH-d positivos no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 49

Tabela 2 - Área superficial da serosa, densidade e número total de neurônios NADPH-d positivos no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 49

Tabela 3 - Área superficial da serosa, densidade e número total de neurônios AChE-positivos no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 62

Tabela 4 - Área superficial da serosa, densidade e número total de neurônios AChE-positivos no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 62

Tabela 5 - Área superficial da serosa, densidade e número total de neurônios corados com o corante pan-neuronal azul cuprolínico, no jejuno e colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 68

Tabela 6 - Relação percentual das frequências da área ocupada pelos neurônios e axônios nitrérgicos no jejuno em ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 72

Tabela 7 - Relação percentual das frequências da área ocupada pelos neurônios e axônios nitrérgicos no jejuno em ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 73

Tabela 8 - Matriz de estados (a) e probabilidade de transição (b) para as frequências encontradas de neurônios e axônios à histoquímica para NADPH-d no plexo mioentérico no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 74

Tabela 9 - Matriz de estados (a) e probabilidade de transição (b) para as frequências encontradas de neurônios e axônios à histoquímica para NADPH-d no plexo mioentérico no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 74

Tabela 10 - Relação percentual das frequências da área ocupada pelos neurônios e axônios colinérgicos no jejuno em ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 75

Tabela 11 - Relação percentual das frequências da área ocupada pelos neurônios e axônios colinérgicos no jejuno em ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 76

Tabela 12 - Matriz de estados (a) e probabilidade de transição (b) para as frequências encontradas de neurônios e axônios à histoquímica para AChE no plexo mioentérico no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 77

Tabela 13 - Matriz de estados (a) e probabilidade de transição (b) para as frequências encontradas de neurônios e axônios à histoquímica para AChE no plexo mioentérico no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal 77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO …….. 20
2 OBJETIVOS ……... 22
3 REVISÃO DE LITERATURA ……. 23
3.1 ESTRUTURA DO PLEXO MIOENTÉRICO …….. 23
3.2 ULTRAESTRUTURA DO PLEXO MIOENTÉRICO ……. 24
3.3 TIPOS DE NEURÔNIOS NO PLEXO MIOENTÉRICO 25
3.3.1 Neurônios motores 26
3.3.2 Interneurônios 27
3.3.3 Neurônios aferentes intrínsecos primários (IPANs) 27
3.3.4 Neurônios intestinofugais 27
3.4 PRINCIPAIS NEUROTRANSMISSORES NO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO 27
3.5 DESENVOLVIMENTO DO SNE 29
3.6 ASPECTOS METODOLÓGICOS DA PESQUISA DO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO 32
3.7 SISTEMA DE INFORMAÇÃO GEOGRÁFICA (SIG) APLICADA NA PESQUISA DO SNE 32
3.8 PROCESSO E CADEIA DE MARKOV 33
4 MATERIAIS E MÉTODOS 35
4.1 ANIMAIS 35
4.2 EUTANÁSIA, COLETA, PREPARAÇÃO E AMOSTRAGEM DO INTESTINO 35
4.3 MARCAÇÃO HISTOQUÍMICA 37
4.3.1 Histoquímica para NADPH-d 37
4.3.2 Histoquímica para AChE 37
4.4 COLORAÇÃO PAN-NEURONAL COM AZUL CUPROLÍNICO 38
4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA 39
4.6 ESTUDO MORFOMÉTRICO 40
4.6.1 Área superficial da serosa 40
4.6.2 Densidade numérica neuronal/área (Q_A) 41
4.6.3 Número total de neurônios 42
4.6.4 Área neuronal média 42
4.7 ANÁLISE DA ÁREA OCUPADA POR NEURÔNIOS E AXÔNIOS ATRAVÉS DO SIG 43

4.7.1 Importação das imagens 43
4.7.2 Decomposição das imagens 43
4.7.3 Processamento das imagens 44
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA 46
5 RESULTADOS 47
5.1 ÁREA SUPERFICIAL DA SEROSA 47
5.2 HISTOQUÍMICA PARA NADPH-d 47
5.3 HISTOQUÍMICA PARA AChE 57
5.4 RELAÇÃO ÁREAS CELULARES DE NEURÔNIOS NITRÉRGICOS E COLINÉRGICOS 65
5.5 COLORAÇÃO PAN-NEURONAL COM AZUL CUPROLÍNICO 65
5.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA 69
5.7 ÁREA OCUPADA POR NEURÔNIOS E AXÔNIOS ATRAVÉS DO SIG 72
5.7.1 Área ocupada por neurônios e axônios nitrérgicos no jejuno 72
5.7.2 Área ocupada por neurônios e axônios nitrérgicos no colo 73
5.7.3 Análise do processo markoviano na histoquímica para NADPH-d no jejuno e no colo 74
5.7.4 Área ocupada por neurônios e axônios colinérgicos no jejuno 74
5.7.5 Área ocupada por neurônios e axônios colinérgicos no colo 75
5.7.6 Análise do processo markoviano na histoquímica para AChE no jejuno e no colo 76
6 DISCUSSÃO 78
7 CONCLUSÕES 86
REFERÊNCIAS 87
APÊNDICES 96

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso entérico (SNE) é muito complexo, com citoarquitetura, código químico e circuitos neuronais característicos, responsável por várias funções como secreção, transporte de íons e água, peristalse e fluxo sanguíneo intestinal (FURNESS, 2006). O plexo mioentérico é o responsável direto pela peristalse intestinal, com controle extrínseco do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático. Além disso, existe a neurotransmissão não-adrenérgica não-colinérgica (NANC), com vários neurotransmissores já identificados (HATA et al., 2000).

O desenvolvimento do SNE começa com a migração de células multipotenciais provenientes da crista neural até o intestino, onde se forma primeiro o plexo mioentérico e, a partir deste, o plexo submucoso (YNTEMA; HAMMOND, 1954). O desenvolvimento continua até depois do nascimento, com mudanças morfológicas e funcionais, incluindo alterações na distribuição e no código químico dos neurônios, até o seu amadurecimento total (SAFFREY; BURNSTOCK, 1994).

Durante a etapa neonatal, existem várias alterações da motilidade intestinal produzidas por defeitos na migração dos neurônios a partir da crista neural. A fisiopatologia destas alterações ainda é obscura, devido ao desconhecimento da morfologia normal do SNE durante o desenvolvimento (PARAN; ROLLE; PURI, 2006).

O conhecimento suficiente da fisiologia do desenvolvimento do sistema nervoso entérico normal é crucial para o entendimento das anormalidades congênitas da inervação do intestino (SRI PARAN; ROLLE; PURI, 2009).

Durante o desenvolvimento pós-natal do SNE, a densidade neuronal diminui enquanto que o tamanho dos neurônios aumenta (PARAN; ROLLE; PURI, 2006). Existem poucos estudos que reportam o número total de neurônios no intestino, parâmetro que reflete com mais acurácia as mudanças morfofisiológicas durante o desenvolvimento pós-natal. Dentre a literatura consultada, somente foi encontrado um estudo que reporta o número total de neurônios, sendo estes marcados com a técnica histoquímica NADH (GABELLA, 1971); outros estudos reportam diminuição dos neurônios nitrérgicos (SCHÄFER; HÄNSGEN; MESTRES, 1999) e ausência de mudanças no número total dos neurônios colinérgicos (VANNUCCHI; FAUSSONE-PELLEGRINI, 1996).

Gabella (1971) reportou aumento no número total de neurônios. No entanto, as causas desse aumento até agora não foram explicadas.

A maioria das pesquisas encontradas na literatura sobre quantificação de neurônios entéricos usa o método morfométrico bidimensional no preparado de membrana. O presente estudo acrescentou alguns elementos metodológicos da estereologia, como o marco sem viés, a amostragem sistemática e uniformemente aleatória, e o uso de pontos para a estimativa de área. Tem sido estatisticamente comprovado que a metodologia estereológica evita o viés na amostragem, o que foi considerado importante neste estudo, dada a distribuição agregada dos neurônios no plexo mioentérico.

Neste estudo foi usada, de maneira inovadora, uma ferramenta da geografia, o Sistema de Informação Geográfica (SIG), com a finalidade de analisar as mudanças pós-natais na área ocupada por neurônios e axônios do plexo mioentérico dentro de um espaço, correspondente ao músculo liso.

Esta pesquisa objetivou fazer uma avaliação histoquímica e imuno-histoquímica dos neurônios do plexo mioentérico do jejuno e do colo durante o desenvolvimento pós-natal, por meio da morfometria aplicada com princípios estereológicos de amostragem. Ao mesmo tempo, serão analisadas as mudanças na área ocupada por neurônios e axônios por meio do uso do SIG.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Fazer uma avaliação histoquímica e imuno-histoquímica dos neurônios do plexo mioentérico do jejuno e do colo durante o desenvolvimento pós-natal por meio da morfometria aplicada com princípios estereológicos de amostragem.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar os seguintes parâmetros morfométricos no plexo mioentérico: área da superfície serosa, densidade numérica neuronal por unidade de área (Q_A), número total de neurônios e área neuronal média para toda a população de neurônios e para os neurônios reativos a acetilcolina e óxido nítrico.
- Fazer uma avaliação qualitativa da marcação imuno-histoquímica do plexo mioentérico para VIP e Substância P.
- Analisar as mudanças ao longo do tempo na área ocupada por neurônios e axônios por meio do uso de Sistemas de Informação Geográfica (SIG).

3 REVISÃO DA LITERATURA

O sistema nervoso entérico (SNE) foi classificado como o terceiro componente do sistema nervoso autônomo (LANGLEY, 1921), devido a sua estrutura única e a que a maioria dos neurônios intrínsecos não recebe inervação eferente pré-ganglionar proveniente do sistema nervoso central. Além do mais, o SNE pode exercer muitas das suas funções sem a participação do componente extrínseco (GABELLA, 1990; FURNESS, 2006).

O SNE é formado pelos plexos mioentérico (PM) e submucoso. É um sistema muito complexo, com citoarquitetura, código químico e circuitos neuronais característicos, responsável por várias funções como secreção, transporte de íons e água, peristalse e fluxo sanguíneo intestinal (FURNESS, 2006).

O sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático forma o componente extrínseco do SNE (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000), com fibras pós-ganglionares simpáticas e parassimpáticas, gânglios e fibras pré-ganglionares parassimpáticas supridas pelo nervo vago (ROZÉ, 1980).

3.1 ESTRUTURA DO PLEXO MIOENTÉRICO

O PM encontra-se entre as duas camadas musculares do intestino (circular interna e longitudinal externa), ao redor de toda a circunferência do tubo digestório e ao longo de todo o trato gastrointestinal (FURNESS, 2000), formando uma rede de tecido nervoso altamente especializada, tanto funcional quanto estruturalmente (GABELLA, 1982). Os axônios dos neurônios mioentéricos inervam outros gânglios, com presença de numerosas sinapses axo-somáticas e axo-dendríticas (GABELLA, 2004), como também as camadas musculares e a mucosa (FURNESS, 2006).

O PM possui três componentes principais: os plexos primário, secundário e terciário. O plexo primário inclui os gânglios e fibras interganglionares (chamadas de fibras internodais). O plexo secundário corresponde às fibras mais finas que saem das fibras internodais e as cruzam paralelas à camada muscular circular e inervam-no. O plexo terciário consta dos feixes mais finos que enchem os espaços entre a rede formada pelo plexo primário e inervam a camada muscular longitudinal (FURNESS, 2006).

Existe uma variação considerável no tamanho dos gânglios mioentéricos. Na cobaia, os gânglios no íleo podem ter de 5 a 200 neurônios; mas também podem ser encontrados neurônios solitários adjacentes a um tronco nervoso (FURNESS, 2006). Os gânglios nem sempre podem ser bem individualizados; existem regiões do colo, por exemplo, onde os gânglios estão completamente fusionados um com os outros formando uma espécie de lâmina fenestrada (GABELLA, 1982).

Os gânglios são deformáveis pelo movimento da musculatura intestinal, por isso, a avaliação do formato e da densidade espacial deve levar em conta o estado de contração da parede intestinal (GABELLA; TRIGG, 1984).

Os ramos do nervo vago entram no trato gastrointestinal na união entre o esôfago e o estômago e formam ramos intramurais que se ramificam em todo o PM (WANG; POWLEY, 2000). Ramos intramurais do nervo pélvico correm ao longo do intestino grosso como fibras mielínicas (CHRISTENSEN; RICK, 1987). As fibras simpáticas entram como feixes de fibras nervosas acompanhando as artérias mesentéricas (FURNESS, 2006).

A coordenação da atividade entre as diferentes partes do trato gastrointestinal é dada por neurotransmissores (NT) que determinam os reflexos neurais. Algumas vias reflexas estão presentes dentro da parede intestinal e algumas saem do intestino em direção ao sistema nervoso central ou ao gânglio pré-vertebral simpático e voltam à parede intestinal; desta maneira, o plexo mioentérico está envolvido nas atividades reflexas e integrativas do intestino (FURNESS, 2000). Apenas sob a ação do SNE, o intestino contrae-se normalmente, contudo, os neurotransmissores exercem um efeito modulador da motilidade intestinal (FURNESS, 2006).

3.2 ULTRAESTRUTURA DO PLEXO MIOENTÉRICO

Os gânglios entéricos são estruturas compactas compostas por neurônios, glia e processos neuronais (GABELLA, 1972), sem a presença de vasos sanguíneos, tecido conjuntivo ou fibrilas colágenas. Os gânglios não estão encapsulados, estão apenas cobertos por uma fina lâmina basal e o tecido conjuntivo das camadas musculares. Os gânglios entéricos recebem seus nutrientes por difusão dos vasos sanguíneos através do tecido conjuntivo que os rodeia. Não existe uma barreira efetiva gânglio/sangue, ou seja, diversos medicamentos que não afetam o sistema nervoso central podem afetar o SNE (FURNESS, 2006).

As sinapses têm densidades pré e pós-sinápticas e acumulação pré-sináptica de vesículas de armazenamento de neurotransmissores, como toda sinapse típica. São observadas terminações livres de

axônios na união com as células intersticiais de Cajal, células musculares e a mucosa (GABELLA, 1972).

3.3 TIPOS DE NEURÔNIOS NO PLEXO MIOENTÉRICO

Os neurônios mostram diferentes formatos e características eletrofisiológicas, e uma grande variedade de códigos químicos que refletem as suas diferenças funcionais (FURNESS, 2006).

Os neurônios foram primeiramente classificados por Dogiel[1] (1899 apud FURNESS, 2006, p. 1), de acordo com a sua morfologia como tipos I, II e III. Os neurônios tipo I são achatados, ligeiramente alongados e com bordas estreladas. Possuem de 4 a 20 dendritos laminares e 1 axônio e seu tamanho é de 13-35 μm de comprimento por 9-22 μm de espessura. Os neurônios tipo II possuem corpos celulares grandes, redondos ou ovalados. Possuem 3-10 dendritos e 1 axônio, mas alguns são pseudo-unipolares. Seu tamanho é de 22-47 μm de comprimento por 13-22 μm de espessura. Os processos longos correm na direção do músculo circular e dão lugar a ramos finos com varicosidades que vão ao mesmo gânglio e a gânglios adjacentes, incluindo outros neurônios tipo II. Estes neurônios possuem uma grande quantidade de mitocôndrias e lissosomas. Os neurônios tipo III têm um formato filamentoso (FURNESS, 2006).

A classificação funcional divide os neurônios em neurônios motores, interneurônios, neurônios intrínsecos aferentes primários (IPANs, nas suas siglas em inglês) e neurônios intestinofugais. Já foi caracterizado o código químico de cada um desses tipos neuronais, especialmente na cobaia. O código químico é definido pelos neurotransmissores (NT) presentes nos neurônios mioentéricos (FURNESS, 2006).

Já foram identificados muitos NT no SNE, sendo os mais importantes a acetilcolina (ACh), o óxido nítrico (NO), a noradrenalina (NA), o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), a serotonina ou 5-Hidroxitriptamina (5-HT), as taquicininas (TK) (entre elas a substância P), o ácido gama-amino-butírico (GABA), a somatostatina (SOM), a calretinina e a calbindina, entre outros (FURNESS, 2000).

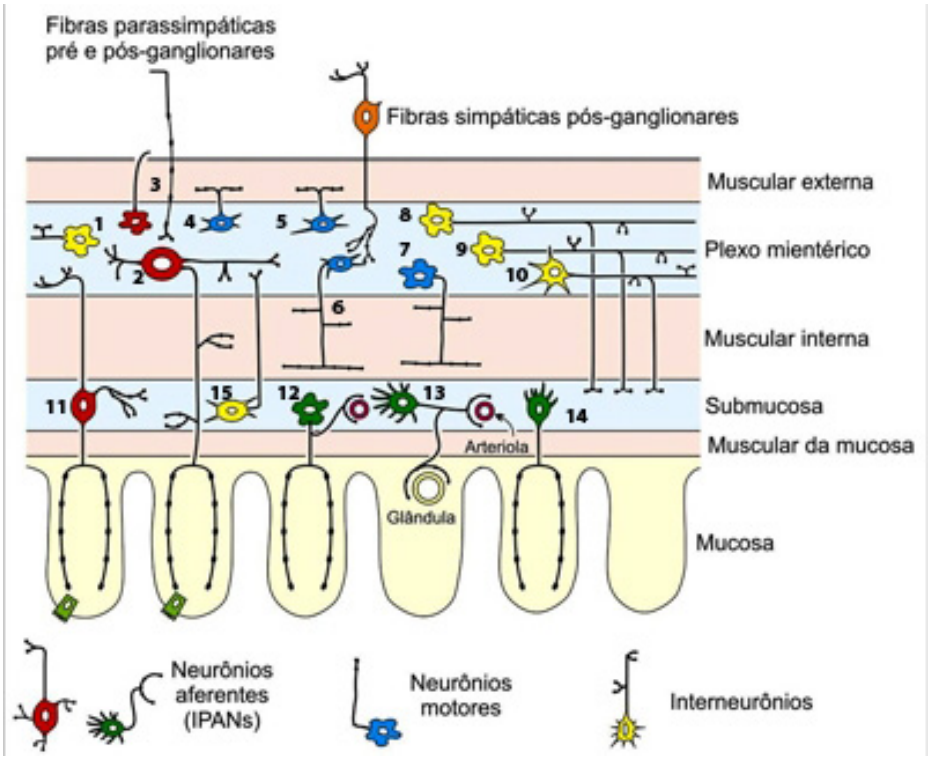
De acordo com a classificação funcional e o código químico, os neurônios do sistema nervoso entérico foram divididos em 14 tipos diferentes (FURNESS, 2000) (Figura 1).

---

[1] DOGIEL, A. Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. **Arch Anat Physiol Leipzig Anat Abt Jg** [S.I.], p. 130-158, 1899.

3.3.1 Neurônios motores

Estes neurônios se encaixam na classificação morfológica Dogiel tipo I (FURNESS, 2006). Os neurônios motores excitatórios do PM são colinérgicos, com o seguinte código químico: ChAT/TK/GABA e ChAT/Calretinina/TK. Estes neurônios representam 37% dos neurônios do PM. Os inibitórios possuem receptores para NOS/VIP/ATP e NOS/VIP/GABA, e estão envolvidos nos reflexos inibitórios descendentes e de acomodação no intestino. Os neurônios inibitórios correspondem a 18% do total de neurônios do PM (FURNESS, 2000). As células musculares lisas formam um sincício elétrico inervado por estes neurônios (KUNZE; FURNESS, 1999).



Fonte: FURNESS, 2006

Figura 1 - Tipos de neurônios no intestino. LM, camada muscular longitudinal; MP, plexo mioentérico; CM, camada muscular circular; SM, plexo submucoso; Muc, mucosa. Interneurônios ascendentes (reflexos locais, 1), neurônios aferentes intrínsecos primários do plexo mioentérico (2) e submucoso (11), neurônios intestinofugais (3), neurônios excitatórios (4) e inibitórios (5) da camada muscular longitudinal, neurônios excitatórios (6) e inibitórios (7) da camada muscular circular, interneurônios descendentes (8, 9, 10), neurônios colinérgicos secretomotores (12, 13, 14) e neurônios uni-axonais (15)

3.3.2 Interneurônios

Estes neurônios correspondem aos tipos I e III de Dogiel, com uma participação de 17% do total de neurônios do PM (FURNESS, 2006). Os interneurônios ascendentes colinérgicos são componentes dos reflexos propulsores do intestino, com o código químico ChAT/Calretinina/TK. Os interneurônios descendentes do PM possuem dois tipos de código químico: 1) ChAT/NOS/VIP: envolvidos nos reflexos locais, 2) ChAT/5-HT: envolvidos em reflexos secretomotores, 3) ChAT/SOM: medeiam o complexo mioelétrico migratório (FURNESS, 2000).

3.3.3 Neurônios aferentes intrínsecos primários (IPANs)

Os IPANs, cujo código químico é ChAT/Calbindina/TK, atuam como quimiosensores e mecanorreceptores da mucosa e são ativados pelo conteúdo no intestino. Fazem conexão direta com os neurônios motores e com os interneurônios ascendentes e descendentes (KUNZE; FURNESS, 1999; FURNESS, 2000). Estes neurônios correspondem com a morfologia tipo II multiaxonal de Dogiel e representam o 26% da população total de neurônios mioentéricos (FURNESS, 2006).

3.3.4 Neurônios intestinofugais

São neurônios cujos axônios se projetam aos gânglios simpáticos, formando parte do braço eferente dos reflexos entero-entéricos, à medula espinal e ao tronco encefálico. Correspondem ao tipo II de Dogiel e representam 2% do total de neurônios do PM (FURNESS, 2006).

3.4 PRINCIPAIS NEUROTRANSMISSORES NO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO

A acetilcolina é o principal NT que determina a excitabilidade do músculo liso e atua através dos receptores muscarínicos M_2 (TAKEUCHI et al., 2005), tendo como co-transmissor a substância P (FURNESS, 2006). O NO, mediador primário da transmissão não-adrenérgica não-colinérgica no trato gastrointestinal, tem como função regular a atividade neuronal motora colinérgica (além de outros neurotransmissores), já que medeia o relaxamento do músculo liso do trato gastrointestinal (BROOKES, 1993). O VIP e o ATP são os NT secundários da inibição motora do intestino (FURNESS, 2006).

Em 1990, o NO foi postulado como neurotransmissor por Bredt, (BREDT; HWANG; SNYDER, 1990). O NO é um mensageiro químico peculiar, porque não é armazenado, mas produzido à demanda quando a enzima óxido nítrico sintase (NOS) é ativada (FURNESS, 2006). O NO é formado a partir de L-arginina com intermediação da enzima NOS, produzindo citrulina como sub-produto e usando NADPH como co-fator (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Já foi demonstrado que o NOS é co-localizado com a atividade da diaforase de adenina dinucleótido fosfato (NADPH-diaforase ou NADPH-d), por meio de coloração histoquímica em várias espécies (HOPE et al., 1991; BELAI et al., 1992; WARD; TORIHASHI, 1995).

Os neurônios positivos ao NOS modulam a motilidade gastrointestinal exercendo um efeito inibitório pré-juncional na liberação de acetilcolina e substância P (HEBEISS; KILBINGER, 1998) ou por meio da ativação da guanilil ciclase e, subsequentemente, aumentando a concentração de GMPc no músculo liso (KANADA et al., 1992; SANDERS; WARD, 1992). Os neurônios nitrérgicos projetam suas fibras preferencialmente em direção anal (COSTA et al., 1992). Já foi demonstrado que as varicosidades presentes nas fibras imunorreativas a NOS fazem sinapse com outros neurônios mioentéricos no intestino delgado da cobaia (LLEWELLYN-SMITH et al., 1992).

Existe evidência farmacológica e fisiológica de que, no jejuno humano normal, o NO exógeno evoca uma hiperpolarização da membrana e inibe a atividade mecânica da camada muscular circular (STARK et al., 1993). A inibição da biossíntese de NO ou a aplicação de hemoglobina exôgena, conhecida por sua capacidade para inativar o NO, leva a uma atenuação do efeito relaxante da estimulação elétrica nos nervos NANC no intestino humano (BURLEIGH, 1992; STARK et al., 1993). Uma deficiência na inervação nitrérgica produz um segmento intestinal hiperexcitável e contraído (DAVIDSON; BAUER, 1958).

No intestino delgado da cobaia, os neurônios entéricos inibitórios contêm VIP, assim como em outras espécies. Esses neurônios projetam-se analmente para inervar o músculo circular (LLEWELLYN-SMITH et al., 1988; BROOKES; STEELE; COSTA, 1991). O VIP é detectado em fibras nervosas que inervam o músculo (FURNESS, 2006). Axônios reativos ao VIP são numerosos em todas as regiões do intestino, sendo de origem intrínseca (BRYANT et al., 1976). As fibras nervosas VIP-érgicas têm sido observadas inervando os corpos celulares nitrérgicos em forma de cesta. NOS e VIP não têm sido encontrados nos mesmos corpos neuronais no estômago de rato (TIMMERMANS et al., 1994); porém, foi descoberta co-localização dos dois NT no intestino delgado da cobaia (COSTA et al., 1992) e no intestino da codorna (BOROS et al., 1994). O VIP possui um potente efeito relaxante no músculo intestinal e têm sido identificados os sítios de ligação para VIP no músculo (ZIMMERMAN et al., 1988).

A substância P pertence ao grupo das taquicininas, que inclui também a neuroquinina A, o neuropeptídeo γ e o neuropeptídeo K; além disso, têm sido identificados os receptores apropriados e os pontos específicos de ligação para a substância P no músculo entérico (BURCHER et al., 1986; MAGGIO, 1988; SHUTTLEWORTH et al., 1991). O papel das taquicininas na excitação do músculo tem sido comprovado, já que a contração persiste depois do bloqueio muscarínico e é reduzida quando os receptores para taquicininas no músculo são antagonizados (BARTHÓ; HOLZER, 1985; SMITH; FURNESS, 1988). A imunorreatividade às taquicininas é muito disseminada nas fibras que inervam o músculo gastrointestinal e, em muitas espécies, as análises farmacológicas demonstram o envolvimento das taquicininas na transmissão nervosa (BARTHÓ; HOLZER, 1985).

3.5 DESENVOLVIMENTO DO SNE

Os neurônios do SNE são derivados das células da crista neural vagal da ectoderme, as quais migram ao longo de vias pré-definidas, em direção crânio-caudal (KUNTZ, 1910; JONES, 1942; YNTEMA; HAMMOND, 1954; GERSHON; CHALAZONITIS; ROTHMAN, 1993; BATES, 2002). Além da crista neural vagal, a crista neural sacra também contribui para a formação do SNE da parte posterior do intestino e do reto (LE DOUARIN; TEILLET, 1974; KAPUR, 2000).

A migração normal das células da crista neural no intestino depende do receptor de membrana tirosina-quinase (*Ret*) e suas moléculas relacionadas, do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e do seu receptor, GFR-1. Outro sistema regulatório que controla o desenvolvimento do SNE são as endotelinas (ETs) que se ligam aos receptores da superfície celular ET_A e ET_B (NEWGREEN; YOUNG, 2002). Portanto, parece que a forma mais importante de ETs no SNE (ET_3), é produzida pelo mesênquima em desenvolvimento e que seu receptor, ET_B, encontra-se nos neurônios entéricos (KAPUR et al., 2004).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que as células precursoras que chegam ao intestino são multipotenciais (SAFFREY; BURNSTOCK, 1994), e não expressam marcadores neurais (PHAM; GERSHON; ROTHMAN, 1991). No camondongo, o processo de migração inicia-se ao redor do nono dia de gestação (ROTHMAN; GERSHON, 1982). Nos dias 9,5-10, as células começam a expressar o fenótipo neural, como imunoreatividade a neurofilamento e características catecolaminérgicas (BAETGE; GERSHON, 1989). O fenótipo catecolaminérgico é perdido quando as células derivadas da crista neural adquirem seus fenótipos finais. As células derivadas da crista neural continuam a se dividir ao longo de toda a vida fetal (PHAM; GERSHON; ROTHMAN, 1991).

Esses precursores dos neurônios entéricos devem formar os 15 a 20 tipos de neurônios presentes no SNE. Assim sendo, devem existir mecanismos de sinalização para controlar a diferenciação final, a densidade dos neurônios, as conexões que fazem e o posicionamento dos plexos mioentérico e submucoso. À medida que as células se depositam nas diversas regiões do intestino, inicia-se o processo de maturação e formação de gânglios (FURNESS, 2006). Foram identificados diversos fatores de transcrição que iniciam a diferenciação dos neurônios entéricos, dentre eles os genes Phox2b e Sox10 (NEWGREEN; YOUNG, 2002). O fator de crescimento neural (NGF) pode ser também um agente regulatório da expressão de vários neuropeptídeos entéricos (BELAI; ABERDEEN; BURNSTOCK, 1992).

O plexo mioentérico é o primeiro que se forma, por fora da camada muscular circular. Posteriormente, a camada muscular longitudinal derivada do mesênquima é formada, colocando o plexo entre duas paredes musculares. Após isto, os neuroblastos do plexo mioentérico migram centripetamente em direção oral-aboral para formar o plexo submucoso (GERSHON; CHALAZONITIS; ROTHMAN, 1993; BATES, 2002).

No início, as células apresentam-se distribuídas de maneira uniforme, com exceção do ceco, onde formam grupos. À medida que o intestino aumenta em comprimento e diâmetro, os neurônios começam a formar gânglios (YOUNG; HEARN; NEWGREEN, 2000).

Os nervos adrenérgicos e colinérgicos aparecem entre as semanas 9ª e 12ª de gestação e o desenvolvimento da inervação NANC se apresenta durante a semana 12ª dentro do PM, no humano (BRANDT; TAM; GOULD, 1996).

No término da gestação existe atividade cíclica regular e atividade propulsiva no intestino (BUENO; RUCKEBUSCH, 1979). Porém, o início do controle simpático extrínseco da motilidade no rato, acontece no terceiro ou quarto dia pós-natal (HILL; NGU, 1987). Durante o período perinatal e de desmame, o trato gastrointestinal sofre um processo de maturação morfológica e fisiológica (LE DOUARIN; TEILLET, 1973; VAN GINNEKEN et al., 1998b). O SNE precisa se adaptar constantemente às mudanças pós-natais do intestino, como aumento do comprimento ou mudanças nos hábitos alimentares (SCHÄFER; HÄNSGEN; MESTRES, 1999).

Gabella (1971) demonstrou que durante a vida pré e pós-natal o número total de neurônios entéricos aumenta, como também a área neuronal, fato que pode ser explicado pelo aumento da quantidade de músculo liso a ser inervado (GABELLA, 1984). O aumento do volume muscular se manifesta em aumento das camadas musculares por divisão celular mitótica e pode ser atribuído à mudança de dieta durante as primeiras semanas após o nascimento (WARD; TORIHASHI, 1995).

Wester, O'Brian e Puri (1999) demonstraram que os neurônios entéricos podem mudar seu código químico durante o desenvolvimento, como também seu número e densidade. A expressão de NT

começa no décimo dia embrionário no camondongo, com a detecção de enzimas que reduzem o NADPH, indicando a presença de NOS e NO (BRANCHEK; GERSHON, 1989). Outros marcadores neurais que aparecem durante o período fetal são NPY, colina acetiltransferase, 5-HT, CGRP, encefalina e VIP (PHAM; GERSHON; ROTHMAN, 1991).

Schäfer, Hänsgen e Mestres (1999) observaram que a intensidade da coloração com azul cuprolínico aumenta com a idade e foi maior no duodeno do que no colo. Esse achado pode refletir um grau variável de maturidade, como já foi demonstrado por vários autores que analisaram a atividade da NADPH-d durante o desenvolvimento embrionário no cão (WARD; TORIHASHI, 1995), na codorna (BOROS et al., 1994) e no humano (TIMMERMANS et al., 1994); e a atividade da AChT no rato (VANNUCCHI; FAUSSONE-PELLEGRINI, 1996).

No camondongo, a imunorreatividade para Substância P e VIP pode ser detectada pela primeira vez no dia 14 da gestação (ROTHMAN; NILAVER; GERSHON, 1984), e no caso do VIP, podem ser desenvolvida nos neurônios até o quinto dia pós-natal. A diferenciação para neurônios colinéricos acontece entre os dias 8 e 15 da gestação (PHAM; GERSHON; ROTHMAN, 1991).

No rato, neurônios NOS-IR e VIP-IR estão presentes ao momento do nascimento e aumentam em número e localização durante as primeiras três semanas de vida (BELAI; COOPER; BURNSTOCK, 1995; MATINI; MAYER; FAUSSONE-PELLEGRINI, 1997). Em contraste, (TIMMERMANS; ADRIAENSEN; LEFEBVRE, 1999) não detectaram um aumento nos neurônios positivos à atividade da NADPH-d durante o desenvolvimento pós-natal.

A diferenciação dos plexos entéricos é dependente do micro-ambiente, já que as mudanças nos plexos estão inter-relacionadas e correlacionadas com as mudanças na dieta, por exemplo, o surgimento das vesículas sinápticas nas fibras nervosas. A diferenciação do plexo mioentérico torna-se completa durante o período de desmame (FAUSSONE-PELLEGRINI; MATINI; STACH, 1996).

Algumas vezes a migração das células da crista neural até o intestino falha, o que gera problemas de motilidade intestinal em animais e humanos recém-nascidos. Dentre as doenças que apresentam falta ou diminuição de neurônios no plexo mioentérico estão a doença de Hirschsprung, a hipoganglionose e a displasia intestinal neuronal. A fisiopatologia destas alterações ainda é obscura, devido ao desconhecimento da complexa interação entre os elementos que são necessários para uma motilidade intestinal normal (PARAN; ROLLE; PURI, 2006).

3.6 ASPECTOS METODOLÓGICOS DA PESQUISA DO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO

A densidade neuronal no SNE varia drasticamente ao longo do comprimento e da circunferência intestinal (SCHÄFER; HÄNSGEN; MESTRES, 1999). A perda neuronal, amplamente reportada como uma conseqüência da idade, poderia ser realmente uma diminuição da densidade por área devida ao crescimento do intestino com um número constante de neurônios (PHILLIPS; POWLEY, 2007). O estiramento ou a retração da parede intestinal durante a fixação do material também afetam bastante a densidade (SCHÄFER; HÄNSGEN; MESTRES, 1999). Efetivamente, vários autores interpretam uma diminuição na densidade neuronal como uma diminuição do número total de neurônios durante o desenvolvimento pós-natal (SRI PARAN; ROLLE; PURI, 2009), sem levar em conta o efeito do crescimento do intestino, que aumenta a área superficial na qual estão distribuídos os neurônios.

Além disso, a falta de uniformidade na descrição dos resultados quantitativos no SNE dificulta a comparação de resultados entre diferentes estudos. A densidade neuronal algumas vezes é estimada nos preparados de membrana e é reportada por comprimento ganglionar (SCHUSSER; WHITE, 1997), por área ganglionar (KARAOSMANOGLU et al., 1996; SCHÄFER; HÄNSGEN; MESTRES, 1999) ou por área superficial da serosa (GABELLA, 1971; VAN GINNEKEN et al., 1998a). Outras vezes é estimada em cortes histológicos e é reportada como número de neurônios por milímetro de seção (MATINI et al., 1995).

Na maioria dos estudos não é determinado o número total de neurônios. Existem autores que estimaram este parâmetro multiplicando a densidade pelo comprimento do segmento, o que gera um resultado fornecido em células/cm (KARAOSMANOGLU et al., 1996). Já o grupo da Dra. Van Ginneken multiplica a densidade por área superficial da serosa pela área total do segmento (VAN GINNEKEN et al., 1998a; VAN GINNEKEN et al., 2001a,b; OSTE et al., 2005b; VAN HAVER et al., 2008), o que sem dúvida é mais acurado.

A estereologia tem demonstrado amplamente as dificuldades existentes na quantificação acurada de estruturas biológicas e tem questionado o valor real dos dados reportados como densidade comparada com o número total, sendo este último o que reflete realmente a funcionalidade do órgão (HOWARD; REED, 1998).

3.7 SISTEMA DE INFORMAÇÃO GEOGRÁFICA (SIG) APLICADA NA PESQUISA DO SNE

Um Sistema de Informação Geográfica (SIG) é um sistema de hardware, software, informação espacial e procedimentos computacionais que permite e facilita a análise, gestão ou representação do

espaço e dos fenômenos que nele ocorrem (LONGLEY et al., 2005).

As ferramentas próprias da análise de dados em SIG são normalmente usadas para interpretação de imagens de satélite, mas por definição, podem ser usadas na interpretação de qualquer imagem digital, com o único requisito de estar referenciada por algum tipo de coordenadas (geográficas, cartesianas, etc) (LONGLEY et al., 2005).

Até agora, o SIG tem sido aplicado nas mais variadas áreas, tais como previsão meteorológica, controle de desmatamento de florestas, sistemas de censo, aplicações de redes (telecomunicações, aqueduto, entre outros) e cadastro de imóveis (QUEIROZ; RODRIGUES; GÓMEZ, 2004). Todavia, sua aplicação no campo da anatomia é inovadora. A maior vantagem está representada na possibilidade de extrair as informações contidas nas imagens através da sua classificação, com a finalidade de identificar com acurácia a informação de cada pixel, classificando-os em categorias de acordo com sua informação espectral (LONGLEY et al., 2005; JENSEN, 2009).

O SNE pode ser estudado de maneira analógica aos estudos geográficos de populações (humanas, animais, vegetação, minerais, etc.) e as suas inter-relações podem ser deduzidas da mesma maneira. Os neurônios e os axônios são estruturas que ocupam um espaço, e a maneira em que ocupam tal espaço pode indicar o seu grau de desenvolvimento.

3.8 PROCESSO E CADEIA DE MARKOV

Um processo de Markov consiste em um conjunto de objetos e em um conjunto de estados tais que: i) em qualquer instante cada objeto deve estar em um estado, sem que necessariamente objetos distintos estejam em estados diferentes e ii) a probabilidade de que um objeto passe de um estado para outro (que pode ser o mesmo que o inicial) em um período de tempo dado, depende apenas desses dois estados. O número inteiro de períodos de tempo passados desde o início do processo é o *estágio* do processo. Esse número pode ser finito ou infinito (AGUILERA, 2009).

Se o número de estados é finito ou infinito numerável, o processo Markov é uma *cadeia de Markov*. Uma cadeia de Markov com um número finito de estados diz-se uma cadeia de Markov finita. A cadeia de Markov é um caso particular de processo estocástico (coleção de variáveis aleatórias indexadas por um parâmetro t Є R, entendido como tempo) com estados discretos (o parâmetro, em geral o tempo, pode ser discreto ou contínuo; no primeiro caso, t é numerável) e apresenta a propriedade Markoviana, também chamada de memória markoviana, consistindo em que os estados anteriores são irrelevantes para a predição dos estados seguintes, desde que o estado atual seja conhecido (SANTOS, 2006; COSTA; FEITOSA; CAMPOS, 2007).

Formalmente, uma cadeia de Markov é uma sequência X_1, X_2, X_3, ... de variáveis aleatórias, cujo escopo é chamado de *espaço de estados*, onde X_n denota o estado do processo no tempo n. Se a distribuição de *probabilidade condicional* de X_{n+1} nos estados passados é uma função apenas de X_n, então:

$$\Pr(X_{n+1} = x | X_0, X_1, X_2, \ldots, X_n) = \Pr(X_{n+1} = x | X_n),$$

onde x é algum estado do processo. A identidade acima define a *propriedade de Markov* (NOGUEIRA, 2009).

No processo Markoviano, o estado do sistema no tempo 2 pode-se predizer pelo estado do sistema no tempo 1 através de uma matriz de probabilidades de transição de cada classe de cobertura (neste caso, neurônios, axônios e espaço livre) a cada una das outras classes de cobertura (SANTOS, 2006; COSTA; FEITOSA; CAMPOS, 2007; GRIGOLETTI, 2010). No Idrisi, o módulo MARKOV pode ser utilizado para criar a matriz de probabilidade de transição.

De acordo com Grigoletti (2010), uma das mais importantes características exibidas por muitas cadeias de Markov é um comportamento de equilíbrio a longo prazo (pouco ou nada variam após um tempo t). Esta característica é atribuída a cadeias de Markov *regulares*. Isto pode ser verificado se em uma matriz de transição P, alguma potência de P contêm somente entradas positivas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas fêmeas de ratos da linhagem Wistar, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram mantidos de acordo com as recomendações do Instituto de Pesquisa em Animais de Laboratório (ILAR, 1996), até atingirem as idades definidas por grupo. Os ratos foram acondicionados em gaiolas de polipropileno com uma camada de maravalha de aproximadamente 3 cm, trocada a cada 3 dias, em uma sala com temperatura controlada por meio de aparelho de ar condicionado (22ºC ± 2 ºC) e fotoperíodo de 12 horas (luzes acessas às 7 horas). Em cada caixa foi colocada ração comercial de referência para ratos (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S.A.) e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com a idade pós-natal, com um *n* de 5 indivíduos por grupo: G0- 0 dias, G7- 7 dias; G21- 21 dias e G60- 60 dias. Devido ao pequeno tamanho do intestino, especialmente nos grupos G0 e G7, e às exigências técnicas de cada reação, foram usados três grupos diferentes de animais, assim: 1) coloração pan-neuronal, 2) histoquímica para NADPH-d e 3) histoquímica para acetilcolinesterase (AChE) e imuno-histoquímica.

Todos os procedimentos desta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Bioética da FMVZ-USP, sob o protocolo No. 1446/2008.

4.2 EUTANÁSIA, COLETA, PREPARAÇÃO E AMOSTRAGEM DO INTESTINO

A eutanásia dos animais foi feita com dose letal de Pentobarbital sódico (200 mg/kg de massa corporal, intraperitoneal) (CLOSE et al., 1996). Após a eutanásia, o abdome foi aberto por meio de uma incisão na linha média ventral. O jejuno e colo foram removidos considerando as suas características anatômicas e localização topográfica dentro do abdome. O jejuno é a porção mais longa e enovelada do intestino delgado, desde a flexura duodeno-jejunal até a prega ileo-cecal; já o colo estende-se a partir do orifício ceco-cólico até o início do reto (entrada da cavidade pélvica), incluindo desta forma o colo ascendente, transverso e descendente (KOMAREK, 2000).

O conteúdo intestinal foi retirado e os segmentos foram lavados com solução de tampão fosfato (PBS; 0,1 M, pH 7,4; protocolo no Apêndice A). Cada segmento foi escaneado para, posteriormente, estimar a área superficial da serosa (ver item 4.6.1) e foi medido o seu comprimento com uma régua.

Posteriormente, cada segmento foi cortado em fragmentos de tamanhos aproximadamente iguais, com um comprimento médio de 5 cm, e foram amostrados 5 fragmentos utilizando o sistema de amostragem sistemática e uniformemente aleatória (SURS, sigla em inglês para "systematic uniform random sampling") (HOWARD; REED, 1998; GUNDERSEN et al., 1999). Tomando como base o número de fragmentos obtidos de cada segmento e o número de fragmentos a serem amostrados, foi calculado um início aleatório para todas as amostragens, usando uma tabela de números aleatórios (Apêndice B). Devido ao pequeno tamanho do colo, especialmente nos grupos G0 e G7, o comprimento médio de cada fragmento foi 0,5-1 cm e foram amostrados de 2 a 4 fragmentos.

Após isto, os fragmentos foram ligados em suas extremidades e preenchidos com diferentes soluções fixadoras por tempos determinados, dependendo da técnica a ser realizada (ver mais adiante a descrição de cada técnica). Mais tarde, foi removida a ligadura para permitir a saída do fixador do interior. Com a finalidade de obter os preparados de membrana, os fragmentos foram abertos por meio de um corte longitudinal no lado mesentérico e dissecados com o auxílio de pinças e tesouras oftalmológicas sob estéreo-microscópio com trans-iluminação (Zeiss Stemi SV 6). A dissecação consiste na separação das camadas submucosa e muscular circular, com o objetivo de remover e descartar a mucosa e a submucosa e preservar as camadas musculares (circular e longitudinal) e serosa, as quais permitem a visualização do plexo mioentérico nas diferentes colorações (Figura 2).

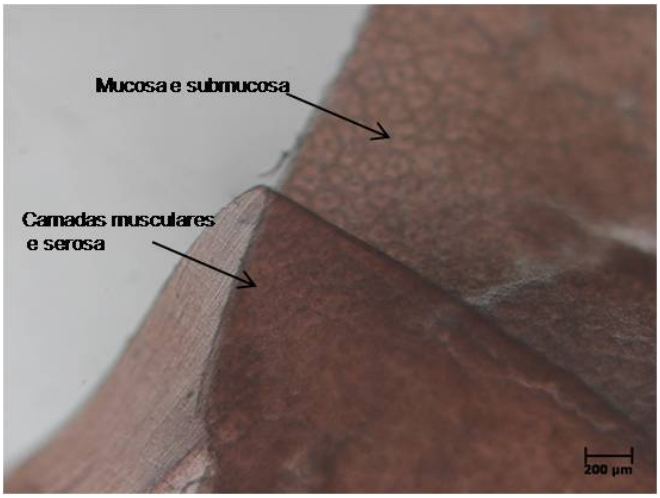


Figura 2 - Dissecação do preparado de membrana mostrando a separação entre as camadas submucosa e muscular circular. Desta forma, o preparado de membrana usado para observar o plexo mioentérico, contém as camadas musculares (circular e longitudinal) e a serosa. As camadas submucosa e mucosa foram descartadas

4.3 MARCAÇÃO HISTOQUÍMICA

As seguir descrevem-se os protocolos da marcação histoquímica para NADPH-d, que identifica os neurônios nitrérgicos (inibitórios), e para AChE, que identifica os neurônios colinérgicos (excitatórios).

4.3.1 Histoquímica para NADPH-d

O procedimento foi baseado no artigo publicado por (SCHERER-SINGLER et al., 1983) com modificações. Após a amostragem dos segmentos intestinais, os fragmentos obtidos foram ligados em suas extremidades oral e aboral, preenchidos com tampão fosfato (PBS 0,1 M; pH 7,4) e mergulhados em formaldeído 4% (Sigma, St.Louis, EUA) em PBS (0,1 M; pH 7,4), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após a fixação, foram feitas três sucessivas lavagens de 10 minutos em PBS (0,1 M; pH 7,4) e imersos na seguinte solução de incubação sob agitação contínua por 60-90 minutos a temperatura ambiente: 0,1 mg/ml de β-nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (β-NADPH, N-7505; Sigma, St.Louis, EUA), 0,5 mg/ml de Nitroblue Tetrazolium (NBT, N-6876; Sigma, St.Louis, EUA) em PBS (0,1M; pH 7,4) e 0,3% de Triton (X-100; Sigma, St.Louis, EUA). A reação foi monitorada mediante a observação sob o estereo-microscópio e quando os neurônios estavam completamente marcados, os fragmentos foram imersos na mesma solução de formaldeído por no mínimo 2 horas. Foram obtidos os preparados de membrana e posteriormente montados em lâminas para microscopia em uma mistura de glicerina/PBS na proporção 2,3:1.

4.3.2 Histoquímica para AChE

O processo foi baseado no artigo publicado por Karnovsky e Roots (1964) com modificações. Após a amostragem dos segmentos intestinais, os fragmentos obtidos foram ligados em suas extremidades oral e aboral, preenchidos com formaldeído 4% (Synth, Diadema, Brasil) em PBS (0,1 M; pH 7,0) e mergulhados na mesma solução fixadora durante 1 hora a temperatura ambiente. Após a fixação, os fragmentos foram mantidos a 4°C durante toda a noite na solução A (13,3 UTR/ml de hialurodinase [Hyalozima®, Apsen, São Paulo, Brasil] e 0,47 mg/ml de tetraisopropilpirofosfamida [ISO-OPMA, T1505; Sigma, St.Louis, EUA] diluídos em uma mistura de água destilada/solução de Krebs pH 7,3 [Protocolo no Apêndice A] em proporção 2:1; pH final: 6,0). Na sequência, os fragmentos

foram incubados por 12-18 horas a 4°C na solução contendo uma mistura 50:50 de solução A e solução B (Iodato de acetiltiocolina [A-5751; Sigma, St.Louis, EUA], 0,5 mg/ml, citrato de sódio [Synth, Diadema, Brasil] 100 mM 0,05 ml/ml; sulfato cúprico [J.T. Baker Ltda., São Paulo, Brasil] 30 mM 0,1 ml/ml, ferricianeto de potássio [J.T. Baker Ltda., São Paulo, Brasil] 5 mM 0,1 ml/ml, Triton [X-100; Sigma, St.Louis, EUA] 0,3%, diluído em PBS 0,1 M pH 6,0; pH final: 6,0). A reação foi monitorada mediante a observação sob o estereo-microscópio e quando os neurônios estavam completamente marcados, os fragmentos foram imersos na mesma solução de formaldeído por no mínimo 2 horas.

Foram obtidos os preparados de membrana e montados em lâminas gelatinizadas, as quais foram deixadas para secagem a temperatura ambiente por 20-30 minutos. Depois foram desidratados em uma série crescente de alcoóis (Álcool etílico; Synth, Diadema, Brasil) (2 minutos em 70%, 80%, 90%, 95%, 2 minutos por 3 vezes em 100%) e diafanizados em xileno (Synth, Diadema, Brasil) (2 minutos, 3 vezes consecutivas). As lâminas foram finalmente montadas com Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

4.4 COLORAÇÃO PAN-NEURONAL COM AZUL CUPROLÍNICO

O protocolo utilizado foi baseado no artigo dos pesquisadores (HOLST; POWLEY, 1995). Após a amostragem dos segmentos intestinais, os fragmentos obtidos foram ligados em suas extremidades oral e aboral, preenchidos com formaldeído 4% (Synth, Diadema, Brasil) em PBS (0,1M; pH 7,4) e mergulhados na mesma solução fixadora durante 2 horas no mínimo a temperatura ambiente. Foram obtidos os preparados de membrana, montados em lâminas gelatinizadas e deixados 10-20 minutos para secagem a temperatura ambiente. Posteriormente cada preparado foi coberto com uma solução micro-filtrada (filtro Millipore 0,22 µm) de azul cuprolínico (Ptalocianina Quinolínica 0,5% w/v [cat. No. 17052, Polysciences, Warrington, PA]) diluído em tampão sódio acetato 0,05 M pH 5,6, com adição de cloreto de magnésio ($MgCl_2$; Synth, Diadema, Brasil) 1,0 M, pH final 4,9) durante 1 hora em câmara úmida à temperatura de 37-40°C. Após isto, foi feita a lavagem com água destilada em mesa agitadora durante 1 minuto, e a diferenciação em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,6 (protocolo no Apêndice A), adicionado com $MgCl_2$ 1,0 M (pH final 4,9) por 2 minutos em mesa agitadora. Finalmente, foram feitas três lavagens sucessivas de 5 minutos com tampão fosfato potássio [KPBS] 0,02 M (Protocolo no Apêndice A).

Posteriormente, os preparados sofreram um processo de desidratação em alcoóis (Álcool etílico; Synth, Diadema, Brasil) com concentrações crescentes (2 minutos em 70%, 80%, 90%, 95%, 2 minutos

por 3 vezes em 100%) e diafanização em xileno (Synth, Diadema, Brasil) (2 minutos por 3 vezes). As lâminas foram finalmente montadas com Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Todo o processo foi realizado com base no artigo publicado por (COSTA et al., 1980). Após a amostragem dos segmentos intestinais, os fragmentos obtidos foram ligados em suas extremidades oral e aboral, preenchidos com fixador Zamboni (Protocolo no Apêndice A) e mergulhados na mesma solução fixadora durante 18 a 24 horas a uma temperatura de 4ºC. Após o período de fixação, os segmentos foram abertos pela borda mesentérica, lavados várias vezes em álcool 80% até a total remoção do fixador, com posterior desidratação em álcool 95%, 100% I e 100% II por um período de 30 minutos cada. Seguindo a desidratação o material foi diafanizado em xileno 100% por um período de 30 minutos, com posterior reidratação em seqüência decrescente de alcoóis (100%, 80% e 50%) por 30 minutos cada. Após a reidratação, os fragmentos foram mantidos em PBS 0,1M; pH 7,3 a 4ºC. Quando foi necessário armazená-los por mais de 1 semana, foi acrescentada azida sódica 0,4% (Synth®, Diadema, Brasil).

Os fragmentos foram dissecados para obter os preparados de membrana, colocados em microtubos e lavados em Triton (X-100; Sigma, St.Louis, EUA) 0,3% diluído em PBS (0,1M; pH 7,3) por 10 minutos sob agitação. Posteriormente, foram incubados em soro de cabra 10% por 2 horas sob agitação. Após este período, os fragmentos foram incubados em anticorpo primário de coelho anti-VIP ou anti- Substância P na diluição de 1:200 (Kit de imuno-fluorescência S-3026 e S-3049; Bachem-Peninsula, California, EUA), por um período de 22 horas a temperatura ambiente e 2 horas a 37ºC. Posteriormente, os fragmentos foram lavados em PBS (0,1M; pH 7,3) por 3 vezes de 5 minutos cada, incubados no escuro no anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugado com o fluorocromo FITC por 2 horas, lavados em PBS (0,1M; pH 7,3) por 5 minutos, 3 vezes consecutivas, e montados em lâminas de microscopia com glicerol.

4.6 ESTUDO MORFOMÉTRICO

Foram estimados os seguintes parâmetros: área superficial da serosa, densidade numérica neuronal/área, número total de neurônios e área neuronal média.

4.6.1 **Área superficial da serosa**

Os espécimes frescos foram colocados entre duas placas de vidro e escaneados junto a uma régua para ter a referência de tamanho. A estimativa da área superficial total da serosa foi feita sobrepondo aleatoriamente um sistema teste de pontos e contando o número de pontos localizados por cima no intestino (Figura 3). O número total de pontos contados foi multiplicado por 2, levando em conta a estrutura tubular do intestino. A imagem foi ampliada no tamanho adequado para contar como mínimo 100 pontos (no programa Microsoft Office Picture Manager), sendo esta ampliação diferente para cada grupo, devido às diferenças de tamanho do jejuno e do colo. Portanto, a área por ponto foi diferente em cada caso.

A área superficial da serosa foi calculada usando a seguinte fórmula (HOWARD; REED, 1998):

$$A = \Sigma p \,.\, a/p$$

Onde, Σp é a somatória dos pontos contados e a/p é a área por ponto. Esta última foi calculada de acordo com a ampliação linear final da imagem, usando a seguinte fórmula:

$$a/p = \Delta x^2 / M^2$$

Δx é a distância entre dois pontos no sistema teste e M é a ampliação, calculada com a seguinte equação:

$$M = \frac{\text{Medida na imagem ampliada}}{\text{Medida no tecido (régua escaneada)}}.$$

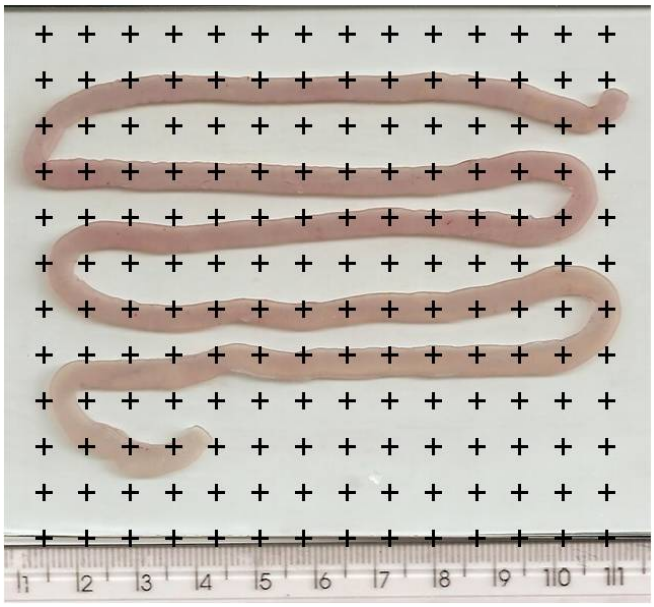


Figura 3 - Estimativa da área da superfície da serosa do jejuno mediante a contagem de pontos que incidem sobre a estrutura

4.6.2 Densidade numérica neuronal/área (Q_A)

A análise quantitativa foi realizada utilizando-se um microscópio de luz (Zeiss, Inc., Axioskop 40) equipado com câmera de vídeo (AxioCam HRC) e o software quantitativo (AxioVision 4.6.3). Em cada preparado de membrana, os campos a serem quantificados foram escolhidos usando o SURS. Com uma magnificação de 400x para NADPH-d dos grupos G21 e G60, e de 1000x para NADPH-d dos grupos G0 e G7 e AChE e azul cuprolínico de todos os grupos, foram quantificados os neurônios que ficaram dentro de um marco de quantificação sem viés com duas linhas de inclusão e duas linhas de exclusão, de acordo com Gundersen (1977). No caso das histoquímicas para NADPH-d e AChE, foram também quantificados separadamente os neurônios que tiveram uma coloração mais forte dos neurônios corados mais fracamente.

A área do marco foi de 29798,3 μm^2 no aumento de 40x e de 4.624,00 μm^2 no aumento de 100x (Figura 4). A regra de quantificação foi contar os núcleos dos neurônios corados, sem importar a intensidade da coloração, localizados dentro do marco sempre e quando não intersectassem a linha de exclusão ou as suas extensões. Foram incluídos todos os neurônios localizados nos diferentes planos focais (Figura 21). Um mínimo de 100 neurônios foram contados por segmento do intestino (jejuno e colo).

A seguinte equação foi usada (GUNDERSEN et al., 1988):

$$Q_A = \sum Q / \sum A_{(m)}$$

Onde, $\sum Q_A$ é a soma dos neurônios contados e $\sum A_{(m)}$ é a soma das áreas de todos os marcos.

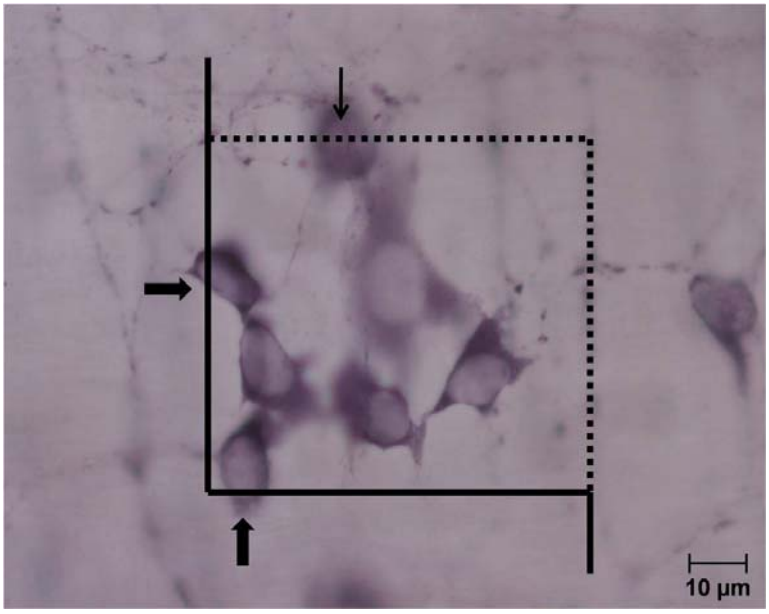


Figura 4 - Uso do marco de quantificação sem viés com linhas de inclusão (pontilhadas) e exclusão (contínuas) para a estimativa da densidade por área de neurônios no jejuno de ratos. Neste caso, foram quantificados os neurônios com o núcleo dentro do marco ou tocando a linha pontilhada (seta delgada), para um total de 5 neurônios. Os núcleos tocando a linha contínua (setas espessas) não foram quantificados. Na figura, neurônios nitrérgicos de jejuno do grupo G7

4.6.3 Número total de neurônios

Esta estimativa foi obtida multiplicando a densidade neuronal pela área superficial da serosa:

$$N = A \cdot Q_A$$

Esta estimativa é adequada, já que o plexo mioentérico está posicionado de uma maneira quase bidimensional e é possível contar todos os neurônios em uma determinada área.

4.6.4 Área neuronal média

A área neuronal foi estimada por meio de planimetria, usando o mesmo software mencionado no item 4.6.2. Este parâmetro foi obtido para as histoquímicas de NADPH-d e AChE, nos mesmos neurônios quantificados para a estimativa da densidade neuronal, fazendo a separação dos neurônios corados fortemente dos neurônios com coloração mais fraca.

4.7 ANÁLISE DA ÁREA OCUPADA POR NEURÔNIOS E AXÔNIOS ATRAVÉS DO SIG

O trabalho foi realizado a partir de fotografias do plexo mioentérico do jejuno e do colo dos quatro grupos, corados por meio da histoquímica para NADPH-d (uma imagem por grupo) e AChE (4 imagens por grupo das regiões oral e aboral). Nos dois grupos, o primeiro passo foi fazer uma análise visual do contraste das imagens em diferentes magnificações: 50x, 100x, 200x, 400x e 1000x. Na menor magnificação observou-se uma abrangência maior do número de neurônios e axônios por campo, porém, o contraste das tonalidades dos pixéis diminuiu, o que diminui a capacidade de diferenciação das estruturas. O melhor contraste foi observado na magnificação 100x, porém, a amostra não era representativa na distribuição das estruturas, o que não iria permitir fazer inferências estatísticas adequadas. No final, foram escolhidas as imagens do campo 20x, já que apresentaram a melhor relação entre área ocupada por neurônios e axônios/contraste dos pixeis. As imagens foram tratadas usando o software Idrisi, versão Andes.

O seguinte roteiro foi seguido para o tratamento das imagens (Figura 5).

4.7.1 Importação das imagens

As imagens em formato JPG foram importadas para o formato Idrisi, através do menu “file”, sub-menu “import”-opção “Desktop Publishing Formats”, comando “JPGIDRIS”. Durante esse processo, foi incluído o sistema de referência em cada fotografia, por meio da inclusão de coordenadas X/Y para cada pixel da foto (Figura 5a).

4.7.2 Decomposição das imagens

Sendo as imagens uma composição colorida do espectro do visível, foram separadas nas bandas 1, 2 e 3 (Figura 5b), correspondentes no espectro às cores primárias vermelho-verde-azul (RGB). A separação foi feita através do menu “display”, sub-menu “separate”. Tais imagens mostravam nesse ponto uma diferenciação na reflectância tanto nas áreas ocupadas pelas estruturas de interesse (neurônios e axônios) quanto nos espaços livres. A partir desse ponto, foi escolhida a imagem que melhor diferenciasse as estruturas entre si e dos os espaços livres.

4.7.3 Processamento das imagens

- *Reclassificação das áreas:* Uma vez escolhida a banda que seria trabalhada, foi produzida uma nova imagem ao reclassificar os valores da imagem de entrada (Figuras 5b, 5c e 5d). As classes e valores individuais foram especificados a partir da imagem original. A sequência de passos a partir do menu principal foi: "GIS Analisys" - "Database Query" - "Reclass", e foi feita em duas etapas: Uma primeira classificação supervisionada dos valores da banda escolhida (Figura 5, banda 2) para criar um número de classes de acordo com a tonalidade (Figura 5c) e, depois, uma segunda classificação supervisionada para separar as áreas ocupadas pelos neurônios e axônios dos espaços livres (Figura 5d).

- *Análise de áreas:* A etapa seguinte foi fazer a análise das áreas ocupadas pelos neurônios e axônios a partir das imagens reclassificadas (Figura 5e). A sequência de passos foi menu – "GIS Analisys" – "Database Query" - "AREA". Optou-se como valor de entrada, uma imagem e como valor de saída, os valores de atributo ao invés de outra imagem, isto para proceder depois à análise estatística dos resultados obtidos nesse processamento da imagem.

- *Análise markoviana*: A última etapa foi a análise markoviana das imagens (Figura 5f). Nesse processo usou-se como imagem de entrada a imagem reclassificada, gerando uma imagem de saída e uma tabela de valores de atributos. A sequência de passos foi "menu" - "GIS Analisys" - "Chance/time series" - "MARKOV".

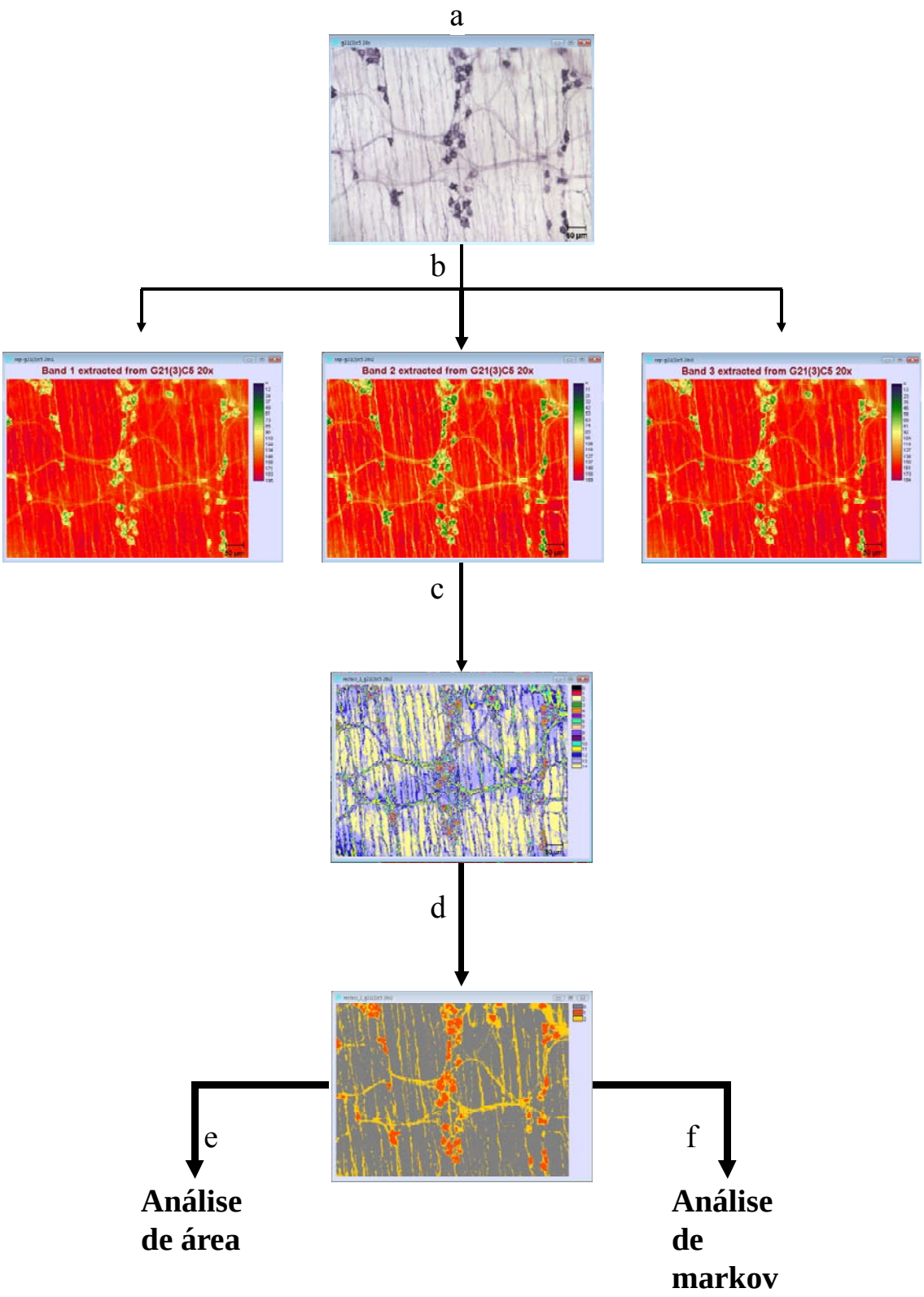


Figura 5 - Roteiro do processamento das imagens para a análise de áreas. No exemplo, imagem do grupo G21 para NADPH-d

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise de variância unidirecional (ANOVA) para testar diferenças gerais entre os grupos, considerando um nível de confiança de 95% ($p<0,05$). Devido a que alguns dados não cumpriam o suposto de homocedasticidade, foi feita a transformação logarítmica. Para detectar diferenças estatisticamente significativas entre grupos específicos foi realizado o teste de Tukey, com o mesmo nível de confiança de 95% ($p<0,05$). O mesmo procedimento foi realizado para detectar as diferenças na densidade numérica/área entre as diferentes porções (proximais e distais) de cada fragmento intestinal. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média. Foi utilizado o programa *Statistica 7.0*.

Para a análise estatística do espaço ocupado pelos neurônios e axônios através do SIG, foi usado *Statistica 7.0* para estabelecer diferenças entre grupos através do test X^2. A análise Markoviana (mudanças no tempo) das proporções da área ocupada por neurônios e axônios foi realizada no software Idrisi, versão Andes. Neste trabalho, foi assumida a probabilidade de transição em intervalos de 7 dias (passo do estado G0 a G7, com projeção para 21 dias de vida), 14 (passo do estado G7 a G21, com projeção para 60 dias de vida) e 39 dias (passo do estado G21 a G60, com uma projeção 60 dias de vida do animal), do possível estado futuro da frequência dos neurônios e axônios. Os resultados obtidos com as imagens usadas são apresentados no vetor de estados, onde se mostram as probabilidades de transição para a matrix no jejuno e no colo (a probabilidade do estado X_{t+1} ser X_{k+1} no instante t_{k+1}, dado que o estado X_{tk} é x_k no instante t_k).

5 RESULTADOS

5.1 ÁREA SUPERFICIAL DA SEROSA

A área média da superfície serosa do jejuno e do colo aumentou durante o desenvolvimento pós-natal, devido ao crescimento do intestino em geral (Gráfico 1 e Tabelas 1 a 5). O aumento foi significativo a partir do grupo G0 no jejuno ($p = 0,021$) e a partir do grupo G7 no colo ($p = 0,0002$).

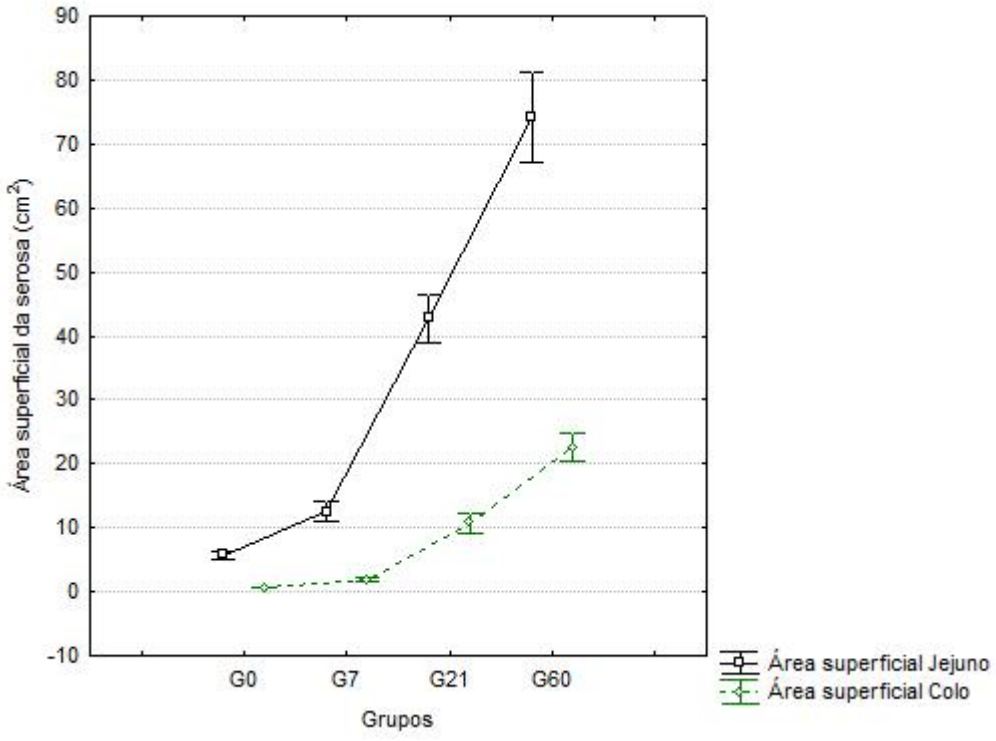


Gráfico 1 - Área superficial da serosa do jejuno e do colo em ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

5.2 HISTOQUÍMICA PARA NADPH-d

Diferenças qualitativas foram observadas no jejuno e no colo entre os grupos, desde a disposição dos gânglios, até o aspecto dos neurônios mioentéricos. Desta forma, tanto no jejuno quanto no colo dos animais dos grupos G0 e G7, os gânglios apresentaram-se mais densamente arranjados e com um número menor de neurônios, ao passo que nos demais grupos (G21 e G60) os mesmos estavam mais

afastados entre si e formados por um número maior de neurônios (Figura 6). Portanto, nos grupos G21 e G60 observou-se uma maior área aganglionar.

Quanto ao aspecto dos neurônios, foi evidente no jejuno e no colo dos animais do grupo G0 diversos neurônios com citoplasma pouco volumoso, conferindo à célula um formato quadrangular. A partir do grupo G7, a totalidade dos neurônios apresentava aspecto típico de célula madura, ou seja, neurônios multidendríticos uniaxonais, com citoplasma volumoso e núcleos redondos ou ovalados. Esta morfologia corresponde com os neurônios Dogiel tipo I. Os corpos neuronais apresentaram um citoplasma de cor roxa escura, com núcleo não reativo. Uma maior percentagem de células apresentou uma reação forte, enquanto os outros neurônios mostraram uma coloração mais fraca, no jejuno e no colo (Figura 7 e Gráficos 2 e 3).

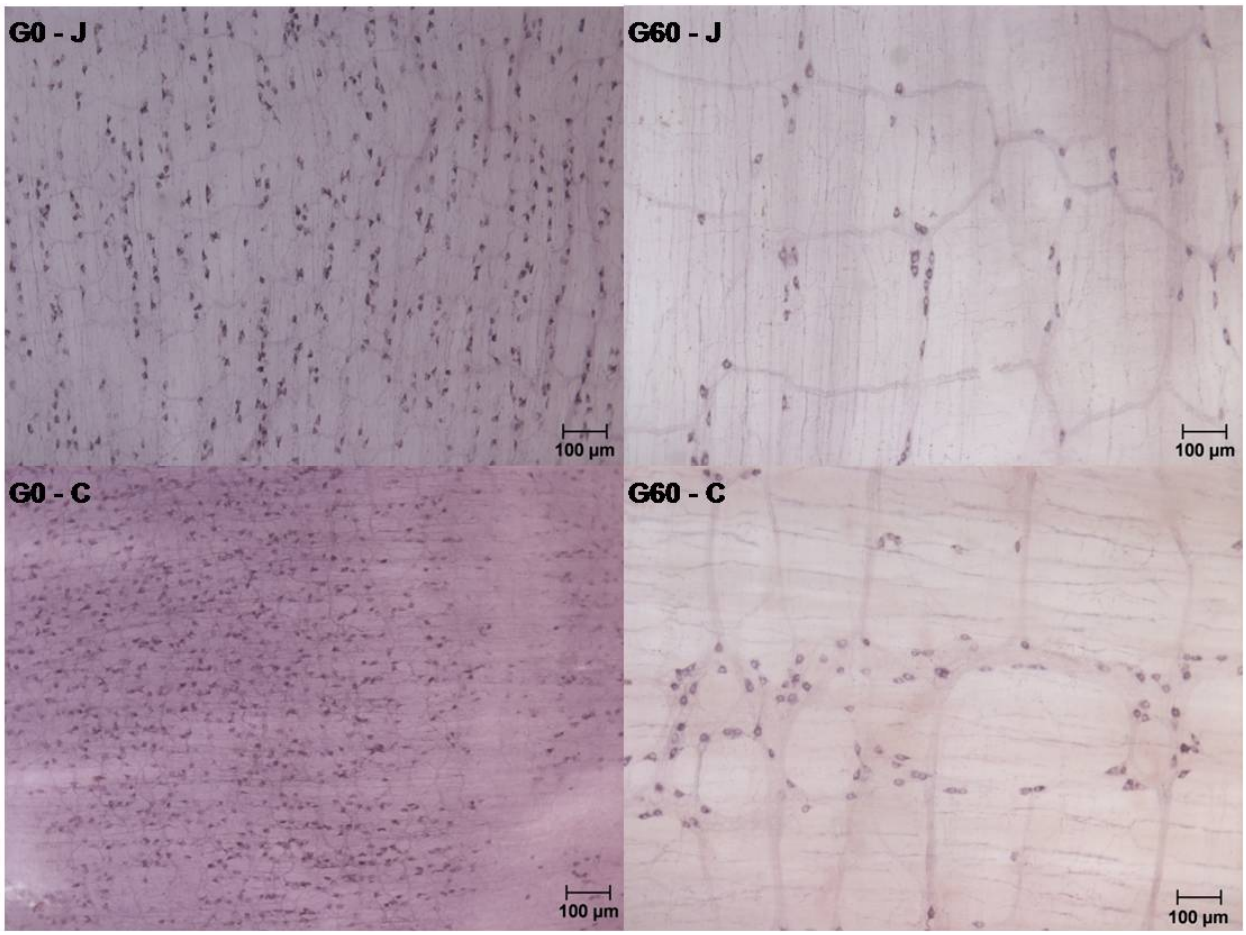


Figura 6 - Disposição dos gânglios reativos para NADPH-d no jejuno (J) e no colo (C) nos grupos G0 e G60 de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Notar como no grupo G0 dificilmente podem ser diferenciados gânglios e como no grupo G60 os gânglios aparecem mais separados entre si

Tabela 1 - Área superficial da serosa, densidade e número total de neurônios NADPH-d positivos no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Grupo	Área superficial da serosa (cm^2)	Densidade total (Q_A/cm^2)	Número total de neurônios	Área neuronal (μm^2)	Área neuronal NF (μm^2)	Área neuronal Nf (μm^2)
G0	4,97 ± 0,78	26839,41 ± 4423,18	133905,1 ± 34334,4[B]	132,85 ± 4,38	132,91 ± 6,50	132,80 ± 4,41
G7	13,75 ± 0,78	26434,85 ± 5333,18[A]	365874,6 ± 86309,0	147,27 ± 15,73[C]	143,44 ± 11,63	151,09 ± 21,85
G21	49,02 ± 7,92	6829,94 ± 884,03	334741,9 ± 63896,1	314,25 ± 8,60	313,42 ± 8,87	315,07 ± 9,24
G60	83,64 ± 5,20	4188,85 ± 966,22	351631,9 ± 90444,3	460,85 ± 18,05	458,97 ± 11,69	462,74 ± 33,41

Valores representam a média ± EPM (Erro padrão da média). Diferença estatísticamente significativa a partir de G7 (p=0,005)[A], entre G0 e G7 (p=0,005)[B], a partir de G7 (p < 0,002)[C]. NF (neurônios com coloração forte). Nf (neurônios com coloração fraca).

Tabela 2 - Área superficial da serosa, densidade e número total de neurônios NADPH-d positivos no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Grupo	Área superficial da serosa (cm^2)	Densidade total (Q_A/cm^2)	Número total de neurônios	Área neuronal (μm^2)	Área neuronal NF (μm^2)	Área neuronal Nf (μm^2)
G0	0,66 ± 0,10	64533,98 ± 15511,42 [A]	42725,10 ± 12350,65	118,05 ± 4,75[D]	117,68 ± 5,21	118,43 ± 5,42
G7	2,55 ± 0,20	42396,38 ± 5759,42	107058,20 ± 18996,14[B]	206,06 ± 10,41	206,27 ± 10,14	205,86 ± 11,54
G21	15,52 ± 2,60	17724,08 ± 2743,94	273976,0 ± 60707,59	357,39 ± 15,96	326,10 ± 45,89	346,41 ± 15,05
G60	30,04 ± 3,24	6730,40 ± 627,22	202450,30 ± 30090,02	495,95 ± 26,53	502,23 ± 34,94	489,66 ± 31,56

Valores representam a média ± EPM (Erro padrão da média). Diferença estatísticamente significativa a partir de G0 (p=0,01)[A], a partir de G7 (p < 0,028)[B], a partir de G0 (p < 0,001)[D]. NF (neurônios com coloração forte). Nf (neurônios com coloração fraca).

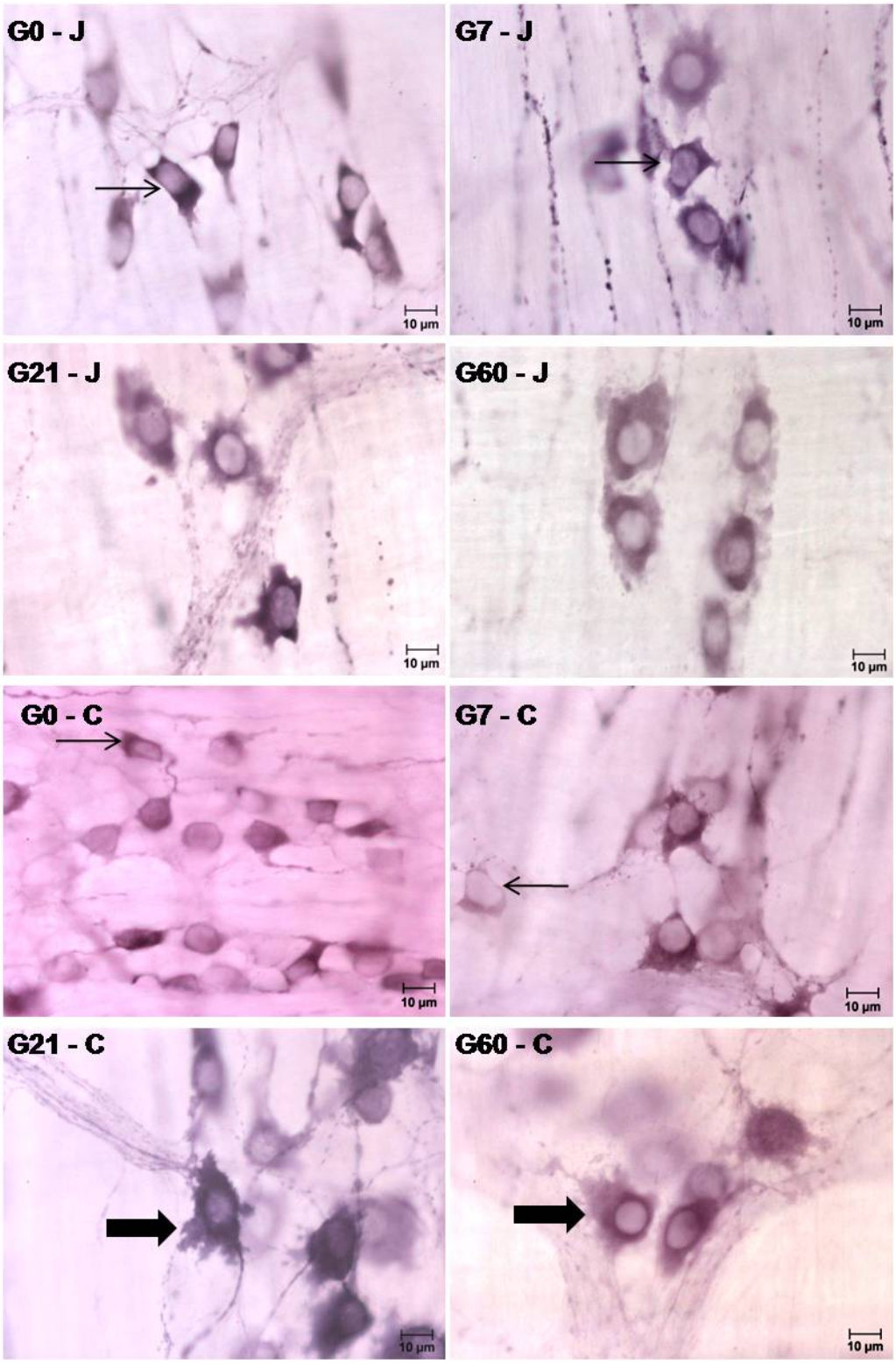


Figura 7 - Detalhe dos neurônios do jejuno (J) e no colo (C) reativos na histoquímica para NADPH-d em ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Podem ser observados os neurônios com escasso citoplasma e formato mais quadrangular (setas delgadas), especialmente nos grupos G0 e G7, tanto no jejuno quanto no colo. Também são evidentes os processos neuronais (setas espessas), com exceção no grupo G0

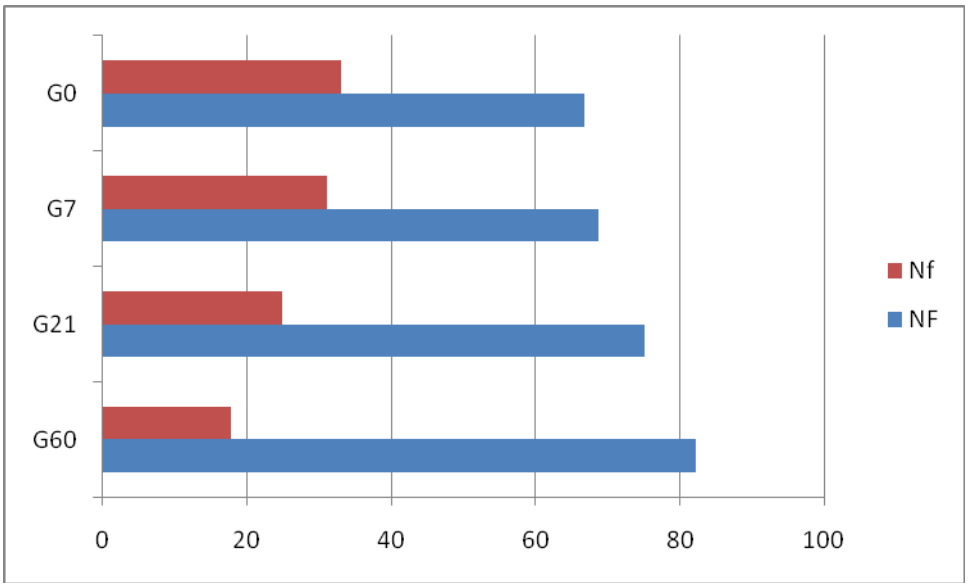


Gráfico 2 - Percentagem de neurônios nitrérgicos com reação fraca (Nf) e com reação mais forte (NF) na histoquímica para NADPH-d no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

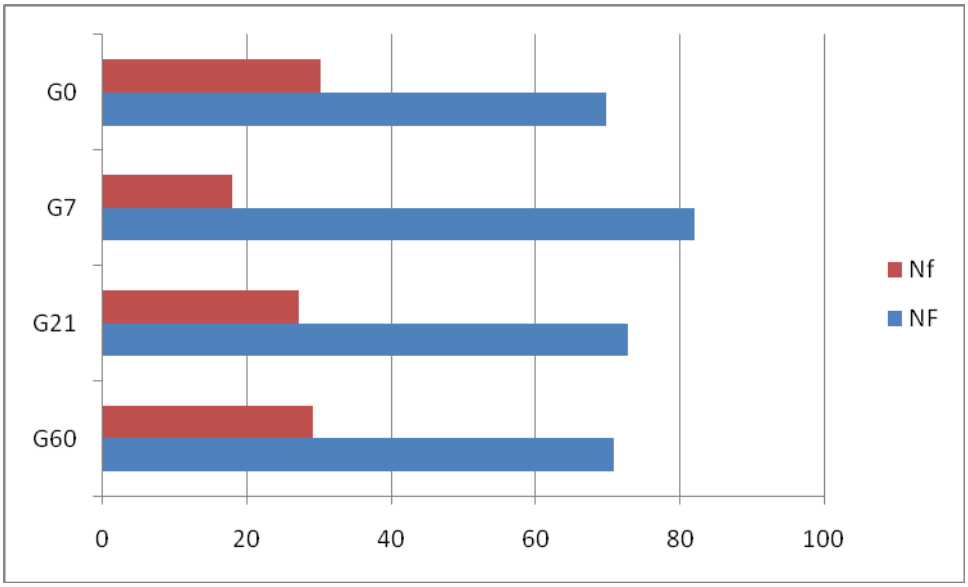


Gráfico 3 - Percentagem de neurônios nitrérgicos com reação fraca (Nf) e com reação mais forte (NF) na histoquímica para NADPH-d no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Os processos neuronais foram evidenciados pela reação histoquímica em todos os grupos, porém, apresentaram-se muito finos no grupo G0 e foram aumentando progressivamente de espessura nos grupos G7, G21 e G60 (Figura 7). Tanto no jejuno quanto no colo, foram detectados os plexos primário, secundário e terciário. As fibras apresentaram varicosidades. Nos animais do grupo G0, as fibras são bem finas e pouco definidas, e não foi possível detectar o plexo terciário (Figuras 7 e 8).

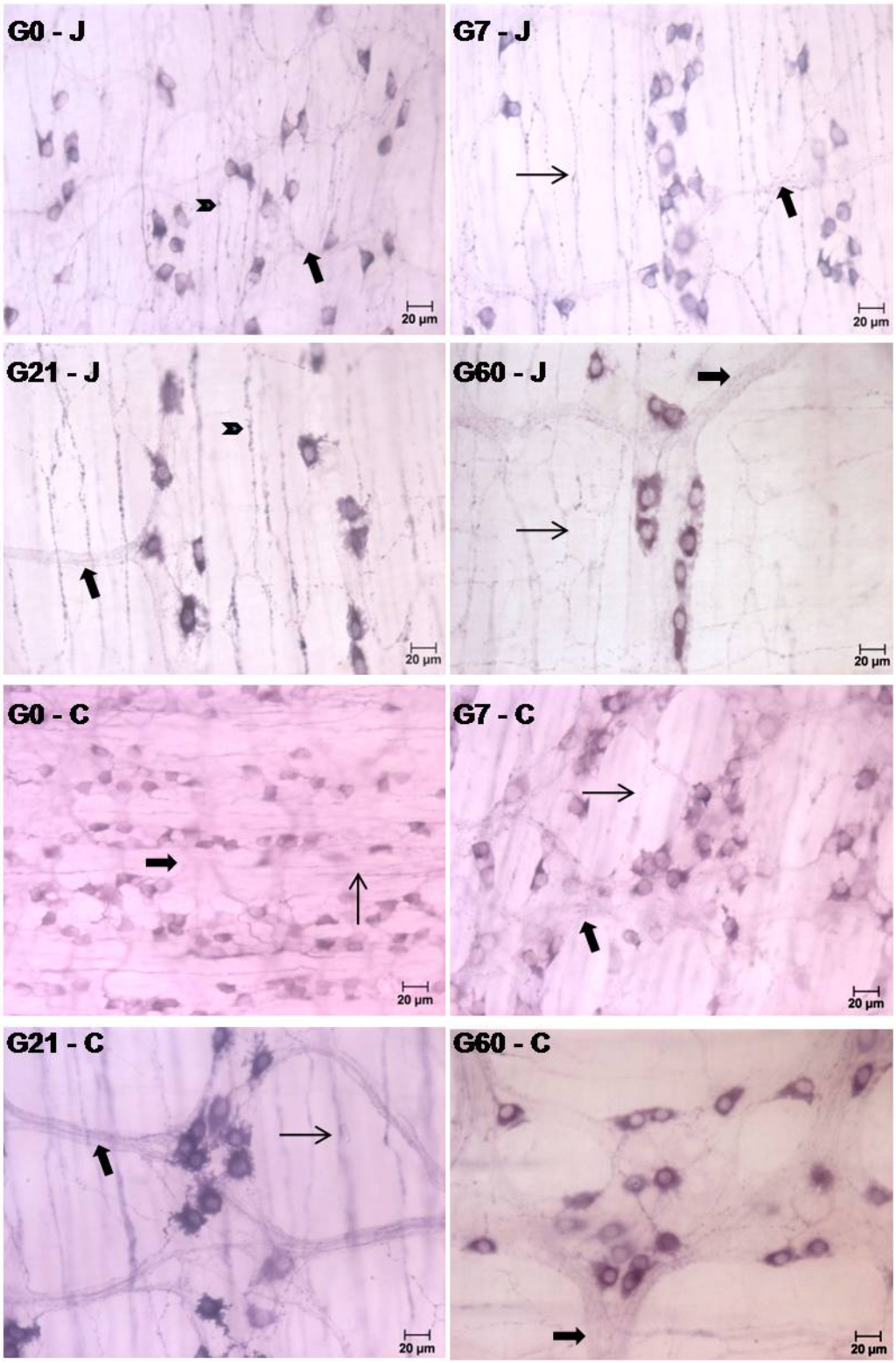


Figura 8 - Coloração histoquímica NADPH-d do jejuno (J) e do colo (C) de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Podem ser observadas as malhas primária (setas espessa) e secundária (setas delgada) com varicosidades (cabeça de seta)

No jejuno foi observada uma diminuição significativa na densidade numérica/área de neurônios positivos a NADPH-d a partir do sétimo dia após o nascimento ($p < 0,005$), enquanto que no colo a diminuição foi significativa a partir do dia 0 do nascimento ($p < 0,01$) (Gráfico 4 e Tabelas 1 e 2). Quanto à análise estatística das diferenças entre as regiões proximais e distais no jejuno e no colo, só foi observada uma diminuição significativa na densidade neuronal/área no colo entre as regiões C1 (mais proximal) e C4 (mais distal) no grupo G21 ($p = 0,0307$, Gráfico 5) e a partir da região C2 no grupo G60 ($p < 0,0031$) (Gráfico 6).

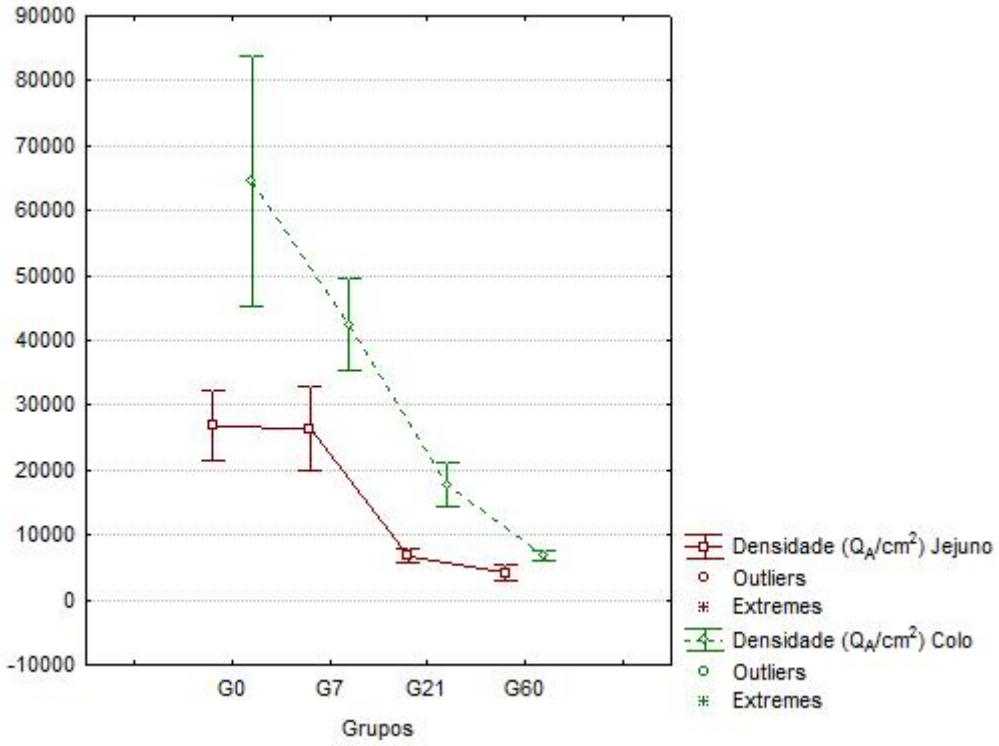


Gráfico 4 - Densidade numérica/área de neurônios nitrérgicos no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Diminuição significativa na densidade numérica/área de neurônios positivos a NADPH-d a partir do sétimo dia após o nascimento ($p < 0,005$) no jejuno e a partir do nascimento no colo ($p < 0,01$)

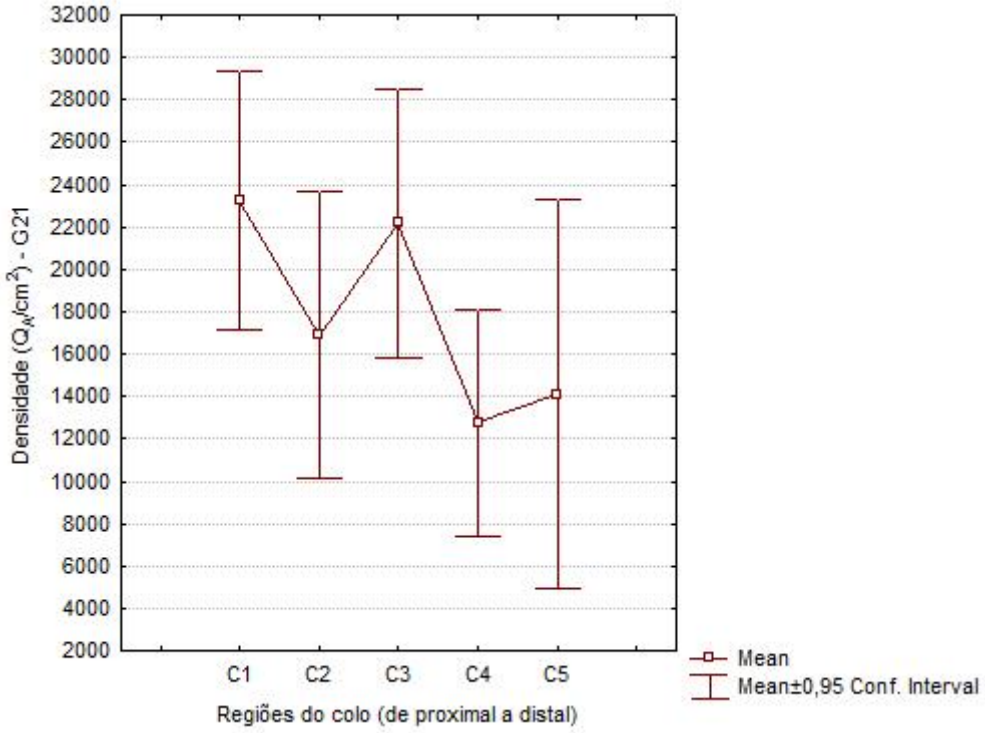


Gráfico 5 - Densidade numérica/área entre regiões do colo no grupo G21. Diminuição significativa entre regiões C1 e C4 (p = 0,0307)

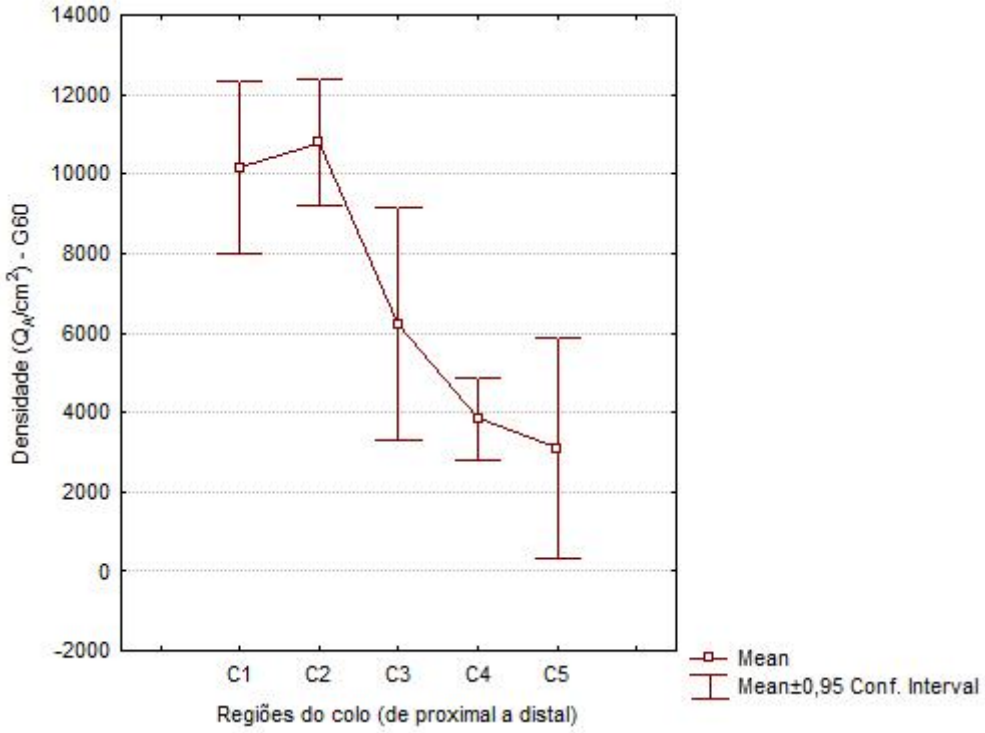


Gráfico 6 - Densidade numérica/área entre regiões do colo no grupo G60. Diminuição significativa a partir da região C2 no grupo G60 ($p < 0,0031$)

Quanto ao número total de neurônios nitrérgicos, no jejuno foi observado um aumento significativo entre os dias 0 e 7 após o nascimento ($p < 0,005$); no colo foi observado um aumento não estatisticamente significativo entre os grupos G0 e G7 ($p = 0,051$) e aumento significativo entre os grupos G7 e G21 ($p = 0,0002$) e uma posterior diminuição significativa entre os dias 21 e 60 após o nascimento ($p = 0,028$) (Gráfico 7 e Tabelas 1 e 2).

A densidade numérica/área foi maior no colo do que no jejuno em todos os grupos, como também foi menor o número total de neurônios no colo, comparado com o jejuno.

Não houve diferença de comportamento nas variáveis considerando os neurônios com coloração forte e fraca separadamente.

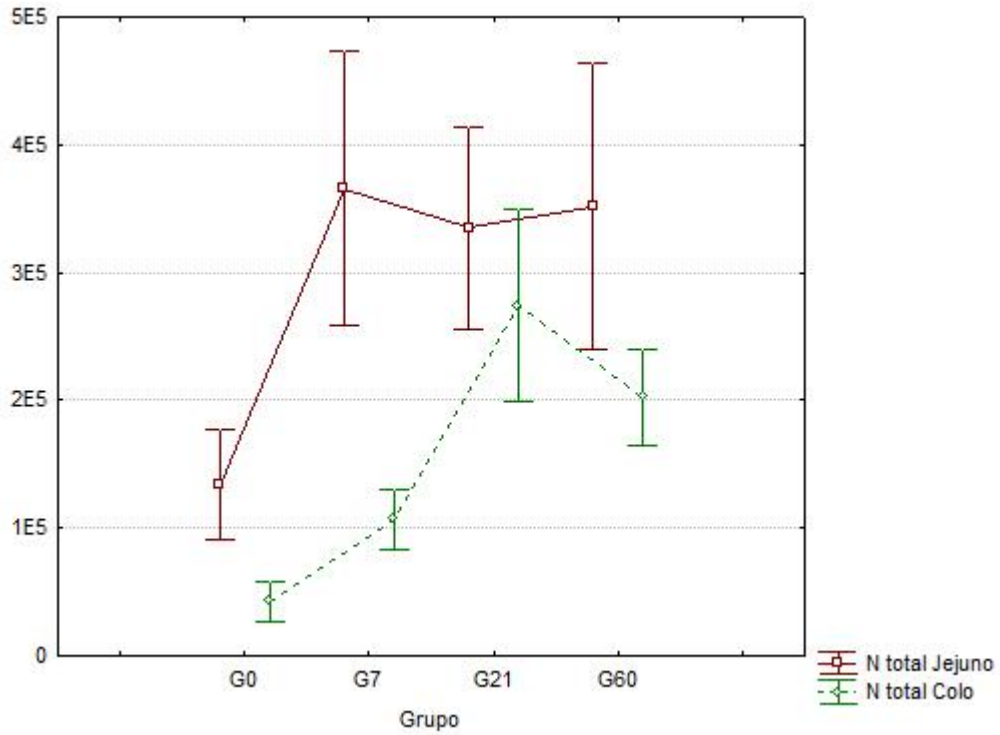


Gráfico 7 - Número total de neurônios nitrérgicos no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Aumento significativo no jejuno entre G0 e G7 ($p < 0,005$). No colo, aumento significativo entre G7 e G21 ($p = 0,0002$) e diminuição significativa entre G21 e G60 ($p = 0,028$)

No jejuno, a área neuronal aumentou significativamente a partir do sétimo dia até o dia 60 de vida ($p < 0,002$), entre os grupos G0 e G7 houve aumento mas este não foi significativo ($p < 0,88$). No grupo G0 e G7, ao redor de 90% dos neurônios mediram 50-200 μm^2, com máximo de 328 μm^2 e mínimo de 33 μm^2; no grupo G21, ao redor de 73% dos neurônios mediram até 400 μm^2, com máximo de 789 μm^2 e mínimo de 70 μm^2; e no grupo G60, os neurônios atingiram até 1110 μm^2 e mínimo de 187 μm^2, com aproximadamente 80% dos neurônios na faixa de 200 a 300 μm^2 (Gráfico 8, Tabelas 1 e 2 e Apêndice C).

No colo, o aumento significativo começou desde o grupo G0 até o G60 ($p < 0,001$). No grupo G0, ao redor de 85% dos neurônios mediram 50-150 μm^2, com máximo de 241 μm^2 e mínimo de 39 μm^2; no grupo G7, ao redor de 90% dos neurônios mediram 100-300 μm^2, com máximo de 530 μm^2 e mínimo de 63 μm^2; no grupo G21, ao redor de 90% dos neurônios mediram até 600 μm^2, com máximo de 1402 μm^2 e mínimo de 21 μm^2; e no grupo G60, os neurônios atingiram até 1063 μm^2 e tiveram uma área mínima de 137 μm^2, com aproximadamente 90% dos neurônios na faixa de 200 a 800 μm^2 (Gráfico 8, Tabelas 1 e 2 e Apêndice C).

A área celular dos neurônios com coloração forte e fraca aumentou na mesma proporção durante o desenvolvimento pós-natal tanto no jejuno quanto no colo (Gráfico 9).

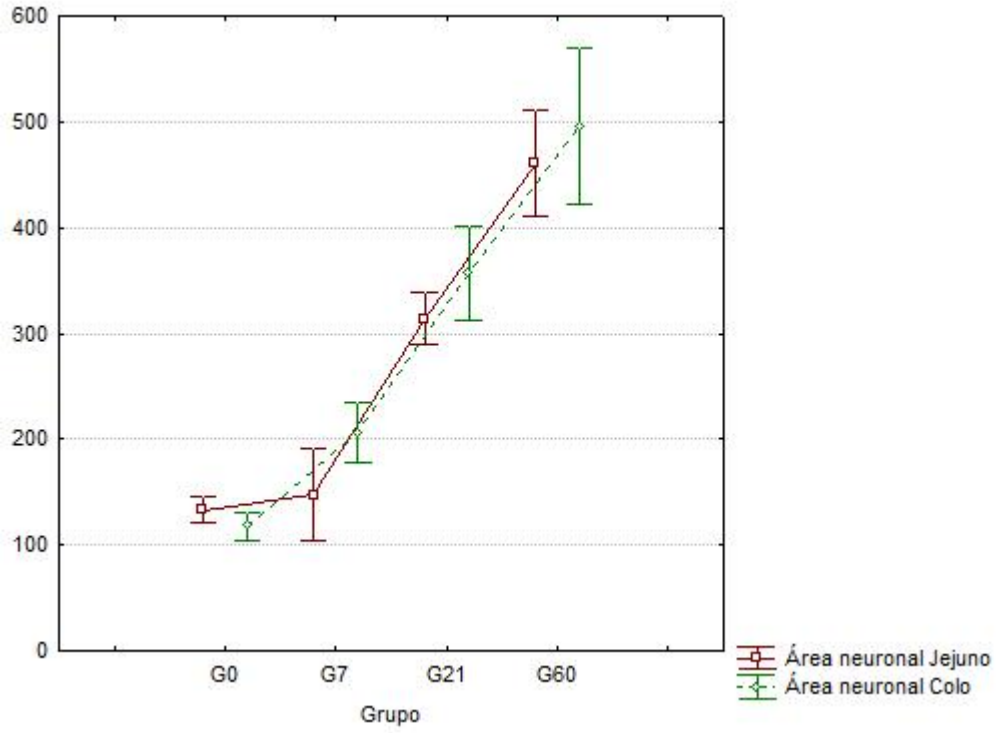


Gráfico 8 - Área neuronal no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Aumento significativo no jejuno a partir de G7 ($p < 0,002$) e no colo a partir de G0 ($p < 0,001$)

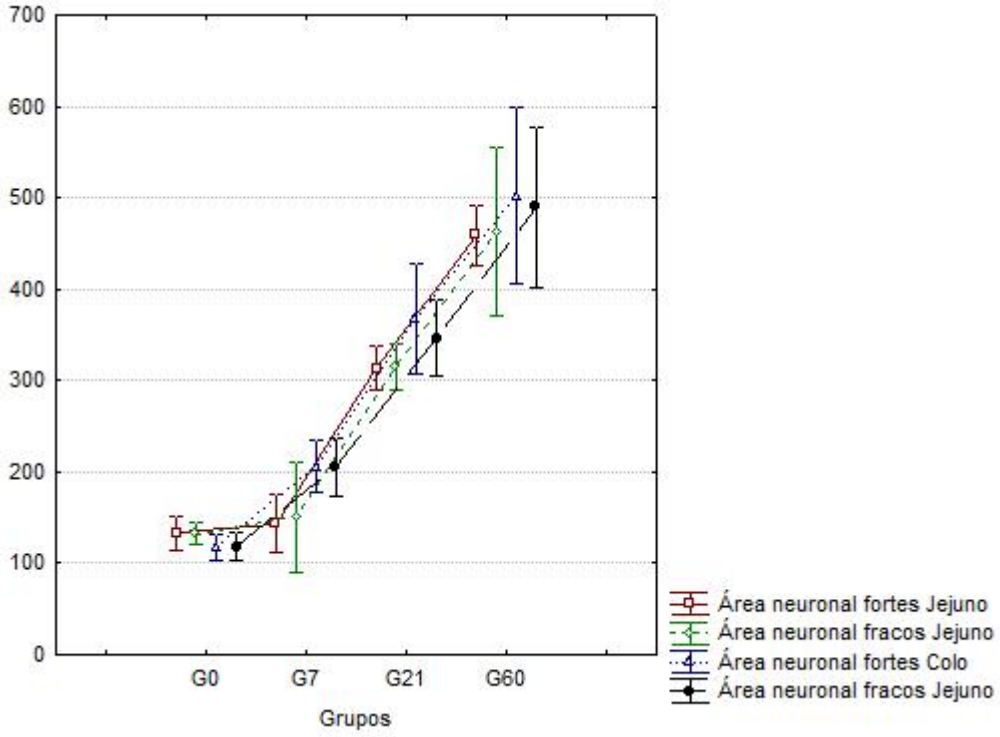


Gráfico 9 - Área neuronal dos neurônios com intensidade de coloração forte e fraca na histoquímica de NADPH-d no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

5.3 HISTOQUÍMICA PARA AChE

Foi observada a coloração marrom típica nos neurônios devido à reação da AChE, havendo neurônios com intensidade forte e outros com uma intensidade mais fraca de marcação, com uma percentagem maior de neurônios com marcação forte (Gráficos 10 e 11). Foram observados neurônios do tipo I, II e III de Dogiel.

Em todos os grupos foram observados gânglios completamente reativos, com poucos neurônios reativos e outros gânglios sem neurônios reativos. A presença desses gânglios sem reatividade foi mais prevalente no colo. No colo dos grupos G0 e G7, também foi identificada a região mesentérica com uma grande densidade de neurônios e gânglios fusionados, enquanto a região anti-mesentérica possuía gânglios distribuídos de maneira esparsa no meio de uma malha primária bem desenvolvida. Puderam ser observadas as malhas interganglionares primária, secundária e terciária em todos os grupos (Figuras 9, 10, 11 e 12).

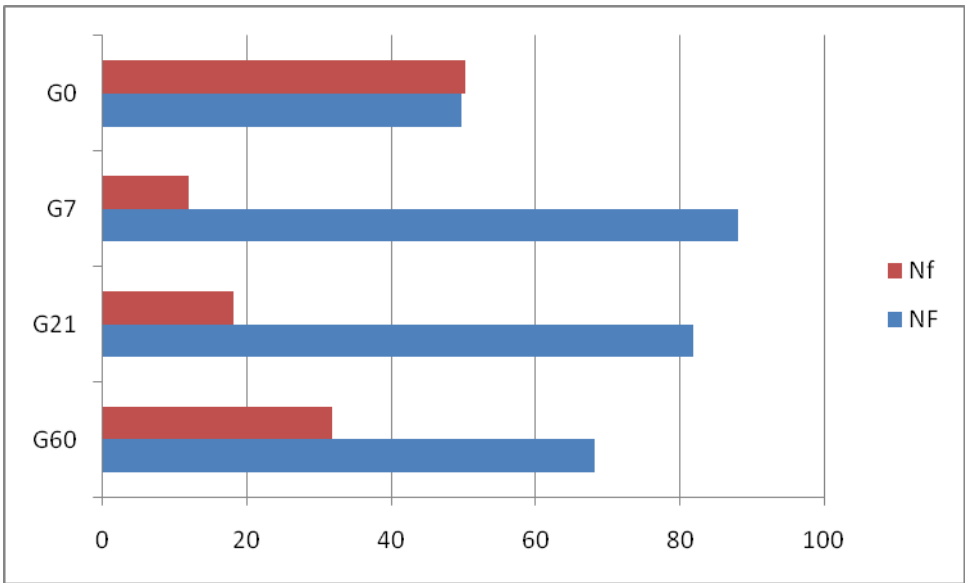


Gráfico 10 - Percentagem de neurônios colinérgicos com reação fraca (Nf) e com reação mais forte (NF) na histoquímica para AChE no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

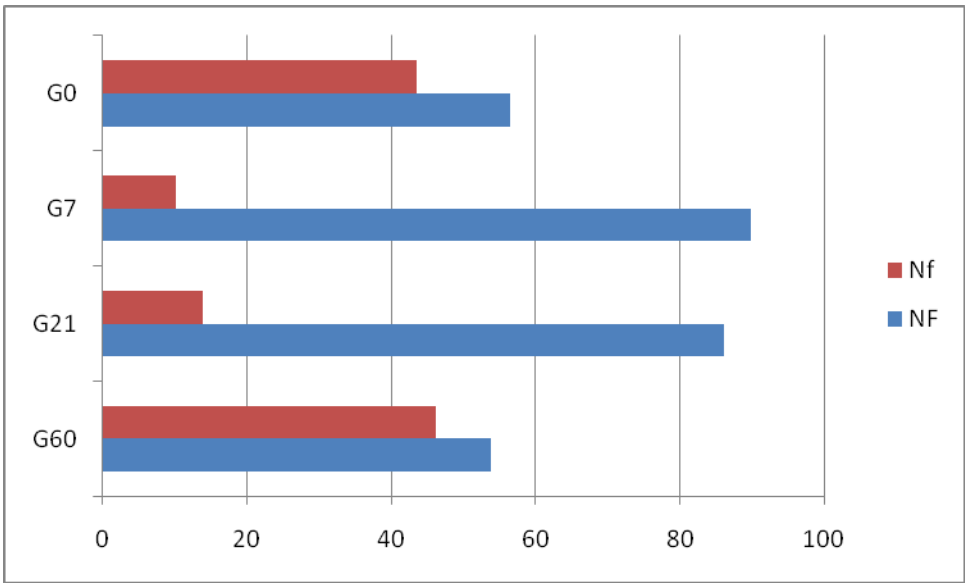


Gráfico 11 - Percentagem de neurônios colinérgicos com reação fraca (Nf) e com reação mais forte (NF) na histoquímica para AChE no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

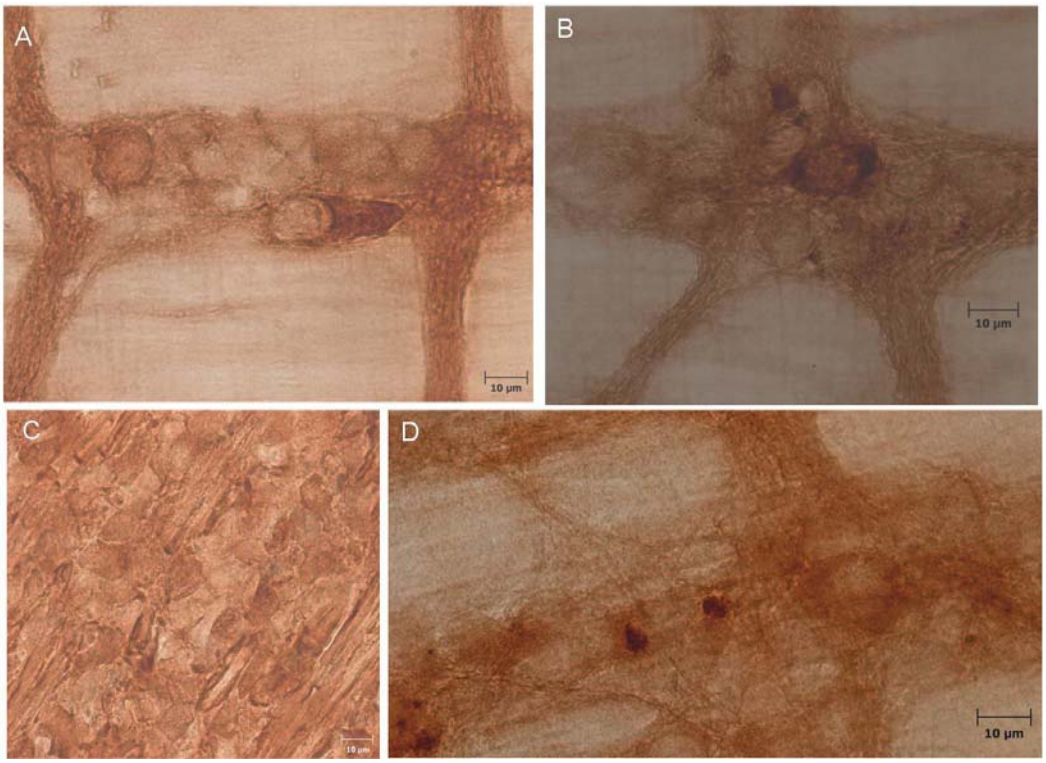


Figura 9 - Marcação histoquímica para AChE no jejuno (A, B) e no colo (C, D) de um animal do grupo G0. Notar em B, um neurônio com uma alta intensidade de marcação. Notar as duas regiões diferenciadas no colo dos animais recém-nascidos, em C a região de neurônios densamente arranjados sem diferenciacião em gânglios e em D a região de gânglios bem conformados com malha primária bem diferenciada

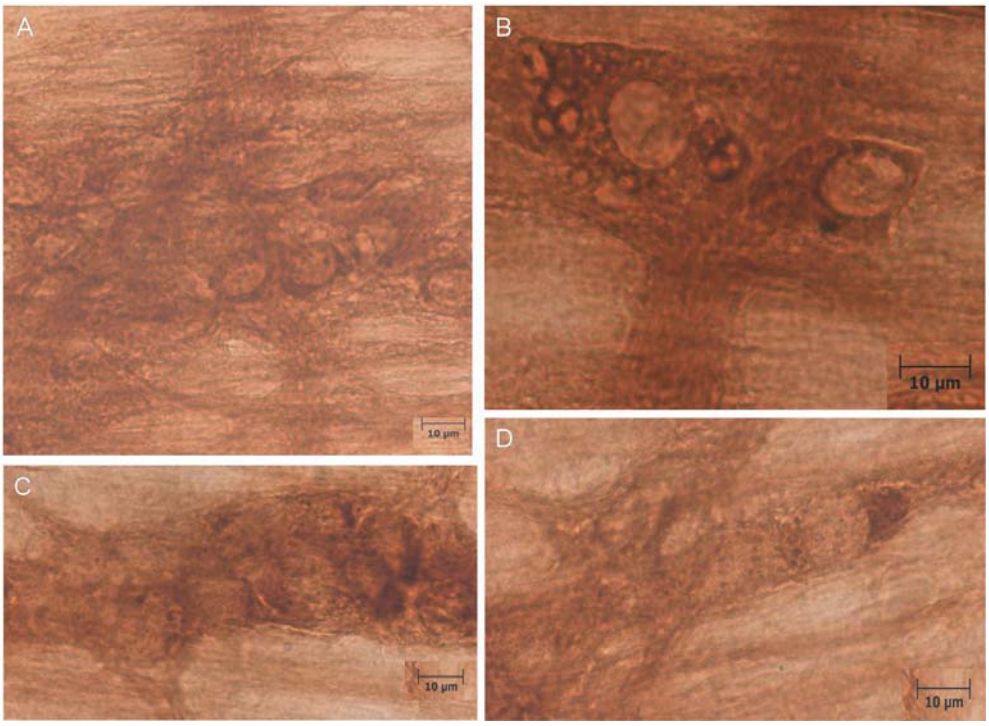


Figura 10 - Marcação histoquímica para AChE no jejuno (A, B) e no colo (C, D) de um animal do grupo G7

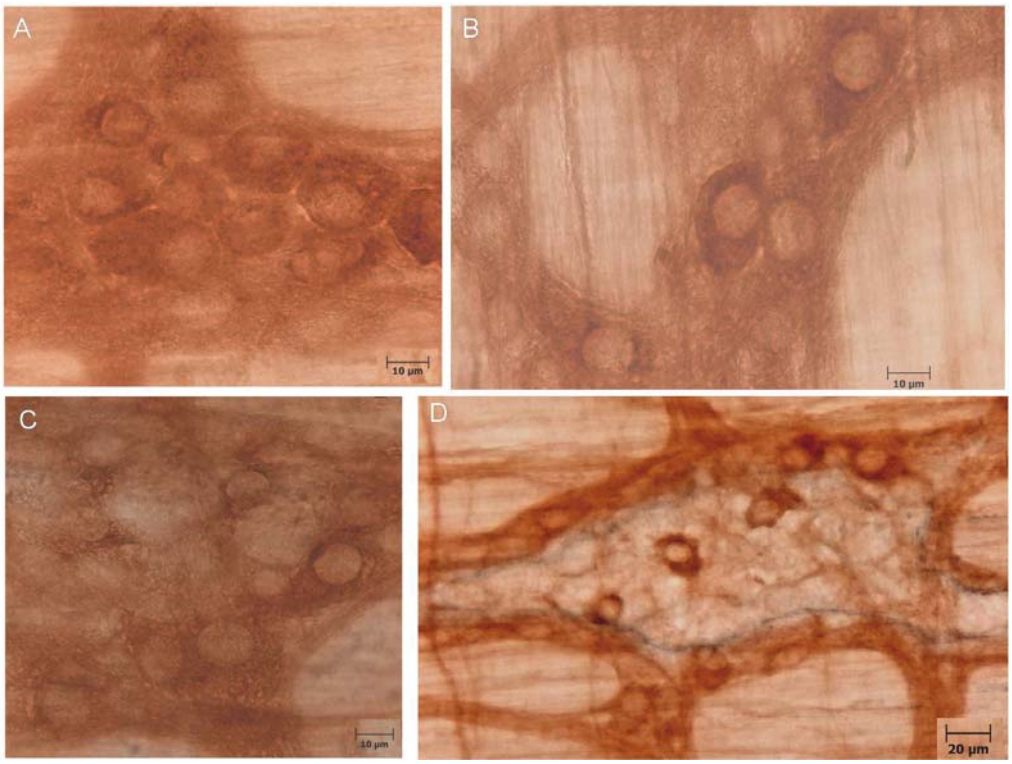


Figura 11 - Marcação histoquímica para AChE no jejuno (A, B) e no colo (C, D) de um animal do grupo G21. Notar em A um gânglio intensamente marcado e em D um gânglio com poucos neurônios reativos

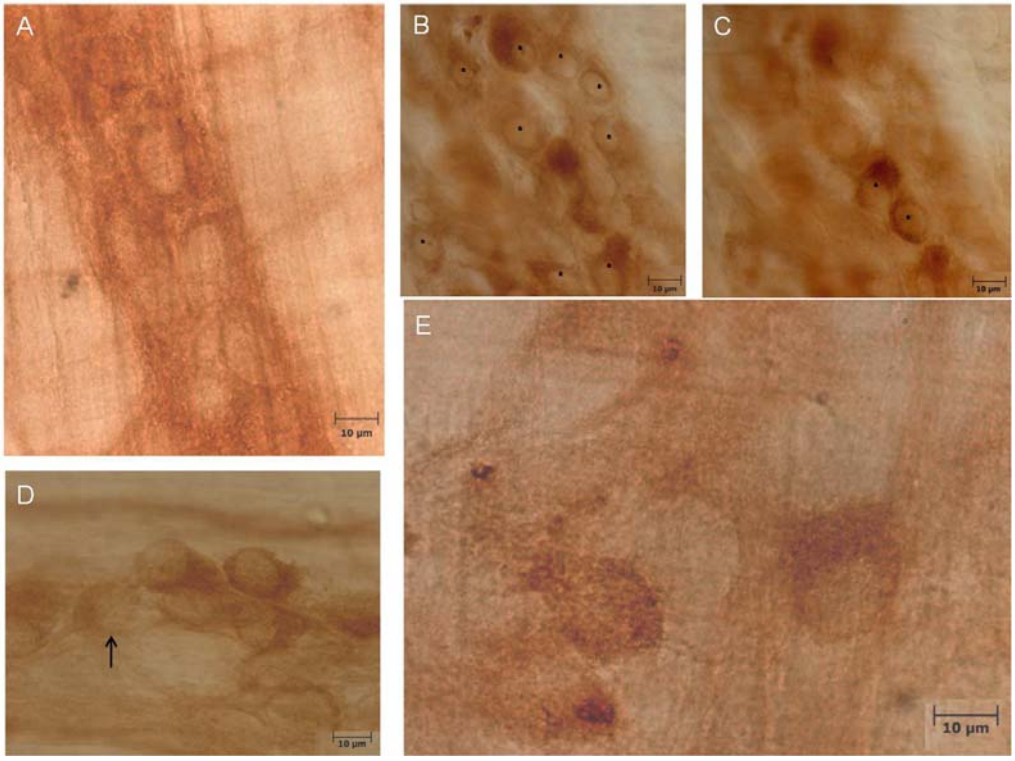


Figura 12 - Marcação histoquímica para AChE no jejuno (A, B) e no colo (C, D) de um animal do grupo G60. Notar em B e C a quantificação dos neurônios (*) em dois planos focais diferentes

No jejuno foi observada uma diminuição significativa na densidade numérica/área de neurônios positivos a AChE desde o nascimento (G0) até o dia 7 (G7) ($p < 0,002$) no jejuno, e desde o nascimento (G0) até o dia 21 (G21) ($p < 0,003$) no colo (Gráfico 12 e Tabelas 3 e 4). A densidade numérica/área foi maior no colo do que no jejuno nos grupos G0 e G7, nos grupos G21 e G60 apresentou valores similares. Não houve diferenças estatisticamente significativas da densidade numérica/área entre as regiões mais proximais e mais distais do jejuno e do colo.

Quanto ao número total de neurônios colinérgicos, no jejuno não foram observadas mudanças significativas; no colo foi observado um aumento estatisticamente significativo entre os grupos G21 e G60 ($p = 0,02$) (Gráfico 13 e Tabelas 3 e 4). O número total de neurônios foi menor no colo comparado com o jejuno.

Não houve diferença de comportamento nas variáveis considerando os neurônios com coloração forte e fraca separadamente.

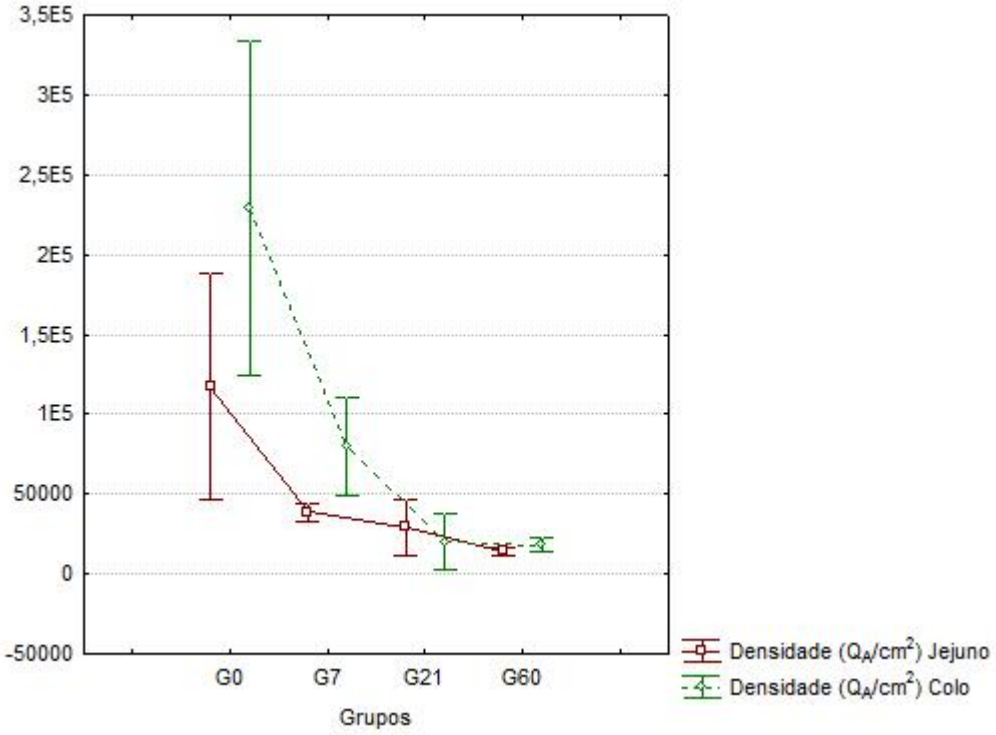


Gráfico 12 - Densidade numérica/área de neurônios positivos a AChE no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Diminuição significativa entre G0 e G7 ($p < 0,002$) no jejuno e entre G0 e G21 ($p < 0,003$) no colo

Tabela 3 - Área superficial da serosa, densidade e número total de neurônios AChE-positivos no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Grupo	Área superficial da serosa (cm^2)	Densidade total (Q_A/cm^2)	Número total de neurônios	Área neuronal (μm^2)	Área neuronal NF (μm^2)	Área neuronal Nf (μm^2)
G0	7,16 ± 0,47	117362,8 ± 25562,48 [A]	847159,5 ± 208758,9	166,7309 ± 14,89503	176,2222 ± 15,66673	155,7668 ± 13,79850
G7	12,50 ± 1,41	38751,44 ± 2010,571	490572,8 ± 71421,53	198,3480 ± 15,80871[B]	239,8030 ± 12,84240	156,8930 ± 22,50138
G21	38,76 ± 2,62	29171,90 ± 6272,436	1191992 ± 309853,0	276,5212 ± 8,863712	274,3530 ± 8,143871	278,6895 ± 16,17822
G60	63,05 ± 3,22	14266,37 ± 935,3648	905191,1 ± 87491,84	258,5459 ± 29,12772	256,1409 ± 24,60126	260,9509 ± 39,92763

Valores representam a média ± EPM (Erro padrão da média). Diferença estatísticamente significativa entre G0 e G7 ($p < 0,002$)[A], G7 e G21 ($p = 0,045$)[B]. NF (neurônios com coloração forte). Nf (neurônios com coloração fraca).

Tabela 4 - Área superficial da serosa, densidade e número total de neurônios AChE-positivos no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Grupo	Área superficial da serosa (cm^2)	Densidade total (Q_A/cm^2)	Número total de neurônios	Área neuronal (μm^2)	Área neuronal NF (μm^2)	Área neuronal Nf (μm^2)
G0	0,61 ± 0,04	228881,2 ± 37801,10 [A]	138721,3 ± 25168,76	115,0469 ± 6,422166	119,5832 ± 14,32687[C]	110,5106 ± 8,512207
G7	1,22 ± 0,13	79920,13 ± 11132,90	101007,1 ± 22579,73	200,3434 ± 10,27142	202,6390 ± 10,13934	198,0479 ± 13,78300
G21	6,03 ± 0,38	20147,84 ± 6247,313	123591,4 ± 42922,82[B]	272,5856 ± 11,89381	279,7135 ± 17,39029	265,4577 ± 11,00385
G60	15,40 ± 0,79	18038,53 ± 1615,074	278141,7 ± 28442,43	267,1131 ± 21,60669	286,0013 ± 19,21784	248,2249 ± 24,44024

Valores representam a média ± EPM (Erro padrão da média). Diferença estatísticamente significativa entre G0 e G21 ($p < 0,0003$)[A], G21 e G60 ($p = 0,02$)[B], G0 e G21 ($p<0,02$)[C]. NF (neurônios com coloração forte). Nf (neurônios com coloração fraca).

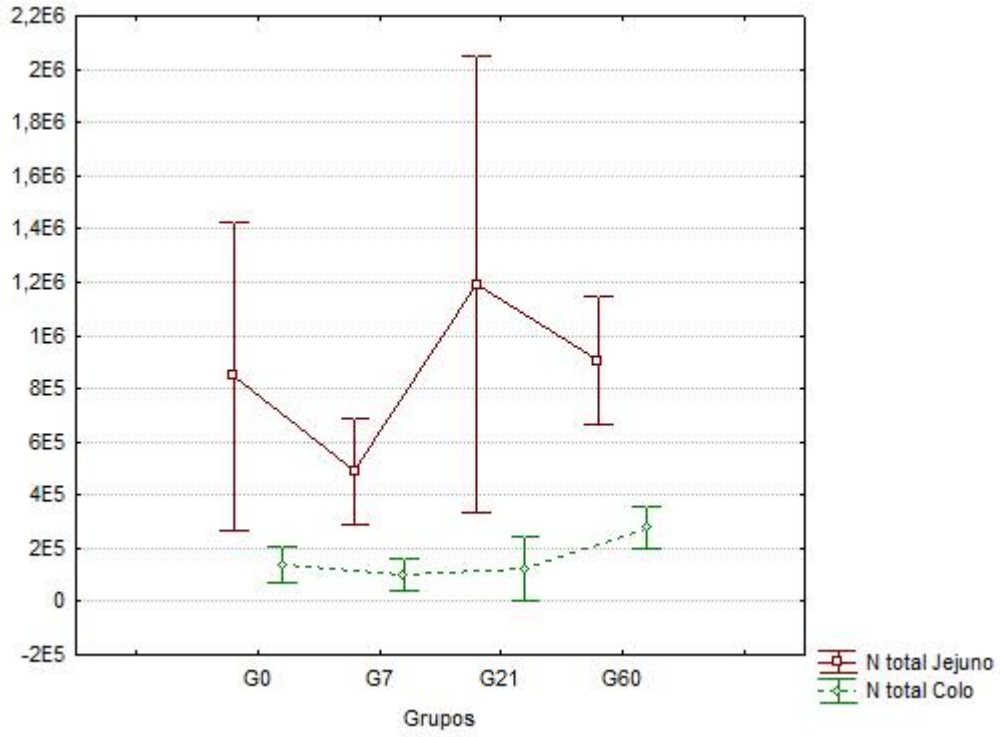


Gráfico 13 - Número total neurônios colinérgicos no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Aumento significativo entre G21 e G60 no colo ($p = 0,02$)

No jejuno, a área neuronal aumentou significativamente a partir do sétimo dia (G7) até o dia 21 de vida (G21) ($p = 0,045$). No grupo G0 e G7, ao redor de 75% dos neurônios mediram 100-300 μm^2, com máximo de 675 μm^2 e um mínimo de 12 μm^2; no grupo G21 e G60, ao redor de 90% dos neurônios mediram até 400 μm^2, com máximo de 980 μm^2 e mínimo de 60 μm^2 (Gráfico 14, Tabelas 3 e 4 e Apêndice C).

No colo, o aumento significativo se deu entre os grupos G0 e G21 ($p < 0,02$). No grupo G0, ao redor de 90% dos neurônios mediram até 200 μm^2, com máximo de 563 μm^2 e mínimo de 28 μm^2; no grupo G7, ao redor de 85% dos neurônios mediram até 300 μm^2, com máximo de 550 μm^2 e mínimo de 77 μm^2; no grupo G21 e G60, ao redor de 85% dos neurônios mediram até 400 μm^2, com máximo de 890 μm^2 e mínimo de 53 μm^2 (Gráfico 14, Tabelas 3 e 4 e Apêndice C).

A área celular dos neurônios com coloração forte e fraca aumentou na mesma proporção durante o desenvolvimento pós-natal tanto no jejuno quanto no colo (Gráfico 15 e Tabelas 3 e 4).

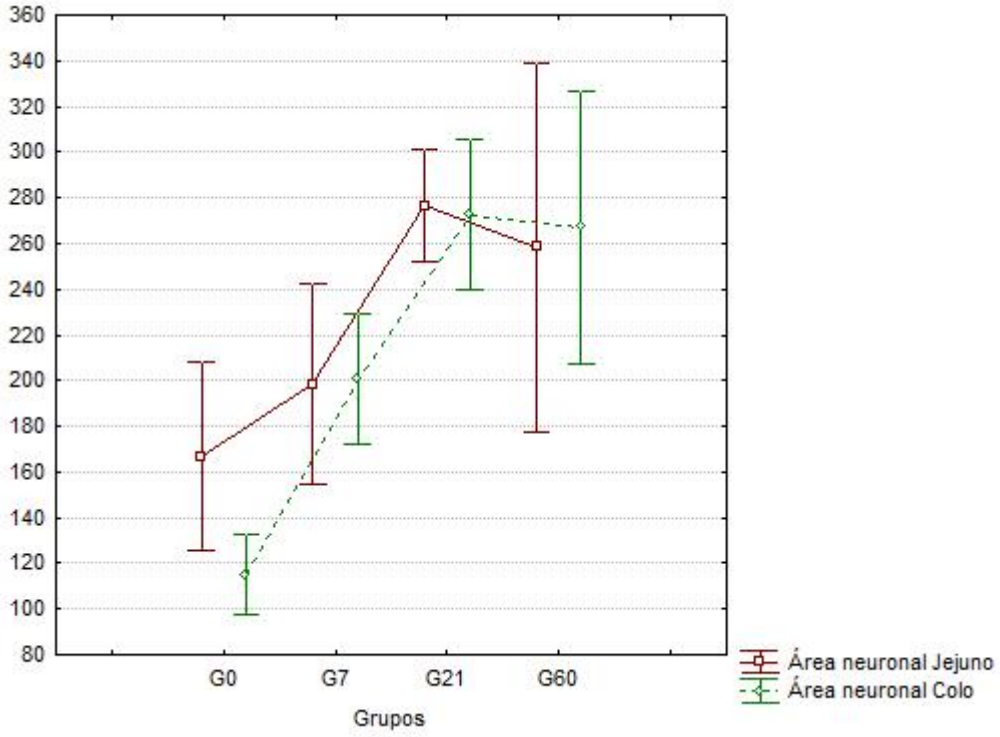


Gráfico 14 - Área celular dos neurônios colinérgicos no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Aumento significativo entre G7 e G21 ($p = 0,045$) no jejuno e entre G0 e G21 ($p<0,02$) no colo

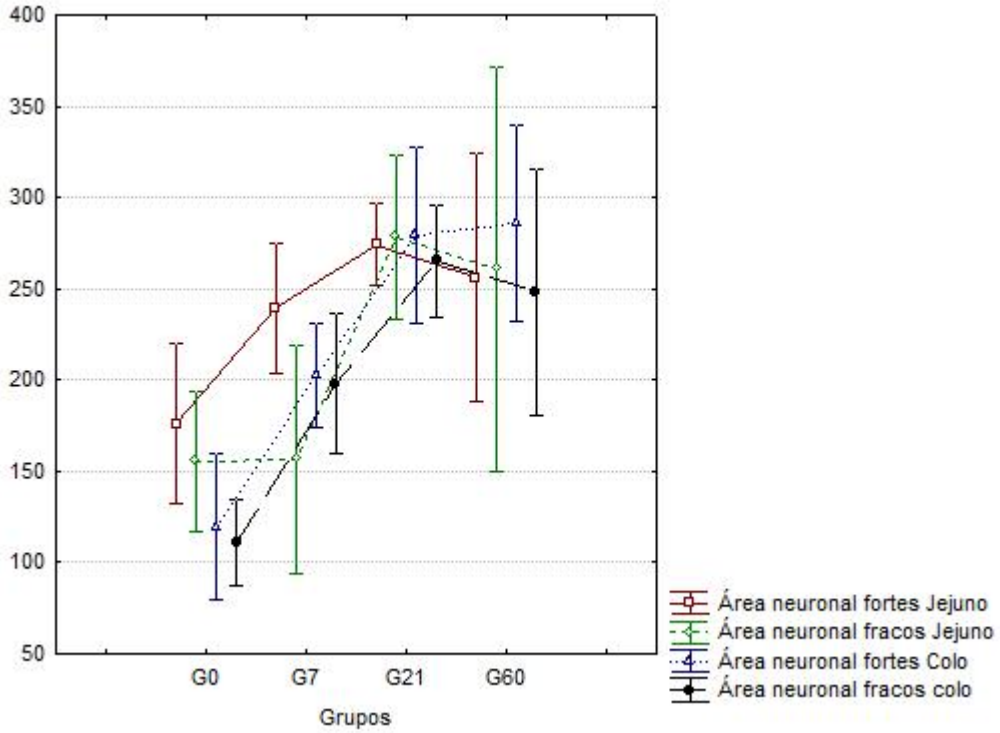


Gráfico 15 - Área neuronal dos neurônios com intensidade de coloração forte e fraca na histoquímica para AChE no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

5.4 RELAÇÃO ÁREAS CELULARES DE NEURÔNIOS NITRÉRGICOS E COLINÉRGICOS

No jejuno e no colo foi observada uma similaridade de áreas celulares entre os neurônios nitrérgicos e colinérgicos nos grupos G0 e G7, mas nos grupos G21 e G60 apresentou um aumento da área neuronal nos dois tipos de neurônios, porém, mais marcante nos neurônios nitrérgicos (Gráfico 16). Aos testes estatísticos foi provada uma diferença significativa entre as áreas neuronais dos dois tipos de neurônios nos grupos G21 (p = 0,02 no jejuno e p = 0,003 no colo) e G60 (p = 0,0005 e p = 0,0004 no colo).

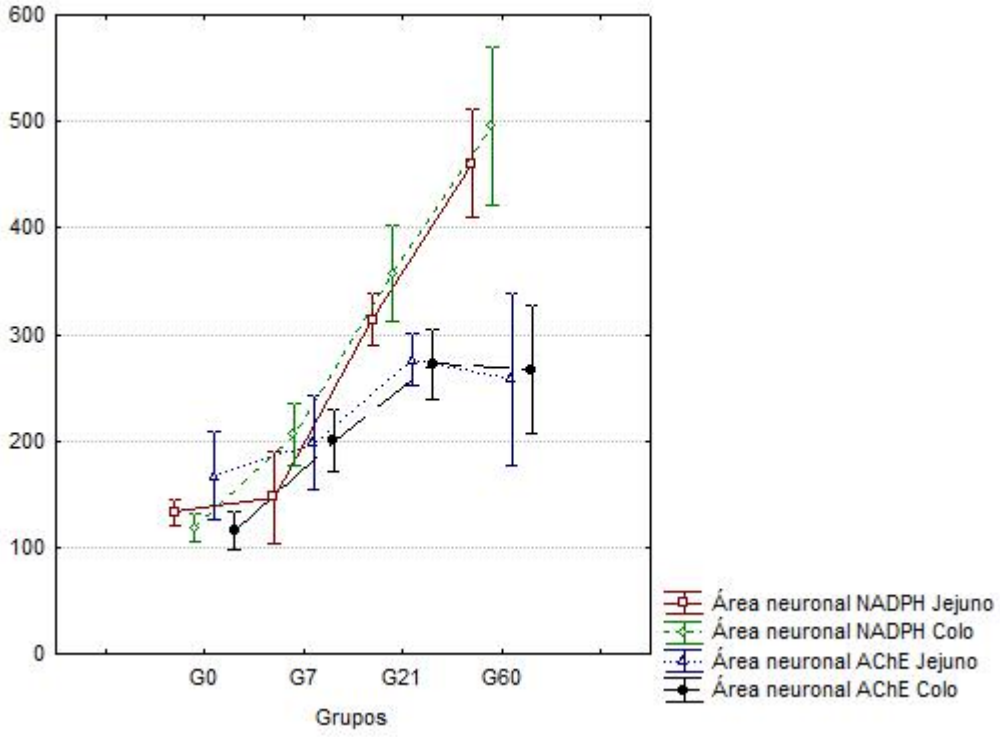


Gráfico 16 - Área celular de neurônios nitrérgicos (NADPH-d) e colinérgicos (AChE) no jejuno e no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

5.5 COLORAÇÃO PAN-NEURONAL COM AZUL CUPROLÍNICO

A evidenciação dos neurônios através dessa metodologia permitiu observar o citoplasma azul e os nucléolos como pontos escuros no interior de um núcleo com marcação mais fraca. Os processos neuronais não foram marcados, facilitando a identificação e a quantificação dos neurônios. Uma observação interessante acerca dessa coloração é que foi aumentando de intensidade na medida em que aumentou a idade dos animais. Comparativamente entre os segmentos intestinais, verificou-se uma

maior intensidade de marcação no jejuno, enquanto que no colo as camadas musculares também foram destacadas, o que implicou em maior dificuldade para a contagem dos neurônios, devido a um efeito maior de fundo promovido pelas fibras musculares coradas.

Os gânglios apresentaram-se alongados, com o maior eixo paralelo à direção da camada muscular circular. Nos grupos G0 e G21, os neurônios apareceram mais densamente arranjados, formando mais fileiras do que propriamente gânglios. Verificou-se um aumento no tamanho dos neurônios durante o desenvolvimento pós-natal (Figura 13).

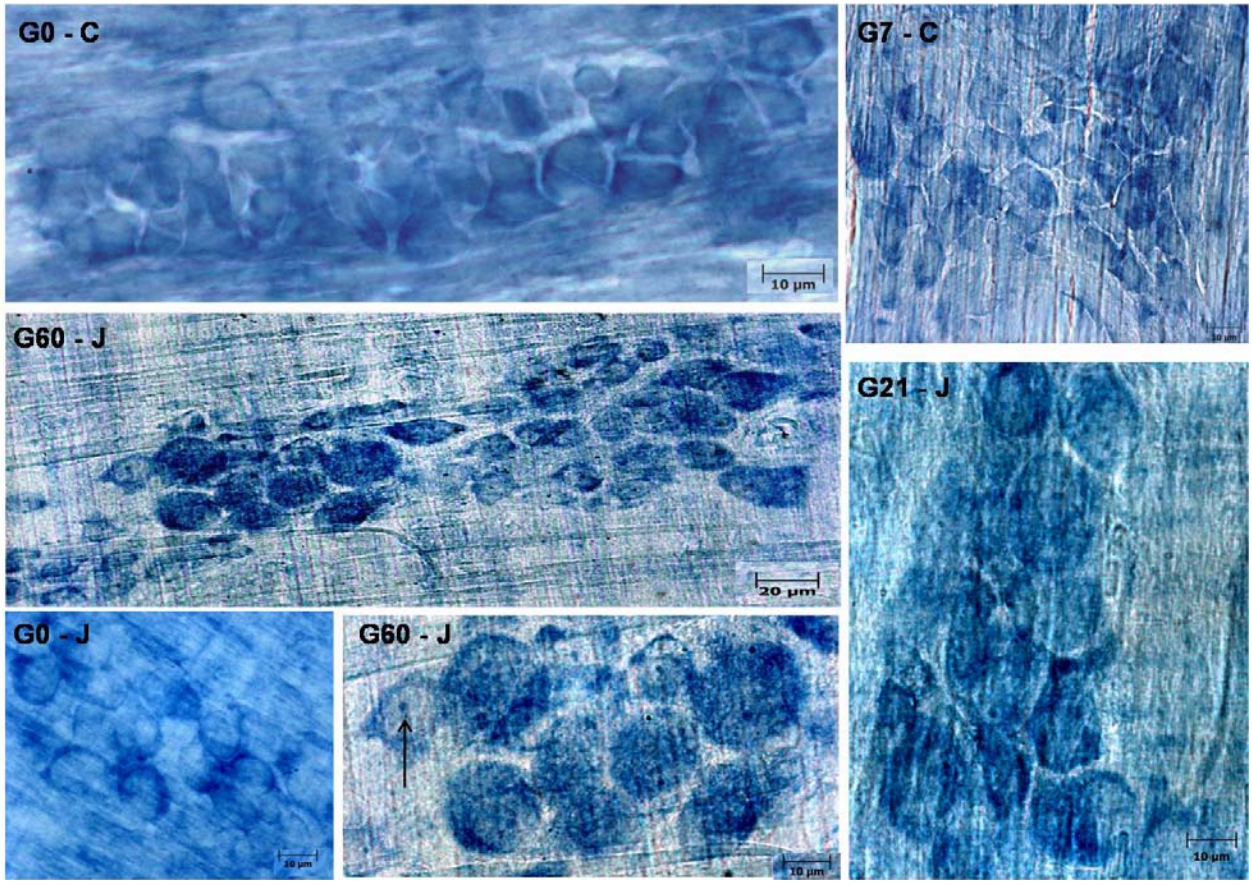


Figura 13 - Neurônios do jejuno e do colo corados com o corante pan-neuronal azul cuprolínico em ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. J – Jejuno, C – Colo. Notar em G60 – J um nucléolo intensamente marcado (seta)

Foi observada uma diminuição na densidade numérica neuronal/área, com diferença estatística a partir do dia 7 (G7, $p < 0{,}018$) no jejuno e a partir do dia 0 (G0, $p < 0{,}002$) no colo. Como foi percebido na histoquímica para NADPH-d, à coloração pan-neuronal, a densidade numérica por área foi maior no colo do que no jejuno em todos os grupos, como também foi menor o número total no colo comparado com o jejuno (Gráfico 17 e Tabela 5).

Não houve diferenças estatisticamente significativas da densidade numérica/área entre as regiões mais proximais e mais distais do jejuno e do colo.

O número total de neurônios não apresentou diferença significativa no jejuno, porém, no colo apresentou um aumento significativo a partir de G7 (p<0,03) (Gráfico 18 e Tabela 5).

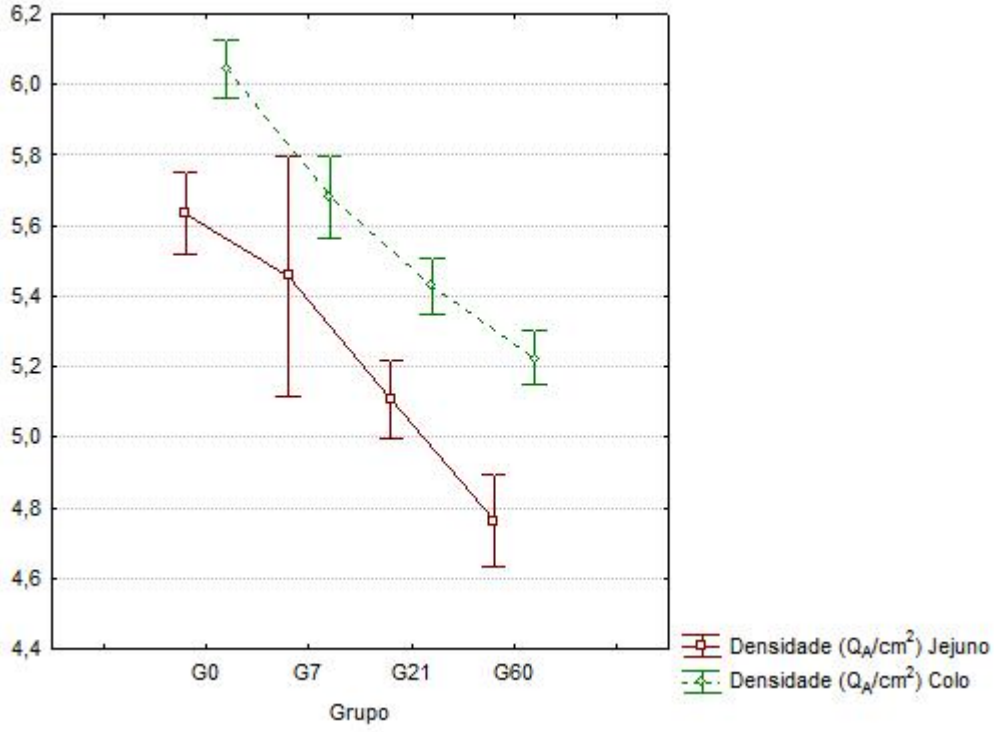


Gráfico 17 - Densidade numérica/área de neurônios corados com o corante pan-neuronal azul cuprolínico no colo e no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Diferença significativa a partir do dia 7 (G7, p < 0,02) no jejuno e a partir do dia 0 (G0, p < 0,0004)

Tabela 5. Área superficial da serosa, densidade e número total de neurônios corados com azul cuprolínico, no jejuno e colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Grupo	Área superficial serosa (cm^2)		Densidade (Q_A/cm^2)		Número total de neurônios	
	Jejuno	Colo	Jejuno	Colo	Jejuno	Colo
G0	5,09 ± 0,64	0.49 ± 0,07	438328,3 ± 46080,57	1119377 ± 68840,66 [B]	2880059 ± 399406	603293 ± 64576,8
G7	11,50 ± 1,13	1,72 ± 0,50	331934,9 ± 85244,71 [A]	489602 ± 50634,36	4773105 ± 1081613	993971 ± 161140,2 [C]
G21	40,38 ± 5,28	10,95 ± 2,14	130334,60 ± 11971,36	270889,10 ± 17891,63	3868836 ± 890289	1873212 ± 110624,7
G60	76,13 ± 9,66	22,40 ± 4,37	59339,40 ± 6260,18	168699 ± 9908,81	3880138 ± 918446	3265550 ± 303955,3

Valores representam a média ± EPM (Erro padrão da média). Diferença estatísticamente significativa a partir de G7 ($p < 0,018$) [A], a partir de G0 ($p < 0,002$) [B], a partir de G7 ($p < 0,03$) [C].

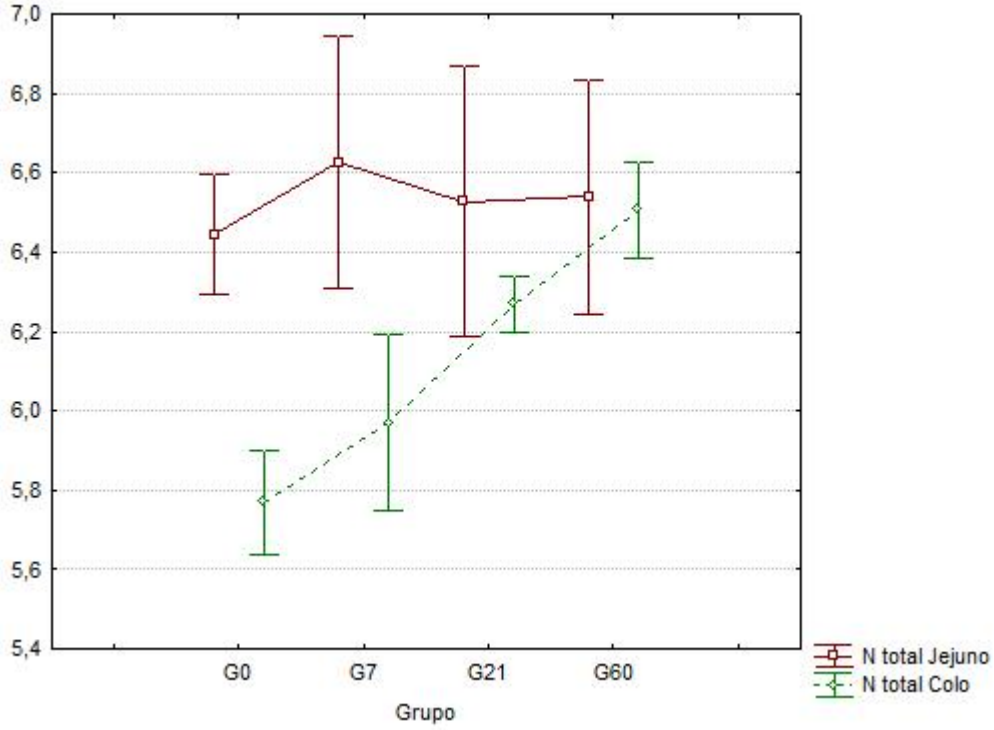


Gráfico 18 - Número total de neurônios corados com o corante pan-neuronal azul cuprolínico no colo e no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Diferença significativa a partir de G7 (p<0,03) no colo

5.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A imunoreatividade, tanto para SP quanto para VIP, foi detectada diferentemente entre os grupos estudados. Assim, corpos neuronais foram detectados nos grupos mais jovens (G0 e G7), ao passo que as varicosidades das malhas primárias e secundárias, foram evidenciadas nos grupos mais velhos (G21, G60). Desta forma, pode-se ressaltar que foi observada uma maior quantidade de corpos celulares, especialmente no colo. Já nos grupos G21 e G60, só foram observadas as malhas primária e secundária, e os espaços correspondentes aos neurônios dentro dos gânglios (Figuras 14 e 15).

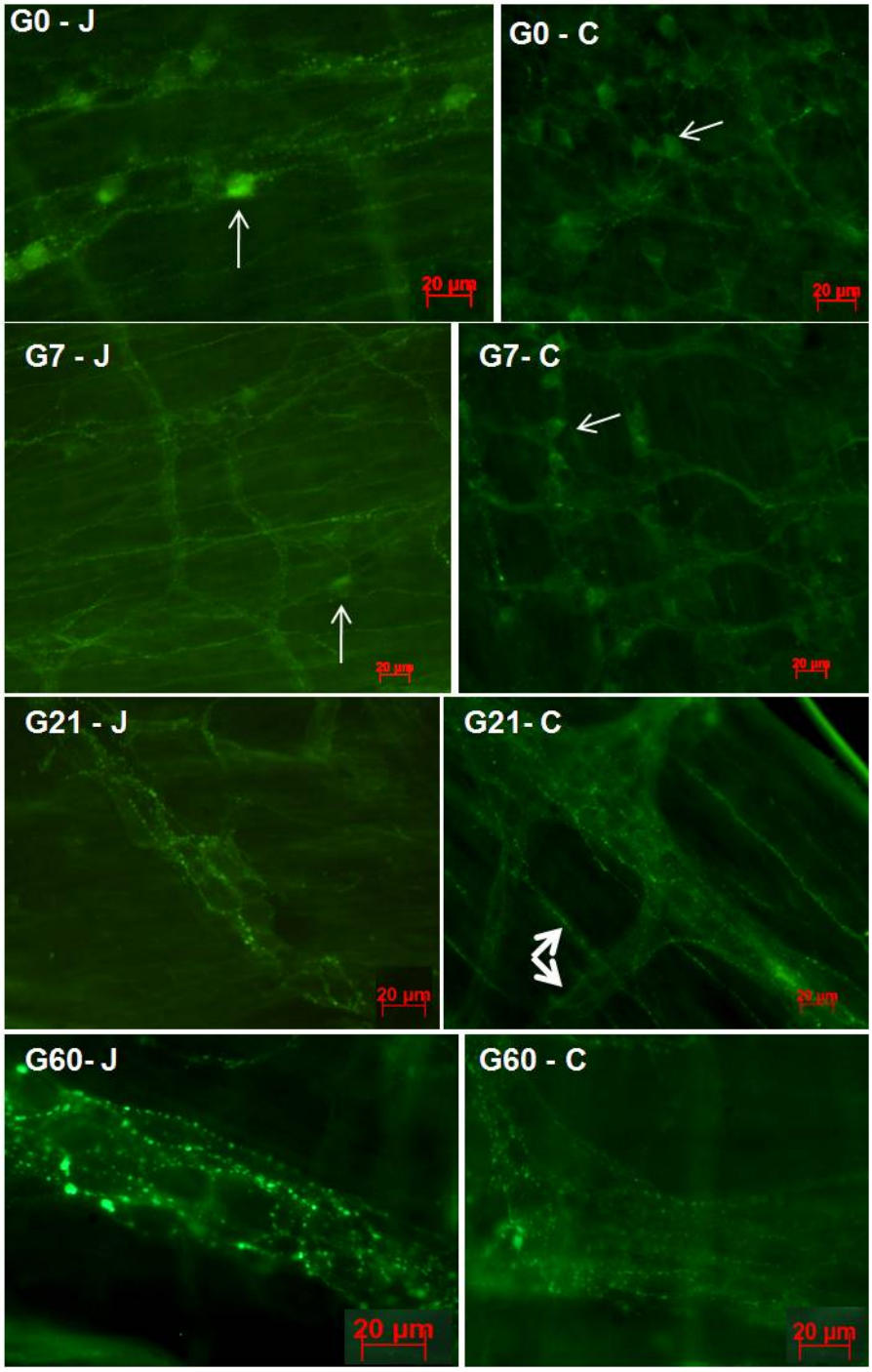


Figura 14 - Imuno-histoquímica para VIP. J – jejuno, C – colo. Podem ser observados os corpos neuronais apresentando imunoreatividade ao VIP, especialmente nos grupos G0 e G7 (setas delgadas). Também podem ser observadas as malhas primária e secundária (setas espessas)

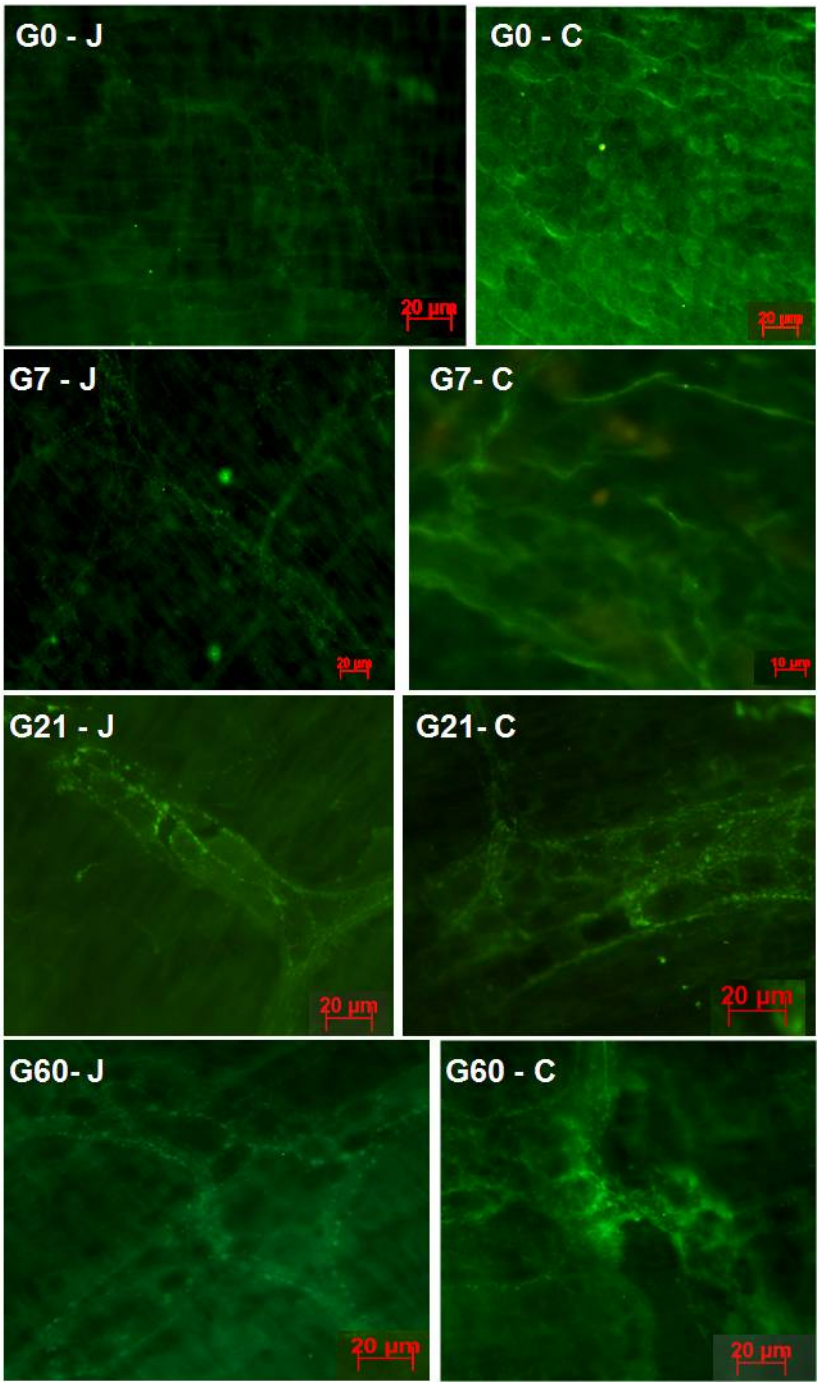


Figura 15 - Imuno-histoquímica para Substância P. J – jejuno, C – colo. Pode ser observada a grande quantidade de corpos neuronais apresentando imunoreatividade à Substância P, especialmente na figura G0-C

5.7 ÁREA OCUPADA POR NEURÔNIOS E AXÔNIOS ATRAVÉS DO SIG

5.7.1 Área ocupada por neurônios e axônios nitrérgicos no jejuno

Houve um aumento significativo nas frequências para a área ocupada, tanto pelos neurônios quanto pelos axônios, comparando os grupos G0 e G7 ($p < 0{,}000184$). Porém, entre os grupos G7 e G21 houve uma redução significativa na área ocupada pelos neurônios como também pelos axônios ($p < 0{,}000498$). Já entre os grupos G21 e G60, houve diminuição na área ocupada pelos neurônios, enquanto que a área ocupada pelos axônios aumentou de maneira significativa ($p = 0{,}010002$) (Gráfico 19 e Tabela 6).

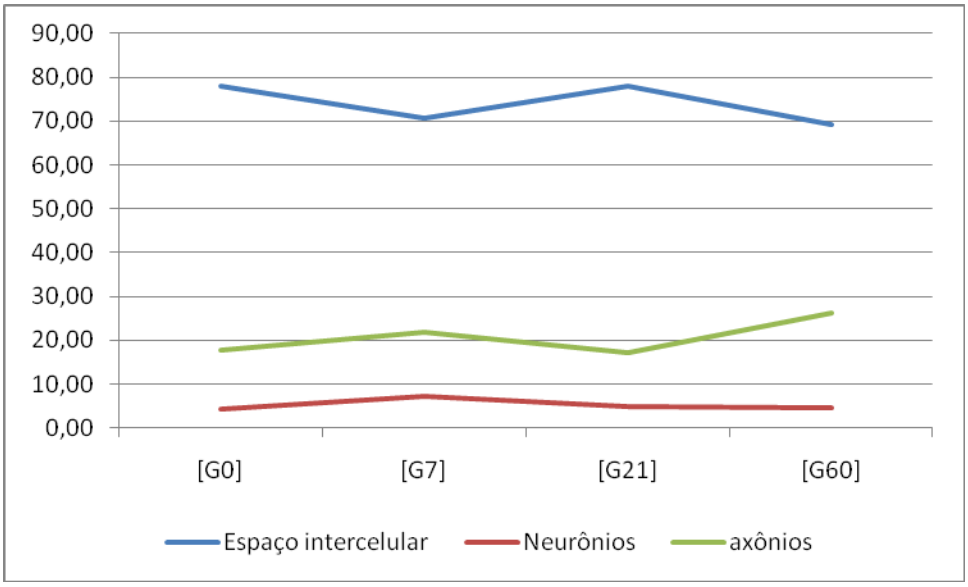


Gráfico 19 - Frequência do espaço ocupado pelos neurônios e axônios nitrérgicos em relação ao espaço livre no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Tabela 6 - Relação percentual das frequências da área ocupada pelos neurônios e axônios nitrérgicos no jejuno em ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Categoria	G0		G7		G21		G60	
	Pixel*	%	Pixel	%	Pixel	%	Pixel	%
Espaço livre	4829607	83,64288	3957250	68,53473	4999982	86,59357	4460108	77,24361
Neurônios	169590	2,937091	390787	6,767953	126986	2,199242	114085	1,975813
Axônios	774883	13,42003	1426043	24,69732	647112	11,20719	1199887	20,78057
Total pixel	5774080							

*Através da escala incluída na imagem, pode ser feita a conversão de pixel para área (em μm^2)

5.7.2 Área ocupada por neurônios e axônios nitrérgicos no colo

Os achados foram similares aos do jejuno, porém, as diferenças não foram significativas entre os grupos G0 e G7, e G7 e G21. Encontrou-se um aumento nas frequências da área ocupada tanto pelos neurônios quanto pelos axônios entre os grupos G0 e G7 ($p < 0{,}172294$), uma redução na área ocupada pelos neurônios entre G7 e G21 ($p < 0{,}263331$), e uma diminuição significativa na área ocupada pelos neurônios e aumento na área ocupada pelos axônios entre G21 e G60 ($p < 0{,}05$) (Gráfico 20 e Tabela 7).

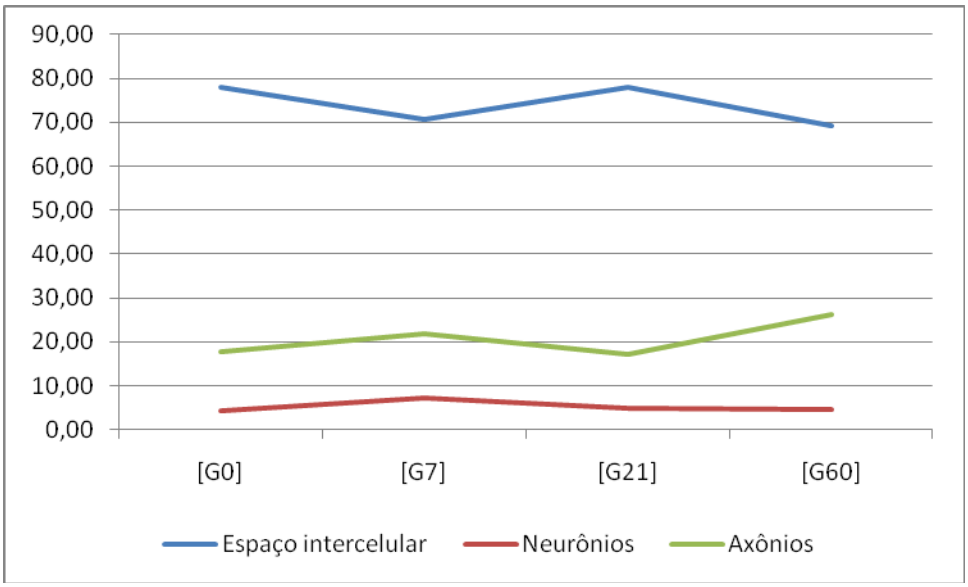


Gráfico 20 - Frequência do espaço ocupado pelos neurônios e axônios nitrérgicos em relação ao espaço livre no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Tabela 7 - Relação percentual das frequências da área ocupada pelos neurônios e axônios nitrérgicos no jejuno em ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Categoria	G0		G7		G21		G60	
	Pixel*	%	Pixel	%	Pixel	%	Pixel	%
Espaço livre	4498194	77.90322	4086573	70.77444	4510426	78.11506	4003510	69.33589
Neurônios	256314	4.439045	420744	7.286771	281010	4.866749	262791	4.551219
Axônios	1019572	17.65774	1266763	21.93879	982644	17.01819	1507779	26.11
Total pixel	5774080							

*Através da escala incluída na imagem, pode ser feita a conversão de pixel para área (em μm^2)

5.7.3 Análise do processo markoviano na histoquímica para NADPH-d no jejuno e no colo

A cadeia de Markov mostrou projeção das frequências de neurônios e axônios no jejuno e no colo para NADPH-d. Nela se mostra como vai diminuindo a probabilidade de que a frequência dos neurônios permaneça no mesmo estado, numa relação inversa aos axônios, até se estabilizar aos 90 dias de vida do animal em uma proporção próxima ao 10% de neurônios em relação aos axônios no jejuno e ao redor de 15 % no colo (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 - Matriz de estados (a) e probabilidade de transição (b) para as frequências encontradas de neurônios e axônios à histoquímica para NADPH-d no plexo mioentérico no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Estados				a. Áreas de transição		b. Probabilidade de transição	
Inicial	Atual	Projeção		Neurônio	Axônio	Neurônio	Axônio
G0	G7	G21	Neurônio	10989	50352	0.1792	0.8208
			Axônio	50672	243477	0.1723	0.8277
G7	G21	G60	Neurônio	5119	33055	0.1341	0.8659
			Axônio	30699	201151	0.1324	0.8676
G21	G60	90 dias de vida	Neurônio	1672	14945	0.1006	0.8994
			Axônio	15506	148885	0.0943	0.9057

Tabela 9 - Matriz de estados (a) e probabilidade de transição (b) para as frequências encontradas de neurônios e axônios à histoquímica para NADPH-d no plexo mioentérico no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Estados				a. Áreas de transição		b. Probabilidade de transição	
Inicial	Atual	Projeção		Neurônio	Axônio	Neurônio	Axônio
G0	G7	G21	Neurônio	23517	71929	0.2464	0.7536
			Axônio	72459	221657	0.2464	0.7536
G7	G21	G60	Neurônio	15145	59637	0.2025	0.7975
			Axônio	58450	230737	0.2021	0.7979
G21	G60	90 dias de vida	Neurônio	8181	48166	0.1452	0.8548
			Axônio	46015	273125	0.1442	0.8548

5.7.4 Área ocupada por neurônios e axônios colinérgicos no jejuno

Observou-se um aumento significativo das frequências dos neurônios e dos axônios entre G0 e G7 ($p < 0,00000$). Houve também um aumento significativo na área ocupada pelos neurônios entre G7 e G21, ao mesmo tempo em que houve uma diminuição na área ocupada pelos axônios ($p < 0,00000$). Porém, entre G21 e G60 houve uma redução dos neurônios e dos axônios, mas não foi significativa ($p < 0,363915$) (Gráfico 21 e Tabela 10).

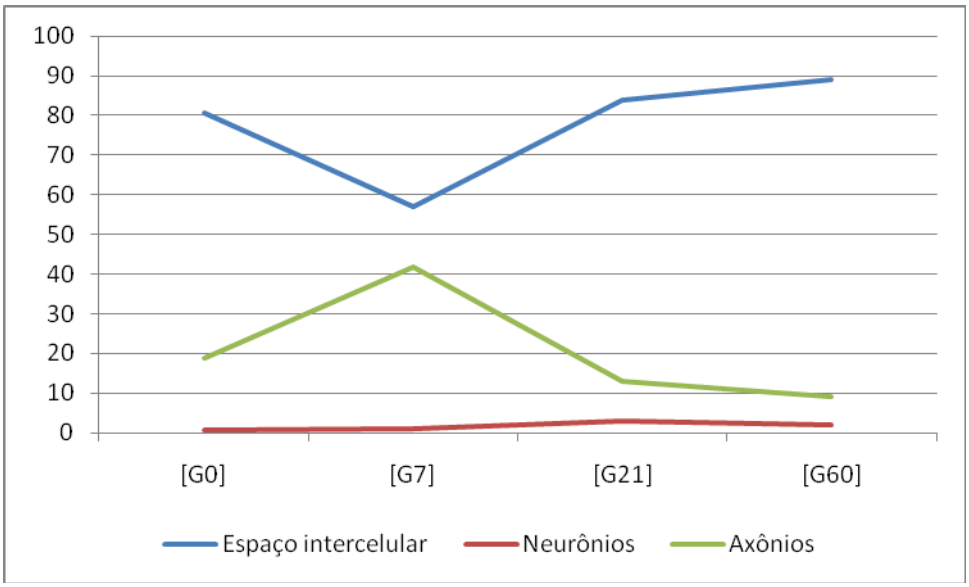


Gráfico 21 - Frequência do espaço ocupado pelos neurônios e axônios colinérgicos em relação ao espaço livre no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Tabela 10 - Relação percentual das frequências da área ocupada pelos neurônios e axônios colinérgicos no jejuno em ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Categoria	G0		G7		G21		G60	
	Pixel*	%	Pixel	%	Pixel	%	Pixel	%
Espaço livre	10457728	80.49558	7424111	57.14512	10897982	83.88432	11576607	89.10785
Neurônios	75077	0.577885	123745	0.952494	386550	2.975366	249610	1.921307
Axônios	2458875	18.92654	5443824	41.90239	1707148	13.14032	1165463	8.970841
Total Pixel	12991680							

*Através da escala incluída na imagem, pode ser feita a conversão de pixel para área (em μm^2)

5.7.5 Área ocupada por neurônios e axônios colinérgicos no colo

Foi observado um aumento significativo na área ocupada pelos neurônios e pelos axônios entre G0 e G7 ($p < 0,00000$). Entre G7 e G21 foi observada uma redução significativa na área ocupada pelos neurônios e pelos axônios ($p < 0,000051$). Já entre G21 e G60 foi observado um aumento significativo na área ocupada pelos neurônios com uma diminuição significativa na área ocupada pelos axônios ($p < 0,01159$) (Gráfico 22 e Tabela 11).

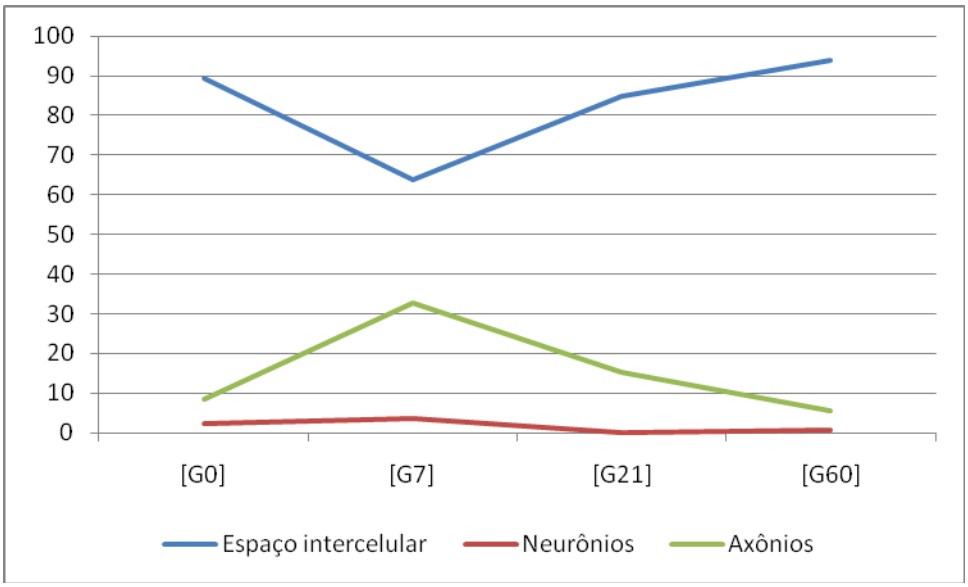


Gráfico 22 - Frequência do espaço ocupado pelos neurônios e axônios colinérgicos em relação ao espaço livre no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Tabela 11 - Relação percentual das frequências da área ocupada pelos neurônios e axônios colinérgicos no jejuno em ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Categoria	G0		G7		G21		G60	
	Pixel	%	Pixel	%	Pixel	%	Pixel	%
Espaço livre	11603094	89.31173	8269404	63.65154	11007678	84.72867	12187431	93.80951
Neurônios	292460	2.251133	464262	3.573533	21265	0.163682	91976	0.707961
Axônios	1096126	8.437138	4258014	32.77493	1962737	15.10765	712273	5.482532
Total Pixel	12991680							

*Através da escala incluída na imagem, pode ser feita a conversão de pixel para área (em μm^2)

5.7.6 Análise do processo markoviano na histoquímica para AChE no jejuno e no colo

Neste caso, observou-se um aumento da probabilidade de que a frequência dos neurônios permaneça no mesmo estado, numa relação inversa aos axônios, até se estabilizar aos 90 dias de vida em uma proporção próxima a 20% de neurônios em relação aos axônios no jejuno e ao redor de 13 % no colo (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12 - Matriz de estados (a) e probabilidade de transição (b) para as frequências encontradas de neurônios e axônios à histoquímica para AChE no plexo mioentérico no jejuno de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Estados				a. Áreas de transição		b. Probabilidade de transição	
Inicial	Atual	Projeção		Neurônio	Axônio	Neurônio	Axônio
G0	G7	G21	Neurônio	665	25034	0.0259	0.9741
			Axônio	24647	987280	0.0244	0.9756
G7	G21	G60	Neurônio	33149	146238	0.1848	0.8152
			Axônio	139065	612659	0.185	0.815
G21	G60	90 dias de vida	Neurônio	9852	41364	0.1924	0.8076
			Axônio	41351	173613	0.1924	0.8076

Tabela 13 - Matriz de estados (a) e probabilidade de transição (b) para as frequências encontradas de neurônios e axônios à histoquímica para AChE no plexo mioentérico no colo de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal

Estados				a. Áreas de transição		b. Probabilidade de transição	
Inicial	Atual	Projeção		Neurônio	Axônio	Neurônio	Axônio
G0	G7	G21	Neurônio	1392	14451	0.0879	0.9121
			Axônio	14172	147387	0.0877	0.9123
G7	G21	G60	Neurônio	15	1880	0.008	0.992
			Axônio	1819	226616	0.008	0.992
G21	G60	90 dias de vida	Neurônio	3937	25317	0.1346	0.8654
			Axônio	22541	140957	0.1379	0.8621

6 DISCUSSÃO

Considerando a literatura à qual se teve acesso, a presente pesquisa é pioneira na utilização da metodologia de contagem de pontos - ferramenta utilizada na estereologia - para a estimativa da área da superfície serosa do jejuno e do colo, em imagens escaneadas. Diferentes pesquisadores têm demonstrado amplamente a acurácia, confiabilidade e praticidade da contagem de pontos para a estimativa de áreas superficiais em vários órgãos (LARSEN, 1998; FERNANDES; ZANIQUELLI; PARANHOS, 2002; FRANZÉN et al., 2005; AYDIN et al., 2007; VAN VRÉ et al., 2007).

Com o objetivo de evitar o viés amostral e o viés sistemático, outras ferramentas estereológicas foram usadas como a SURS, tanto para amostragem dos fragmentos jejunais quanto para amostragem de campos em cada preparado de membrana, e o marco sem viés para a quantificação dos neurônios. Esta aplicação da metodologia estereológica tem sido reportada para estudo morfométrico do plexo mioentérico apenas por um grupo da Universidade de Antwerp, na Bélgica, coordenado pela pesquisadora C. Van Ginneken (VAN GINNEKEN et al., 1998a; VAN GINNEKEN et al., 2001a,b; OSTE et al., 2005a; VAN HAVER et al., 2008).

Foram observadas diferenças na intensidade da coloração do azul cuprolínico nas diferentes idades e localizações, conforme a descrição de Schäfer, Hänsgen e Mestres (1999). Nas histoquímicas para NADPH-d e AChE foram observados neurônios com diferentes graus de coloração, sendo que foram classificados em duas categorias: neurônios com coloração forte e neurônios com coloração fraca. No entanto, apenas na histoquímica para NADPH-d no jejuno foi observado um padrão de aumento de neurônios com coloração forte na medida em que aumentou a idade. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Boros et al. (1994), Timmermans et al. (1994) e Ward e Torihashi (1995) em codornas, suínos e caninos, respectivamente. Na inervação colinérgica foi relatado um comportamento similar por outros autores (VANNUCCHI; FAUSSONE-PELLEGRINI, 1996); no entanto, neste estudo não foi observado algo similar na histoquímica para AChE. Diferenças de intensidade em animais adultos não têm sido relatadas, o que pode demonstrar um estado de equilíbrio depois de ter-se alcançado um estágio pleno de desenvolvimento (SCHÄFER; HÄNSGEN; MESTRES, 1999).

Alguns autores relataram uma imunorreatividade mais fraca no intestino delgado comparada com o colo nos animais recém-nascidos (MATINI; MAYER; FAUSSONE-PELLEGRINI, 1997); porém, essa diferenciação não foi observada no presente estudo usando a histoquímica para NADPH-d.

A falta de marcação da estrutura fina dos processos neuronais nos neurônios nitrérgicos dos animais recém-nascidos e de 7 dias de idade indica que esses neurônios não estão completamente desenvolvidos (VOYVODIC, 1992).

A identificação de corpos celulares imunorreativos nos grupos G0 e G7 à imuno-histoquímica indica um lento processo de transporte axoplasmático nos neurônios mioentéricos desses grupos, provavelmente por causa do seu estado ainda imaturo. Nos grupos G21 e G60 não foram identificados corpos celulares imunorreativos, indicando um transporte axoplasmático ativo e a necessidade do uso da colchicina (TIMMERMANS et al., 1994). A identificação da extensa rede de fibras dos plexos primário e secundário está de acordo com os resultados reportados por outros autores (TIMMERMANS et al., 1994; BELAI; COOPER; BURNSTOCK, 1995; MATINI; MAYER; FAUSSONE-PELLEGRINI, 1997).

Durante o desenvolvimento pós-natal, os gânglios apresentaram-se maiores, melhor demarcados pelos feixes nervosos e mais separados um do outro. Essa observação sugere que os gânglios sofrem um processo de fusão desde o nascimento até o momento do desmame (21 dias de idade) (VAN GINNEKEN et al., 1998a; SRI PARAN; ROLLE; PURI, 2009). Outros autores reportaram achados similares durante o desenvolvimento pós-natal do plexo mioentérico do estômago nos gatos; porém, eles atribuem o aumento nas dimensões do gânglio somente ao fato dos neurônios serem maiores (LOLOVA; ITSEV, 1983).

A disposição diferenciada dos gânglios mioentéricos nas regiões mesentérica e anti-mesentérica do colo, que foi muito evidente na histoquímica para AChE nos grupos G0 e G7, foi descrita também na cobaia (GABELLA, 1990).

No presente estudo não foi considerada a estimativa da densidade de gânglios no plexo mioentérico, devido à extrema variação de número de neurônios por gânglio e à dificuldade de individualizar os gânglios, como já foi reportado por vários autores (GABELLA, 1982; FURNESS, 2006). Na opinião do autor, devido a essa variação e a subjetividade que implica a diferenciação entre gânglios, a densidade ganglionar não reflete tão bem a funcionalidade do plexo mioentérico como a densidade neuronal.

A respeito da estimativa do número total de neurônios, foi considerada como a melhor opção multiplicar a densidade neuronal/área pela área total da serosa, concordando com a metodologia de outros autores (VAN GINNEKEN et al., 1998a). A estimativa da densidade de neurônios por área ganglionar, como reportada por Karaosmanoglu (1996), é constante em todos os segmentos do intestino e é independente do grau de dilatação ou retração da parede intestinal; porém, não reflete diversas mudanças como a diminuição da densidade neuronal/área durante o desenvolvimento pós-natal, como também não permite a estimativa do número total de neurônios. Outro aspecto é que não permite ter uma

idéia da parte funcional, ou seja, da proporção de neurônios inervando uma determinada área de camadas musculares.

As estimativas de densidade numérica pan-neuronal e do número total de neurônios foram obtidas em preparados de membrana corados com azul cuprolínico. Este método foi escolhido por ter sido previamente demonstrado que outros métodos de coloração neuronal não coram todos os neurônios ou coram também o neurópilo, o que dificulta a diferenciação dos neurônios nos preparados de membrana; além do mais, foi comprovado que não cora a glia (KARAOSMANOGLU et al., 1996). O azul cuprolínico cora todos os neurônios, de forma similar à imuno-histoquímica com Anti-Hu (PHILLIPS et al., 2004). O azul cuprolínico se une ao RNA de cadeia simples na presença de íons de Mg^{2+} e, desta forma, atua como um corante ribossomal, marcando somente o citoplasma. No plexo mioentérico, os ribossomas estão presentes no citoplasma dos neurônios, em grandes quantidades (HEINICKE; KIERNAN; WIJSMAN, 1987).

Neste estudo foi evidenciada uma diminuição na densidade neuronal/área nos neurônios totais, nos neurônios nitrérgicos e nos neurônios colinérgicos; como também um aumento no número total de neurônios corados com azul cuprolínico e no número total de neurônios nitrérgicos e colinérgicos no colo. O número total de neurônios nitrérgicos apresentou aumento apenas no jejuno. Também foi percebido um aumento na área neuronal entre os grupos.

A respeito da densidade numérica neuronal total/área, Gabella (1971) também reportou uma diminuição deste parâmetro no intestino delgado de ratos, comparando animais recém-nascidos (64346±3068 neurônios/cm^2) com animais de 6 meses de idade (9405±677 neurônios/cm^2), revelada usando a histoquímica de NADH-diaforase. Neste estudo observou-se também diminuição na densidade, porém, a partir de valores muito maiores. Já foi comprovado que a histoquímica NADH-diaforase não marca todos os neurônios (JOHNSON et al., 1998), o que pode explicar as grandes diferenças nos valores. Outro fator que poderia ter influenciado na diferença dos valores é que esse autor fez a quantificação em fotografias, enquanto que nesta pesquisa quantificou-se diretamente em um programa analisador de imagem, com a possibilidade de focar diferentes planos onde era possível encontrar neurônios. Outra explicação poderia ser o fato de ter utilizado um método de amostragem diferente.

Román et al. (2001) reportaram também diminuição da densidade neuronal do plexo mioentérico de pintos durante os primeiros 7 dias de vida, como anteriormente reportado por Schäfer, Hänsgen e Mestres (1999), os quais observaram uma diminuição na densidade neuronal durante os primeiros 14 dias de vida no colo de rato. Porém, seus valores foram bem superiores do que aqueles evidenciados neste estudo (1810000000 e 940000000 neurônios/cm^2 em ratos recém-nascidos e de 7 dias, respectivamente). Os autores utilizaram também o corante pan-neuronal azul cuprolínico, não

obstante, a densidade foi medida por cm^2 de área ganglionar, fato que provavelmente tenha superestimado os valores obtidos.

A densidade numérica/área dos neurônios corados com azul cuprolínico foi entre duas a três vezes maior no colo do que no jejuno em todos os grupos, inversamente ao descrito por Schäfer, Hänsgen e Mestres (1999) no rato e Román *et al*. (2001) no pinto, que verificaram uma diminuição na densidade neuronal no sentido oral-aboral do intestino.

A diminuição da densidade numérica/área dos neurônios nitrérgicos durante o desenvolvimento pós-natal observada neste estudo está de acordo com os resultados de Van Ginneken et al. (2001a,b) e Sri Paran et al. (2009) em intestino de suínos, Román et al. (2001) em intestino de frangos, Wester et al. (1999) e Timmermans et al. (1994) em humanos, Ward e Torihashi (1995) em cães e Schäfer, Hänsgen e Mestres (1999) em duodeno e colo de ratos. Todavia, contrasta com o estudo de Matini et al. (1997), no qual reportam uma densidade constante de neurônios imunoreativos a NOS durante a vida pós-natal; entretanto, esses autores mediram a densidade como células/mm em cortes de criostato.

Este parâmetro foi 2,4 vezes maior no colo do que no jejuno nos grupos G0 e G21 e 1,6 vezes maior nos grupos G7 e G60. Estes resultados estão de acordo com os reportados por Timmermans et al. (1994) em humanos, com valores similares aos reportados neste estudo (para fetos de 32 semanas: 31742 ± 1371 neurônios/cm^2 no jejuno e 63418 ± 619 no colo; para bebês de 2 meses: 3710 ± 161 no jejuno e 8878 ± 25 no colo). Outros autores já reportaram também a densidade neuronal/área maior no colo do que no intestino delgado, em humanos (DE GIORGIO et al., 1994) e em ratos (BELAI; COOPER; BURNSTOCK, 1995; MATINI; MAYER; FAUSSONE-PELLEGRINI, 1997).

A densidade numérica/área dos neurônios colinérgicos também diminuiu durante o desenvolvimento pós-natal. No jejuno, essa diminuição foi significativa entre os dias 0 e 7, e entre os dias 0 e 21, no colo. A densidade foi sempre maior no colo do que no jejuno para todas as idades. Estes resultados estão de acordo com os reportados por Vannucchi e Faussone-Pellegrini (1996), embora elas tenham usado uma metodologia diferente (cortes em criostato e imuno-histoquímica para AChE).

Somente foram evidenciadas diferenças regionais na densidade numérica/área entre os segmentos orais e aborais no colo dos neurônios nitrérgicos nos grupos G21 e G60, sendo maior nas porções orais. Van Ginneken et al. (1998) evidenciaram o mesmo comportamento nos neurônios nitrérgicos no duodeno de suínos e sugerem que as porções orais estão mais envolvidas na regulação dos processos mediados pelo NO. Matini et al. (1995) e Sri Paran et al. (2009) também encontraram diferenças significativas na densidade de neurônios nitrérgicos; porém, não corroboram com os achados desta pesquisa e dos de Van Ginneken et al. (1998), uma vez que foi menor na porção oral. Ambos os autores usaram metodologias diferentes às usadas no presente estudo para estimar a densidade neuronal. Isto está em concordância com o observado por alguns autores sobre a variação no envolvimento de

neurotransmissores ao longo do intestino (COSTA; FURNESS; HUMPHREYS, 1986; MATINI et al., 1995).

É muito provável que a diminuição da densidade seja devido à expansão da rede nervosa à medida que aumenta a idade (WARD; TORIHASHI, 1995; SCHÄFER; HÄNSGEN; MESTRES, 1999; WESTER; O'BRIAIN; PURI, 1999). Contudo, funcionalmente é mais significativo conhecer a mudança no número total de neurônios do que somente a densidade, a qual está influenciada por fatores como contração, retração ou dilatação da parede intestinal. Além do mais, uma diminuição de densidade poderia levar a falsas conclusões a respeito de uma diminuição da população de neurônios.

O número total de neurônios foi estável no jejuno e aumentou 3,3 vezes no colo desde o grupo G7 até grupo G60. Gabella (1971) reportou um aumento de 4.4 vezes o número total de neurônios do intestino delgado de ratos, comparando entre recém-nascidos (420.000 células) e adultos de 6 meses (1.850.000 células). Novamente, o número de células foi muito menor do que o reportado no presente estudo, apesar de ser o número total de neurônios em todo o intestino delgado. Esta diferença parece dever-se principalmente à baixa densidade, porque os dados de área superficial da serosa não diferem muito daqueles aqui apresentados, ao menos no recém-nascido (6,5 cm^2), que é o que se pode comparar. Os resultados deste estudo contrastam com a teoria de que o número total de neurônios já está pré-estabelecido no momento do nascimento no rato (VANNUCCHI; FAUSSONE-PELLEGRINI, 1996).

O aumento pós-natal do número de neurônios é uma ocorrência conhecida no sistema nervoso central do rato, devido à mitose (ALTMAN; DAS, 1966). Segundo Pham et al. (1991), as células derivadas da crista neural continuam a se dividir ao longo de toda a vida fetal no intestino. Porém, experimentos não demonstraram mitose depois do nascimento no SNE (GABELLA, 1968). Outra opção para explicar o aumento, seria a transformação de células não-nervosas ou células-tronco em neurônios (MASSON, 1928; VAN CAMPENHOUT, 1967). Todavia, ainda não existem estudos que expliquem com certeza a origem da grande quantidade de neurônios que surgem no colo após o nascimento no plexo mioentérico.

A estimativa do número total de neurônios nitrérgicos aumentou 2,5 vezes entre o nascimento e os 7 dias de vida no jejuno e entre os 7 e 21 dias de vida no colo. Matini et al. (1997) também detectaram um aumento do número de neurônios nitrérgicos somente até a terceira semana de vida no rato (período de desmame), e Belai et al. (1995) reportaram um aumento na proporção de neurônios nitrérgicos de 22% no quarto dia de vida a 27% no sexto mês de vida no rato. Esses resultados são comparáveis aos de Van Ginneken et al. (1998) que detectaram um aumento significativo de neurônios nitrérgicos entre suínos antes do nascimento e com 3 a 6 semanas de idade. Pode-se afirmar, em concordância com Matini et al. (1997), que o desenvolvimento completo dos neurônios nitrérgicos é atingido no período de desmame; porém, esse fato só foi observado no colo no presente estudo.

Van Ginneken et al. (1998) atribuíram o aumento no número total de neurônios nitrérgicos, a uma necessidade maior de inervação inibitória e Belai et al. (1995) a uma resposta protetora do NO nos neurônios ou à mudança secundária associada a outras mudanças que acontecem no plexo mioentérico com a idade. Tal aumento reflete-se fisiologicamente como um aumento no relaxamento nitrérgico induzido por estimulação elétrica entre a segunda e oitava semana de vida no estômago do rato, junto a uma reação contrária para a ação da acetilcolina (SMITS; LEFEBVRE, 1996).

As alterações na expressão de NOS podem ser devidas às mudanças no equilíbrio entre hormônios, estímulos pré-sinápticos e sinais derivados do alvo, provavelmente devidos ao crescimento pós-natal (VAN GINNEKEN et al., 1998a). Tem sido demonstrado também que a ingestão de nutrientes afeta o padrão de desenvolvimento da motilidade intestinal (BUENO; RUCKEBUSCH, 1979). No período perinatal existe um desenvolvimento dinâmico dentro do SNE à medida que o código químico é estabelecido, os reflexos se desenvolvem e os contatos neuromusculares são determinados (WARD; TORIHASHI, 1995).

O número total de neurônios colinérgicos também permaneceu constante a partir do nascimento no jejuno e sofreu um aumento significativo entre os dias 21 e 60 de vida no colo. Estes achados demonstram que o desenvolvimento dos neurônios colinérgicos pode se estender até a vida adulta (90 dias de vida) no colo do rato, ao contrário da opinião das autoras Vannucchi e Faussone-Pellegrini (1996), as quais afirmaram que os neurônios colinérgicos terminam seu desenvolvimento durante a período do desmame (21 dias de vida).

O número total de neurônios foi maior no jejuno do que no colo nas três colorações (pan-neuronal, histoquímica para NADPH-d e para AChE), o que pode ser devido a área superficial da serosa ser muito maior no jejuno do que no colo.

O aumento observado no tamanho dos neurônios durante o desenvolvimento pós-natal tem sido demonstrado por vários autores (GABELLA, 1971; SCHÄFER; HÄNSGEN; MESTRES, 1999; SRI PARAN; ROLLE; PURI, 2009), e pode ser atribuído ao aumento na quantidade de músculo liso a ser inervado Levi[2] (1906 apud FURNESS, 2006, p. 25; TERNI, 1920), aumento do número de sinapses (GABELLA, 1971) ou ao próprio processo de maturação. Já foi demonstrado que os neurônios aumentam de tamanho na cobaia adulta em reação à hipertrofia das camadas musculares do intestino (GABELLA, 1984), como também pode aumentar concomitantemente o número de neurônios (FILOGAMO; VIGLIANI, 1954).

O tamanho dos neurônios nitrérgicos aumentou 3 vezes no jejuno entre os 7 dias e os 60 dias de idade, e 4 vezes entre 0 dia e 60 dias de idade no colo. Este aumento mais marcante no colo já foi

---

[2] LEVI, G. Studi sulla grandezza delle celluleI.. Richerche comparative sulla grandezza delle cellule dei mammiferi. **Arch. ital. Anat. Embriol.,** [S.I.], v. 5, n. 1, p. 291-358, 1906.

reportado também por Sri Paran et al. (2009) no suíno. O aumento foi mais discreto nos neurônios colinérgicos, sendo de 1,7 vezes entre os dias 7 e 21 no jejuno, e de 2,4 vezes entre os dias 0 e 21 no colo. Estes resultados estão de acordo com os reportados anteriormente no intestino do suíno durante o desenvolvimento pós-natal (SRI PARAN; ROLLE; PURI, 2008). Para os grupos G0 e G7, as populações de neurônios nitrérgicos e colinérgicos não podem ser diferenciadas pelo tamanho dos neurônios; porém, nos grupos G21 e G60 já podem ser caracterizadas duas populações com tamanhos neuronais significativamente diferentes, sendo os neurônios nitrérgicos maiores do que os colinérgicos.

Em geral, pode ser observado que o processo de desenvolvimento apresenta-se em tempos diferentes no jejuno e no colo. A tendência observada foi um tempo mais prolongado em que as mudanças na densidade neuronal/área e no número total de neurônios se apresentam no colo comparado com o jejuno, geralmente se prolongado até o dia 60 de vida. O que está en concordância com Faussone-Pellegrini et al. (1996), que reportam que o colo atinge a sua diferenciação completa posteriormente ao intestino delgado.

Até agora, as pesquisas morfométricas do plexo mioentérico tem sido baseadas na quantificação dos neurônios, ou seja, em uma apreciação de presença-ausência. Embora isso seja importante, resulta insuficiente se não se levam em conta as mudanças na área que ocupam os neurônios e os axônios. Em particular os axônios apresentam uma dificuldade metodológica maior, enquanto a dificuldade para estimar a densidade por área. Com a finalidade de resolver essa dificuldade metodológica, foi usado pela primeira vez na área da anatomia, o SIG, método usado primeiramente para análise geográfica, mas que recentemente tem sido utilizado em múltiplas aplicações.

As mudanças que acontecem nos axônios durante o desenvolvimento pós-natal são importantes para deduzir as complexas relações morfofisiológicas que acontecem no período entre o nascimento e o completo desenvolvimento do animal. Pelo conhecimento do autor, é a primeira vez que é analisado o comportamento pós-natal do espaço ocupado pelos neurônios e pelos axônios, e a sua relação com a área a ser inervada, ou seja, o músculo liso. Estes parâmetros podem refletir as diferenças funcionais do intestino nos diferentes estágios do desenvolvimento: recém-nascido (G0), lactante (G7), recém-desmamado (G21) e adulto jovem (G60).

Nas duas reações histoquímicas (NADPH-d e AChE) houve um aumento na área ocupada pelos axônios entre os grupos G0 e G7, refletindo o desenvolvimento da malha primária no início da lactância. É provável que nessa etapa, o início da alimentação ative fatores de crescimento que estimulam o desenvolvimento do neurópilo para suprir as necessidades de inervação do intestino em crescimento (FAUSSONE-PELLEGRINI; MATINI; STACH, 1996). No entanto, entre G7 e G21 houve uma diminuição nesse parâmetro, provavelmente mostrando o efeito que exerce o crescimento do intestino na densidade dos elementos do plexo mioentérico. Curiosamente, houve novamente um aumento entre G21

e G60, com exceção do jejuno na AChE. Estes resultados estão de acordo com os de Sri Paran et al. (2008), os quais evidenciaram um aumento no diâmetro axonal entre as 4 a 12 semanas de vida no suíno.

A projeção futura feita com a análise de Markov mostrou diferença entre as histoquímicas para NADPH-d e AChE. No caso da inervação nitrérgica, a tendência para os 90 dias de vida do animal é de diminuição da proporção de neurônios com respeito à dos axônios. No caso da inervação colinérgica, a tendência é oposta. É importante esclarecer que este teste não leva em conta o espaço livre, ou seja, o músculo liso; somente analisa a proporção de um elemento em relação ao outro (neurônio/axônio).

No caso da histoquímica para NADPH-d, este aumento relativo de axônios indica um desenvolvimento das projeções neuronais até os 90 dias de vida, mostrando que as malhas ganglionares têm que se desenvolver enquanto o crescimento do animal continua, para suprir as demandas de inervação do músculo liso com um volume cada vez maior.

7 CONCLUSÕES

Estes resultados sugerem que os neurônios sofrem mudanças morfológicas e químicas durante o desenvolvimento pós-natal do SNE, provavelmente em razão de fatores microambientais como os fatores de crescimento e de replicação. Assim como o período da vida embrionária em que colonizaram cada região do intestino, a alimentação e o próprio crescimento deste órgão. Do presente estudo pode ser concluído que a completa maturidade do intestino seja atingida quando este finaliza o seu processo de crescimento, o que acontece além dos 60 dias de idade. Porém, esse desenvolvimento é diferenciado para cada segmento intestinal e cada tipo de neurônio.

Os neurônios nitrérgicos estabilizam seu número total durante o aleitamento (dia 7) no jejuno e no período do desmame (dia 21) no colo. Os neurônios colinérgicos estabilizam-se antes do nascimento no jejuno; porém, no colo é provável que o desenvolvimento seja atingido na vida adulta, uma vez que o aumento no número de neurônios foi observado entre os dias 21 e 60 de vida.

Quanto ao processo de maturação de cada neurônio evidenciado no aumento da área neuronal, tudo indica que na população de neurônios nitrérgicos esta maturidade é atingida na fase adulta (90 dias de vida), e na população de neurônios colinérgicos, durante o desmame (dia 21).

Em geral, o número total de neurônios foi estável no jejuno desde o nascimento até o dia 60, indicando que a população de neurônios já foi pré-estabelecida antes do nascimento neste segmento intestinal, o que se modifica é o código químico dos neurônios. Porém, o aumento do número total de neurônios no colo ocorreu desde o dia 7 até o dia 60 de vida, indicando que a estabilização da população neuronal neste segmento intestinal pode ser atingida em um estágio mais avançado da vida, talvez na fase adulta.

Pode-se afirmar que, além do desenvolvimento dos neurônios no que se refere às modificações em número e área celular, eles também sofrem um marcante desenvolvimento nos axônios. É provável que esse desenvolvimento seja requerido para suprir toda a inervação da extensa área de camadas musculares lisas que formam o intestino.

REFERÊNCIAS

AGUILERA, N. **Cadenas de Markov**: secondary title. Buenos Aires: Universidad Nacional del Litoral y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, 2009. 35 p.

ALTMAN, J.; DAS, G. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. **Journal of comparative neurolology**, v. 126, n. 3, p. 337-389, 1966.

AYDIN, F.; SENTURK, N.; SAHIN, B.; BEK, Y.; YUKSEL, E.; TURANLI, A. A practical method for the estimation of vitiligo surface area: a comparison between the point counting and digital planimetry techniques. **European journal of dermatology**, v. 17, n. 1, p. 30-32, 2007.

BAETGE, G.; GERSHON, M. Transient catecholaminergic (TC) cells in the vagus nerves and bowel of fetal mice: relationship to the development of enteric neurons. **Developmental biology**, v. 132, n. 1, p. 189-211, 1989.

BARTHÓ, L.; HOLZER, P. Search for a physiological role of substance P in gastrointestinal motility. **Neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 1-32, 1985.

BATES, M. Development of the enteric nervous system. **Clinics in perinatology**, v. 29, n. 1, p. 97-114, 2002.

BELAI, A.; ABERDEEN, J.; BURNSTOCK, G. Differential effect of immunosympathectomy on the expression of rat enteric neurotransmitters. **Neuroscience letters**, v. 139, n. 2, p. 157-160, 1992.

BELAI, A.; COOPER, S.; BURNSTOCK, G. Effect of age on NADPH-diaphorase-containing myenteric neurones of rat ileum and proximal colon. **Cell and tissue research**, v. 279, n. 2, p. 379-383, 1995.

BELAI, A.; SCHMIDT, H.; HOYLE, C.; HASSALL, C.; SAFFREY, M.; MOSS, J.; FÖRSTERMANN, U.; MURAD, F.; BURNSTOCK, G. Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in the myenteric plexus of the rat gut. **Neuroscience letters**, v. 143, n. 1-2, p. 60-64, 1992.

BOROS, A.; TIMMERMANS, J.; FEKETE, E.; ADRIAENSEN, D.; SCHEUERMANN, D. Appearance and some neurochemical features of nitrergic neurons in the developing quail digestive tract. **Histochemistry**, v. 101, n. 5, p. 365-374, 1994.

BRANCHEK, T.; GERSHON, M. Time course of expression of neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide, and NADPH diaphorase activity in neurons of the developing murine bowel and the appearance of 5-hydroxytryptamine in mucosal enterochromaffin cells. **Journal of comparative neurology**, v. 285, n. 2, p. 262-273, 1989.

BRANDT, C.; TAM, P.; GOULD, S. Nitrergic innervation of the human gut during early fetal development. **Journal of pediatric surgery**, v. 31, n. 5, p. 661-664, 1996.

BREDT, D.; HWANG, P.; SNYDER, S. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 768-770, 1990.

BROOKES, S. Neuronal nitric oxide in the gut. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 8, n. 6, p. 590-603, 1993.

BROOKES, S.; STEELE, P.; COSTA, M. Identification and immunohistochemistry of cholinergic and non-cholinergic circular muscle motor neurons in the guinea-pig small intestine. **Neuroscience**, v. 42, n. 3, p. 863-878, 1991.

BRYANT, M.; POLAK, M.; MODLIN, I.; BLOOM, S.; ALBUQUERQUE, R.; PEARSE, A. Possible dual role for vasoactive intestinal peptide as gastrointestinal hormone and neurotransmitter substance. **Lancet**, v. 1, n. 7967, p. 991-993, 1976.

BUENO, L.; RUCKEBUSCH, Y. Perinatal development of intestinal myoelectrical activity in dogs and sheep. **American Journal of Physiology**, v. 237, n. 1, p. E61-67, 1979.

BURCHER, E.; BUCK, S.; LOVENBERG, W.; O'DONOHUE, T. Characterization and autoradiographic localization of multiple tachykinin binding sites in gastrointestinal tract and bladder. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 236, n. 3, p. 819-831, 1986.

BURLEIGH, D. Ng-nitro-L-arginine reduces nonadrenergic, noncholinergic relaxations of human gut. **Gastroenterology**, v. 102, n. 2, p. 679-683, 1992.

CHRISTENSEN, J.; RICK, G. Intrinsic nerves in the mammalian colon: confirmation of a plexus at the circular muscle-submucosal interface. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 21, n. 2-3, p. 223-231, 1987.

CLOSE, B.; BANISTER, K.; BAUMANS, V.; BERNOTH, E.; BROMAGE, N.; BUNYAN, J.; ERHARDT, W.; FLECKNELL, P.; GREGORY, N.; HACKBARTH, H.; MORTON, D.; WARWICK, C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. **Laboratory animals**, v. 30, n. 4, p. 293-316, 1996.

COSTA, M.; BROOKES, S.; HENNIG, G. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**, v. 47, p. iv15-19, 2000. Supplement 4.

COSTA, M.; BUFFA, R.; FURNESS, J.; SOLCIA, E. Immunohistochemical localization of polypeptides in peripheral autonomic nerves using whole mount preparations. **Histochemistry**, v. 65, n. 2, p. 157-165, 1980.

COSTA, M.; FEITOSA, R.; CAMPOS, V. Classificação Multitemporal de Imagens utilizando Cadeias de Markov Nebulosas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO (SBSR), 13., 2007, Florianópolis. **Anais…** p. 87.

COSTA, M.; FURNESS, J.; HUMPHREYS, C. Apamin distinguishes two types of relaxation mediated by enteric nerves in the guinea-pig gastrointestinal tract. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 332, n. 1, p. 79-88, 1986.

COSTA, M.; FURNESS, J.; POMPOLO, S.; BROOKES, S.; BORNSTEIN, J.; BREDT, D.; SNYDER, S. Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea-pig small intestine. **Neuroscience letters**, v. 148, n. 1-2, p. 121-125, 1992.

DAVIDSON, M.; BAUER, C. Studies of distal colonic motility in children. IV. Achalasia of the distal rectal segment despite presence of ganglia in the myenteric plexuses of this area. **Pediatrics**, v. 21, n. 5, p. 746-761, 1958.

DE GIORGIO, R.; PARODI, J.; BRECHA, N.; BRUNICARDI, F.; BECKER, J.; GO, V.; STERNINI, C. Nitric oxide producing neurons in the monkey and human digestive system. **Journal of comparative neurology**, v. 342, n. 4, p. 619-627, 1994.

FAUSSONE-PELLEGRINI, M.; MATINI, P.; STACH, W. Differentiation of enteric plexuses and interstitial cells of Cajal in the rat gut during pre- and postnatal life. **Acta anatomica**, v. 155, n. 2, p. 113-125, 1996.

FERNANDES, R.; ZANIQUELLI, O.; PARANHOS, H. F. Analysis of the point-counting and planimetric methods in the quantification of denture biofilm--a methodological validation study. **Pesquisa odontológica brasileira**, v. 16, n. 1, p. 63-68, 2002.

FILOGAMO, G.; VIGLIANI, F. [Experimental research on the correlation between the extent of innervation and the size and number of ganglion cells of the mesenteric plexus (Auerbach's plexus) in the dog.]. **Rivista di patologia nervosa e mentale**, v. 75, n. 2, p. 441-472, 1954.

FRANZÉN, L.; EKSTEDT, M.; KECHAGIAS, S.; BODIN, L. Semiquantitative evaluation overestimates the degree of steatosis in liver biopsies: a comparison to stereological point counting. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 18, n. 7, p. 912-916, 2005.

FURNESS, J. **The enteric nervous system**. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2006. 274 p.

FURNESS, J. Types of neurons in the enteric nervous system. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 81, n. 1-3, p. 87-96, 2000.

GABELLA, G. Autonomic nervous system. In: G. Paxinos (Ed.). **The rat nervous system**. San Diego: Academic Pres Inc, 2004, p.77-109

GABELLA, G. Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. **Journal of anatomy**, v. 111, n. Pt 1, p. 69-97, 1972.

GABELLA, G. L'áctivité mitotique dans le plexus d'Auerbch au cours de l'accroissement post-natal et en conditions experimentales. **Comptes rendus de l'Association des Anatomistes**, v. 52, p. 541-544, 1968.

GABELLA, G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. **Journal of anatomy**, v. 109, n. Pt 1, p. 81-95, 1971.

GABELLA, G. On the ultrastructure of the enteric nerve ganglia. **Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement** v. 71, n., p. 15-25, 1982.

GABELLA, G. On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 30, p. S59-66, 1990. Supplement.

GABELLA, G. Size of neurons and glial cells in the intramural ganglia of the hypertrophic intestine of the guinea-pig. **Journal of neurocytology**, v. 13, n. 1, p. 73-84, 1984.

GABELLA, G.; TRIGG, P. Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. **Journal of neurocytology**, v. 13, n. 1, p. 49-71, 1984.

GERSHON, M.; CHALAZONITIS, A.; ROTHMAN, T. From neural crest to bowel: development of the enteric nervous system. **Journal of neurobiology**, v. 24, n. 2, p. 199-214, 1993.

GRIGOLETTI, P. **Cadeias de Markov**. Pelotas: Escola de Informática da Universidade Católica de Pelotas (UCPel), 2010. 8 p. Apostila.

GUNDERSEN, H. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary particles: The edge effect. **Journal of microscopy**, v. 111, n. 2, p. 219-223, 1977.

GUNDERSEN, H.; BENDTSEN, T.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MØLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.; PAKKENBERG, B.; SØRENSEN, F.; VESTERBY, A. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica scandinavica**, v. 96, n. 5, p. 379-394, 1988.

GUNDERSEN, H.; JENSEN, E.; KIÊU, K.; NIELSEN J. The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. **Journal of microscopy**, v. 193, Pt 3, p. 199-211, 1999.

HATA, F.; TAKEUCHI, T.; NISHIO, H.; FUJITA, A. Mediators and intracellular mechanisms of NANC relaxation of smooth muscle in the gastrointestinal tract. **Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanshi**, v. 36, n. 6, p. 181-204, 2000.

HEBEISS, K.; KILBINGER, H. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase inhibits acetylcholine release and excitatory motor transmission in the guinea-pig ileum. **Neuroscience**, v. 82, n. 2, p. 623-629, 1998.

HEINICKE, E.; KIERNAN, J.; WIJSMAN, J. Specific, selective, and complete staining of neurons of the myenteric plexus, using cuprolinic blue. **Journal of neuroscience methods**, v. 21, n. 1, p. 45-54, 1987.

HILL, C.; NGU, M. Development of the extrinsic sympathetic innervation to the enteric neurones of the rat small intestine. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 19, n. 2, p. 85-93, 1987.

HOLST, M.; POWLEY, T. Cuprolinic blue (quinolinic phthalocyanine) counterstaining of enteric neurons for peroxidase immunocytochemistry. **Journal of neuroscience methods**, v. 62, n. 1-2, p. 121-127, 1995.

HOPE, B.; MICHAEL, G.; KNIGGE, K.; VINCENT, S. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 7, p. 2811-2814, 1991.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased stereology:** three-dimensional measurement in microscopy**.** Oxford: Bios Scientific Publishers, 1998. 246 p.

ILAR. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Washington, DC: The National Academy Press, 1996. 140 p.

JENSEN, J. **Sensoriamento Remoto do Ambiente**. São José dos Campos: Parêntese Editora, 2009. 598 p.

JOHNSON, R.; SCHEMANN, M.; SANTER, R.; COWEN, T. The effects of age on the overall population and on sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine. **Journal of anatomy**, v. 192, Pt 4, p. 479-488, 1998.

JONES, D. The origin of the vagi and the parasympathetic ganglion cells of the viscera of the chick. **The anatomical record**, v. 82, n. 2, p. 185-197, 1942.

KANADA, A.; HATA, F.; SUTHAMNATPONG, N.; MAEHARA, T.; ISHII, T.; TAKEUCHI, T.; YAGASAKI, O. Key roles of nitric oxide and cyclic GMP in nonadrenergic and noncholinergic inhibition in rat ileum. **European journal of pharmacology**, v. 216, n. 2, p. 287-292, 1992.

KAPUR, R. Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: experimental support for an evolutionarily conserved model. **Developmental biology**, v. 227, n. 1, p. 146-155, 2000.

KAPUR, R.; GERSHON, M.; MILLA, P.; PACHNIS, V. The influence of Hox genes and three intercellular signalling pathways on enteric neuromuscular development. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 16, p. 8-13, 2004. Supplement 1.

KARAOSMANOGLU, T.; AYGUN, B.; WADE, P.; GERSHON, M. Regional differences in the number of neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine and colon: an evaluation of markers used to count neurons. **The Anatomical record**, v. 244, n. 4, p. 470-480, 1996.

KARNOVSKY, M.; ROOTS, L. A "DIRECT-COLORING" THIOCHOLINE METHOD FOR CHOLINESTERASES. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 12, n., p. 219-221, 1964.

KOMAREK, V. Gross anatomy. In: KRINKE, G. (Ed.). **The laboratoy rat**. London: Academic Press, 2000, p. 273-276.

KUNTZ, A. The development of the sympathetic nervous system in mammals. **Journal of Comparative Neurology**, v. 20, n. 3, p. 211-258, 1910.

KUNZE, W.; FURNESS, J. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. **Annu Rev Physiol**, v. 61, p. 117-142, 1999.

LANGLEY, J. **The autonomic nervous system, Part I**. Cambridge: W. Heffer, 1921.

LARSEN, J. Stereology of nerve cross sections. **Journal of neuroscience methods**, v. 85, n. 1, p. 107-118, 1998.

LE DOUARIN, N.; TEILLET, M. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 30, n. 1, p. 31-48, 1973.

LE DOUARIN, N.; TEILLET, M. Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. **Developmental biology**, v. 41, n. 1, p. 162-184, 1974.

LOLOVA, I.; ITSEV, D. Postnatal development of the myenteric plexus in cat stomach. **Acta physiologica et pharmacologica Bulgarica**, v. 9, n. 4, p. 74-84, 1983.

LONGLEY, P.; GOODCHILD, M.; MAGUIRE, D.; RHIND, D. **Geographic Information Systems and Science**. Chichester: Wiley, 2005. 536 p.

LLEWELLYN-SMITH, I.; FURNESS, J.; GIBBINS, I.; COSTA, M. Quantitative ultrastructural analysis of enkephalin-, substance P-, and VIP-immunoreactive nerve fibers in the circular muscle of the guinea pig small intestine. **Journal of comparative neurology**, v. 272, n. 1, p. 139-148, 1988.

LLEWELLYN-SMITH, I.; SONG, Z.; COSTA, M.; BREDT, D.; SNYDER, S. Ultrastructural localization of nitric oxide synthase immunoreactivity in guinea-pig enteric neurons. **Brain research**, v. 577, n. 2, p. 337-342, 1992.

MAGGIO, J. Tachykinins. **Annual review of neuroscience**, v. 11, p. 13-28, 1988.

MASSON, P. Carcinoids (Argentaffin-Cell Tumors) and Nerve Hyperplasia of the Appendicular Mucosa. **American journal of pathology**, v. 4, n. 3, p. 181-212.119, 1928.

MATINI, P.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M.; CORTESINI, C.; MAYER, B. Vasoactive intestinal polypeptide and nitric oxide synthase distribution in the enteric plexuses of the human colon: an histochemical study and quantitative analysis. **Histochemistry and cell biology**, v. 103, n. 6, p. 415-423, 1995.

MATINI, P.; MAYER, B.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life. **Cell and tissue research**, v. 288, n. 1, p. 11-23, 1997.

NEWGREEN, D.; YOUNG, H. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 1. **Pediatric and developmental pathology : the official journal of theSociety for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society**, v. 5, n. 3, p. 224-247, 2002.

NOGUEIRA, F. **Modelagem e simulação - Cadeias de Markov**. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora UFJF, 2009**,** 40 p. Apostila.

OSTE, M.; VAN GINNEKEN, C.; VAN HAVER, E.; BJORNVAD, C.; THYMANN, T.; SANGILD, P. The intestinal trophic response to enteral food is reduced in parenterally fed preterm pigs and is associated with more nitrergic neurons. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 11, p. 2657-2663, 2005a.

OSTE, M.; VAN GINNEKEN, C.; VAN HAVER, E.; BJORNVAD, C.; THYMANN, T.; SANGILD, P. The intestinal trophic response to enteral food is reduced in parenterally fed preterm pigs and is associated with more nitrergic neurons. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 11, p. 2657-2663, 2005b.

PALMER, R.; FERRIGE, A.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.

PARAN, T.; ROLLE, U.; PURI, P. Enteric nervous system and developmental abnormalities in childhood. **Pediatric surgery international**, v. 22, n. 12, p. 945-959, 2006.

PHAM, T.; GERSHON, M.; ROTHMAN, T. Time of origin of neurons in the murine enteric nervous system: sequence in relation to phenotype. **Journal of comparative neurology**, v. 314, n. 4, p. 789-798, 1991.

PHILLIPS, R.; HARGRAVE, S.; RHODES, B.; ZOPF, D.; POWLEY, T. Quantification of neurons in the myenteric plexus: an evaluation of putative pan-neuronal markers. **Journal of neuroscience methods**, v. 133, n. 1-2, p. 99-107, 2004.

PHILLIPS, R.; POWLEY, T. Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 136, n. 1-2, p. 1-19, 2007.

QUEIROZ, R.; RODRIGUES, A.; GÓMEZ, A. Estudo Comparativo entre as Técnicas Máxima Verossimilhança Gaussiana e Redes Neurais na Classificação de Imagens IR-MSS CBERS 1. In: WORKCOMP-Sul., 2004, São Leopoldo. **Anais…** p. 8.

ROMAN, V.; KRECSMARIK, M.; BAGYANSZKI, M.; FEKETE, E. Evaluation of the total number of myenteric neurons in the developing chicken gut using cuprolinic blue histochemical staining and neurofilament immunocytochemistry. **Histochemistry and cell biology**, v. 116, n. 3, p. 241-246, 2001.

ROTHMAN, T.; GERSHON, M. Phenotypic expression in the developing murine enteric nervous system. **Journal of Neuroscience**, v. 2, n. 3, p. 381-393, 1982.

ROTHMAN, T.; NILAVER, G.; GERSHON, M. Colonization of the developing murine enteric nervous system and subsequent phenotypic expression by the precursors of peptidergic neurons. **Journal of comparative neurology**, v. 225, n. 1, p. 13-23, 1984.

ROZÉ, C. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. **Reproduction, nutrition, development**, v. 20, n. 4B, p. 1125-1141, 1980.

SAFFREY, M.; BURNSTOCK, G. Growth factors and the development and plasticity of the enteric nervous system. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 49, n. 3, p. 183-196, 1994.

SANDERS, K.; WARD, S. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. **American Journal of Physiology**, v. 262, n. 3 Pt 1, p. G379-392, 1992.

SANTOS, R. **Cadeias de Markov.** Belo Horizonte: Departamento de Matemática (ICEx) da Universidade Federal de Minas Gerais, 2006**.** 7 p. Apostila.

SCHÄFER, K.; HÄNSGEN, A.; MESTRES, P. Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. **The Anatomical record**, v. 256, n. 1, p. 20-28, 1999.

SCHERER-SINGLER, U.; VINCENT, S.; KIMURA, H.; MCGEER, E. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. **Journal of neuroscience methods**, v. 9, n. 3, p. 229-234, 1983.

SCHUSSER, G.; WHITE, N. Morphologic and quantitative evaluation of the myenteric plexuses and neurons in the large colon of horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, n. 7, p. 928-934, 1997.

SHUTTLEWORTH, C.; MURPHY, R.; FURNESS, J.; POMPOLO, S. Comparison of the presence and actions of substance P and neurokinin A in guinea-pig taenia coli. **Neuropeptides**, v. 19, n. 1, p. 23-34, 1991.

SMITH, T.; FURNESS, J. Reflex changes in circular muscle activity elicited by stroking the mucosa: an electrophysiological analysis in the isolated guinea-pig ileum. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 25, n. 2-3, p. 205-218, 1988.

SMITS, G.; LEFEBVRE, R. Development of cholinergic and inhibitory non-adrenergic non-cholinergic responses in the rat gastric funds. **British journal of pharmacology**, v. 118, n. 8, p. 1987-1994, 1996.

SRI PARAN, T.; ROLLE, U.; PURI, P. Age-related changes in the myenteric plexus of the porcine bowel. **Journal of pediatric surgery**, v. 44, n. 9, p. 1771-1777, 2009.

SRI PARAN, T.; ROLLE, U.; PURI, P. Postnatal changes in enteric plexus axonal thickness. **Pediatric surgery international**, v. 24, n. 12, p. 1365-1367, 2008.

STARK, M.; BAUER, A.; SARR, M.; SZURSZEWSKI, J. Nitric oxide mediates inhibitory nerve input in human and canine jejunum. **Gastroenterology**, v. 104, n. 2, p. 398-409, 1993.

TAKEUCHI, T.; FUJINAMI, K.; GOTO, H.; FUJITA, A.; TAKETO, M.; MANABE, T.; MATSUI, M.; HATA, F. Roles of M2 and M4 muscarinic receptors in regulating acetylcholine release from myenteric neurons of mouse ileum. **Journal of neurophysiology**, v. 93, n. 5, p. 2841-2848, 2005.

TERNI, T. Sulla correlazione fra ampiezza del territorio di innervazione e grandezza delle cellule gangliari. 2. Richerche sui gangli spinali che innervano la coda rigenerata, nei Sauri (Gongylus ocellatus). **Archivio italiano di anatomia e di embriologia. Italian journal of anatomy and embryology**, v. 17, n. 1, p. 507-543., 1920.

TIMMERMANS, J.; ADRIAENSEN, D.; LEFEBVRE, R. Postnatal development of nitrergic neurons in the myenteric plexus of rat stomach. **Histochemistry and cell biology**, v. 111, n. 6, p. 429-434, 1999.

TIMMERMANS, J.; BARBIERS, M.; SCHEUERMANN, D.; BOGERS, J.; ADRIAENSEN, D.; FEKETE, E.; MAYER, B.; VAN MARCK, E.; DE GROODT-LASSEEL, M. Nitric oxide synthase immunoreactivity in the enteric nervous system of the developing human digestive tract. **Cell and tissue research**, v. 275, n. 2, p. 235-245, 1994.

VAN CAMPENHOUT, E. [The nervous system of the mucosa of the human ileocecal appendix]. **Revue canadienne de biologie / éditée par l'Université de Montréal**, v. 26, n. 2, p. 95-107, 1967.

VAN GINNEKEN, C.; VAN MEIR, F.; SOMMEREYNS, G.; SYS, S.; WEYNS, A. Nitric oxide synthase expression in enteric neurons during development in the pig duodenum. **Anatomy and embryology**, v. 198, n. 5, p. 399-408, 1998a.

VAN GINNEKEN, C.; VAN MEIR, F.; SOMMEREYNS, G.; SYS, S.; WEYNS, A. Nitric oxide synthase expression in enteric neurons during development in the pig duodenum. **Anatomy and embryology**, v. 198, n. 5, p. 399-408, 1998b.

VAN GINNEKEN, C.; VAN MEIR, F.; SYS, S.; WEYNS, A. Developmental changes in heme-oxygenase-2 and bNOS expression in enteric neurons in the pig duodenum. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 91, n. 1-2, p. 16-25, 2001a.

VAN GINNEKEN, C.; VAN MEIR, F.; SYS, S.; WEYNS, A. Stereologic description of the changing expression of constitutive nitric oxide synthase and heme oxygenase in the enteric plexuses of the pig small intestine during development. **Journal of comparative neurology**, v. 437, n. 1, p. 118-128, 2001b.

VAN HAVER, E.; DE VOOGHT, L.; OSTE, M.; SANGILD, P.; THYMANN, T.; WEYNS, A.; VAN GINNEKEN, C. Postnatal and diet-dependent increases in enteric glial cells and VIP-containing neurones in preterm pigs. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society** v. 20, n. 9, p. 1070-1079, 2008.

VAN VRÉ, E.; VAN BEUSEKOM, H.; VRINTS, C.; BOSMANS, J.; BULT, H.; VAN DER GIESSEN, W. Stereology: a simplified and more time-efficient method than planimetry for the quantitative analysis of vascular structures in different models of intimal thickening. **Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology**, v. 16, n. 1, p. 43-50, 2007.

VANNUCCHI, M.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. Differentiation of cholinergic cells in the rat gut during pre- and postnatal life. **Neuroscience letters**, v. 206, n. 2-3, p. 105-108, 1996.

VOYVODIC, J. Development and ongoing regulation of synaptic connections and neuronal morphology in autonomic ganglia. In: HENDRY, I E HILL, C. (Ed.). **Development, regeneration and plasticity of the autonomic nervous system**. Bélgica: Harwood, 1992. p. 383-413.

WANG, F.; POWLEY, T. Topographic inventories of vagal afferents in gastrointestinal muscle. **Journal of comparative neurology**, v. 421, n. 3, p. 302-324, 2000.

WARD, S.; TORIHASHI, S. Morphological changes during ontogeny of the canine proximal colon. **Cell and tissue research**, v. 282, n. 1, p. 93-108, 1995.

WESTER, T.; O'BRIAIN, D.; PURI, P. Notable postnatal alterations in the myenteric plexus of normal human bowel. **Gut**, v. 44, n. 5, p. 666-674, 1999.

YNTEMA, C.; HAMMOND, W. The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. **Journal of comparative neurology**, v. 101, n. 2, p. 515-541, 1954.

YOUNG, H.; HEARN, C.; NEWGREEN, D. Embryology and development of the enteric nervous system. **Gut**, v. 47, n., p. iv12-14, 2000. Supplement 4.

ZIMMERMAN, R.; GATES, T.; MANTYH, C.; VIGNA, S.; BOEHMER, C.; MANTYH, P. Vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in the canine gastrointestinal tract. **Peptides**, v. 9, n. 6, p. 1241-1253, 1988.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Protocolos para a preparação de soluções

Tampão fosfato (PBS) 0,1 M pH7,4

Cloreto de sódio (NaCl)	8,17 g
Fosfato de sódio monobásico monoidratado ($NaH_2PO_4H_20$)	0,36 g
Fosfato de sódio dibásico disódico ($NaH_2PO_47H_20$)	1,95 g
Água destilada	1.000 ml

Solução de Krebs pH 7,3

Bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$)	1,3 g
Cloreto de magnésio ($MgCl_26H_20$)	0,24 g
Cloreto de potássio (KCl)	0,44 g
Fosfato de sódio (NaH_2PO_4)	0,165 g
Cloreto de sódio (NaCl)	7,05 g
Cloreto de cálcio ($CaCl_22H_2O$)	0,367 g
Água destilada	1.000 ml

Tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,6

Ácido acético 0,1 M	52,2 ml
Acetato de sódio trihidratado 0,1 M	947,8 ml

Tampão fosfato potássio (KPBS)

Soluções de estoque:

Solução A. Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) 2,0 M. Estocar a 4ºC.

Solução B. Potássio fosfato dibásico (K_2HPO_4) 2,0 M. Estocar a 4ºC.

Solução 0,1 M:

Solução A	3,6 ml
Solução B	16,4 ml
Cloreto de sódio	8 g
Água destilada	1.000 ml

Fixador Zamboni

Este fixador é uma mistura de tampão fosfato Sorensen, formaldeído 4% e solução saturada de ácido pícrico.

Tampão fosfato Sorensen:

Solução A.

Fosfato de sódio monobásico monoidratado ($NaH_2PO_4H_2O$)	4,68 g
Água destilada	150 ml

Solução B.

Fosfato de sódio bibásico anidro (Na_2HPO_4)	4,26 g
Água destilada	150 ml

Misturar 42 ml de solução A e 108 ml de solução B. Ajustar o pH para 7,2-7,4.

Acrescentar a essa solução 150 ml de formaldeído 4%. Na sequência, misturar 255 da solução obtida com 45 ml de solução saturada de ácido pícrico (2,36 g em 200 ml de agua destilada).

APÊNDICE B. Tabela de números aleatórios

You are looking for a random number R fulfilling 1 ≦ R ≦ 57.

1: Take the first unused digit in the first (unnumbered) blocks- and cross it out! (= 9)

2: In the block with that number read the unused digits in pairs until a pair fulfill the criterion.(= 26)
Cross out all read pairs. If the upper limit of the number you are looking for is => 100 you deal with triplets in stead, etc.

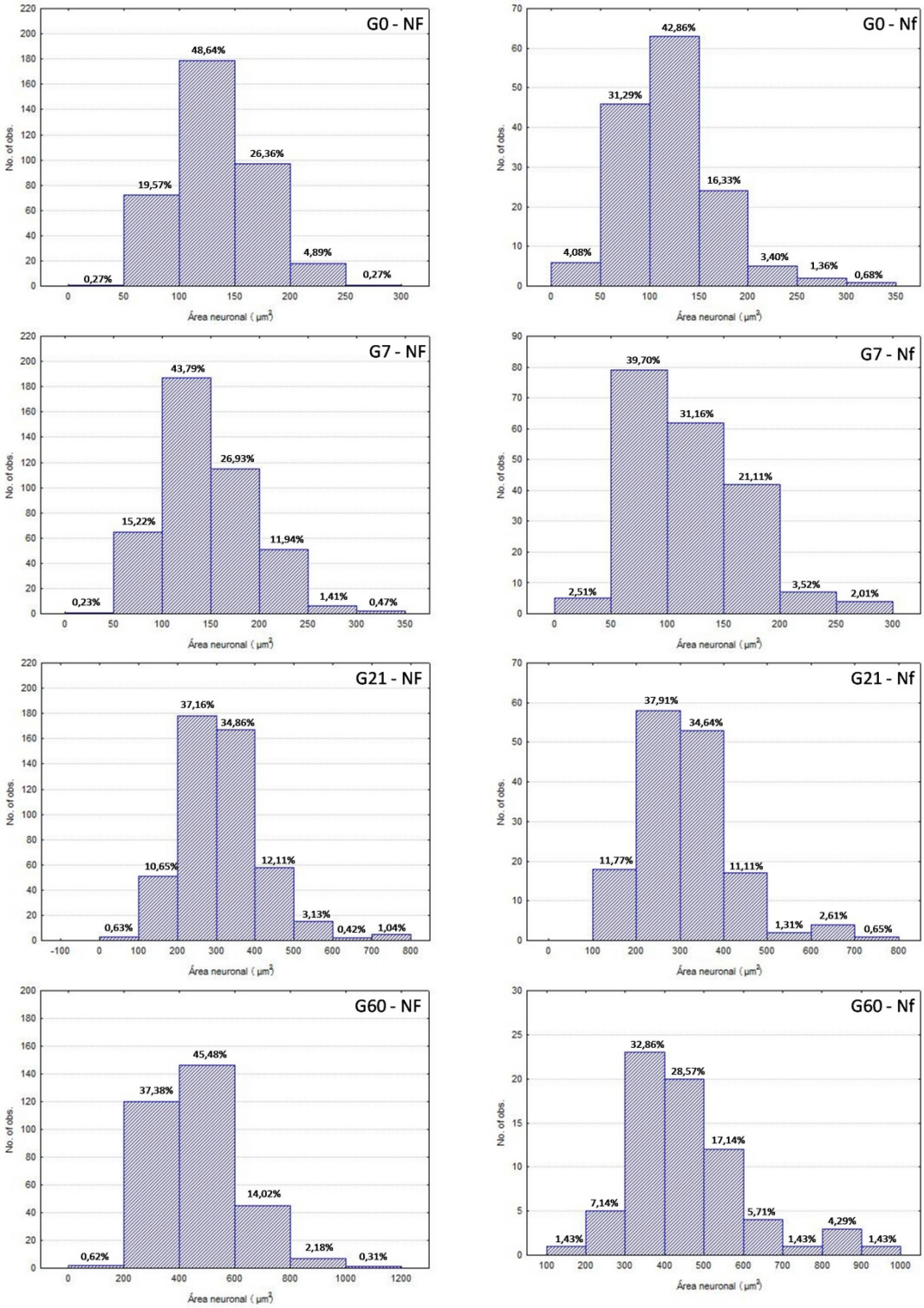
96238	57864	86267	18741	86154	20843	88460	34049	19544	08406	69984	71128	26820	66299	50962																					
92197	57257	73187	46115	87375	79147	20537	06126	92480	97027	56919	88547	94162	42006	99213																					
61709	88182	92769	75518	30878	14979	96907	37411	90717	57662	61757	71249	13402	74318	20992																					
48146	50411	50511	74169	25311	80669	88992	69756	46722	38634	47463	99728	60399	19080	72417																					
76788	84281	58581	64912	62494	31231	78680	98734	92743	03656	14735	78351	13884	25376	60187																					
71903	23541	92400	76799	46790	28464	45486	58338	12464	15486	73835	51776	69946	66875	31598																					
46747	19860	76129	28675	04242	20735	75829	71060	91605	49167	81559	47202	76952	50065	89540																					
61030	46122	54941	05673	49516	98035	28575	08455	93825	87791	76192	56686	08612	39886	33050																					
74544	92903	58427	62643	74966	08777	53680	45747	87442	87355	27209	09827	93610	51745	97527																					
23485	18424	65084	01922	05709	77900	09996	77753	49227	30136	58254	71090	25837	70906	62841																					

Random Numbers'

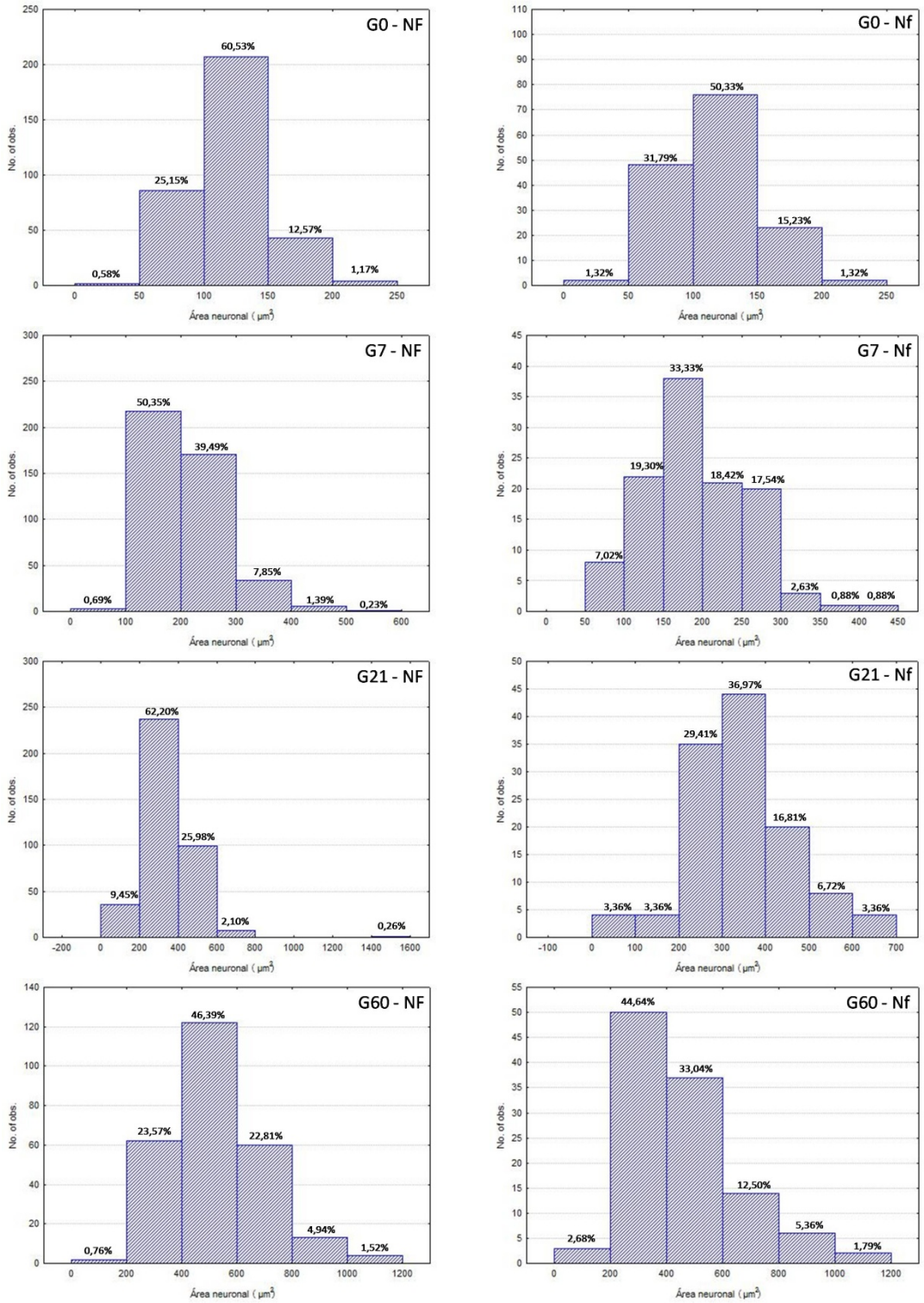
72137	73850	32733	35321	80647	39713	61060	57865	88049	20557	43375	50914	83628	73935	72502	48174	62551	96122	22375	96488	46596	51960	02957	56574	18672	02994	39960	02489	53079	72789	22562	39359	38220	13972	86115	17196	24569
04254	60099	50584	10961	57642	19101	30613	01549	96531	83936	45842	78222	88481	44933	12839	20750	47116	58973	99018	22769	52928	66296	15570	31407	54988	78749	16135	82797	31296	93268	10104	95616	82618	85756	51156	74037	12501
48083	50731	81250	57995	41467	29834	08059	22945	72193	36677	82577	16210	76092	87730	90049	02115	37096	20505	91037	69776	09403	50848	71088	31308	35677	49046	10870	72107	11550	61175	33345	56717	07896	74085	59886	03051	78702
16602	26772	89693	92558	38394	84119	68486	17622	30953	78267	31568	58297	88922	50436	86135	42726	54307	29170	13045	65527	30328	72163	65728	81091	52307	78952	60261	11207	73065	48286	57057	49472	95241	84360	13960	95736	43637
29910	55480	47184	79775	09779	08718	45822	17643	63252	00232	98059	07255	90786	95246	15280	61692	45137	17539	31799	64780	78707	57821	28410	64908	30432	78760	36880	02564	96978	62332	77321	92228	53849	26578	39954	86726	91039
77708	83761	89238	86521	82711	79266	47763	26173	36183	65869	64355	91271	49295	98354	28005	69792	01480	51557	70726	35862	73597	94657	72927	46459	61325	50908	25601	30038	78786	65197	65283	18169	72967	53031	47906	99501	27753
90715	65115	12870	89922	24926	44062	94896	97561	96490	35454	51623	98381	11055	32951	28363	16451	67912	66404	76254	75495	07446	66408	19958	65159	11338	39231	72802	70630	87336	16385	32784	38073	87910	89260	66444	15979	83469
79666	48119	38525	82189	34921	49838	47558	92343	47408	99542	44247	12762	54488	74321	36224	95619	16238	25374	13653	25345	47870	55448	14158	83451	58729	42430	42234	04905	83274	22459	75032	93544	10482	34277	40177	01081	57788
53294	49761	76235	55814	29900	03796	73326	94291	10739	36087	32326	52225	72447	77804	57045	27552	72387	34001	83792	66764	84269	35324	35508	49481	56478	30246	41771	61308	98154	61644	12405	45037	68034	98561	46747	30655	41878
44422	78305	76369	20601	39701	80769	17322	78280	42376	64899	62390	68375	42921	28545	33167	85710	11035	40171	04840	69848	52704	71441	50581	65679	37597	17182	60733	11765	09293	70076	40751	95846	80277	92450	60888	18689	45966
12601	54432	65017	91131	50515	97477	80691	31834	32401	11994	97820	06653	27477	61364	22681	02280	53815	47479	44017	37563	19020	09999	08316	32781	89731	52148	09111	64205	77930	32391	69076	13459	59896	78185	60268	03650	36814
65664	73669	24910	25458	23699	86413	19985	49355	24358	02915	81553	92012	50435	73814	96290	86827	81430	45597	82296	28947	19442	94873	36976	30366	65815	66895	27222	17378	59359	00055	66780	54939	78369	04163	77673	73342	78915
18363	66515	23098	22384	87756	66396	63646	50963	99099	62895	09202	48494	95974	33534	94657	71126	71770	16092	03942	90111	39523	74227	51895	39733	29426	76685	93548	87546	07687	47338	12240	32277	23015	54261	95020	77705	81682
00491	53688	72033	68063	86104	90576	04119	65531	30304	39202	82110	82254	03669	03281	11613	36336	98297	48100	71594	52667	01201	85057	93409	81200	21176	78459	18960	85182	02245	11566	52527	62992	55171	85448	12545	75992	08790
02878	83197	94318	47901	85252	91124	32939	75043	40325	53252	18175	09457	83810	46392	02705	85591	33192	65127	80852	42030	51725	60273	84903	84374	31438	36959	83719	40702	79038	68639	63329	93821	58095	62204	69319	00672	96037
79920	22780	43100	83886	26378	66010	00020	80666	66861	17820	50756	80608	35695	72641	26306	76298	32532	22644	96853	18610	91045	72642	42684	32419	12825	58785	84563	62071	17799	96994	41635	52830	19700	98193	37600	70617	58959
97556	54260	42361	12741	56996	48177	85725	36668	45531	85245	12710	60264	74650	92126	08152	32147	17457	56298	48964	64733	54896	95603	17290	91508	95605	82514	32257	15699	02654	83110	44278	95523	12666	87597	23190	26243	36690
79435	52143	12322	12254	04314	98550	58315	78036	24355	85822	44424	88508	66190	74060	93206	92840	44833	81146	64060	62975	92324	88115	77848	38006	45600	02181	79261	49705	31491	25318	52586	72494	66685	05344	71633	68536	18786
93903	78220	09178	33676	58996	78675	11648	96220	54127	24804	24720	66501	74157	42246	41688	72835	87258	89384	11251	34329	88397	78035	06366	37342	62070	74459	62026	13032	14048	16304	11959	78684	72590	47283	45445	35611	98354
04758	50961	90230	72006	24268	77817	10524	60304	79352	31942	85419	93017	28087	78323	77109	56832	78400	24190	37978	85863	52118	65337	13461	18438	16099	57330	05018	92605	10316	07351	78020	86361	30286	06434	50229	09070	44848
53841	28758	93442	42983	25254	96336	16570	89358	36619	72838	10933	99964	13468	17211	48046	51122	92668	96750	11139	06275	37202	05623	23595	79677	59772	37141	63390	48093	02366	05407	08325	52046	87494	95585	25547	53500	45047
07626	78473	17708	59059	33584	52451	11575	55992	83228	38546	49559	71671	53603	24491	57570	00789	32932	67449	05115	45941	71637	80269	83299	89743	94628	26784	17792	09214	53781	90102	25774	92525	32301	25923	76556	13274	39776
40645	27008	16341	05870	42604	79286	08720	13175	89573	38051	39391	92039	71664	40219	97707	93975	66981	19556	24605	52169	35790	19603	31212	34419	34728	47391	93272	09887	34196	98251	62453	37703	70711	37921	54989	17828	60976
82666	14127	94390	07069	39152	10357	94612	56748	75428	28101	38543	54214	48928	32818	51963	87353	15094	29529	87305	01361	99087	72525	34402	50115	09825	54728	37514	24437	01316	04770	06534	17768	36086	05468	41631	95632	78154
60147	99378	58310	34655	48242	58656	30544	01860	08322	70476	44242	54227	28598	64422	29361	20359	48577	05971	92373	22765	89768	36608	49108	92337	79809	81934	06370	18703	90858	55130	40869	88243	37403	42231	17073	49097	54147
61557	43927	11643	65522	76713	95782	34956	67384	47654	64999	11468	74149	81386	94127	67342	38010	92522	57728	39432	27914	83816	00718	94663	39629	27812	28250	44983	33834	54280	67850	96025	96117	00768	14821	69029	25453	48798
71522	16545	68464	62540	76143	06328	94718	58404	84099	73641	52165	54336	89196	40042	37889	06003	58033	59082	94988	62152	00806	20667	81224	24296	39967	60239	89494	34431	44890	59892	79682	20308	82510	53609	13258	89631	80497
05366	66273	49518	25413	20346	22719	18255	47685	78475	67421	83093	77038	55399	67893	89597	85630	68059	35757	49479	63531	65733	03902	29140	05414	62087	65727	54430	52632	94126	95597	48338	67645	44676	14730	22642	21919	21050
72668	62720	08971	97908	15905	86615	97559	68107	10649	30976	66455	90708	08450	50120	17795	55604	51222	17900	55553	02980	60671	23190	47433	86979	45281	69750	96999	42104	34377	63309	82181	00278	28209	95629	75818	09043	48564
51497	78491	83680	08319	51223	19735	72708	82599	28127	29660	30790	65154	19582	20942	81439	83917	90452	64753	99645	19799	45326	86280	74876	51858	03263	10215	87947	09427	32380	43636	58578	07761	28456	46570	11623	50417	37763
66170	68781	91423	86645	02925	51327	41022	76893	29200	82747	97297	74420	18783	93471	89055	56413	77817	10655	52915	68198	54419	65493	88741	89069	10789	00973	30238	46126	85306	37114	22718	50584	92291	56575	24075	43889	40909
23361	60672	52451	03774	06365	94880	70978	57385	70532	46978	87390	53319	90155	03154	20301	47831	86786	11284	49160	79852	72845	68939	06483	40835	16564	75047	22938	13073	32066	43098	75738	94910	15403	89151	73522	18370	90586
53608	59661	70966	24937	56559	98856	19207	41684	20288	19783	82215	35810	39852	43795	21530	96315	55657	76473	08217	46810	01828	48113	60005	87083	90000	22346	89182	27750	63314	87302	49472	24885	79506	60638	07132	00908	92035
24079	01177	02666	35515	24819	73382	50172	23114	28745	12249	35844	63265	26451	06986	08707	99251	06260	74779	96285	31998	89871	81320	05251	25930	37320	11895	16187	03303	40287	52435	23926	92544	54099	31497	03863	22864	72620
50495	87947	20592	91917	59595	55083	43112	94833	72864	58785	53473	06308	56778	30474	57277	23425	27092	47759	18422	56074	74883	93005	77888	64673	19302	54669	21526	07401	30925	46148	20138	33874	56715	38424	38273	11361	15203
93550	48308	20282	92711	74402	51335	64031	41740	69680	69373	73674	97914	77989	47280	71804	74587	70563	77813	50242	60398	25493	56247	46907	25634	84751	76421	42907	95158	27146	37012	43361	03173	97911	71313	44256	66609	42504
16269	03381	09798	89487	33632	47073	92357	38870	73784	95662	83923	90790	49474	11901	30322	80254	99608	17019	17892	76813	28278	93841	13134	25129	55536	19838	21479	48265	01674	47274	56350	37512	14883	99673	62298	33948	32456
32868	72831	55156	90166	91599	09471	79945	42580	86605	97758	08206	54199	41327	01170	21745	71318	07978	35440	26128	10545	44834	89816	52509	85192	32114	83770	90076	70233	76730	25043	16686	54737	57431	01786	20803	69465	37970
80722	21328	19977	82161	29385	62151	48030	05125	70866	72154	86385	39490	57482	32921	33795	43155	30432	48384	85430	51828	23329	74767	85661	54449	76606	02131	93202	25355	93941	84434	22384	13240	93617	51549	28532	57150	77261
67362	87389	09559	98456	70498	40173	80016	81500	48061	25583	74101	87573	01556	89183	64830	16779	35724	82103	61658	20296	33176	16108	98145	27652	76918	41000	46059	72208	90475	10341	39703	83224	37858	61657	04184	15597	29448
83452	92994	85019	57720	36951	03383	34265	65728	89776	04006	06089	84076	12445	47416	83620	59151	97420	23689	74515	55211	44597	28074	92908	22392	38034	83739	32876	98604	75652	95680	51386	48724	76069	94867	93570	20306	31712
51168	41624	94768	53124	95920	04777	82534	76335	21108	42302	79496	21054	80132	67719	72662	58360	57384	65406	63918	17046	81456	81110	94771	13664	07478	80992	58485	18882	13238	59865	55644	05528	94935	58972	43340	94718	97397
83805	28803	63272	65480	08764	16379	72055	61146	82780	89411	53131	57879	39099	42715	24830	60045	23250	39847	46616	17817	91503	59589	22803	18122	17790	00236	93750	20468	92189	66781	06210	18208	13973	57905	66878	55721	67437
59782	50488	77081	10186	86577	28581	26999	96294	20431	30114	23035	30380	76272	60343	57573	42492	47962	21439	54664	97968	63651	64109	13207	68346	42140	00052	04099	48767	23355	42505	34539	51129	48580	59386	62209	29754	77409
09627	26695	79373	09119	79765	99918	01628	47335	17893	53176	07436	14799	78197	48601	97557	83918	20530	61565	69344	71964	30709	25869	68851	65221	69392	35106	36393	27129	17326	86452	69952	68433	72332	62502	76323	38379	07293
20160	50603	71684	34875	60617	77991	66322	27390	73834	73494	21527	93579	20949	85666	25102	64733	93872	72698	87520	43340	50664	80487	41973	98456	51147	51327	26590	94684	58103	96936	71276	30275	22753	46046	67196	65135	54879
04375	15463	49139	17369	71179	77472	96239	18521	67354	41883	58939	36222	43935	36272	47817	90287	91434	86453	84477	03559	80089	83750	36605	85343	26090	28447	33179	69730	09683	08770	50381	43130	88108	64709	15191	68718	38375
67163	48629	25607	27003	09721	70206	10497	83617	39176	45062	63903	33862	14903	38996	60027	41702	78189	28598	12707	91191	19293	91304	37043	82077	42231	31534	54358	52939	26655	72687	26616	09608	59223	74533	64986	49667	78039
49380	42273	93835	32621	60848	67721	69712	33438	85908	58620	50646	47857	96024	58568	67614	44370	40276	85964	71604	05691	97754	28401	62553	98641	48553	35996	08033	91811	70471	81538	20017	19613	81103	37642	41866	96777	08667
56013	02278	53110	33235	62949	53799	51375	42451	76889	68096	80657	91046	95340	70209	23825	46031	45306	64476	31460	61553	47923	38366	81939	61526	27691	13988	21630	00957	50559	91260	72832	89364	14158	71740	91289	61204	91185

0.3

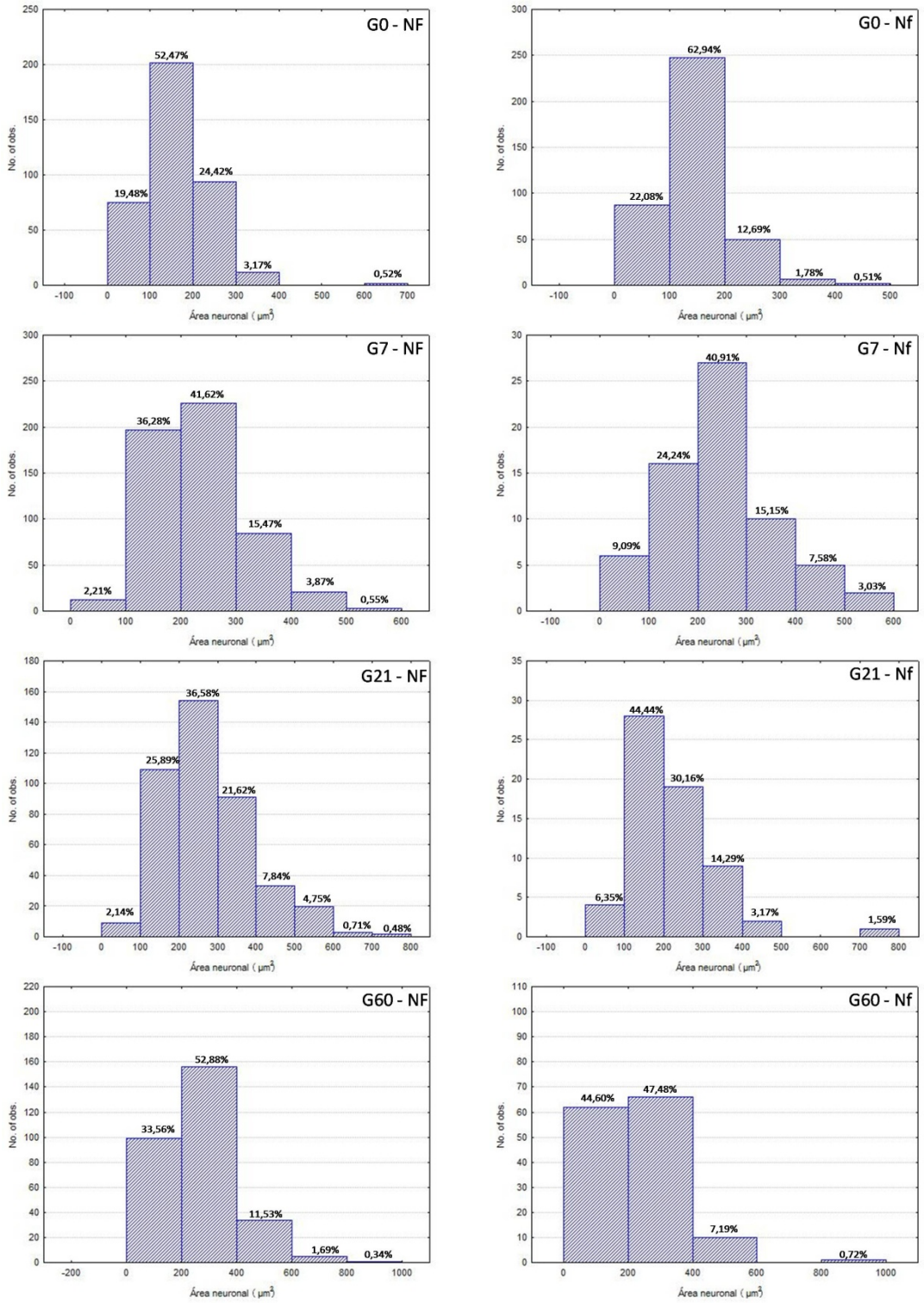
APÊNDICE C. Histogramas da área neuronal do jejuno e do colo para as histoquímicas NADPH-d e AChE



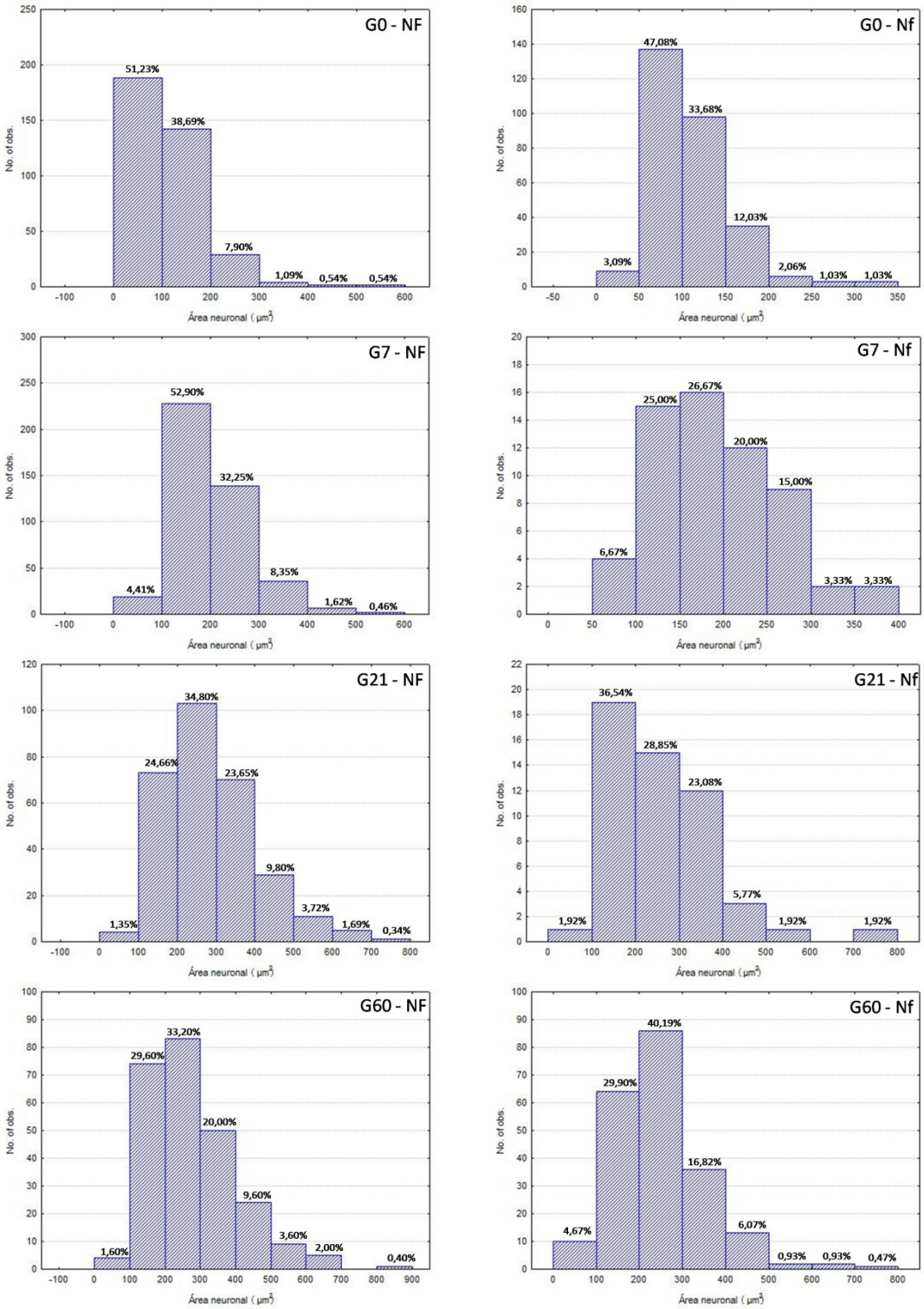
Apêndice C1. Histogramas da área neuronal no jejuno de ratos Wistar corados por meio de histoquímica de NADPH-d. NF – neurônios com coloração forte. Nf – neurônios com coloração fraca.



Apêndice C2. Histogramas da área neuronal no colo de ratos Wistar corados por meio de histoquímica de NADPH-d. NF – neurônios com coloração forte. Nf – neurônios com coloração fraca.



Apêndice C3. Histogramas da área neuronal no jejuno de ratos Wistar corados por meio de histoquímica de AChE. NF – neurônios com coloração forte. Nf – neurônios com coloração fraca.



Apêndice C4. Histogramas da área neuronal no colo de ratos Wistar corados por meio de histoquímica de AChE. NF – neurônios com coloração forte. Nf – neurônios com coloração fraca.