ELIZANGELA DOS ANJOS SILVA

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E QUANTITATIVA DOS
NEURÔNIOS DO PLEXO MIOENTÉRICO NAS DIFERENTES
PORÇÕES DO CECO DE RATOS COM SEIS E DOZE MESES
DE IDADE, SEDENTÁRIOS, E RATOS SUBMETIDOS À
ATIVIDADE FÍSICA REGULAR, COM DOZE MESES**

São Paulo
2006

ELIZANGELA DOS ANJOS SILVA

Avaliação morfológica e quantitativa dos neurônios do plexo mioentérico nas diferentes porções do ceco de ratos com seis e doze meses de idade, sedentários, e ratos submetidos à atividade física regular, com doze meses

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

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Isaura Maria Mesquita Prado

São Paulo
2006

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1796
FMVZ

Silva, Elizangela dos Anjos

Avaliação morfológica e quantitativa dos neurônios do plexo mioentérico nas diferentes porções do ceco de ratos com seis e doze meses de idade, sedentários, e ratos submetidos à atividade física regular, com doze meses / Elizangela dos Anjos Silva. – São Paulo: E. A. Silva, 2006.

83 f. : il.

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

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

Orientador: Profa. Dra. Isaura Maria Mesquita Prado.

1. Neurônios mioentéricos. 2. Ceco. 3. Atividade física (veterinária).
4. Plasticidade neuronal. 5. Ratos Wistar. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Quantificação e mensuração da área do perfil dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos NADH e NADPH-DIAFORASE positivos da porção terminal do íleo e ceco de ratos de meia idade submetidos a programa de atividade física (corrida em esteira)”, protocolo nº774/2005, utilizando 30 (trinta) ratos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Isaura Maria Mesquita Prado, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia 16/08/06.

(We certify that the Research “Quantification and mensuration of the area and neurons myoenterics profile positives NADH and NADPH-DIAPHORASE of the ileum terminal portion and cecum, of middle age rats submited after the program physical activity (treadmill workout)”, protocol number 774/2005, under the responsibility of Profa. Dra. Isaura Maria Mesquita Prado, utilizing 30 (thirty) rats, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting 08/16/2006).

São Paulo, 09 de outubro de 2006

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Elizangela dos Anjos

Título: Avaliação morfológica e quantitativa dos neurônios do plexo mioentérico nas diferentes porções do ceco de ratos com seis e doze meses de idade, sedentários, e ratos submetidos à atividade física regular, com doze meses

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIAS

A **Deus** e a minha **Mãezinha do Céu**,

Sempre estiveram comigo em toda esta caminhada tão difícil, cheia de limitações e ao mesmo tempo cheia de vitórias, mas muito importante como exemplo em minha vida.

Meus pais **José Reis da Silva** e **Iracilda Donizete dos Anjos Silva “Nena”**,

Mesmo distantes, agradeço ao AMOR compartilhado, ajudando-me sempre a enfrentar as dificuldades e ensinando-me a conquistar os objetivos com muita dignidade.

Meus irmãos **“Clau e Suzi”**,

Claudio Reis dos Anjos Silva e sua esposa Selma Felipe Silva, e Suziane dos Anjos Silva e seu esposo José Luiz Valério, e a minha irmãzinha de coração Érica Goularte, pelo apoio participado.

Meus sobrinhos, **Alexander, Igor e Vítor**,

Meus três anjinhos me ensinaram que nas dificuldades o bom mesmo é olhar pra trás e lembrar que um dia eu também fui criança e que com o passar dos anos a gente se torna grande o suficiente pra poder vencer e enfrentar tudo.

Aos meus **avós**,

Germano Moreira dos Anjos (in memoriam) e Regina Aparecida Botura dos Anjos, pelo ensinamento do dom da vida.

AGRADECIMENTOS:

A minha grande Orientadora, **Isaura Maria Mesquita Prado,**

Sempre agiu como uma grande guiadora e muitas vezes como mãe, sabendo a hora e o momento certo de aconselhar, me ensinando ser uma verdadeira pesquisadora; sempre me apoiando em tudo que precisava e a ir atrás dos objetivos e das conquistas.

A Professora **Maria Raquel Marçal Natali,**

Minha querida, sempre dedicada e doce em seus ensinamentos, e um dia ela me disse: Elizangela você é muito preocupada, sai pra tomar umas... mas que destinou grande parte do seu tempo a mim para que este trabalho fosse realizado.

Professoras Isaura e Raquel,

Quando a gente pensa que é bastante forte e que podemos caminhar sozinhos... mero engano! Então surge a inesperada surpresa! Como é bom saber que existem pessoas como vocês, humanas acima de tudo... que se preocuparam comigo a todo o momento no decorrer do desenvolvimento deste trabalho! Seus gestos de atenção e carinho que me proporcionaram momentos de alegria e às vezes de preocupação, para meu próprio crescimento. Vocês são mesmo pessoas muito especiais! Que Deus as conserve sempre assim, preocupadas em doar um pouco do tempo e do amor às pessoas a sua volta, inclusive a mim...

Waldmer Neylson Reccanello Facina, meu “pequeno”,

é uma daquelas pessoas raras, com um objetivo único de dar alegrias às pessoas que lhe cercam. A VOCÊ que me ensinou o verdadeiro sentido daquela velha frase... “No final tudo dá certo”...

Aos pais de **Waldmer**,

Waldemar Facina e Neide Reccanello Facina, que me aconselharam tão bem e acima de tudo isso, atuando como pais na fase final da minha pesquisa.

Aos meus grandes **amigos de Maringá**,

Cesar Augusto Secco e José Antônio de Souza que contribuíram muito, tanto com palavras, quanto com conhecimentos para a elaboração deste trabalho; a Francisco Rodrigues de Camargo Neto, com seu brilhante dom contribuiu e muito na ilustração desta pesquisa.

Aos meus “**irmãos de coração**”,

Os admiro muito, Sílvio Pires Gomes e Josy Alvarenga Cal.

Aos Professores e amigos da **Universidade Estadual de Maringá**,

Sonia Lucy Molinari, Marcílio Hubner de Miranda-Neto, Célia de Godói Gomes, Maria Eurides Carlos Cansino, Maria dos Anjos Moreira Fortunato, Cleonira Sarro, Maria Vilma Moraes de Sarro, Antonio Paulo Merceno, Angela Cristina Benedito Merceno, João Batista Alves de Assis, Liana Ribeiro Zanzarine, Marcelo Vladimir Piloto e Fernando Carlos de Souza que sempre estiveram prontos a me ajudar.

Às meninas,

Naianne Kelly Clebis e Karina Martinez Gagliardo, pela brilhante idéia da instauração de um projeto de pesquisa, que abordou o tema desta dissertação, e pelo material compartilhado.

Agradeço aos **Animais**,

Graças a eles esta pesquisa pode ser realizada.

Aos colegas **Pós-graduandos**,

Ana Paula Vidotti, Claudia Kanashiro, Joel Alves de Souza, Fabiana Matsumoto, Hildebrando Gomes Benedicto, Ana Paula Castelo, que me proporcionaram grandes momentos. Agradeço muito ao Carlos Eduardo Seyfert e Renata de Brito Mari, que modéstia parte sou muito grata pelo grande ensinamento transmitido.

Aos meus **Grandes Amigos**,

Fernando Ladd, Andréia Bogoslavsky, Vivian Samoto, Cristiane V. Wenceslau, Emerson Ticono Fioretto e Ana Rita de Lima, que estiveram sempre prontos a me aconselhar e a me ajudar.

Aos **Professores e Funcionários**,

Maycon Barbosa da Silva e Jaqueline Martins de Santana; Técnicos de Laboratório, Diogo Palermo, Sandra Freiburger Affonso, Ronaldo Agostinho da Silva e Edinaldo Ribas Farias (Índio) e aos Professores, Professor Francisco Javier Hernandez-Blasquez, Professora Maria Angélica Miglino, Professor Romeu Rodrigues de Souza e Professor Antônio Augusto Coppi Maciel Ribeiro da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, pela atenção dada durante todo o desenvolvimento da pesquisa quando precisei.

A **Professora**,

Doutora Maria Angélica Miglino, pelo excelente Programa de Pós-graduação oferecido.

A **Faculdade**,

De Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – USP.

Aos **colegas e amigos**,

Com um simples gesto fizeram parte deste trabalho.

Obrigada a todos!

*“Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso, porque já chorei demais
Hoje me sinto forte, mais feliz quem sabe
Eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei
E nada sei
Conhecer as manhas e as manhãs o sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz pra poder sorrir
É preciso chuva para florir
Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada
Eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou
Estrada eu sou
Todo mundo ama um dia, todo mundo chora
Um dia a gente chega, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
E cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz
Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso, porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história
E cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz”
(Tocando em Frente - Almir Sater/Renato Teixeira)*

RESUMO

SILVA, E. A. **Avaliação morfológica e quantitativa dos neurônios do plexo mioentérico nas diferentes porções do ceco de ratos com seis e doze meses de idade, sedentários, e ratos submetidos à atividade física regular, com doze meses.** [Morphological and quantitative evaluation of the neurônios of the myenteric plexus in the different portions of the cecum of sedentary rat, with six and twelve months of age, and rats undergone to the physical regular activity, with twelve months]. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Estudou-se o arranjo do plexo mioentérico, o número de neurônios e a área do perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios mioentéricos, nas diferentes porções das regiões apical e basal, do ceco de ratos Wistar. Trinta ratos foram, igualmente, distribuídos em grupos de seis (G-6) e doze meses de idade (G-12^S), sedentários, e um grupo com doze meses (G-12^T), que foi submetido a um programa de atividade física de intensidade moderada. Foram montados preparados de membrana que receberam as técnicas histoquímica de NADH-diaforase (NADH-d) e NADPH-diaforase (NADPH-d). O arranjo do plexo mioentérico e o número de neurônios foram avaliados comparativamente entre os três grupos e entre as diferentes porções das regiões do ceco. Os neurônios das regiões apical e basal foram distribuídos em classes com intervalos de $100\mu\text{m}^2$, sendo comparadas às médias da mensuração dos pares, considerando as variáveis de idade e tratamento. Não foram observadas alterações na arquitetura do plexo mioentérico nas diferentes porções do ceco dos animais nos três grupos estudados. O número de neurônios NADH-d positivos foi maior do que o de NADPH-d em todas as porções, de ambas as regiões, de todos os grupos. O grupo G-12^T apresentou maior número de neurônios NADH-d reativos do que os animais sedentários, com a mesma idade, em todas as porções do ceco, excetuando-se a porção próxima à ampola cecal. Os neurônios NADPH-d positivos não diferiram em número entre os grupos G-6 e G-12^T (p-valor < 5%). A área do perfil dos neurônios NADH-d e NADPH-d reativos foi maior na região apical do que na basal em todos os grupos estudados, com exceção dos neurônios NADPH-d dos animais G-12^T. Os neurônios NADH-d reativos são mais afetados pela idade do animal e pelo exercício físico do que os neurônios NADPH-d. Pela primeira vez, o número de neurônios do plexo mioentérico é reportado em porções pré-estabelecidas do ceco de ratos. Nossos resultados reiteram a importância da indicação precisa da porção estudada neste segmento intestinal.

Palavras-chave: Neurônios mioentéricos. Ceco. Atividade física (veterinária). Plasticidade neuronal. Ratos Wistar.

ABSTRACT

SILVA, E. A. Morphological and quantitative evaluation of the neurônios of the myenteric plexus in the different portions of the cecum of sedentary rat, with six and twelve months of age, and rats undergone to the physical regular activity, with twelve months. [Avaliação morfológica e quantitativa dos neurônios do plexo mioentérico nas diferentes porções do ceco de ratos com seis e doze meses de idade, sedentários, e ratos submetidos à atividade física regular, com doze meses]. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The arrangement of the myenteric plexus, the number of neurons, and the area of the profile of neuronal body (μm^2) were studied in the different portions of the apical and basal regions of the cecum of rats. Thirty rats had been, equally, distributed in groups of six (G-6) and twelve months of age (G-12^S), were sedentary, and a group with twelve months (G-12^T), which was submitted to a program of physical activity of moderate intensity. They had been mounted whole mount preparation and were stained with the NADH-diaforase (NADH-d) and NADPH-diaforase (NADPH-d) histochemical techniques. The arrangement of the plexus and the number of neurons had been evaluated comparatively between the three groups, and the different portions of the regions of cecum. The neurons of the regions apical and basal had been distributed in class with intervals of $100\mu\text{m}^2$, and the averages of the measurements of the pairs were compared, considering the different ages and treatments. It was not observed alterations in the architecture of the myoenteric plexus in the portions of cecum, neither in the different studied groups. There was more NADH-d positive neurons than NADPH-d ones, in all the portions, of both the regions, of all the groups. The G-12^T animals presented greater number of reactive NADH-d neurons than the sedentary ones, in all the portions of cecum, excepting the portion near to the cecal ampoule. The number of the positive NADPH-d neurons did not differ between G-6 and G-12^T (p-value < 5%). The cellular profile area of the NADH-d and NADPH-d reactive neurons was bigger in the apical region than in the basal, in all groups, excepted of the NADPH-d neurons of animals G-12^T. The NADH-d reactive neurons were more affected by the age of the animal and the physical exercise than the NADPH-d neurons. For the first time, the number of neurons of the myenteric plexus is reported in preset portions of ceco of rats. Our results reiterate the necessity of indication of the portion studied in this intestinal segment.

key words: Myenteric neurons. Cecum. Physicall activity (veterinary). Neuronal plasticity. Wistar rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fotografia de ratos Wistar realizando atividade física (corrida em esteira).....	41
Figura 2 -	Desenho esquemático do ceco, íleo (I) e colon ascendente adjacentes (C), na sua face ventral 2(a), indicando as diferentes regiões e porções estudadas; 2b. Regiões apical e basal; 2c. Porções do ceco: AM (apical mesentérica); AI (apical intermediária); AA (apical antimesentérica); PA (próxima à ampola cecal); BI (basal intermediária), e BA (basal antimesentérica).....	45
Figura 3 -	Demonstração da mensuração da área do perfil do corpo celular de um neurônio NADPH-diaforase positivo, a partir do programa Image Pro Plus.....	46
Quadro 1 -	Comparações do número de neurônios reativos às diferentes técnicas histoquímicas, realizadas nas diferentes porções da região apical do ceco.....	47
Quadro 2 -	Comparações do número de neurônios reativos às diferentes técnicas histoquímicas, realizadas nas diferentes porções da região basal do ceco.....	48
Quadro 3 -	Comparações múltiplas, do número de neurônios reativos às diferentes técnicas histoquímicas, entre as várias porções da região apical do ceco dos diferentes grupos.....	48
Quadro 4 -	Comparações múltiplas, do número de neurônios reativos às diferentes técnicas histoquímicas, entre as várias porções da região basal do ceco dos diferentes grupos.....	48
Quadro 5 -	Comparações do número total de neurônios reativos às diferentes técnicas histoquímicas, realizadas entre as regiões apical e basal do ceco.....	48
Quadro 6 -	Comparações múltiplas, do número total de neurônios reativos às diferentes técnicas histoquímicas, entre as regiões apical e basal do ceco nos diferentes grupos.....	49
Figura 4 -	Animais sedentários (G-12 ^S) e treinado(G-12 ^T) segundo a média da velocidade máxima (Km/h), obtida nos sete testes de esforço máximo. São Paulo, SP, 2006. *letras iguais indicam que não houve diferença significativa (P>0,05) entre os grupos.....	50
Figura 5 -	Micrografia do ceco de rato, com 12 meses de idade, treinado (G-12 ^T), evidenciando neurônios NADH-d reativos na região apical, localizados em gânglios (seta escura) e isolados (seta clara). (Aumento original: 100X).....	52
Figura 6 -	Micrografia do ceco de rato, com 6 meses de idade (G-6), evidenciando feixes de fibras nervosas de diferentes espessuras – primários (seta clara); secundários (seta escura) e terciários (ponta de seta), na porção intermediária da região basal do ceco. Técnica: NADPH-d (Aumento original: 40X).....	52
Figura 7 -	Micrografia do ceco de rato, com 6 meses de idade (G-6), evidenciando as diferentes conformações das malhas de feixes nervosos, na porção próxima à ampola cecal. Técnica NADH-d. (Aumento original: 20X).....	53

- Figura 8 - Micrografia da região apical do ceco de rato, 12 meses de idade (G-12^S), evidenciando neurônios NADH-d reativos, predominantemente, em forma gota, no trajeto dos feixes de fibras nervosas. Note a disposição dos núcleos das células. (Aumento original: 100X).....54
- Figura 9 - Micrografia do ceco de rato com 6 meses de idade (G-6). Note espessos feixes de fibras nervosas na porção próxima à ampola cecal. Técnica: NADPH-d (Aumento original: 40X)55
- Figura 10 - Micrografia do ceco de ratos demonstrando diferentes formas de neurônios NADPH-d reativos. 10a. região apical de animal do grupo G-12^S - neurônio alongado, com núcleo disposto perifericamente; 10b. região basal de G-6 - neurônio estrelado (seta) e em forma de gota (ponta de seta). (Aumento original: 400X) 55
- Quadro 7 - Análise comparativa do número de neurônios NADH-d reativos, entre as diferentes regiões e porções do ceco, segundo teste de Friedman, nos animais do grupo G-6 (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006.....57
- Quadro 8 - Análise comparativa do número de neurônios NADH-d reativos, entre as diferentes regiões e porções do ceco, segundo teste de Friedman, nos animais do grupo G-12^S (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006.....57
- Quadro 9 - Análise comparativa do número de neurônios NADH-d reativos, entre as diferentes regiões e porções do ceco, segundo teste de Friedman, nos animais do grupo G-12^T (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006.....58
- Quadro 10 - Comparação do número de neurônios NADH-d reativos, segundo teste de Friedman, nas diferentes regiões e porções do ceco, entre os animais dos grupos G-6 e G-12^S (a) e G-6 e G-12^T (b) (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo – 2006..... 58
- Quadro 11 - Comparação do número de neurônios NADH-d reativos, segundo teste de Friedman, nas diferentes regiões e porções do ceco, entre os animais dos grupos G-12^S e G-12^T (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006.....59
- Quadro 12 - Análise comparativa do número de neurônios NADPH-d reativos, entre as diferentes regiões e porções do ceco, segundo teste de Friedman, nos animais do grupo G-6 (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006.....60
- Quadro 13 - Análise comparativa do número de neurônios NADPH-d reativos, entre as diferentes regiões e porções do ceco, segundo teste de Friedman, nos animais do grupo G-12^S (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006.....61
- Quadro 14 - Análise comparativa do número de neurônios NADPH-d reativos, entre as diferentes regiões e porções do ceco, segundo teste de Friedman, nos animais do grupo G-12^T (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006.....61

Quadro 15 - Comparação do número de neurônios NADPH-d reativos, segundo teste de Friedman, nas diferentes regiões e porções do ceco, entre os animais dos grupos G-6 e G-12 ^S (a) e G-6 e G-12 ^T (b) (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo -2006.....	61
Quadro 16 - Comparação do número de neurônios NADPH-d reativos, segundo teste de Friedman, nas diferentes regiões e porções do ceco, entre os animais dos grupos G-12 ^S e G-12 ^T (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006.....	62
Figura 11 - Histograma representativo da frequência de distribuição dos neurônios NADH-diaforase reativos da região apical do ceco, dos grupos controle e experimental, em classes de 100 μm^2 de área - São Paulo - 2006.....	64
Figura 12 - Histograma representativo da frequência de distribuição dos neurônios NADH-diaforase reativos da região basal do ceco, dos grupos controle e experimental, em classes de 100 μm^2 de área - São Paulo - 2006.....	64
Figura 13 - Histograma representativo da frequência de distribuição dos neurônios NADPH-diaforase reativos da região apical do ceco, dos grupos controle e experimental, em classes de 100 μm^2 de área - São Paulo - 2006.....	65
Figura 14 - Histograma representativo da frequência de distribuição dos neurônios NADPH-diaforase reativos da região basal do ceco, dos grupos controle e experimental, em classes de 100 μm^2 de área - São Paulo - 2006.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ratos dos grupos G-6, sedentários (G-12 ^S) e treinados (G-12 ^T), segundo as médias de peso corporal (em gramas) obtidas nas aferições mensais - São Paulo - 2006.....	51
Tabela 2 - Ratos Wistar com seis meses de idade (G-6), segundo o número de neurônios NADH-d, nas diferentes porções do ceco - São Paulo - 2006.....	56
Tabela 3 - Ratos Wistar com 12 meses de idade, sedentários (G-12 ^S), segundo o número de neurônios NADH-d, nas diferentes porções do ceco - São Paulo - 2006.....	57
Tabela 4 - Ratos Wistar com 12 meses de idade, treinados (G-12 ^T), segundo o número de neurônios NADH-d, nas diferentes porções do ceco - São Paulo - 2006.....	58
Tabela 5 - Ratos Wistar com seis meses de idade (G-6), segundo o número de neurônios NADPH-d reativos, nas diferentes porções do ceco - São Paulo - 2006.....	59
Tabela 6 - Ratos Wistar com 12 meses de idade, sedentários (G-12 ^S), segundo o número de neurônios NADPH-d reativos, nas diferentes porções do ceco - São Paulo - 2006.....	60
Tabela 7 - Ratos Wistar com 12 meses de idade, treinados (G-12 ^T), segundo o número de neurônios NADPH-d reativos, nas diferentes porções do ceco - São Paulo - 2006.....	60
Tabela 8 - Valores mínimo e máximo da área do perfil de neurônios NADH-diaforase reativos (em micrômetros quadrados) nas regiões apical e basal do ceco de ratos Wistar, nos grupos G-6, G-12 ^S e G-12 ^T - São Paulo - 2006.....	62
Tabela 9 - Valores mínimo e máximo da área do perfil de neurônios NADPH-diaforase reativos (em micrômetros quadrados) nas regiões apical e basal do ceco de ratos Wistar, nos grupos G-6, G-12 ^S e G-12 ^T - São Paulo - 2006.....	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1 ATIVIDADE FÍSICA.....	25
3.2 ARRANJO DO PLEXO MIOENTÉRICO.....	26
3.3 NÚMERO DE NEURÔNIOS.....	30
3.4 ÁREA DO PERFIL NEURONAL.....	35
4 MATERIAL E MÉTODO.....	40
4.1 MATERIAL.....	40
4.2 MÉTODO.....	40
4.2.1 Manejo.....	40
4.2.2 Protocolo de atividade física para G-12 ^S	42
4.2.3 Protocolo de atividade física para G-12 ^T	42
4.2.4 Coleta de material.....	42
4.2.5 Técnicas Histoquímicas.....	43
<i>4.2.5.1 Técnica histoquímica de NADH-diaforase (GABELLA, 1969).....</i>	<i>43</i>
<i>4.2.5.2 Técnica histoquímica de NADPH-diaforase (SCHERER-SINGLER et al., 1983)..</i>	<i>43</i>
4.2.6 Obtenção dos preparados de membrana.....	44
4.2.7 Análise quantitativa.....	44
4.2.8 Análise morfométrica.....	46
4.2.9 Análise estatística.....	47
5 RESULTADOS.....	50
5.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	50
5.2 PESAGEM.....	50
5.3 ARRANJO DO PLEXO MIOENTÉRICO.....	51
5.3.1 Neurônios NADH-d reativos.....	53
5.3.2 Neurônios NADPH-d reativos.....	54
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS.....	56
5.4.1 Neurônios NADH-diaforase reativos.....	56
5.4.2 Neurônios NADPH-diaforase reativos.....	59

5.5 MENSURAÇÃO NEURONAL.....	62
6 DISCUSSÃO.....	67
6.1 QUANTIFICAÇÃO NEURONAL.....	68
6.1.1 Quantificação de neurônios NADH-diaforase positivos reativos.....	69
6.1.2 Quantificação de neurônios NADPH-diaforase positivos reativos.....	71
6.2 ÁREA DO PERFIL NEURONAL.....	72
7 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

Os diferentes segmentos do TGI (trato gastrointestinal) têm funções específicas, sendo basicamente, o intestino delgado responsável pelos processos de digestão e absorção e o intestino grosso pela absorção de sais, água, secreção e por comportar uma importante flora microbiana. Estas duas divisões do intestino têm características morfológicas e microbióticas próprias que devem ser mantidas para a homeostase do organismo (GUYTON; HALL, 1997). Fazendo parte do intestino grosso (BANKS, 1991), o ceco de ratos tem função da digestão da celulose (RERAT, 1978) e fermentação bacteriana (BRUNS; HOOD; SEELEY, 1977). Além disso, este órgão tem sido indicado como responsável pela absorção de importantes eletrólitos, como: cálcio (PETITH; SCHEDL, 1976); vitamina K (HOLLANDER; TRUSCOTT, 1974); magnésio (RAYSSIGUIER; REMESY, 1977), além da absorção de água e eletrólitos (DONOWITZ; BINDER, 1979) e utilização de ácidos graxos voláteis (BOND; LEVITT, 1976). Admite-se, ainda, que 20% dos carboidratos e proteínas não digeridas no intestino delgado, possam ser digeridas pela flora microbiana do ceco (RERAT, 1978). A manutenção da atividade motora destes órgãos é fundamental, permitindo o adequado tempo para que ocorram os processos de digestão e absorção (SNIPES, 1981).

O controle neural da função do TGI é predominantemente mediado por neurônios entéricos, que se localizam em pequenos gânglios, ligados por feixes de fibras nervosas, formando uma rede, presente ao longo do comprimento de todo o TGI (FURNESS; COSTA, 1987). Estes neurônios estão agrupados no chamado “sistema nervoso entérico” (SNE), estrutura altamente complexa que envolve citoarquitetura, código químico e circuitos neuronais similares aqueles do sistema nervoso central (SNC) (FURNESS; COSTA, 1987), que é responsável, em última instância, pelo controle das diversas funções do trato gastrointestinal (TGI), tais como secreção (COOKE, 2000; HANSEN; SKADHAUGE, 1995), transporte de água e íons, fluxo sanguíneo intestinal (HANSEN; DRESNER; WAIT, 1998; STERNINI, 1988), motilidade (FURNESS; COSTA, 1987; HANSEN, 2003b; KNUTSON et al., 1995) e ainda atua no sistema imune intestinal (FRIELING; WEBER; SCHEMANN, 2000; SHANAHAN, 1998). Esses neurônios não estão distribuídos uniformemente pelo TGI. De fato, apresentam distribuição diversa entre distintos segmentos e mesmo num mesmo segmento intestinal.

Os neurônios do SNE são extremamente plásticos, ou seja, eles passam por alterações morfológicas e numéricas na dependência de uma série de fatores, como, por exemplo: estado nutricional e higidez do indivíduo; idade; nível de atividade física, etc.

O ceco é um importante segmento intestinal, particularmente para animais herbívoros. Em roedores está envolvido no processo de quebra de celulose e na absorção parcial dos produtos da digestão (OLDS; OLDS, 1991; RÉRAT, 1978). A particular conformação e atividade deste segmento faz com que apresente uma atividade motora distinta entre suas diferentes regiões (ROGER; CABANIE; FERRE, 1991), o que é, possivelmente, acompanhado por distinta morfologia (SEYFERT, 2003).

Aproximadamente 16-21% da população em países desenvolvidos e 8-10% em países em desenvolvimento, estão com idade acima dos 60 anos. O grande aumento no número de pessoas idosas é prognosticado com base na menor taxa de mortalidade infantil e, especialmente, no aumento da longevidade, resultado dos avanços científicos nas áreas da Saúde. O envelhecimento em humanos, entretanto, varia individualmente e dependente de considerações sócio-econômicas e estilo de vida, como também fatores genéticos (GOLDSPINK, 2005).

O envelhecimento é um complexo processo biológico que induz as mudanças estruturais e funcionais (SMITS; LEFEBVRE, 1996). As pessoas tornam-se menos ativas, isto direciona ainda mais o indivíduo a um estilo de vida totalmente sedentário, levando este paciente a ter mudanças corporais intrínsecas (REILLY; WATERHOUSE; ATKINSON, 1997). O envelhecimento manifesta-se por declínio das funções dos diversos órgãos que, caracteristicamente, tende a ser linear em função do tempo (PAPALÉO-NETTO, 1996).

Mudanças eletrofisiológicas e metabólicas são apontadas, como o declínio na velocidade de condução do impulso nervoso, na percepção sensorial e na resposta autonômica (HALL, 2002). As alterações clínicas decorrentes com o aumento da idade no sistema nervoso autônomo (SNA) podem ser exemplificadas com os distúrbios na motilidade no sistema digestório (EL-SALHY; SANDSTRÖM; HOLMLUND, 1999; GEBOES; BOSSAERT, 1977; SANTER; BAKER, 1993). Alterações no tamanho e número de neurônios do sistema nervoso entérico (SNE) de diferentes espécies têm sido indicadas (ALIAN; GABELLA, 1996; BAKER; SANTER, 1988; CARVALHO FILHO; ALENCAR, 2000; JOHNSON et al., 1998; SANTER; BAKER, 1988; TIMMERMANS; ADRIAENSEN; LEFEBVRE, 1999; ZANONI et al., 1997).

Recentes estudos têm demonstrado que a atividade física reduz significativamente o esvaziamento gástrico durante o exercício intenso (acima de 70% do VO_2 máx); e que tipos diferentes de exercícios podem afetar diferentemente a velocidade de esvaziamento gástrico, como em corridas de longa distância ou triatlo (WILMORE; COSTILL, 2001). Embora controverso, a prática de exercício físico tem sido recomendada profilaticamente para os casos de constipação crônica (BLANKE; LANDECK; MEYER, 2001; SIMMONS; SCHNELLE, 2004; SIMREN, 2002).

Apesar dos inúmeros trabalhos sobre a morfologia e a quantificação dos neurônios do plexo mioentérico de ratos, poucos são os relatos sobre as alterações produzidas neste plexo, com o amadurecimento do animal ou com o treinamento físico, particularmente no que se refere ao ceco, nas suas diferentes regiões.

Objetivando contribuir para o conhecimento de aspectos morfológicos e quantitativos dos neurônios NADH-d e NADPH-d reativos do plexo mioentérico do ceco de ratos, pretendemos avaliar o número e a área do perfil neuronal em diferentes porções deste segmento intestinal, em animais com idade de seis e doze meses, sedentários, e de doze meses, submetidos a um programa de atividade física regular.

2 OBJETIVOS

Os objetivos foram divididos em gerais e específicos.

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar comparativamente o número e a área do perfil celular dos neurônios NADH-d e NADPH-d reativos do plexo mioentérico, nas diferentes porções do ceco de ratos Wistar de seis meses, e ratos de doze meses sedentários e submetidos a um programa moderado de atividade física (corrida em esteira).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- descrever o arranjo do plexo mioentérico nesses animais;
- quantificar os neurônios mioentéricos NADH-diaforase (NADH-d) e NADPH-diaforase (NADPH-d) positivos nas diferentes porções do ceco desses animais;
- mensurar a área do perfil dos corpos celulares dos neurônios NADH-diaforase (NADH-d) e NADPH-diaforase (NADPH-d) positivos nas regiões apical e basal do ceco desses;
- confrontar a morfologia e a quantificação dos os neurônios NADH-d e NADPH-d positivos nos diferentes grupos (G-6, G-12^S e G-12^T).

3 REVISÃO DE LITERATURA

Em roedores, o ceco está envolvido no processo de quebra de celulose, e absorção parcial dos produtos da digestão (OLDS; OLDS, 1991; RERAT, 1978).

Apesar do importante papel do sistema nervoso central (SNC) sobre a atividade do trato gastrointestinal (TGI), especialmente na sua porção superior (esôfago e estômago) e inferior (reto e esfíncter anal) (COSTA; BROOKES, 1994), um controle efetivo e independente deste trato é feito por neurônios intramurais do TGI – uma divisão autônômica denominada sistema nervoso entérico (SNE) – capaz de manter seu funcionamento independentemente de ação central (FURNESS; COSTA, 1987; GABELLA, 1989; GERSHON; KIRCHGESSNER; WADE, 1994). Assim a inervação intestinal é formada por um componente intrínseco - representado pelos neurônios do plexo mioentérico e submucoso - e por um componente extrínseco, formado por fibras colinérgicas (do parasimpático) e fibras adrenérgicas (do simpático) (ZANONI et al., 2005).

O SNE desenvolve-se a partir de células precursoras multipotentes da crista neural do neuroectoderma, que migram para o intestino, estando envolvido no controle da motilidade (COSTA; BROOKES, 1994; FURNESS; BORNSTEIN, 1995), da secreção endócrina e exócrina e da microcirculação do TGI, além de um possível papel na regulação imune e em processos inflamatórios. Em função do grande número de neurônios que compõe este sistema (3-4 milhões no intestino delgado de mamíferos, e 10 milhões na espécie humana), aliado a sua complexidade e extensão, e capacidade de mediar reflexos independentemente de aferências centrais (WOOD, 1994), o SNE tem sido reconhecido como o “cérebro do intestino” (GERSHON, 1981; GERSHON; KIRCHGESSNER; WADE, 1994).

A arquitetura geral do SNE consiste de dois plexos ganglionados interconectados, o plexo mioentérico e o plexo submucoso (BROOKES, 2001; GOYAL; HIRANO, 1996; SCHOFFEN et al., 2005; WADE, 2002). O plexo mioentérico está localizado entre as duas camadas de musculatura lisa intestinal, circular interna e longitudinal externa, estendendo-se ao longo de todo o comprimento do intestino, com função de controlar a atividade motora do TGI. O plexo submucoso, disposto no tecido conjuntivo da tela submucosa, coordena a absorção e as funções secretomotoras do epitélio gastrointestinal (FURNESS; COSTA, 1987; WADE; HORNBY, 2005).

O plexo mioentérico está distribuído desde o esôfago até o canal anal, localizado entre os estratos longitudinal e circular da túnica muscular (GABELLA, 1979; IRWIN, 1931 *apud* GABELLA, 1971, p. 81-95; SCHOFFEN et al., 2005) e, também, em meio às fibras dos estratos circular e longitudinal da túnica muscular, dependendo do segmento e da espécie analisada (GABELLA, 1971).

Normalmente, os neurônios deste plexo organizam-se em gânglios, podendo ocorrer neurônios isolados em roedores (GABELLA, 1989). Ao assumir a organização ganglionar, esses gânglios são revestidos externamente por tecido conjuntivo, ricamente vascularizado, separando-os do tecido muscular circundante (GABELLA, 1979). Os gânglios entéricos são compactos e, ao contrário da maioria dos outros gânglios autonômicos, não contêm vasos sanguíneos ou tecido conectivo, mas contêm um denso neurópilo sináptico.

As diferentes classes funcionais de neurônios entéricos podem ser divididas em: motoneurônios excitatórios para a musculatura circular – estes, segundo Costa e Brookes (1994) são neurônios Dogiel tipo 2 que se projetam localmente ou oralmente para a musculatura circular, todos contêm colina acetil transferase (ChAT) e substância P, todavia estes neurônios representam 12% dos neurônios mioentéricos; neurônios motores inibitórios para a musculatura circular – estes são neurônios Dogiel tipo 1, com pequenas e longas projeções para a musculatura circular, todos contêm VIP, óxido nítrico sintase e calponina, porém representam aproximadamente 16% dos neurônios mioentéricos. Todavia, há dois mecanismos de transmissão dos neurônios motores inibitórios que de acordo com Costa et al. (1987) um mecanismo é mediado pelos canais de potássio sensíveis a apamina e são provavelmente mediados pelo ATP ou ainda mediado pelo PCPAP (polipeptídeo ativador da adenil ciclase pituitária); o outro mecanismo é mediado pelo óxido nítrico, com provável envolvimento do VIP, e resultam em um baixo e pequeno potencial de junção inibitório. Os neurônios motores inibitórios para o intestino delgado da cobaia têm sido demonstrados ser imunoreativo ao óxido nítrico e ao VIP (COSTA; FURNESS; LLEWELLYN-SMITH, 1987). Interneurônios ascendentes – há somente uma classe de interneurônios ascendentes, eles são neurônios Dogiel tipo 1 e projetam para outros gânglios mioentéricos orais, representam 5% dos neurônios mioentéricos e contêm ChAT, substância P, calretinina e proteína neurofilamento; interneurônios descendentes – são representados por quatro classes de neurônios que projetam analmente para outros gânglios mioentéricos e submucosos, estes incluem classes de neurônios colinérgicos com somatostatina, serotonina (5-HT) e VIP, porém uma classe desses neurônios não contém ChAT, mas tem um código químico similar

para os motoneurônios inibitórios longo-descendentes contendo VIP, óxido nítrico sintase e peptídeo liberador de gastrina, todos juntos representam aproximadamente 11% dos neurônios mioentéricos (COSTA; BROOKES 1994); e os neurônios vasomotor secretomotor - estes neurônios encontram-se na submucosa, mas projetam para a mucosa e vasos sanguíneos da mucosa, e atuam como neurônios vasomotor/secretomotor, estes incluem neurônios colinérgicos com calretinina e com neuropeptídeo Y, somatostatina, colecistoquinina e peptídeo gene relacionado a calcitonina e neurônios não-colinérgicos com VIP e dinorfina.

Goyal e Hirano (1996) relataram que os neurônios motores inibitórios na camada muscular circular projetam caudalmente e contém VIP e óxido nítrico. A ausência dos neurônios inibitórios contendo óxido nítrico e VIP é cogitada como causa da falta de relaxamento na doença intestinal.

Os neurotransmissores não-adrenérgicos não-colinérgicos (NANC) promovem um essencial suprimento nervoso autonômico inibitório para a musculatura intestinal. O óxido nítrico sintase, evidenciado pelo NADPH-d em neurônios do plexo mioentérico, é sugerido como mediador primário da neurotransmissão inibitória NANC no intestino humano e no TGI em várias espécies (BELAI; COOPER; BURNSTOCK, 1995; TOOLE; BELAI; BURNSTOCK, 1998). O óxido nítrico é o principal neurotransmissor responsável pelo relaxamento nervoso mediado na musculatura longitudinal do ceco de camundongos. Calcula-se que existam, aproximadamente, 34% de neurônios NADPH-diaforase positivos do número total de neurônios entéricos de acordo com Wester; O'Brian; Puri (1999).

Neurônios contendo óxido nítrico podem ser marcados pela NADPH-d, descrita por Scherer-Singler et al. (1983), que coram uma subpopulação de neurônios que reagem com o óxido nítrico produzindo a enzima óxido nítrico sintase (NOS), tanto no cérebro como no tecido neuronal periférico.

Gershon; Kirchgessner; Wade (1994) comentam que o óxido nítrico é um importante neurotransmissor inibitório sintetizado e liberado por neurônios nitrérgicos do SNE. Nestes neurônios, o óxido nítrico é formado como um subproduto da conversão da L-arginina para L-citrulina que é catalizada pela enzima NOS, assim neurônios nitrérgicos podem ser histoquimicamente corados pela NADPH-d. Ficou comprovado que a NOS comporta-se como uma NADPH-diaforase e que esta localização histoquímica é um marcador confiável para a presença da enzima (YOUNG et al., 1992; WESTER; O'BRIAN; PURI, 1999).

Costa; Brookes (1994) destacaram que o uso de combinações de métodos para estudar os diferentes aspectos dos neurônios mioentéricos tem sido importante na identificação e caracterização dos diferentes tipos de células. Belai; Cooper; Burnstock (1995) estudaram os neurônios do plexo mioentérico de diferentes segmentos do TGI de ratos (estômago, duodeno, ceco, íleo, colo proximal e distal), por meio de dupla marcação - NADPH-d e NOS. Verificaram que quase todos os neurônios imunoreativos ao NOS, em todas as regiões examinadas, foram também marcadas pela NADPH-diaforase. Entretanto, o tamanho e a forma dos neurônios reativos ao NOS e a NADPH-diaforase variaram de uma região para outra do intestino. A presença da atividade da NADPH-diaforase em todos os neurônios mioentéricos que eram imunoreativos ao NOS ajudam a confirmar a sugestão que o NOS e a NADPH-diaforase são idênticos.

A técnica histoquímica de NADH-d, desenvolvida por Gabella (1969, 1987), tem por objetivo investigar a forma, o número total e a distribuição dos neurônios entéricos, baseada na reação histoquímica para a detecção da atividade da NADH-diaforase, tendo o nitro-BT comoceptor de elétrons (GABELLA, 1989). Este marcador neuronal, contudo, está ausente em aproximadamente 20% dos neurônios entéricos. Johnson et al. (1998), em seus experimentos com ratos Sprague Dawley de 4 e 24 meses, verificaram que o íleo apresentou uma estimativa próxima de 50% de corpos celulares identificados pela técnica de NADH-d, quando comparado a técnica de imunohistoquímica de PGP 9.5, que representa ser um marcador para a maioria dos neurônios entéricos.

Miranda-Neto et al. (2005) destacaram que a técnica de evidência neuronal pela atividade da enzima NADH-diaforase marca os neurônios com grande atividade respiratória e não necessariamente toda a população neuronal. Apontaram que, quando algumas condições de marcações são realizadas, a redução na população de neurônios NADH-diaforase positivos em um grupo experimental comparativo ao controle é sugestivo de uma intensa diminuição metabólica ou da ocorrência de morte celular em parte desta população.

3.1 ATIVIDADE FÍSICA

Wade (2002) indicam que pelo menos no colon do rato e da cobaia, os neurônios aferentes primários intrínsecos submucosos do intestino podem degenerar desproporcionalmente comparados com todos outros neurônios entéricos. Observações

realizadas por Wade et al. (2003) sugerem que no colon de cobaias pode haver plasticidade compensatória, porque enquanto a subpopulação de neurônios aferentes primários intrínsecos nos gânglios submucosos diminuiu com a idade, neurônios aferentes primários intrínsecos no plexo mioentérico não são somente preservados, mas também aumentados em proporção relativa.

O plexo mioentérico atua na parede intestinal, e a camada muscular é o tecido alvo responsável para esta manutenção, desenvolvimento e plasticidade (SAFFREY; BURNSTOCK, 1994). Esta plasticidade não está limitada ao período inicial de crescimento corporal, mas persiste no tecido nervoso diferenciado, com o potencial para promover aumento ou redução no volume celular neuronal para níveis desejados, dependendo das diferentes condições (GABELLA, 1987). Fatores neurotróficos podem estar envolvidos na manutenção do SNE, dentre eles terapias que podem ajudar o TGI a sustentar seu “cérebro” dentro do processo de envelhecimento normal (WADE; HORNBY, 2005).

Apesar de não completamente esclarecido, estudos sugerem que a atividade física ou exercício moderado contribuem para a melhora na motilidade intestinal (PETERS et al. 2001).

Evans et al. (1998) referiram o prolongamento do tempo de trânsito intestinal em indivíduos com idade avançada, como resultado da constipação. Portanto, parece lógico incluir o treinamento físico como parte do tratamento da constipação crônica, provavelmente atuando como efeito estimulante do trânsito colônico (OETTLE, 1991).

Mitsui et al. (2003) referiram maior risco de crescimento bacteriano no intestino delgado de indivíduos senis, provavelmente devido a uma redução na motilidade intestinal. O treinamento físico é, freqüentemente, recomendado para uma melhor evacuação (MESHKINPOUR; KEMP; FAIRSHTER, 1989).

3.2 ARRANJO DO PLEXO MIOENTÉRICO

O plexo mioentérico de cobaias mostrou arranjo heterogêneo, sendo constituído por pequenos gânglios na região abaixo da prega do peritônio, gânglios grandes e muito próximos em regiões adjacentes à prega peritonal e gânglios mais afastados na região antiperitonal (Gabella, 1979, 1989).

Zanoni et al. (1997) estudaram o plexo mioentérico do ceco de ratos Wistar, machos, pela técnica de Giemsa. Para tanto, dividiram os animais em 3 grupos: D-2 e C-2 – animais com dois meses de idade, respectivamente, diabéticos e não-diabéticos; D-8 e C-8 – animais com oito meses, diabéticos e não-diabéticos. Verificaram que em ambos os grupos controle e diabéticos, os gânglios encontrados eram poligonais e triangulares, mas a maior parte dos gânglios eram alongados. Os gânglios eram constituídos de neurônios de tamanhos variados e formas alongadas e ovais.

A maioria dos neurônios mioentéricos do jejuno e colon ascendente e descendente de ratos Wistar apresentou formato alongado, dispostos dentro de gânglios, contudo, neurônios isolados também foram evidenciados (CLEBIS, 2006; GAGLIARDO, 2006). Esta observação foi feita, também, por Hanani (2004) em colon de humanos, mas ocasionalmente estes neurônios eram verificados dispostos unicamente em apêndice de coelhos. Seyfert (2003) em experimento com ceco de ratos Wistar por meio da técnica NADH-d verificou que os neurônios apresentavam formato alongado, triangular e irregular; nas porções AM, BA e PA, gânglios com formato triangular e irregular em sua grande maioria e em poucos casos apresentaram formato alongado. Raros neurônios isolados foram evidenciados na região apical mesentérica. Para a técnica de NADPH-d a região apical antimesentérica possuíam gânglios pequenos e irregulares, sendo compostos por poucos neurônios, além de existir uma grande quantidade de células nervosas isoladas.

O formato dos neurônios marcados pelas técnicas de NADH-d, NADPH-d e acetilcolinesterase variou de acordo com o tamanho celular. As células de tamanho pequeno, geralmente, possuíam formato arredondado; as médias, ovaladas ou levemente alongada e as grandes, em sua grande maioria alongada. O núcleo geralmente excêntrico para os neurônios médios e grandes (SEYFERT, 2003).

Wester; O'Briain; Puri (1999) relataram que as fibras musculares circular contêm um grande número distribuídos de feixes nervosos finos de NADPH-diaforase positivas, paralelas com as fibras musculares. Ocasionalmente células NADPH-diaforase positivas foram vistas na camada muscular circular, são células em forma de barra. As células NADPH-diaforase positivas restringiam-se ao plexo mioentérico, localizadas nos gânglios nas intersecções dos feixes nervosos, embora neurônios isolados ou grupo de células nervosas pequenas geralmente vistas ao longo do feixe.

Castelucci et al. (2002), em experimento com o colon de ratos Wistar, com 21 e 42 dias de idade, submetidos à restrição protéica, referiram gânglios de neurônios mioentéricos NADH-d reativos alongados com seus longos eixos paralelos a camada muscular circular, nos grupos controle e experimental.

Miranda-Neto et al. (2001) estudaram 18 ratos Wistar (sete meses de idade), com a proposta de analisar a densidade neuronal nas regiões mesentérica, antimesentérica e intermediária do íleo de ratos, por meio das técnicas de Giemsa, histoquímica de NADH-d, NADPH-d e acetilcolinesterase. Verificaram que os corpos celulares neuronais estavam predominantemente aglomerados em gânglios, freqüentemente alongados, seguindo o extenso eixo, orientados circularmente. Os gânglios NADPH-d reativos apresentaram-se interconectados, circular e longitudinalmente, por densos feixes de fibras nervosas (fibras primárias), formando uma ampla rede. Observaram que os neurônios NADPH-d positivos, comparativos àqueles evidenciados por Giemsa, representavam 22.09%, 20.74% e 18.12%, respectivamente, nas regiões mesentérica, intermediária e antimesentérica.

Seyfert (2003) indicou gânglios NADPH-d positivos e feixes de fibras nervosas que compõe o plexo mioentérico com diferentes espessuras, de acordo com a quantidade de fibras nervosas contidas em seu interior, formando malhas primárias, secundárias e terciárias, as quais exibiam diferentes conformações nas diversas porções do ceco.

Wester; O'Briain; Puri (1999) estudaram as alterações pós-natal ocorridas no plexo mioentérico de crianças a termo (entre um dia e 15 anos de idade), tendo coletado amostras de todos os níveis do intestino delgado e cólon, as quais foram submetidas às técnicas de NADPH-diaforase e de azul coprulínico. Observaram que os preparados de membrana facilitaram a visualização das malhas de feixe nervoso no plexo mioentérico, que inclui um plexo primário, secundário e terciário, havendo uma malha regular de feixe nervoso com gânglios (grupo de células ganglionares) nas intersecções (plexo primário), feixes de nervos conectando outros feixes do plexo primário sem entrada nos gânglios (plexo secundário) e no espaço entre o feixe nervoso e os gânglios do plexo primário, uma malha de muitos feixes finos (plexo terciário).

A distribuição do plexo mioentérico, ou seja, a presença de fibras nervosas que se interconectam, a disposição dos neurônios no interior de gânglios e eventualmente no trajeto das fibras, promove estrategicamente um arranjo particular deste plexo, originando, desta forma, feixes de fibras nervosas – plexos primário, secundário e terciário – que foram

amplamente descritos (FURNESS; COSTA, 1987; GABELLA, 1979; SCHEMANN; NEUNLIST, 2004; SANTER; BAKER, 1993;). Wester; O'Briain; Puri (1999) relataram que a morfologia do plexo mioentérico primário varia com a idade e entre os diferentes níveis do trato gastrointestinal.

Na porção descendente a distribuição dos gânglios e das fibras nervosas foi uniforme entre as regiões mesentérica e antimesentérica em toda a circunferência intestinal (ARAÚJO et al., 2003; GAGLIARDO, 2006). Em espécies onívoras e carnívoras, como o cão, gato, macaco e marsupiais, foi relatada a presença de uma região representada pela porção mais distal do colo descendente, que não é encontrada em roedores como rato, coelho e cobaia; nesta região foi verificado um plexo com disposição irregular, com muitas fibras nervosas de vários tamanhos com poucos e pequenos gânglios; as outras regiões do colo descendente apresentam um grande plexo estrelado com disposição regular conectados por fibras nervosas, sendo comum nas espécies onívoras e carnívoras (CHRISTENSEN et al., 1984).

Seyfert (2003), analisando os neurônios do plexo mioentérico (NADH-d, NADPH-d e acetilcolinesterase reativos) do ceco de ratos Wistar, com sete meses de idade, observou que os gânglios estavam dispostos paralelamente à camada circular da túnica muscular, apresentando quantidade variável de células nervosas. Na porção próxima à ampola cecal, as malhas do plexo mioentérico apresentavam arranjo hexagonal. Os gânglios, geralmente, acompanhavam o sentido das fibras musculares da camada circular; na porção próxima à ampola cecal (PA) apresentou distribuição divergente em direção às regiões apical e basal, tendo a conformação semelhante a um leque. Nas demais porções – apical antimesentérica (AA), apical mesentérica (AM) e basal antimesentérica (BA), as malhas do plexo mioentérico demonstraram formato alongado, semelhante a um retângulo, seguindo o sentido das fibras da camada circular. Os gânglios nervosos reativos a NADPH-d, na porção próxima à ampola cecal, na apical mesentérica e na basal antimesentérica, apresentaram formatos alongado, triangular e irregular, sendo compostos por neurônios esparsos em seu interior, com poucas células nervosas isoladas sendo encontradas.

Clebis (2006) e Gagliardo (2006), em pesquisa com jejuno e colon ascendente e descendente, respectivamente, de ratos da linhagem Wistar de 6 e 12 meses, e 12 meses submetidos a programa de atividade física, não observaram alterações morfológicas nos neurônios mioentéricos NADH-diaforase e NADPH-diaforase positivos. Os neurônios mioentéricos, encontrados entre as túnicas circular e longitudinal da camada muscular, estavam, principalmente, localizados em gânglios, frequentemente alongados e com seu maior

eixo orientado na mesma direção da camada muscular circular. Referiram eventuais neurônios isolados no trajeto dos feixes de fibras nervosas. Os gânglios reativos a técnica da NADPH-d no colon ascendente e descendente de ratos Wistar eram conectados uns aos outros por uma malha espessa de fibras nervosas (feixes primários). Feixes nervosos mais finos (secundários) formavam uma malha interligando os feixes primários entre si, e vários ramos finos e fibras nervosas isoladas (feixes terciários) conectando-se entre si (GAGLIARDO, 2006). Clebis (2006) descreveu arranjo semelhante no jejuno.

Gagliardo (2006) comenta que o arranjo do plexo mioentérico expressa algumas diferenças entre as porções ascendente e descendente do colo. Na primeira porção a região mesentérica apresenta um denso plexo, isto é, os gânglios estão mais próximos, conectados por espessas e densas fibras primárias. Já na região antimesentérica os gânglios estão mais espaçados em relação uns aos outros e conectados por fibras não tão espessas. Gagliardo (2006) verificou neurônios de vários tamanhos e formas nos gânglios, tanto na porção ascendente quanto na porção descendente do colon pelas técnicas da NADH-d e NADPH-d.

3.3 NÚMERO DE NEURÔNIOS

Sant'Ana et al. (1997) em estudos do cólon de ratos observaram um grande número de neurônios na região intermediária quando comparado com a região antimesocólica, porém esta diferença foi atribuída a presença de camada densa de fibras musculares encontradas na região intermediária que poderia requerer um grande número de neurônios para inervá-los.

Miranda-Neto et al. (2001), ao analisar a densidade neuronal nas regiões mesentérica, antimesentérica e intermediária do íleo de ratos, por meio das técnicas de Giemsa, histoquímica de NADH-d, NADPH-d e acetilcolinesterase, de 18 ratos Wistar, com idade de 7 meses, observaram que no íleo, mais distante da borda mesentérica, a densidade neuronal apresentou-se pequena, ou seja, na região da borda mesentérica uma ampla densidade neuronal foi observada, na região oposta (região antimesentérica) uma pequena densidade neuronal foi verificada. Independentemente da técnica empregada verificaram que a região mesentérica apresentava uma grande densidade neuronal, possivelmente porque os neurônios promovem a inervação das fibras musculares lisas da parede intestinal e do plexo vascular que penetra na parede intestinal pelo mesentério para irrigar ou deixar o intestino para drená-lo.

Seyfert (2003) avaliou comparativamente o número de neurônios NADH-d e NADPH-d reativos nas diferentes porções do ceco de ratos Wistar com sete meses de idade. Referiu diferenças significantes no número de neurônios NADH-d reativos entre as porções apical antimesentérica (AA), apical mesentérica (AM), basal antimesentérica (BA) e porção próxima à ampola cecal (PA), indicando os seguintes valores: AA: 457 ± 121 ; AM: 519 ± 131 ; BA: 381 ± 91 ; PA: 717 ± 142 . O maior número de neurônios na porção próxima à ampola cecal foi atribuído à característica transicional desta porção. Os números de neurônios NADPH-d positivos para as diferentes porções foram: AA - 188 ± 33 , AM - 219 ± 38 , BA - 173 ± 36 e PA - 240 ± 26 , no teste “ χ^2 ” ($P < 0,05$).

Clebis (2006) avaliou ratos Wistar sedentários com seis e 12 meses, e animais submetidos a programa de atividade física (corrida em esteira), com doze meses de idade, quanto ao número de neurônios mioentéricos NADH-d e NADPH-d reativos, do jejuno. Indicaram diminuição no número médio de neurônios NADH-diaforase reativos ($P < 0,05$) nos animais sedentários com doze meses, comparativamente aos de seis meses de idade. O número de neurônios NADPH-d positivos teve diminuição significativa ($P > 0,05$) nos animais com 12 meses, em ambos os grupos (sedentário e treinado), em relação aos animais com seis meses de idade.

Gagliardo (2006) pesquisou os neurônios do plexo mioentérico, NADH-d e NADPH-d reativos, das porções ascendente e descendente do colon ratos Wistar, sedentários (seis e 12 meses de idade) e submetidos a programa de atividade física (corrida em esteira) (12 meses). Os resultados referentes à densidade neuronal dos neurônios NADH-d reativos não diferiram significativamente ($P < 0,05$) na comparação entre os grupos ou porções do colon. Os animais com seis meses de idade apresentaram maior densidade de neurônios NADPH-d reativos do que os demais ($P < 0,05$). Por outro lado, não foram observadas diferenças significantes ($P < 0,05$) entre os animais de doze meses sedentários e treinados, tampouco entre as diferentes porções do colon.

Cowen et al. (2000) utilizaram ratos machos Sprague-Dawley, com 4 - 6, 16, 20 e 24 meses de idade, todos, inicialmente, submetidos à alimentação *ad libitum*, e posteriormente a uma dieta alimentar restritiva. A restrição de dieta em 16% reduziu o número de neurônios nos animais de 24 meses, comparativamente aos animais jovens. Esta diminuição no número de neurônios mioentéricos, contudo, não era uniforme em toda a circunferência – aqueles neurônios mais distantes do mesentério eram menos vulneráveis aos efeitos da dieta e da idade.

Molinari et al. (2002) referiram diferença na densidade de neurônios NADH-d no estômago aglandular do rato, comparativamente entre a região central, próxima à prega limitante, e a região próxima à curvatura gástrica maior. Diferenças na densidade neuronal do plexo mioentérico dos diferentes contornos de um mesmo segmento intestinal foram também indicadas no intestino grosso de cobaias (IRWIN, 1931 *apud* GABELLA, 1971, p. 81-95), no íleo de galinha (ALI; McLELLAND, 1979) e na região média do intestino de ratos (SANTER, 1994). De Souza; Carvalho; Fujimura (1988) observaram menor número de neurônios no segmento superior do esôfago de indivíduos humanos, relativamente ao inferior.

Diferença na densidade de neurônios tem sido relacionada à espessura da túnica muscular (SAFFREY; BURNSTOCK, 1994). Isto é reforçado pelos estudos realizados no ceco de rato, onde se observa que a musculatura na porção próxima à ampola cecal é mais espessa (SNIPES, 1981) e rica em feixes de fibras nervosas mioentéricas e vasos sanguíneos (ROGER; CABANIE; FERRE, 1991). No rato, verificou-se predomínio de maior número de neurônios em locais onde a camada muscular é mais espessa, como foi mencionado para o estômago por Fregonesi; Miranda-Neto; Molinari (1998) e Oliveira et al. (2002).

Gabella (1971) indicou diminuição da população de neurônios NADH-d-reativos em ratos adultos, comparativamente aos jovens. Santer; Baker (1988), em experimento com ratos Wistar machos, com idade entre seis e 24 meses, referiram o menor número total de neurônios mioentéricos NADH-d reativos em animais com 24 meses. A contagem de neurônios por cm^2 foi: íleo – 6 meses: 8.169 ± 413 e 24 meses: 4.962 ± 628 ; jejuno – 6 meses: 5.477 ± 275 e 24 meses: 3.290 ± 78 ; cólon – 6 meses: 14.214 ± 587 e 24 meses: 5.128 ± 1.004 e reto – 6 meses: 9.716 ± 1.156 e 24 meses: 5.612 ± 698 . Os resultados deste estudo sugeriram que há uma grande diminuição no número de neurônios no plexo mioentérico por todo o trato intestinal, com diminuição pronunciada (64.0%) no cólon quando comparado com outras regiões.

Zanoni et al. (1997) avaliaram, pela técnica de Giemsa, a quantificação de neurônios o ceco de 32 ratos Wistar machos, diabéticos e não-diabéticos, com idades de 2 e oito meses, encontrando, numa área de $6,92\text{mm}^2$, valores de 331.80 ± 100.50 , 120.60 ± 22.48 , 237.40 ± 75.62 , 155 ± 38.66 neurônios, respectivamente nos grupos controle de 2 e oito meses e no grupo diabético de oito meses de idade.

El-salhy; Sandström; Holmlund (1999), avaliando as alterações no número de neurônios do SNE em diferentes segmentos (antro, cólon distal e duodeno proximal) de camundongos com idades entre um e 24 meses (um, três, 12 e 24 meses), indicaram perda

neuronal nos animais de 12 e 24 meses, em ambos os plexos, mioentérico e submucoso, quando comparados com camundongos de três meses. Estas observações são consistentes com outros achados no plexo mioentérico do trato gastrointestinal de humanos (De SOUZA et al, 1993; GOMES; De SOUZA; LIBERTI, 1997; MECIANO et al. 1995) e no intestino delgado de ratos (SANTER; BAKER, 1988) e cobaias (GABELLA, 1989).

Miranda-Neto et al. (2001) indicaram diferenças no número de neurônios nos contornos mesentérico e antimesentérico do íleo de ratos Wistar de sete meses de idade.

Timmermans et al. (1994) compararam a densidade dos neurônios/cm² NADPH-d, em fetos com 32 semanas, e uma criança com dois meses de idade. No plexo mioentérico do jejuno proximal do feto encontraram 31.742 neurônios, comparado com 3.710 neurônios na criança. A densidade neuronal foi consideravelmente alta no colon proximal, denotando quantidade de 63.418 neurônios e 8.878 neurônios no feto e na criança, respectivamente.

Timmermans; Adriaensen; Lefebvre (1999) pesquisaram o desenvolvimento pós-natal (um dia, uma e duas semanas, um e dois meses de idade) do plexo mioentérico em cinco diferentes regiões do estômago de ratos Wistar, por meio das técnicas de PGP9.5 e NADPH-d. Verificaram que o número total de neurônios mioentéricos foi aproximadamente 200.000, porém 34.7% demonstrou positividade a NADPH-d. A porcentagem média dos neurônios NADPH-d por área e grupo de idade variou entre 27.9% a 39.5%. Nenhuma mudança significativa na proporção dos neurônios nitrérgicos foi observada dentro de uma distinta região em função do tempo, exceto para a área 1 (região proventricular), onde um leve, mas significativa diminuição ($P=0.002$) pode ser notada com o aumento da idade, apesar de uma parcial recuperação de uma para duas semanas. A porcentagem média dos neurônios nitrérgicos para todos os grupos de idade na região antral (área 5 - porcentagem média de 29.1%) foi significativamente baixo ($P=0.001$) que na proventricular (área 1 - porcentagem média de 36.3%; área 2 - porcentagem média de 37.9%; área 3 - porcentagem média de 35.5%) e região fúndica (área 4 - porcentagem média de 34.1%).

Hanani (2004), em experimento com 22 apêndices de indivíduos humanos, com idade entre 2 meses e 65 anos, apontou diminuição na densidade dos neurônios NADPH-d reativos nos indivíduos com idade entre 11 e 51 anos, comparativamente com aqueles entre dois e 30 meses de idade.

Phillips et al. (2003) investigaram o plexo mioentérico no intestino delgado e grosso de ratos Fischer 344, com três e 24 meses de idade. Indicaram que o número de neurônios

NADPH-d reativos/cm² foi respectivamente de: no fundo do estômago 2.013±78 e 2.130±52; corpo do estômago 2.618±80 e 2.478±79; antro do estômago 2.723±203 e 2.204±244; bulbo duodenal 6.757±289 e 6.899±664; duodeno 4.963±102 e 5.159±319; jejuno 6.595±97 e 6.450±118; íleo 4.779±87 e 5.107±208; cólon 5.019±107 e 5.071±184; e reto 4.644±67 e 4.418±139.

Johnson et al. (1998) analisaram ratos Sprague Dawley com quatro e 24 meses de idades, com a finalidade de observar a população de neurônios mioentéricos no intestino delgado. Reportaram que o número de neurônios/cm² NADH-d e NADPH-d reativos, no grupo com quatro meses, foi de 9.490±580 e 2.100±90, e no grupo de 24 meses foi 7.950±370 e 1.780±420, havendo uma redução significativa de aproximadamente 15% no grupo de 24 meses marcado pela técnica da NADH-d, porém não apresentando diferença significativa nos grupos submetidos a técnica da NADPH-d.

Santer (1988) relatou que os neurônios expressando óxido nítrico são poupados no processo de envelhecimento do sistema nervoso entérico. Estudos revelaram uma diminuição de 15% na população de neurônios nitrérgicos entre as idades de quatro e 24 meses no intestino delgado de ratos (SANTER, 1994), comparados com uma diminuição de 40% em todos os neurônios mioentéricos (BAKER; SANTER, 1988). A redução no número de neurônios mioentéricos é um resultado comum em modelos experimentais de envelhecimento (GABELLA, 1989; JOHNSON et al., 1998; SANTER; BAKER, 1988; SANTER, 1994).

Wu et al. (2003) relataram substancial perda celular na população mioentérica total (29%), de ratos Wistar, durante o envelhecimento, com pouco comprometimento de neurônios nitrérgicos (14%). Por outro lado, em ratos Sprague-Dawley, nenhuma diferença foi observada entre a diminuição no número total de neurônios entéricos (25%) e o número da população nitrérgica. A alta porcentagem de neurônios nitrérgicos no esôfago de ratos Wistar, especialmente em animais de 20 meses de idade, de acordo com Wu et al. (2003) é sugestivo de um papel protetor do óxido nítrico nos neurônios mioentéricos esofageanos, que é sustentado por acúmulo de dados nos mecanismos de efeito protetor do óxido nítrico (KEILHOFF; FANSA WOLF, 2002; SANDGREN et al. 2002; SERFOZO; ELEKES, 2002), mas não deve ser pensado como um protetor geral, mas como um mecanismo embutido dentro do sistema nervoso entérico em todas as regiões e em todas as espécies.

Peng et al. (2001) observaram diferentes densidades de neurônios NADPH-d nas distintas regiões do estômago de ratos Wistar adultos (62±38 no antro; 43±32 no corpo, e

32 ± 28 neurônios/cm² no fundo), o que atribuíram às atividades das diferentes porções do estômago.

Dupont; Jervis; Sprinz (1965) pesquisaram o ceco de ratos Fisher adultos submetidos a uma dieta com grãos, referindo maior número de neurônios NADPH-d na borda mesentérica do que na antimesentérica.

3.4 ÁREA DO PERFIL NEURONAL

De acordo com Furlan (2000), a classificação dos neurônios entéricos de acordo com seus tamanhos, difere entre os vários autores, dificultando o confronto dos resultados. Ainda que parte dos autores classifiquem os neurônios em pequenos, médios e grandes, o parâmetro utilizado para a classificação é distinta. Castelucci et al. (2002), Miranda-Neto et al. (2005), Santer; Baker (1988), Schoffen et al. (2005), e Zanoni et al. (2005) destacaram que os neurônios podem ser distribuídos de acordo com o tamanho da área do perfil celular neuronal, em classes de intervalo em 100μm².

Burnstock (1959) categorizou como células nervosas pequenas aquelas com 10-15μm de diâmetro. Para a classificação, Gabella (1971), Gabriel; Halasy; Csoknya (1988) e Santer; Baker (1988) avaliaram a área dos perfis dos corpos celulares neuronais; Gabriel; Halasy; Csoknya (1988) basearam-se na multiplicação dos eixos longitudinal e transversal do corpo celular dos neurônios; Fregonesi; Miranda-Neto; Molinari (1998) e Stabille; Lima; Germano (1998) apoiaram suas observações na soma desses eixos; Miranda-Neto et al. (2005) e Natali et al. (2005) fundamentaram-se na média e desvio padrão da área do perfil do corpo celular.

Clebis (2006) avaliou os neurônios do plexo mioentérico do jejuno de ratos Wistar, distribuídos em grupos controle e sedentários, respectivamente, com seis e 12 meses de idade, e grupo submetido a programa de atividade física (corrida em esteira) (12 meses). Encontraram valores médios de $167 \pm 6,93$, $103,4 \pm 8,68$ e $198,4 \pm 8,22 \mu\text{m}^2$ para a área do perfil do corpo dos neurônios NADH-d reativos, respectivamente, nos animais controle e sedentários (com seis e doze meses) e treinados, e de $186,8 \pm 9,34$, $157,3 \pm 3,64$ e $129,9 \pm 9,55 \mu\text{m}^2$, para a área dos neurônios NADPH-d reativos nos respectivos animais. Os valores observados para os neurônios NADH-d mostraram diferenças significantes ($P > 0,05$), pelo teste de Tukey, entre os grupos. Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) na área dos neurônios NADPH-d reativos somente entre os animais dos grupos controle e sedentário, este

com menor média. A maioria dos neurônios NADH-d e dos NADPH-d positivos mostrou área média do perfil do corpo celular entre 100-200 μm^2 em todos os grupos estudados.

Gagliardo (2006) mensurou a área do perfil dos neurônios NADH-d e NADPH-d reativos do colon de ratos Wistar, submetidos a um programa de atividade física (corrida em esteira). A área dos neurônios NADH-d reativos dos animais controle com seis meses de idade variou de 17 a 555 μm^2 , com médias de 130,7 e 127,7 μm^2 , respectivamente nas porções ascendente e descendente. No grupo sedentário de 12 meses, os valores variaram de 28 a 667 μm^2 , na porção ascendente do colon média de 175 μm^2 e na descendente 153 μm^2 . Os animais treinados com 12 meses tiveram área variando entre 15 e 598 μm^2 , com média de 155 μm^2 na porção ascendente, e de 119 μm^2 na descendente. Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos ou entre as porções ascendente e descendente. A mensuração da área dos neurônios NADPH-d reativos dos animais com seis meses de idade variou entre 55 e 919 μm^2 (208,7 $\pm$ 33,7; coeficiente de variação 16%), com média de 195 μm^2 e 222 μm^2 , respectivamente nas porções ascendente e descendente do colon. No grupo sedentário com 12 meses de idade, os valores alternaram entre 23 e 724 μm^2 (161 $\pm$ 46; coeficiente de variação 28,7%), sendo que, na porção ascendente, a média foi 198 μm^2 , e na descendente 125 μm^2 . Nos animais treinados a área do perfil neuronal esteve entre 20 e 967 μm^2 (174 $\pm$ 78; coeficiente de variação 44%), média de 151 μm^2 na porção ascendente e de 197 μm^2 , na porção. Não foi verificada diferença significativa ($P < 0,05$) na área do perfil dos neurônios NADPH-reativos entre os grupos, ou entre as porções ascendente e descendente. No grupo controle de seis meses de idade, 52% dos neurônios apresentaram tamanho entre 100-200 μm^2 , no grupo de animais com doze meses, sedentários, 42% dos neurônios estavam entre 1-100 μm^2 , e nos animais treinados, 41% entre 100-200 μm^2 .

Seyfert (2003) analisou a área do perfil dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos reativos à NADH-d e a NADPH-d em ratos Wistar, com sete meses de idade. Baseando-se na média e desvio padrão, classificou os neurônios em pequenos, médios e grandes. Para análise estatística aplicou o teste ANOVA ($P > 0,05\%$). Encontrou os seguintes intervalos para as diferentes classes de neurônios NADH-d reativos, nas porções estudadas – neurônios pequenos: AA 101,32 a 364,56; AM 90,12 a 327,12; BA 103,04 a 235,04 e PA 100,04 a 352; neurônios médios: AA 361,24 a 774,52; AM 317,08 a 738,44; BA 226,12 a 751,24 e PA 211,84 a 451,24, e neurônios grandes: AA 780,56 a 1250,04; AM 697,32 a 1248,96; BA 759,56 a 1427,16 e PA 734,12 a 1324,80. Em todas as porções estudadas houve

predomínio do corpo celular médio, não sendo observadas diferenças significantes no tamanho do perfil neuronal entre as porções estudadas.

Os intervalos da mensuração dos neurônios NADPH-d reativos dos neurônios pequenos, médios e grandes nas diferentes porções foram – neurônios pequenos: AA 124,90 a 244,89; AM 108,941 a 246,913; BA 134,20 a 248,02 e PA 96,88 a 202,38; neurônios médios: AA 245,53 a 810,89; AM 249,035 a 722,876; BA 250,03 a 700,30 e PA 203,80 a 584,91, e neurônios grandes: AA 817,26 a 1568,50; AM 732,755 a 1513,764; BA 701,40 a 1579,64 e PA 587,42 a 1422,51. Os neurônios reativos a NADPH-d, variou de $96,88\mu\text{m}^2$ a $1579,64\mu\text{m}^2$. As menores porcentagens de neurônios pequenos e grandes foram verificadas na porção PA 9% e 13,4%, respectivamente. A maior porcentagem dos neurônios pequenos, 14,6% e grandes, 19,2% foi verificada na porção BA. A porcentagem dos neurônios de tamanho médio variou de 66,2% na região BA a 77,6% para porção PA.

Miranda-Neto et al. (2005), apoiados na média e desvio padrão do grupo controle, classificaram os neurônios do jejuno de ratos Wistar em pequenos, médios e grandes. Os neurônios com área menor do que $113,96\mu\text{m}^2$ foram considerados pequenos; aqueles com valores acima de $266,64\mu\text{m}^2$, neurônios grandes, sendo que os com valores entre $113,96$ e $266,64\mu\text{m}^2$, médios. Agrupando os neurônios em classes de $100\mu\text{m}^2$, referiram maior número de neurônios nos intervalos entre 101 e $400\mu\text{m}^2$.

Gabella (1971) estudou o estômago, intestino delgado, ceco, cólon e reto de ratos albinos recém-nascidos com 1-16 horas e com seis meses de idade, por meio da técnica histoquímica da NADH-d. Observou tamanho médio dos neurônios no intestino delgado variando entre 50 e $750\mu\text{m}^2$; no ceco, entre $75\mu\text{m}^2$ e $975\mu\text{m}^2$, podendo atingir, neste segmento do intestino grosso, $6.500\mu\text{m}^2$, sendo este o maior neurônio encontrado em todos os segmentos. Classificou os neurônios do ceco em intervalos de $100\mu\text{m}^2$, indicando ser a maior variedade neuronal de $240\text{-}260\mu\text{m}^2$. No reto e no estômago, 2,69 e 1,89%, respectivamente, com os neurônios demonstrando valores acima de $825\mu\text{m}^2$. Ponderou que o crescimento do tubo digestório é acompanhado por mudanças neuronais que podem ser divididas em três estágios: 1. aumento do número de neurônios e no tamanho de alguns neurônios; 2. crescimento dos neurônios pequenos, e 3. aumento de tamanho dos neurônios grandes. Assim, o tamanho celular médio e as variações de tamanho são mais pronunciados na vida pós-natal. Ressaltou que pouco se sabe sobre os fatores que regulam o volume da célula nervosa, sugerindo dois pontos que poderiam ter importante papel no controle do tamanho desta célula – o aumento no volume do órgão inervado, acompanhado por um aumento no volume do

tecido nervoso intramural (aumento neuroplasmático), e o grande aumento no tamanho dos neurônios ocorre somente quando o reservatório de pequenos neurônios é reduzido.

Gabella (1987) destacou que a plasticidade neuronal não está limitada ao período inicial de crescimento corporal, mas persiste no tecido nervoso diferenciado, com o potencial para promover aumento ou redução no volume celular para níveis adequados, dependendo das condições.

Os neurônios NADPH-d reativos das porções, A¹ e A (porções antimesentérica e mesentérica da região basal, respectivamente) do ceco de ratos Fisher adultos, submetidos à dieta com grãos foram classificados por Dupont; Jervis; Sprinz (1965), com base na média dos diâmetros perpendiculares do neurônio; ressaltaram que a maior parte dos neurônios (67%) era de tamanho médio (10-20 μ). O tamanho médio dos neurônios nos animais tratados foi de 42,3 μ , três vezes maior do que aquele encontrado nos animais controle (16,10 μ). Referiram neurônios “monstruosos” (156,1 μ) no ceco dos animais tratados. A frequência da distribuição dos neurônios nas diferentes classes, em valores percentuais, nos animais controle, foi: 0-10 μ : 6,8%; 10-20 μ : 67,35; 20-30 μ : 25,85; 30-45 μ : 0,68; 45-60 μ : 0; >60 μ : 0, e nos tratados: 0-10 μ e 10-20 μ : 0%; 20-30 μ : 26,02; 30-45 μ : 30,89; 45-60 μ : 21,95; >60 μ : 20,33%.

Zanoni et al. (1997) estudaram os neurônios do plexo mioentérico de ceco de 32 ratos Wistar, machos, com dois e 8 meses de idade, diabéticos e não-diabéticos, pela técnica de Giemsa. Os neurônios foram classificados em pequenos, médios e grandes, de acordo com os valores da média e desvio padrão encontrado nos animais controle (não-diabéticos). Os neurônios pequenos incluíam aqueles medindo de 19,70 a 28,89 μ ; médios de 28,90 a 49,89 μ , e grandes aqueles acima de 49,90 μ .

Schoffen et al. (2005) avaliaram os neurônios mioentéricos (técnica imunohistoquímica da Miosina-V) do colon de 10 ratos Wistar machos, com 360 dias de idade, submetidos à restrição protéica, comparativamente com animais controle (sem restrição). Os neurônios foram distribuídos em classes, obedecendo ao intervalo de 100 μ m². Em ambos os grupos, os neurônios apresentaram grande diversidade de tamanho (de 51,12 a 840,43 μ m²). Nos dois grupos, a maioria dos neurônios encontrava-se nas classes de 101-200 μ m² e de 201-300 μ m². Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos pelo teste t de Student (P<0.05).

Natali et al. (2005) pesquisaram a população de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos Wistar, machos, adultos (345 dias), suplementados com dieta hipoprotéica, pela técnica de Giemsa. Baseados na média e desvio padrão dos neurônios do grupo controle, classificaram-nos em pequenos, médios e grandes.

Zanoni et al. (2005) investigaram o efeito da suplementação com ácido ascórbico sobre o plexo mioentérico do íleo de ratos Wistar com 32 semanas, por meio das técnicas de Miosina-V e de NADPH-d positiva. Os neurônios distribuídos em classes com intervalo de $100\mu\text{m}^2$. A maioria dos neurônios do grupo controle e do experimental apresentou área entre $200\text{-}400\mu\text{m}^2$. A média do tamanho dos neurônios marcados pela Miosina-V e pela NADPH-d, nos grupos controle e experimental foi respectivamente, $340,2\pm 6,1$ e $296,4\pm 4,5$; $327,9\pm 5,7$ e $274,1\pm 4,5$. Os neurônios NADPH-d reativos do grupo experimental mostraram menor área de perfil neuronal do que os do grupo controle, pelo teste t ($P < 0.05$).

4 MATERIAL E MÉTODO

O material e o método utilizados nesta pesquisa estão descritos abaixo.

4.1 MATERIAL

Foram utilizados cecos de trinta (30) ratos machos¹ (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, de seis meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. Os animais receberam um número de identificação e foram, igualmente, distribuídos em três grupos:

G-6: grupo controle

G-12^S: grupo experimental – sedentário

G-12^T: grupo experimental – treinado

4.2 MÉTODO

4.2.1 Manejo

Durante o período experimental (de setembro de 2005 a fevereiro de 2006), os animais dos grupos G-12^S e G-12^T permaneceram alojados em caixas de polipropileno, providas de bebedouro e comedouro, mantidas em condições ambientais controladas de temperatura (22-24°C) e iluminação (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro), sendo fornecida ração comercial de referência para ratos (Nuvital[®]) e água *ad libitum*.

O grupo G-6 correspondeu ao grupo controle, de seis meses de idade, sendo que os animais que o compunham não passaram por nenhum manejo, tendo sido eutanasiados com seis (6) meses de idade; foram sacrificados no dia da coleta do material, sendo realizado com estes animais uma única pesagem, média de 439.5 ± 13.1 g.

G-12^S: dez animais submetidos a um programa de atividade física leve, durante 6 meses, considerados sedentários.

¹Este trabalho faz parte do projeto: “Quantificação e mensuração da área do perfil dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos NADH e NADPH-diaforase positivos da porção terminal do íleo e ceco de ratos de meia idade submetidos a programa de atividade física (corrida em esteira)”, aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo (Protocolo nº 774/2005), Anexo 1.

G-12^T: constituído por dez animais que foram submetidos a programa de atividade física (corrida em esteira) durante 6 meses (6^o - 12^o mês de idade).

Figura 1 - Fotografia de ratos Wistar realizando atividade física (corrida em esteira)

Para o estabelecimento do protocolo inicial, foi realizado o teste de esforço máximo, com velocidade inicial de 0,3 Km/h, a qual foi aumentada, na mesma proporção (0,3 Km/h), a cada quatro minutos (SILVA et al., 1997). Sete testes de esforço máximo foram realizados – o primeiro antes do início do experimento e os demais mensalmente. A velocidade máxima (V_{máx.}) estipulada, correspondeu a 60% da média da intensidade máxima obtida no teste de esforço. Os animais foram pesados a cada teste de esforço, e antes da coleta do material, totalizando sete pesagens.

4.2.2 Protocolo de atividade física para G-12^S

Os animais do grupo G-12^S, a partir do sexto mês de idade, foram submetidos a um programa de atividade física leve – corrida em esteira, na velocidade de 0,3 Km/h, durante dez minutos, uma vez por semana (SILVA et al., 1997).

4.2.3 Protocolo de atividade física para G-12^T

A partir do sexto mês, os ratos G-12^T iniciaram atividade física, com velocidade máxima calculada baseada no obtido nos testes de esforço, como descrito acima, de modo que a V_{máx.} variava mensalmente. Os animais exercitavam-se cinco vezes por semana, durante trinta minutos, na primeira semana, com aumento de 10 minutos a cada semana, atingindo, pois, 60 minutos na quarta semana.

4.2.4 Coleta de material

Para a coleta do material, os animais passaram por um jejum de 12 horas, foram pesados e anestesiados, com injeção de tiopental intraperitoneal (40mg/kg de peso corpóreo, Sigma[®]). Procedeu-se, então, a laparotomia para remoção do ceco (limite cranial – junção íleo-cecal; limite caudal – junção ceco-cólica). Após a coleta, os segmentos intestinais foram lavados com solução salina e preparados para receberem diferentes técnicas. Os cecos de cinco animais de cada grupo foram submetidos às técnicas histoquímicas de NADH-diaforase (NADH-d) e NADPH-diaforase (NADPH-d) positiva, para a avaliação comparativa do número e da área dos neurônios reativos a cada técnica, entre as diferentes regiões e porções do ceco e entre os diferentes grupos, conforme se segue.

4.2.5 Técnicas Histoquímicas

Para receber as diferentes técnicas, os cecos foram lavados com solução de Krebs¹ (pH 7.3); tiveram uma das extremidades (junção íleo-cecal) ligada; com auxílio de uma seringa, foram preenchidos, completamente, com a mesma solução, tendo a extremidade oposta (junção ceco-cólica) ligada, formando, assim, uma “vesícula” repleta com a solução. Este material passou, então, por duas lavagens em solução de Krebs (10 minutos/cada), e foi permeabilizado com esta solução, acrescida de Triton X-100² a 0,3%, dissolvido em tampão fosfato de sódio (PBS), pH 7.3, onde permaneceu por tempo variável de acordo com a técnica empregada.

4.2.5.1 Técnica histoquímica de NADH-diaforase (GABELLA, 1969)

Para a técnica de NADH-d, cinco cecos de cada grupo permaneceram em solução de permeabilização por 5 minutos. Após este período, foram lavados duas vezes (10 minutos/cada) em Krebs, sendo incubados no seguinte meio de reação: 25 ml de solução estoque de Nitro Blue Tetrazolium (NBT³, solução estoque na concentração de 0,5 mg/ml); 25 ml de tampão fosfato de sódio³ (0,1 M), pH 7.3; 50 ml de água destilada e 0,05 g de β -NADH³.

O desenvolvimento da reação foi controlado visualmente, com o auxílio do estereomicroscópio (Tecnival[®]). A incubação durou, em média, 45 minutos. A seguir, os cecos foram abertos e fixados em solução de formaldeído a 10%, em tampão fosfato de sódio³ (0,1M), pH 7.3, na qual permaneceram até dissecação.

4.2.5.2 Técnica histoquímica de NADPH-diaforase (SCHERER-SINGLER et al., 1983)

Cinco cecos de cada grupo foram permeabilizados durante 10 minutos. Após, receberam então, mais duas lavagens (10 minutos/cada), em salina tamponada fosfatada

¹ Solução de Krebs: 1,3g de NaHCO₃¹; 0,24g de MgCl₂.6H₂O¹; 0,44g de KCl¹; 0,165g de NaH₂PO₂¹; 7,05g de NaCl¹; 0,27g de CaCl₂¹, em um litro de água destilada.

² Sigma[®]

³ Sinth[®]

(PBS), para posterior incubação em meio de reação constituída por: Nitro Blue Tetrazolium (NBT)³ (0,25 mg/ml); β -NADPH³ (0,5 mg/ml), e Triton X-100³ 0,3%, em tampão Tris-HCl³ (0,1 M), pH 7.6.

O desenvolvimento da reação foi controlado visualmente, com o auxílio do estereomicroscópio (Tecnival[®]), tendo ocorrido em, aproximadamente, duas horas. Os cecos foram, então, abertos, longitudinalmente ao seu eixo maior, e imersos em solução de formaldeído a 4%, para fixação e armazenagem.

4.2.6 Obtenção dos preparados de membrana

Para a avaliação do número e da área de perfil neuronal, o material foi dissecado, obtendo-se o “preparado de membrana”, permitindo a exposição do plexo mioentérico, disposto entre os estratos longitudinal e circular da túnica muscular, como segue.

Após fixação, iniciou-se a microdissecação, sob estereomicroscópio (Tecnival[®]), com transiluminação (aumento: 4x), com o auxílio de pinças e tesouras apropriadas, removendo-se a túnica mucosa e tela submucosa, com o cuidado de preservar as túnicas musculares, com o plexo mioentérico. Os preparados foram posicionados sobre a lâmina; receberam glicerina⁴ tamponada em tampão fosfato de sódio³, e foram cobertos com lamínula, completando a vedação com esmalte.

4.2.7 Análise quantitativa

Para a análise quantitativa dos neurônios, a face ventral do ceco (Figura 2a) foi dividida em regiões apical e basal (Figura 2b), e cada uma delas em três porções (Figura 2c), a saber: apical mesentérica (AM); apical intermediária (AI); apical antimesentérica (AA); próximo à ampola cecal (PA); basal intermediária (BI), e basal antimesentérica (BA) (SEYFERT, 2003).

Figura 2 - Desenho esquemático do ceco, íleo (I) e colon ascendente adjacentes (C), na sua face ventral 2(a), indicando as diferentes regiões e porções estudadas; 2b. Regiões apical e basal; 2c. Porções do ceco: AM (apical mesentérica); AI (apical intermediária); AA (apical antimesentérica); PA (próxima à ampola cecal); BI (basal intermediária), e BA (basal antimesentérica)

Em cada porção, foram quantificados 40 campos microscópicos, perfazendo um total de 240 campos em ambas as regiões. A área de cada campo microscópico, aferida com régua micrometrada Olympus^{®4}, objetiva de 40x e ocular de 10x, foi de 0,424 mm², totalizando 16,98 mm² nos 40 campos estudados.

Em cada porção, os neurônios reativos foram contados nos 40 campos pretendidos, obedecendo a uma proporção de 1:3 campos, ou seja, um campo era contado e três ignorados, contando-se o seguinte. Todos os neurônios do campo foram contados, sendo que os meios neurônios eram computados alternadamente (contava-se o meio neurônio de um campo e desprezava-se o do campo seguinte).

Os preparados foram avaliados sob microscópio Olympus BX-40 F4, com objetiva de 40x e ocular de 10x.

No canto superior direito de cada figura com imagem neuronal apresentamos um desenho esquemático que indica a porção estudada.

⁴B – 0550, Short Desc OBM 1/100. Tokyo, Item. Ax 0001

4.2.8 Análise morfométrica

A mensuração dos neurônios foi feita em microscópio Olympus U-KPA, model BX50F-3 (objetiva de 40x e ocular de 10x), acoplado a uma câmara digital 3CCD Pro-series, por meio do programa Image Pro Plus V.4.5.1 (Media Cybernetics). O equipamento foi calibrado utilizando uma régua micrometrada Olympus® (B – 0550, Short Desc OBM 1/100. Tokyo, Item. Ax 0001). Cada campo capturado correspondeu a $10.913 \mu\text{m}^2$.

As imagens foram, aleatoriamente, capturadas a partir da porção antimesentérica, em direção à mesentérica, seguindo o trajeto do mesmo gânglio, até completar 35 neurônios em cada porção, totalizando 105 neurônios por região. As imagens foram armazenadas em Cd-rom para posterior análise.

Para a mensuração da área dos neurônios utilizou-se o mesmo programa (Image Pro Plus V.4.5.1, Media Cybernetics) (Figura 3), instalado em um computador (Pentium® IV 2.6, 512MB, HD 80GB). Mensurou-se a área de 100 neurônios de cada região, englobando as três porções, totalizando 200 corpos celulares por ceco. Os neurônios foram agrupados em classes com intervalos de $100 \mu\text{m}^2$ de área neuronal (BARBOSA, 1973; GABELLA, 1971; SANTER; BAKER, 1988).

Figura 3 – Demonstração da mensuração da área do perfil do corpo celular de um neurônio NADPH-diaforase positivo, a partir do programa Image Pro Plus.

4.2.9 Análise estatística

Para análise dos resultados aplicamos os seguintes testes estatísticos: 1, teste t de Student, com a finalidade de comparar as médias do peso corporal/mês (em gramas); média da velocidade máxima (Km/h) obtida nos testes de esforço máximo/mês, dos animais G-12^S e G-12^T, e médias da mensuração dos pares, considerando as variáveis (A6, A12S, A12T, B6, B12S e B12T), e 2. Análise de variância não-paramétrica, teste de Friedman, para comparar o número total de neurônios reativos da região apical e da basal nos diferentes grupos e entre eles, e comparações múltiplas (duas a duas) para verificar, entre os números das diferentes porções das regiões apical (AA x AI; AI x AM; AA x AM) e basal (BA x BI; BA x PA; BI x PA), quais podem ser considerados estatisticamente diferentes. Todas as análises por este teste foram realizadas, em cada grupo, para as técnicas de NADH-d e de NADPH-d, entre os grupos, e entre as duas técnicas (Quadros 1-6). Para as análises foi utilizado o programa estatístico STATISTICA versão 7.0⁵. Em ambos os testes estatísticos, fixamos em 0,05 ou 5% ($\alpha \leq 0,05$) o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

Quadro 1 - Comparações do número de neurônios reativos às diferentes técnicas histoquímicas, realizadas nas diferentes porções da região apical do ceco

G-6	G-12^S	G-12^T
AA ⁶ x AI ⁶	AA ^S x AI ^S	AA ^T x AI ^T
AI ⁶ x AM ⁶	AI ^S x AM ^S	AI ^T x AM ^T
AA ⁶ x AM ⁶	AA ^S x AM ^S	AA ^T x AM ^T

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica. Indicação sobrescrita, representando: ⁶: G-6; ^S: G-12^S; ^T: G-12^T

⁵ StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com.

Quadro 2 - Comparações do número de neurônios reativos às diferentes técnicas histoquímicas, realizadas nas diferentes porções da região basal do ceco

<i>G-6</i>	<i>G-12^S</i>	<i>G-12^T</i>
BA ⁶ x BI ⁶	BA ^S x BI ^S	BA ^T x BI ^T
BI ⁶ x PA ⁶	BI ^S x PA ^S	BI ^T x PA ^T
BA ⁶ x PA ⁶	BA ^S x PA ^S	BA ^T x PA ^T

BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal. Indicação sobrescrita, representando: ⁶: G-6; ^S: G-12^S; ^T: G-12^T

Quadro 3 - Comparações múltiplas, do número de neurônios reativos às diferentes técnicas histoquímicas, entre as várias porções da região apical do ceco dos diferentes grupos

<i>G-6 e G-12^S</i>	<i>G-6 e G-12^T</i>	<i>G-12^S e G-12^T</i>
AA ⁶ x AA ^S	AA ⁶ x AA ^T	AA ^S x AA ^T
AI ⁶ x AI ^S	AI ⁶ x AI ^T	AI ^S x AI ^T
AM ⁶ x AM ^S	AM ⁶ x AM ^T	AM ^S x AM ^T

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica. Indicação sobrescrita, representando: ⁶: G-6; ^S: G-12^S; ^T: G-12^T

Quadro 4 - Comparações múltiplas, do número de neurônios reativos às diferentes técnicas histoquímicas, entre as várias porções da região basal do ceco dos diferentes grupos

<i>G-6 e G-12^S</i>	<i>G-6 e G-12^T</i>	<i>G-6 e G-12^S</i>
BA ^{G-6} x BA ^{G-12S}	BA ^{G-6} x BA ^{G-12T}	BA ^{G-12S} x BA ^{G-12T}
BI ^{G-6} x BI ^{G-12S}	BI ^{G-6} x BI ^{G-12T}	BI ^{G-12S} x BI ^{G-12T}
PA ^{G-6} x PA ^{G-12S}	PA ^{G-6} x PA ^{G-12T}	PA ^{G-12S} x PA ^{G-12T}

BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal. Indicação sobrescrita, representando: ⁶: G-6; ^S: G-12^S; ^T: G-12^T

Quadro 5 - Comparações do número total de neurônios reativos às diferentes técnicas histoquímicas, realizadas entre as regiões apical e basal do ceco

<i>G-6</i>	<i>G-12^S</i>	<i>G-12^T</i>
Total região apical ⁶ x total região basal ⁶	Total região apical ^S x total região basal ^S	Total região apical ^T x total região basal ^T

Indicação sobrescrita, representando: ⁶: G-6; ^S: G-12^S; ^T: G-12^T

Quadro 6 - Comparações múltiplas, do número total de neurônios reativos às diferentes técnicas histoquímicas, entre as regiões apical e basal do ceco nos diferentes grupos

<i>G-6 e G-12^S</i>	<i>G-6 e G-12^T</i>	<i>G-12^S e G-12^T</i>
Total região apical ⁶ x total região apical ^S	Total região apical ⁶ x total região apical ^T	Total região apical ^S x total região apical ^T
Total região basal ⁶ x total região basal ^S	Total Região basal ⁶ x total região basal ^T	Total Região basal ^S x total região basal ^T

Indicação sobrescrita, representando: ⁶: G-6; ^S: G-12^S; ^T: G-12^T

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos estão descritos nos itens deste capítulo.

5.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O treinamento aumentou a média da velocidade máxima no grupo G-12^T (Figura 4).

Figura 4 - Animais sedentários (G-12^S) e treinados (G-12^T) segundo a média da velocidade máxima (Km/h), obtida nos sete testes de esforço máximo. São Paulo, SP, 2006.
*letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos

5.2 PESAGEM

A atividade física promoveu perda de peso corporal nos animais do grupo G-12^T, a partir do quarto mês após o início da mesma (Tabela 1).

Tabela 1 - Ratos dos grupos G-6, sedentários (G-12^S) e treinados (G-12^T), segundo as médias de peso corporal (em gramas) obtidas nas aferições mensais - São Paulo - 2006

Grupo	Peso (em gramas)/aferição/mês						
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a
G-6 [*] (n=10)	-	-	-	-	-	-	439.5±13.1a
G-12 ^S (n=10)	421±9.1a	446.2±9.2a	465.4±8.9a	483.4±9.5a	497.2±9.6a	505.4±10.3a	488±11.6b
G-12 ^T (n=10)	421.3±7.9a	431.9±7.0a	449.7±7.7a	461.2±7.7a	472.2±7.6b	478.5±8.8b	468.5±9.9ab

Letras iguais indicam na coluna que não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos, pelo teste t de Student. *Pesagem única

5.3 ARRANJO DO PLEXO MIOENTÉRICO

Os neurônios reativos a NADH-d e NADPH-d estavam dispostos entre os estratos circular e longitudinal da túnica muscular do ceco, isolados ou organizados em gânglios (Figura 5), com predomínio deste último. Os gânglios eram, na sua maioria, alongados, com seu maior eixo acompanhando a direção do estrato circular, e estavam conectados uns aos outros por feixes nervosos de diferentes espessuras (feixes primários, secundários, feixes terciários) e estes interconectados, formando uma rede nervosa (Figura 6).

Figura 5 - Micrografia do ceco de rato, com 12 meses de idade, treinado (G-12^T), evidenciando neurônios NADH-d reativos na região apical, localizados em gânglios (seta escura) e isolados (seta clara). (Aumento original: 100X)

Figura 6 - Micrografia do ceco de rato, com 6 meses de idade (G-6), evidenciando feixes de fibras nervosas de diferentes espessuras – primários (seta clara); secundários (seta escura) e terciários (ponta de seta), na porção intermediária da região basal do ceco. Técnica: NADPH-d (Aumento original: 40X)

5.3.1 Neurônios NADH-d reativos

Em geral, a rede de neurônios reativos à NADH-d apresentava feixes nervosos pouco evidentes, não sendo possível identificar um arranjo em particular. Os gânglios mostravam-se espaçados entre si, conectados por feixes delicados. Contudo, na porção mesentérica e naquela próxima à ampola cecal, os feixes eram mais espessos, organizando-se de modo a formar malhas, predominantemente, ovaladas e retangulares (Figura 7).

Os neurônios NADH-d reativos apresentaram diferentes formas (em gota, oval, redonda, alongada, e triangular), predominando a forma de gota, com núcleo central ou periférico (Figura 8).

Figura 7 - Micrografia do ceco de rato, com 6 meses de idade (G-6), evidenciando as diferentes conformações das malhas de feixes nervosos, na porção próxima à ampola cecal. Técnica NADH-d. (Aumento original: 20X)

Figura 8 - Micrografia da região apical do ceco de rato, 12 meses de idade (G-12^S), evidenciando neurônios NADH-d reativos, predominantemente, em forma gota, no trajeto dos feixes de fibras nervosas. Note a disposição dos núcleos das células. (Aumento original: 100X)

5.3.2 Neurônios NADPH-d reativos

A técnica de NADPH-d mostrou feixes espessos formando um denso plexo nervoso nas porções apical mesentérica e próxima à ampola cecal (Figura 9), e feixes mais delgados nas porções intermediárias e antimesentéricas (Figura 6). As malhas formadas por esses plexos nervosos apresentavam formas variadas – piriformes, quadradas, arredondadas, ovaladas, retangulares, triangulares, etc. Na porção próxima à ampola cecal, os gânglios estavam mais próximos entre si, predominando o aspecto arredondado das malhas.

A forma e o tamanho dos neurônios NADPH-d reativos variaram. A maioria apresentou formato alongado (Figura 10a), com núcleo, predominantemente, arredondado e disposto periféricamente. Foram, também, identificados neurônios triangulares, com núcleo periférico; neurônios arredondados, em forma de gota e estrelados, com núcleo central (Figura 10b).

Figura 9 - Micrografia do ceco de rato com 6 meses de idade (G-6). Note espessos feixes de fibras nervosas na porção próxima à ampola cecal. Técnica: NADPH-d (Aumento original: 40X)

Figura 10 - Micrografia do ceco de ratos demonstrando diferentes formas de neurônios NADPH-d reativos. 10a. região apical de animal do grupo G-12^s - neurônio alongado, com núcleo disposto perifericamente; 10b. região basal de G-6 - neurônio estrelado (seta) e em forma de gota (ponta de seta). (Aumento original: 400X)

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS

O número de neurônios NADH-d foi maior do que o de NADPH-d em todas as porções, de ambas as regiões, de todos os grupos estudados (Tabelas 2-4; Quadros 7-11).

5.4.1 Neurônios NADH-diaforase reativos

O número de neurônios NADH-d reativos diferiu nas diferentes porções das regiões apical e basal em todos os grupos (G-6, G-12^S, G-12^T) (Tabelas 2 a 4), não se mostrando significativa no grupo G-6, somente, na comparação entre as porções basal antimesentérica e basal intermediária (Quadro 7).

Nos animais com 12 meses de idade, sedentários (G-12^S) e naqueles treinados (G-12^T), não houve diferença significativa entre as diferentes porções da região apical. Nestes grupos, a porção intermediária da região basal apresentou maior número de neurônios do que a intermediária da mesma região. O número total de neurônios NADH-d reativos foi maior na região basal do que na apical nestes grupos (Quadros 8 e 9).

Tabela 2 - Ratos Wistar com seis meses de idade (G-6), segundo o número de neurônios NADH-d, nas diferentes porções do ceco - São Paulo - 2006

NÚMERO DE OBSERVAÇÃO	AA	AI	AM	BA	BI	PA
II	3.171	3.523	4.082	4.068	3.314	3.205
III	1.326	1.848	2.158	2.983	3.863	3.593
IV	1.721	3.108	3.674	3.670	3.729	4.111
I	2.150	1.972	3.764	2.747	4.522	5.089
V	2.092	2.613	3.419	3.367	3.857	3.999
TOTAL	10.460	13.064	17.097	16.835	19.285	19.997

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal

Quadro 7 - Análise comparativa do número de neurônios NADH-d reativos, entre as diferentes regiões e porções do ceco, segundo teste de Friedman, nos animais do grupo G-6 (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006

AA x AI	*	BA x BI		AA x BA	*
AA x AM	*	BA x PA	*	AI x BI	*
AI x AM	*	BI x PA	*	AM X PA	*
APICAL TOTAL X BASAL TOTAL					*

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal

Tabela 3 - Ratos Wistar com 12 meses de idade, sedentários (G-12^S), segundo o número de neurônios NADH-d, nas diferentes porções do ceco - São Paulo - 2006

NÚMERO DE OBSERVAÇÃO	AA	AI	AM	BA	BI	PA
18	907	1.025	1.148	1.173	1.890	3.107
28	896	1.150	1.200	1.638	1827	1.855
43	543	571	729	1.100	2.055	1.958
05	3.046	3.427	3.205	2.982	2.752	3.687
40	1.325	1.068	1.018	2.033	1.733	2.573
TOTAL	6.717	7.241	7.300	8.926	10.257	13.180

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal

Quadro 8 - Análise comparativa do número de neurônios NADH-d reativos, entre as diferentes regiões e porções do ceco, segundo teste de Friedman, nos animais do grupo G-12^S (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006

AA x AI		BA x BI	*	AA x BA	*
AA x AM		BA x PA		AI x BI	*
AI x AM		BI x PA		AM X PA	*
APICAL TOTAL X BASAL TOTAL					*

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal

Tabela 4 - Ratos Wistar com 12 meses de idade, treinados (G-12^T), segundo o número de neurônios NADH-d, nas diferentes porções do ceco - São Paulo - 2006

NÚMERO DE OBSERVAÇÃO	AA	AI	AM	BA	BI	PA
65	2.475	1.706	1.208	1.993	1.907	1.351
08	3.385	3.529	3.171	3.445	5.265	5.359
51	3.325	4.033	3.310	3.194	3.653	4.668
64	1.628	1.643	1.493	2.598	2.949	2.596
12	2.094	1.908	1.763	3.380	3.214	2.359
TOTAL	12.907	12.819	10.945	14.610	16.988	16.333

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal

Quadro 9 - Análise comparativa do número de neurônios NADH-d reativos, entre as diferentes regiões e porções do ceco, segundo teste de Friedman, nos animais do grupo G-12^T (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006

AA x AI		BA x BI	*	AA x BA	*
AA x AM		BA x PA		AI x BI	*
AI x AM		BI x PA		AM X PA	*
APICAL TOTAL X BASAL TOTAL					*

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal

Quadro 10 - Comparação do número de neurônios NADH-d reativos, segundo teste de Friedman, nas diferentes regiões e porções do ceco, entre os animais dos grupos G-6 e G-12^S (a) e G-6 e G-12^T (b) (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006

(a) G-6 e G-12 ^S				(b) G-6 e G-12 ^T			
AA ⁶ x AA ^S		BA ⁶ x BA ^S	*	AA ⁶ x AA ^T	*	BA ⁶ x BA ^T	
AI ⁶ x AI ^S	*	BI ⁶ x BI ^S	*	AI ⁶ x AI ^T	*	BI ⁶ x BI ^T	
AM ⁶ x AM ^S	*	PA ⁶ x PA ^S	*	AM ⁶ x AM ^T	*	PA ⁶ x PA ^T	*
APICAL TOTAL ⁶ X APICAL TOTAL ^S			*	APICAL TOTAL ⁶ X APICAL TOTAL ^T			
BASAL TOTAL ⁶ X BASAL TOTAL ^S				BASAL TOTAL ⁶ X BASAL TOTAL ^T			*

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal. ⁽⁶⁾ Animais do grupo G-6; ^(S) animais do grupo G-12^S

Quadro 11 - Comparação do número de neurônios NADH-d reativos, segundo teste de Friedman, nas diferentes regiões e porções do ceco, entre os animais dos grupos G-12^S e G-12^T (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006

AA ^S x AA ^T	*	BA ^S x BA ^T	*
AI ^S x AI ^T	*	BI ^S x BI ^T	*
AM ^S x AM ^T	*	PA ^S x PA ^T	
APICAL TOTAL ^S x APICAL TOTAL ^T			*
BASAL TOTAL ^S x BASAL TOTAL ^T			

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal. ^(S) Animais do grupo G-12^S; ^(T)animais do grupo G-12^T

5.4.2 Neurônios NADPH-diaforase reativos

As diferentes porções das regiões apical e basal diferiram quanto ao número de neurônios NADPH-d reativos, em todos os grupos estudados (G-6, G-12^S, G-12^T) (Tabelas 5-7).

O confronto comparativo dos resultados obtidos, segundo o teste de Friedman, para as regiões apical e basal nos diferentes grupos são apresentados nos quadros 12 a 16.

Tabela 5 - Ratos Wistar com seis meses de idade (G-6), segundo o número de neurônios NADPH-d reativos, nas diferentes porções do ceco - São Paulo - 2006

NÚMERO DE OBSERVAÇÃO	AA	AI	AM	BA	BI	PA
I	176	180	289	218	290	533
III	209	197	215	115	158	307
II	86	104	134	145	248	298
IV	66	130	107	77	111	320
V	64	109	150	82	124	219
TOTAL	601	720	895	637	931	1.677

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal

Tabela 6 - Ratos Wistar com 12 meses de idade, sedentários (G-12^S), segundo o número de neurônios NADPH-d reativos, nas diferentes porções do ceco - São Paulo - 2006

NÚMERO DE OBSERVAÇÃO	AA	AI	AM	BA	BI	PA
42	112	167	176	108	155	197
06	123	141	188	128	162	278
26	95	115	112	105	155	329
22	147	121	141	122	131	214
30	146	179	215	106	152	263
TOTAL	623	723	832	569	755	1.281

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal

Tabela 7 - Ratos Wistar com 12 meses de idade, treinados (G-12^T), segundo o número de neurônios NADPH-d reativos, nas diferentes porções do ceco - São Paulo - 2006

NÚMERO DE OBSERVAÇÃO	AA	AI	AM	BA	BI	PA
55	61	55	93	89	123	232
71	106	88	118	90	140	126
20	118	193	189	162	182	321
24	85	103	118	71	66	98
48	94	105	104	68	192	240
TOTAL	464	544	622	480	703	1.017

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal

Quadro 12 - Análise comparativa do número de neurônios NADPH-d reativos, entre as diferentes regiões e porções do ceco, segundo teste de Friedman, nos animais do grupo G-6 (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006

AA x AI	*	BA x BI	*	AA x BA	*
AA x AM	*	BA x PA	*	AI x BI	*
AI x AM	*	BI x PA		AM X PA	
APICAL TOTAL X BASAL TOTAL					*

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal

Quadro 13 - Análise comparativa do número de neurônios NADPH-d reativos, entre as diferentes regiões e porções do ceco, segundo teste de Friedman, nos animais do grupo G-12^S (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006

AA x AI		BA x BI		AA x BA	*
AA x AM	*	BA x PA	*	AI x BI	*
AI x AM		BI x PA	*	AM X PA	
APICAL TOTAL X BASAL TOTAL					*

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal

Quadro 14 - Análise comparativa do número de neurônios NADPH-d reativos, entre as diferentes regiões e porções do ceco, segundo teste de Friedman, nos animais do grupo G-12^T (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006

AA x AI	*	BA x BI		AA x BA	*
AA x AM	*	BA x PA	*	AI x BI	*
AI x AM		BI x PA	*	AM X PA	
APICAL TOTAL X BASAL TOTAL					

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal

Quadro 15 - Comparação do número de neurônios NADPH-d reativos, segundo teste de Friedman, nas diferentes regiões e porções do ceco, entre os animais dos grupos G-6 e G-12^S (a) e G-6 e G-12^T (b) (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo -2006

(a) G-6 e G-12 ^S				(b) G-6 e G-12 ^T			
AA ⁶ x AA ^S		BA ⁶ x BA ^S		AA ⁶ x AA ^T	*	BA ⁶ x BA ^T	
AI ⁶ x AI ^S		BI ⁶ x BI ^S		AI ⁶ x AI ^T	*	BI ⁶ x BI ^T	
AM ⁶ x AM ^S		PA ⁶ x PA ^S		AM ⁶ x AM ^T	*	PA ⁶ x PA ^T	*
APICAL TOTAL ⁶ X APICAL TOTAL ^S				APICAL TOTAL ⁶ X APICAL TOTAL ^T			*
BASAL TOTAL ⁶ X BASAL TOTAL ^S				BASAL TOTAL ⁶ X BASAL TOTAL ^T			*

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal. ⁽⁶⁾Animais do grupo G-6; ^(S)animais do grupo G-12^S

Quadro 16 - Comparação do número de neurônios NADPH-d reativos, segundo teste de Friedman, nas diferentes regiões e porções do ceco, entre os animais dos grupos G-12^S e G-12^T (os valores significantes estão indicados por “*”) - São Paulo - 2006

AA ^S x AA ^T		BA ^S x BA ^T	
AI ^S x AI ^T	*	BI ^S x BI ^T	
AM ^S x AM ^T	*	PA ^S x PA ^T	
APICAL TOTAL ^S x APICAL TOTAL ^T			*
BASAL TOTAL ^S x BASAL TOTAL ^T			

AA: apical antimesentérica; AI: apical intermediária; AM: apical mesentérica; BA: basal antimesentérica; BI: basal intermediária; PA: próximo à ampola cecal. ^(S)Animais do grupo G-12^S, ^(T)animais do grupo G-12^T

5.5 MENSURAÇÃO NEURONAL

A área (em μm^2) dos neurônios NADH-d e NADPH-d reativos para as diferentes regiões do ceco de ratos, nos diferentes grupos, variou, respectivamente, de 56,46 a 1.497,10 μm^2 (Tabela 8) e de 99,67 a 2.440,14 μm^2 (Tabela 9),

Tabela 8 - Valores mínimo e máximo da área do perfil de neurônios NADH-diaforase reativos (em micrômetros quadrados) nas regiões apical e basal do ceco de ratos Wistar, nos grupos G-6, G-12^S e G-12^T - São Paulo - 2006

GRUPO/ REGIÃO	VALORES (em μm^2)					
	G-6		G-12 ^S		G-12 ^T	
	MIN.	MAX.	MIN.	MAX.	MIN.	MAX.
APICAL	56,46	1.128,95	86,57	1.423,05	74,78	1.276,49
BASAL	79,21	1.078,21	112,50	1.366,19	81,31	1.497,10

Tabela 9 - Valores mínimo e máximo da área do perfil de neurônios NADPH-diaforase reativos (em micrômetros quadrados) nas regiões apical e basal do ceco de ratos Wistar, nos grupos G-6, G-12^S e G-12^T - São Paulo – 2006

GRUPO/ REGIÃO	VALORES (em μm^2)					
	G-6		G-12 ^S		G-12 ^T	
	MIN.	MAX.	MIN.	MAX.	MIN.	MAX.
APICAL	155.13	2.064,02	104,91	1.547,85	99,67	2.170,12
BASAL	152.94	1.565,68	108,06	2.186,72	121,82	2.440,14

De acordo com os valores encontrados para a área do perfil neuronal das diferentes regiões do ceco, os neurônios NADH-d e NADPH-d reativos, dos três grupos, foram distribuídos em classes, com intervalo de $100 \mu\text{m}^2$. A frequência da distribuição da área dos neurônios variou com o tipo de reação histoquímica, com a região e com o grupo estudado. A maior parte dos neurônios NADH-d reativos, na região apical, encontravam-se nos intervalos de 201 e $500 \mu\text{m}^2$ em todos os grupos, e, na região basal, para G-6, de 101 e $400 \mu\text{m}^2$; G-12^S, de 201 e $500 \mu\text{m}^2$, e para G-12^T variando no intervalo de 201 - $300 \mu\text{m}^2$. Nos animais G-6 e G-12^T a maioria dos neurônios NADPH-d positivos, da região apical, estava acima de $900 \mu\text{m}^2$, e no grupo G-12^S, entre 301 e $500 \mu\text{m}^2$. Na região basal a frequência foi maior no intervalo de 301 e $500 \mu\text{m}^2$, em G-6; de 201 a $400 \mu\text{m}^2$, em G-12^S, e acima de $900 \mu\text{m}^2$ em G-12^T (Figuras 11-14).

Figura 11 - Histograma representativo da frequência de distribuição dos neurônios NADH-diaforase reativos da região apical do ceco, dos grupos controle e experimental, em classes de 100 μm^2 de área - São Paulo - 2006

Figura 12 - Histograma representativo da frequência de distribuição dos neurônios NADH-diaforase reativos da região basal do ceco, dos grupos controle e experimental, em classes de 100 μm^2 de área - São Paulo - 2006

Figura 13 - Histograma representativo da frequência de distribuição dos neurônios NADPH-diaforase reativos da região apical do ceco, dos grupos controle e experimental, em classes de 100 μm^2 de área - São Paulo - 2006

Figura 14 - Histograma representativo da frequência de distribuição dos neurônios NADPH-diaforase reativos da região basal do ceco, dos grupos controle e experimental, em classes de 100 μm^2 de área - São Paulo - 2006

A análise estatística indicou maior área do perfil de neurônios NADH-d positivos (ao nível de 0,05 de significância), na região apical do que na basal em todos os grupos estudados, sendo que os animais de 12 meses apresentaram maior área do que os de seis meses, sem diferenças significantes entre os animais de mesma idade (G-12^S e G-12^T).

Os neurônios NADPH-d reativos da região apical, nos grupos G-6 e G-12^S, foram maiores do que os da basal, não sendo detectadas diferenças entre as duas regiões dos animais G-12^T. No confronto entre os diferentes grupos, os neurônios tanto da região apical quanto da basal de G-6 e de G-12^T mostraram-se maiores do que aqueles das respectivas regiões de G-12^S. Não foi detectada diferença significativa na mensuração dos neurônios das regiões apical e basal entre G-6 e G-12^T.

6 DISCUSSÃO

A instituição de um programa de treinamento físico contribuiu para uma melhora significativa na performance dos animais. Tal afirmação baseia-se nos resultados obtidos nesta investigação científica, onde os animais (ratos) submetidos a um programa diário de treinamento com intensidade sub-máxima (60%) (grupo G-12^T), apresentaram melhora significativa ($P < 0,05$) no desempenho quando comparado com animais (ratos) sedentários (G-12^S). O desempenho observado nos animais G-12^T seguiu 3 diferentes fases: ascensão, platô e posterior declínio. Contudo, mesmo em fase de declínio o desempenho do grupo G-12^T foi melhor quando comparado com os animais do grupo G-12^S. O declínio do desempenho nos animais do grupo G-12^S pode estar associado ao envelhecimento (McARDLE, 1998).

Os animais dos grupos G-12^S e G-12^T ganharam peso, progressivamente, ao longo do período experimental, com exceção do último mês de análise. Todavia, os animais G-12^S ganharam peso mais rapidamente do que os G-12^T durante os cinco primeiros meses. A partir de então, comportaram-se de forma similar. Nossos resultados assemelham-se aos descritos para a espécie humana, na qual indivíduos com mais de 35 anos de idade que não participam de um programa diário de atividade física, independentemente do sexo, tendem a ganhar mais gordura corporal até quinta ou sexta década da vida. Após os sessenta anos de idade, o peso corporal total se reduz, apesar de um maior nível de gordura corporal (McARDLE, 1998).

Em roedores, o ceco está envolvido no processo de quebra de celulose, e absorção parcial dos produtos da digestão (OLDS; OLDS, 1991; RAYSSIGUIER; REMESY, 1977; RÉRAT, 1978), revestindo de importância o estudo deste segmento. Além disso, a particular topografia e atividade deste órgão em diferentes espécies, aliada à facilidade de obtenção e de manejo de ratos, têm levado à escolha deste animal como modelo experimental para o estudo deste segmento.

O emprego das técnicas histoquímicas de NADH-d e NADPH-d vem sendo adotado satisfatoriamente na avaliação dos neurônios do plexo mioentérico, ainda que não permitam a quantificação da população neuronal total (COSTA; FURNESS; LLEWELLYN-SMITH, 1987; GABELLA, 1979; MIRANDA-NETO et al., 2001; SANT'ANA, 1997).

Em nosso experimento, todos os neurônios estudados, em todos os grupos (G-6, G-12^S e G-12^T), estavam dispostos entre os estratos circular e longitudinal da túnica muscular do

ceco, isolados ou organizados em gânglios, com predomínio deste último. Tais disposição e arranjo têm sido descritos para diferentes espécies e segmentos do TGI (BROOKES, 2001; CASTELUCCI et al., 2002; CHRISTENSEN et al., 1984; CLEBIS, 2006; COSTA; BROOKES, 1994; FURNESS; BORNSTEIN, 1995; FURNESS; COSTA, 1987; GABELLA, 1979; GAGLIARDO, 2006; GERSHON, 1981; GERSHON; KIRCHGESSNER; WADE, 1994; GOYAL; HANANI, 2004; HIRANO, 1996; SANTER; BAKER, 1993; SCHEMANN; NEUNLIST, 2004; WADE, 2002; WADE; HORNBY, 2005; WESTER; O'BRIAIN; PURI, 1999; WOOD, 1994).

Nossos resultados demonstraram que, em geral, a rede de neurônios NADH-d e NADPH-d reativos apresentou feixes nervosos pouco evidentes, não sendo possível identificar um arranjo particular, ainda que esta última tenha apresentado feixes mais evidentes, com exceção da porção mesentérica e daquela próxima à ampola cecal. A presença de feixes espessos nessas porções é justificada por suas características – na mesentérica, os neurônios poderiam contribuir para a inervação das fibras musculares lisas da parede intestinal e do plexo vascular que a penetra (MIRANDA-NETO et al., 2001), e na porção próxima à ampola cecal o maior número de feixes é resultado da maior espessura da túnica muscular e alta atividade motora (DUPONT; JERVIS; SPRINZ, 1965; ROGER; CABANIE; FERRE, 1991; SAFFREY; BURNSTOCK, 1994; SEYFERT, 2003; SNIPES, 1981;). Observações semelhantes foram indicadas em diferentes segmentos do TGI de ratos (FREGONESI; MIRANDA-NETO; MOLINARI, 1998; GABELLA, 1979, 1989; GAGLIARDO, 2006; OLIVEIRA et al., 2002; SANT'ANA, 1997).

Observamos grande variedade na conformação dos gânglios do plexo mioentérico, em ambas as técnicas utilizadas, reiterando o descrito para este plexo, por diferentes técnicas, e em diferentes espécies (GABELLA, 1979, 1990; GAGLIARDO, 2006; HANANI, 2004; SEYFERT, 2003; ZANONI et al., 1997).

6.1 QUANTIFICAÇÃO NEURONAL

O número de neurônios reativos a NADH-d e NADPH-d diferiu entre as diferentes porções e regiões do ceco, particularmente nos animais mais jovens (seis meses), ressaltando a importância da escolha precisa da porção a ser estudada em pesquisas envolvendo o ceco de ratos. De fato, poucos trabalhos sobre a avaliação do número de neurônios mioentéricos no

TGI, particularmente nos segmentos saculares, distinguem a região de coleta de material (MOLINARI et al., 2002; PENG et al., 2001; SEYFET, 2003). Diferenças na densidade neuronal do plexo mioentérico de um mesmo segmento intestinal foram também encontradas no intestino grosso de cobaias (IRWIN, 1931 *apud* GABELLA, 1971, p. 81-95⁶), no colon de ratos (BARBOSA, 1973); no intestino delgado de ratos (SANTER, 1994); no íleo de galinha (ALI; McLELLAND, 1979) e de ratos (MIRANDA-NETO et al., 2001), na região média do intestino de ratos (SANTER, 1994), no esôfago de indivíduos humanos (De SOUZA, CARVALHO; FUJIMURA, 1988). Em cobaias, a proporção relativa dos neurônios mioentéricos NADPH-d positivos é mais alta no esôfago (54-69%) (FURNESS et al., 1994; MORIKAWA; KOMURO, 1998) que no estômago (21%), intestino delgado (12-19%) e cólon (25%) (FURNESS et al., 1994). Os resultados de Wu et al. (2003) indicam que aproximadamente $\frac{3}{4}$ (64-89%) dos neurônios mioentéricos do esôfago de ratos jovens e idosos são NADPH-d positivos. Esta proporção é alta, quando comparada com outros resultados encontrados em outras partes do trato gastrointestinal: 29-38% no estômago (TIMMERMANS; ADRIAENSEN; LEFEBVRE, 1999), 28% no duodeno (JARVINEN et al., 1999), 15-27% no íleo (BELAI; COOPER; BURNSTOCK, 1995; COWEN et al., 2000; CRACCO; FILOGAMO, 1994) e 12-57% no cólon (MATINI; MAYER; FAUSSONE-PELLEGRINI, 1997; NICHOLS; STAINES; KRANTIS, 1993). Ressalte-se que a falta da indicação precisa do local de coleta do material pode comprometer, sobremaneira, a análise dos resultados e, especificamente, o confronto com a literatura pertinente.

6.1.1 Quantificação de neurônios NADH-diaforase positivos reativos

O número de neurônios NADH-diaforase positivos (NADH-d) do plexo mioentérico, nos animais de seis meses, foi maior do que nos de doze meses sedentários em todas as porções das regiões apical e basal, com exceção da apical antimensentérica. Tal observação vem de encontro com os relatos de diminuição do número total de neurônios deste plexo, no TGI de diversas espécies, com a idade, avaliado por diferentes técnicas (CLEBIS, 2006; COWEN et al., 2000; De SOUZA et al., 1993; EL-SALHY; SANDSTRÖM; HOLMLUND, 1999; GABELLA, 1971, 1989; GOMES; De SOUZA; LIBERTI, 1997; MECIANO et al. 1995; SANTER; BAKER, 1988; ZANONI et al., 1997). Cowen et al. (2000) indicaram os

neurônios do contorno antimesentérico do íleo como menos susceptíveis a perdas neuronais com a idade, concordando com nossas observações. Gagliardo (2006), entretanto, não encontrou diferença significativa entre os números de neurônios reativos à NADH-d, no cólon de animais de seis e doze meses de idade.

Tem sido relatada a perda neuronal no intestino delgado e grosso de ratos idosos (SANTER; BAKER, 1988), com evidências histoquímicas (BAKER; SANTER, 1988; SANTER, 1979) e farmacológicas (BAKER; WATSON; SANTER, 1991) para uma marcada redução na inervação simpática do intestino, e também evidências imunohistoquímicas para a redução no número de axônios peptidérgicos, originados de neurônios mioentéricos em ratos idosos (FEHER; PENZES, 1987).

Os animais com 12 meses de idade, submetidos à atividade física, apresentaram maior número de neurônios NADH-d do que os animais sedentários, com a mesma idade, em todas as porções do ceco, excetuando-se a porção próxima à ampola cecal. Também o número total de neurônios na região apical foi maior nos animais treinados, o que não ocorreu na região basal. Isso pode ser esperado diante do maior número de neurônios na porção PA, a qual não mostrou diferença significativa entre os grupos. Ainda que o número de neurônios dos animais de seis meses e daqueles do grupo G-12^T tenha diferido em todas as porções da região apical e naquela próxima à ampola cecal na região basal, o confronto dos resultados ora apresentados sugerem que a atividade física moderada teve efeito benéfico sobre a população neuronal NADH-d positiva.

De fato, pesquisas têm indicado aumento na permeabilidade dos vasos sangüíneos no SNC, induzido pela atividade física (BLACK et al., 1990; ISAACS et al., 1992; KLEIM; COOPER; VANDENBERG, 2002; LATERRA; GUERIN; GOLDSTEIN, 1990) e a angiogênese estriatal e cortical (DING et al., 2003, 2004). Li et al. (2005) convalidaram em ratos treinados a angiogênese assim como a astrocitose no córtex frontoparietal e estriato dorsolateral. van Praag et al. (1999) afirmaram que a atividade física pode aumentar o número de novas células no hipocampo, por estimular a neurogênese. Com as técnicas empregadas não podemos apontar a “neurogênese” como responsável pelo número de neurônios nos animais treinados. Contudo, considerando que a técnica NADH-d marca neurônios metabolicamente ativos (MIRANDA-NETO et al., 2001), inferimos que nossos resultados poderiam estar refletindo um processo de angiogênese, o que contribuiria para satisfazer o

⁶IRWIN, D. A. The anatomy of the Auerbach's plexus. **The American Journal of Anatomy**, Baltimore, v. 49, p. 141-166, 1931.

aumento das demandas de oxigênio e de glicose, necessário para uma maior atividade neuronal (ISAACS et al., 1992; VISSING; ANDERSEN; DIEMER, 1996).

6.1.2 Quantificação de neurônios NADPH-diaforase positivos reativos

Utilizamos em nosso experimento a técnica histoquímica de NADPH-diaforase positiva (NADPH-d), porque esta indica aqueles neurônios que expressam evidências à enzima óxido nítrico sintase (TOOLE; BELAI; BURNSTOCK, 1998; YOUNG et al., 1992). Nestes neurônios, o óxido nítrico, um importante neurotransmissor inibitório sintetizado e liberado por neurônios nitrérgicos do sistema nervoso entérico (GERSHON; KIRCHGESSNER; WADE, 1994), é formado como um subproduto da conversão da L-arginina para L-citrulina que é catalizada pela enzima óxido nítrico sintase (BELAI; COOPER; BURNSTOCK, 1995).

O teste de Friedman indicou diferenças significantes (p -valor $< 5\%$) no número de neurônios NADPH-d reativos, nos animais de seis meses de idade, entre as diferentes porções de ambas as regiões, com exceção das porções intermediária e próxima à ampola cecal, na região basal. O confronto entre os grupos G-6 e G-12^S não indicou significância em nenhuma das comparações, indicando não haver alteração na população de neurônios NADPH-d reativos no ceco de ratos submetidos ao protocolo utilizado neste trabalho. Ainda que a redução no número de neurônios mioentéricos seja esperada em modelos experimentais de envelhecimento (GABELLA, 1989; JOHNSON et al., 1998; SANTER; BAKER, 1988; SANTER, 1994), alguns autores sugeriram que os neurônios ON são poupados no processo de envelhecimento do SNE (SANTER, 1988; 1994; JOHNSON et al., 1998; COWEN et al., 2000; WU et al., 2003), os quais poderiam ter importante papel na promoção do desenvolvimento e sobrevivência de neurônios centrais e periféricos (CIANI et al., 2002; KEILHOFF; FANSA WOLF, 2002; SANDGREN et al., 2002; SERFOZO; ELEKES, 2002), além de papel protetor sobre os neurônios mioentéricos do esôfago de ratos (Wu et al., 2003) como resultado do efeito protetor do óxido nítrico (KEILHOFF; FANSA WOLF, 2002; SANDGREN et al. 2002; SERFOZO; ELEKES, 2002).

Todavia, outros autores indicaram diminuição do número de neurônios nitrérgicos no plexo mioentérico (TAKAHASHI et al., 2000; WADE et al., 2003) de diversos segmentos intestinais, em diferentes espécies: no jejuno e cólon de indivíduos humanos

(TIMMERMANS et al., 1994); na região proventricular do estômago de ratos (TIMMERMANS; ADRIAENSEN; LEFEBVRE, 1999); no apêndice cecal em humanos (HANANI, 2004); no jejuno (CLEBIS, 2006) e cólon (GAGLIARDO, 2006) de ratos. Como o indicado para o jejuno (CLEBIS, 2006), notamos, entre os grupos G-6 e G-12^T, redução no número de neurônios nos animais mais velhos, exceto nas porções basal antimesentérica e intermediária, ainda que no cômputo geral desta região (basal total) tenha ocorrido redução. Entre animais da mesma idade, sedentários e tratados, encontramos números significativamente reduzidos de neurônios somente nas porções apical intermediária e mesentérica e na região apical como um todo. Essas análises estatísticas podem ser indicativas de perda de neurônios ON na região apical do ceco de animais submetidos à atividade física moderada. A diminuição desses neurônios inibitórios poderia ser um dos fatores responsáveis pela maior motilidade intestinal, observada em indivíduos submetidos à atividade física (EVANS et al., 1998; MESHKINPOUR; KEMP; FAIRSHTER, 1989; MITSUI et al., 2003; OETTLE, 1991; PETERS et al., 2001).

6.2 ÁREA DO PERFIL NEURONAL

A área do perfil dos neurônios NADH-d e NADPH-d reativos foi maior na região apical do que na basal em todos os grupos estudados, com exceção dos neurônios NADPH-d dos animais G-12^T.

É fato que várias formas podem ser adotadas para a classificação do tamanho de neurônios do plexo mioentérico (FURLAN, 2000). Mais habitualmente a classificação ocorre, de forma genérica, em neurônios pequenos, médios e grandes, ou pela metodologia adotada neste trabalho, baseada na distribuição dos neurônios em classes de intervalo em $100\mu\text{m}^2$, de acordo com o tamanho da área do perfil celular neuronal. A classificação em pequenos, médios e grandes, no entanto, é, relativamente, “subjativa” uma vez que diferentes autores referem parâmetros diversos – Burnstock (1959) categorizaram como células nervosas pequenas aquelas com 10-15 μm de diâmetro; Gabriel; Halasy; Csoknya (1988) empregaram a multiplicação dos eixos longitudinal e transversal do corpo celular dos neurônios; Fregonesi; Miranda-Neto; Molinari (1998) e Stabille; Lima; Germano (1998) determinaram os tamanhos neuronais de acordo com a soma desses eixos; Miranda-Neto et al. (2005) e Natali et al. (2005) classificaram os neurônios baseados na média e desvio padrão da área do perfil do corpo celular, e ainda outros autores como Gabella (1971), GABRIEL; BENEDECZKY;

CSOKNYA, (1989) e Santer; Baker (1988) avaliam a área dos perfis dos corpos celulares neuronais.

Apesar de alguns autores terem utilizado a mesma metodologia por nós empregada (CASTELUCCI et al., 2002; MIRANDA-NETO et al., 2005; SANTER; BAKER, 1988; SEYFERT, 2003; SCHOFFEN et al., 2005; ZANONI et al., 2005), o confronto de nossos resultados ficou prejudicado, uma vez que o trabalho ora desenvolvido é bastante peculiar, não só no que diz respeito ao segmento utilizado (diferentes regiões do ceco), como na metodologia, contemplando animais de diferentes idades e condições, além da avaliação estatística.

Dupont; Jervis; Sprinz (1965) pesquisaram o ceco de 30 ratos Fisher, apenas as porções, A¹ e A, foram submetidos às técnicas de NADPH-d, para posterior mensuração. O tamanho celular foi mensurado por meio da soma dos dois maiores diâmetros perpendiculares de cada neurônio e dividido por dois. Observaram que 67% dos neurônios eram de tamanho médio (10-20 μ); neurônios “monstruosos” foram observados no ceco dos animais tratados (156,1 μ).

Zanoni et al. (1997) também realizaram medições neuronais, porém diferente do abordado por nós, contudo analisaram o ceco, de 32 ratos machos da linhagem Wistar, com 2 e 8 meses. Os neurônios corados pela técnica de Giemsa foram classificados em μ m. Os neurônios pequenos eram considerados aqueles medindo de 19.70 a 28.89; médios de 28.90 a 49.89, e grandes, acima de 49.90. Já Barbosa (1973) em estudo com colon e ceco de 10 ratos albinos adultos submetidos à técnica de Giemsa, observou que a área citoplasmática em ambos os segmentos variou entre 80 μ^2 no colon a 1.040 μ^2 no ceco em 100 neurônios/animal, porém a área citoplasmática média variou entre 180 a 520 μ^2 , 57.50% no ceco e 73.33% no colon. Apesar da metodologia de mensuração diversificada, estes autores consideraram grandes os neurônios verificados no ceco.

Nossos resultados são sugestivos de que o amadurecimento leva ao aumento da área do corpo celular dos neurônios NADH-d reativos.

7 CONCLUSÕES

Diante do que foi exposto, julgamos poder concluir que:

- 1) a arquitetura do plexo mioentérico não é afetada no processo de amadurecimento do animal, tampouco pela atividade física moderada (corrida em esteira)
- 2) o número de neurônios NADH-d e NADPH-d reativos do plexo mioentérico de ratos é distinto nas diferentes porções do ceco.
- 3) ocorrem alterações, em grau variado, no número de neurônios NADH-d e NADPH-d reativos com o amadurecimento do animal e com a atividade física moderada.
- 4) a região basal apresenta maior número de neurônios NADH-diaforse positivos do que a apical, em todos os grupos estudados (G-6, G-12^S e G-12^T)
- 5) o número de neurônios NADH-d positivos em todas as porções da região apical foi maior nos animais submetidos à atividade física moderada, comparativamente aos sedentários.
- 6) não foram observadas diferenças significativas quando são comparados o número total de neurônios NADPH-d positivos da região basal, e das suas diferentes porções, do ceco dos animais dos grupos G-12^S e G-12^T.
- 7) as médias das mensurações dos neurônios reativos a NADH-d das regiões apical e basal entre os grupos estudados (G-6, G-12^S, G-12^T), não diferiram significativamente, entre os grupos G-12^S e G-12^T, em ambas as regiões do ceco.
- 8) as médias das mensurações dos neurônios reativos a NADPH-d positivos das regiões apical e basal entre os grupos estudados (G-6, G-12^S, G-12^T), diferiram significativamente em ambas as regiões dos grupos G-6 e G-12^S; G-12^S e G-12^T; exceto entre os grupos G-6 e G-12^T, em ambas as regiões.

REFERÊNCIAS*

- ALI, H. A.; McLELLAND, J. Neuron number in the intestinal myenteric plexus of the domestic fowl (*Gallus gallus*). **Anatomy and Histology and Embryology**, v. 8, n. 3, p. 277-283, 1979.
- ALIAN, M.; GABELLA, G. Decrease and disappearance of intramural neurons in the rat bladder during post-natal development. **Neuroscience Letters**, v. 218, n. 2, p. 103-106, 1996.
- BAKER, D. M.; SANTER, R. M. A quantitative study of the effects of age on the noradrenergic innervation of Auerbach's plexus in the rat, **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 42, n. 2, p. 147-158, 1988.
- BAKER, D. M.; WATSON, S. P.; SANTER, R. M. Evidence for a decrease in sympathetic control of intestinal function in the aged rat. **Neurobiology of Aging**, v. 12, n. 4, p. 363-365, 1991.
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1991. 45-57 p.
- BARBOSA, A. J. A. Auerbach's plexus of the albino rat. I. Quantitative study of the ganglia and nerve cells in the caecum and colon. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 6, n. 5, p. 253-262, 1973.
- BELAI, A.; BURNSTOCK, G. Distribution and colocalization of nitric oxide synthase and calretinin in myenteric neurons of developing, aging, and Crohn's disease human small intestine. **Digestive Diseases Sciences**, v. 44, n. 8, p. 1579-1587, 1999.
- 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.
- BLACK, J. E.; ISAACS, K. R.; ANDERSON, B. J.; ALCANTARA, A. A.; GREENOUGH, W. T. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis in cerebellar cortex of adult rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 14, p. 5568-5572, 1990.
- BLANKE, B.; LANDECK, K. J.; MEYER, I. An exercise program for women suffering from constipation. **Fortschritte der Medizin. Originalien**, v. 199, n. 3-4, p. 99-102, 2001.
- BOND, J. H. JR; LEVITT, M. D. Fate of soluble carbohydrate in the colon of rats and man. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 57, n. 5, p. 1158-1164, 1976.
- BROOKES, S. J. H. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. **The Anatomical Record**, v. 262, p. 58-70, 2001.
- BRUNS, P.; HOOD, L. F.; SEELEY, H. W. Effects of modified starch on the microflora of the small intestine and caecum of rats. **Nutrition Reports International**, v. 15, p. 131-138, 1977.
- BURNSTOCK, G. The innervation of the gut of the brown trout (*Salmo trutta*). **The Quarterly Journal Microscopical Science**, v. 100, n. 2, p. 199-220, 1959.

* De acordo com "Diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo", 2003.

- CARVALHO FILHO, E. T.; ALENCAR, Y. M. G. Teorias do envelhecimento. In: CARVALHO FILHO, E. T.; PAPLÉO NETTO, M. Geriatria: fundamentos, clínica e terapêutica. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 1-36.
- CASTELUCCI, P.; DE SOUZA, R. R.; DE ANGELIS, R. C.; FURNESS, J. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. **Cell and Tissue Research**, v. 310, n. 1, p. 1-7, 2002.
- CHRISTENSEN, J.; STILES, M. J.; RICK, G. A.; SUTHERLAND, J. Comparative anatomy of the myenteric plexus of the distal colon in eight mammals. **Gastroenterology**, v. 86, n. 4, p. 706-713, 1984.
- CIANI, E.; GUIDI, S.; BARTESAGHI, R.; CONTESTABILE, A. Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of oxide nitric. **Journal of Neurochemistry**, v. 82, n. 5, p. 1282-1289, 2002.
- CLEBIS, N. K. **Influência da atividade física sobre o envelhecimento inicial do plexo mioentérico do jejuno em rato Wistar**. 2006. 96 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- COOKE, H. J. Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 915, p. 77-80, 2000.
- COSTA, F. A. A. M.; BROOKES, S. J. H. The enteric nervous system. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 89, n. 8, p. S129-S137, 1994.
- COSTA, M.; FURNESS, J. B.; LLEWELLYN-SMITH, I. J. **Histochemistry of the enteric nervous system. Physiology of the gastrointestinal tract**. Ed. JOHNSON, L. R. 2.ed. Raven Press: New York, 1987, p. 1-40.
- COWEN, T.; JOHNSON, R. J. R.; SOUBEYRE, V.; SANTER, R. M. Restricted diet rescues rat enteric motor neurones from age related cell death. **Gut**, v. 47, n. 5, p. 653-660, 2000.
- CRACCO, C.; FILOGAMO, G. Quantitative study of the NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons of the rat ileum. **Neuroscience**, v. 61, n. 2, p. 351-359, 1994.
- DE SOUZA, R. R.; CARVALHO, C. A. F.; FUJIMURA, I. Plexo mioentérico do esôfago humano em preparados de membrana. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 43. n. 1, p. 81-83, 1988.
- DE SOUZA, R. R.; MORATELLI, H. B.; BORGES, N.; LIBERTI, E. A. Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. **Gerontology**, v. 39, n. 4, p. 183-188, 1993.
- DING, Y. H.; LUAN, X. D.; LI, J.; RAFOLS, J. A.; GUTHINKONDA, M.; DIAZ, F. G.; DING, Y. Exercise-induced overexpression of angiogenic factors and reduction of ischemia/reperfusion injury in stroke. **Current Neurovascular Research**, v. 1, n. 5, p. 411-420, 2004a.
- DONOWITZ, M.; BINDER, H. Mechanism of fluid and electrolyte secretion in the germ-free rat cecum. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 24, n. 7, p. 551-559, 1979.

- DUPONT, J. R.; JERVIS, H. R.; SPRINZ, H. Auerbach's plexus of the rat cecum in relation to the germfree state. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 125, n. 1, p. 11-18, 1965.
- EL-SALHY, M.; SANDSTRÖM, O.; HOLMLUND, F. Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 107, n. 1, p. 93-103, 1999.
- EVANS, J. M.; FLEMING, K. C.; TALLEY, N. J.; SCHLECK, C. D.; ZINSMEISTER, A. R.; MELTON, L. J. Relation of colonic transit to functional bowel disease in older people: a population-based study. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 46, n. 1, p. 83-87, 1998.
- FEHER, E.; PENZES, L. Density of substance P, vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin-containing nerve fibers in the ageing small intestine of the rats. **Gerontology**, v. 33, n. 6, p. 341-348, 1987.
- FREGONESI, C. E. P. T.; MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L. Estudo morfológico e quantitativo dos neurônios do plexo mioentérico do corpo do estômago de *Rattus norvegicus*. **Acta Scientiarum**, v. 20, n. 2, p. 221-224, 1998.
- FRIELING, T.; WEBER, E.; SCHEMANN, M. **Neuroimmune interactions: alarm programs as a defence mechanism**. Falk symposium 112. Neurogastroenterology: From Basic to the Clinic. Ed.: KRAMMER, H.; SINGER, M. V. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2000. 577-581 p.
- FURLAN, M. M. D. P. Ontogenia e filogenia do sistema nervoso entérico. **Arquivo de Ciências da Saúde da Universidade Paranaense**, v. 4, n. 2, p. 149-157, 2000.
- FURNESS, J. B.; BORNSTEIN, J. C. The enteric nervous system and its extrinsic connections. In: UAMADA, T. ed. Textbook of Gastroenterology. 2. ed. vol. 1. Philadelphia: J. B. Lippincott: 1995. p. 2-24.
- FURNESS, J. B.; COSTA, M. **The enteric nervous system**. New York: Churchill Livingstone, Edinburgh, 1987.
- FURNESS, J. B.; LI, Z. S.; YOUNG, H. M.; FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. **Cell and Tissue Research**, v. 277, n. 1, p. 139-149, 1994.
- GABELLA, G. Detection of nerve cells by a histochemical technic. **Experientia**, v. 25, n. 2, p. 218-219, 1969.
- GABELLA, G. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. **Gastroenterology**, v. 96, n. 6, p. 1487-1493, 1989.
- GABELLA, G. Innervation of the gastrointestinal tract. **International Review of Cytology**, v. 59, p. 129-193, 1979.
- GABELLA, G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. **The American Journal of Anatomy**, v. 109, n. 1, p. 81-95, 1971.
- GABELLA, G. On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 30, p. S59-S66, 1990. Supplement.

- GABRIEL, R.; BENEDECZKY, I.; CSOKNYA, M. Myenteric plexus of frog large intestine: light and electron microscopy of fiber system and neurons. **Acta Morphologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 37, n. 1-2, p. 71-84, 1989.
- GABRIEL, R.; HALASY, K.; CSOKNYA, M. Visualization of neurons by NADH-diaphorase staining in the myenteric plexus of some invertebrate and vertebrate species. **Zeitschrift fur Mikroskopisch-Anatomische Forschung**, v. 102, n. 5, p. 769-784, 1988.
- GAGLIARDO, K. M. **Efeitos do exercício físico no envelhecimento inicial do plexo mioentérico do colo de rato Wistar**: estudo quantitativo, morfométrico e ultra-estrutural. 2006. 123 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- GEBOES, K.; BOSSAERT, H. Gastrointestinal disorders in old age. **Age and Ageing**, v. 6, n. 4, p. 197-200, 1977.
- GERSHON, M. D. The enteric nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v. 4, p. 227-272, 1981.
- GERSHON, M. D.; KIRCHGEISSNER, A. L.; WADE, P. R. Functional anatomy of the enteric nervous system. In: JOHNSON, L. R. ed. **Physiology of the gastrointestinal tract**. 3. ed. New York: Raven Press, p. 381-422, 1994.
- GOLDSPINK, D. F. Ageing and activity: their effects on the functional reserve capacities of the heart and vascular smooth and skeletal muscles. **Ergonomics**, v. 48, n. 11-14, p. 1334-1351, 2005.
- GOMES, O. A.; DE SOUZA, R. R.; LIBERTI, E. A. A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. **Gerontology**, v. 43, n. 4, p. 210-217, 1997.
- GOYAL, R. K.; HIRANO, I. The enteric nervous system. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 17, p. 1106-1115, 1996.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 765-768 p.
- HALL, K. E. Aging and neural control of the GI tract II. Neural control of aging gut: can an old dog learn new tricks? **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, n. 4, p. G827-G832, 2002.
- HANANI, M. Multiple myenteric networks in the human appendix. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 110, n. 1, p. 49-54, 2004.
- HANSEN, M. B. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. **Physiological Research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 52, n. 1, p. 1-30, 2003.
- HANSEN, M. B.; DRESNER, L. S.; WAIT, R. B. Profile of neurohumoral agents on mesenteric and intestinal blood flow in health and disease. **Physiological Research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 47, n. 5, p. 307-327, 1998.
- HANSEN, M. B.; SKADHAUGE, E. New aspects of the pathophysiology and treatment of secretory diarrhoea. **Physiological Research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 44, n. 2, p. 61-78, 1995.

HOLLANDER, D.; TRUSCOTT, T. C. Colonic absorption of vitamin K-3. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 83, n. 4, p. 648-656, 1974.

ISAACS, K. R.; ANDERSON, B. J.; ALCANTARA, A. A.; BLACK, J. E.; GREENOUGH, W. T. Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 110-119, 1992.

JARVINEN, M. K.; WOLLMANN, W. J.; POWROZEK, T. A.; SCHULTZ, J. A.; POWLEY, T. L. Nitric oxide synthase-containing neurons in the myenteric plexus of the rat gastrointestinal tract: distribution and regional density. **Anatomy and Embryology**, v. 199, n. 2, p. 99-112, 1999.

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

KEILHOFF, G.; FANSA, H.; WOLF, G. Neuronal nitric oxide synthase is the dominant nitric oxide supplier for the survival of dorsal root ganglia after peripheral nerve axotomy. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 24, n. 3, p. 181-187, 2002.

KLEIM, J. A.; COOPER, N. R.; VANDENBERG, P. M. Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex. **Brain Research**, v. 934, n. 1, p. 1-6, 2002.

KNUTSON, T. W.; KNUTSON, L. F.; HOGAN, D. L.; KOSS, M. A.; ISENBERG, J. I. Human proximal duodenal ion and water transport. Role of enteric nervous system and carbonic anhydrase. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 40, n. 2, p. 241-246, 1995.

LATERRA, J.; GUERIN, C.; GOLDSTEIN, G. W. Astrocytes induce neural microvascular endothelial cells to form capillary-like structures in vitro. **Journal of Cellular Physiology**, v. 144, n. 2, p. 204-215, 1990.

LI, J.; DING, Y. H.; RAFOLS, J. A.; LAI, Q.; McALLISTER II, J. P.; DING, Y. Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. **Neuroscience Letters**, v. 386, n. 3, p. 160-164, 2005.

MATINI, P.; MAYER, B.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S. Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life. **Cell and Tissue Research**, v. 228, n. 1, p. 11-23, 1997.

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

MESHKINPOUR, H.; KEMP, C.; FAIRSHTER, R. Effect of aerobic exercise on mouth-to-cecum transit time. **Gastroenterology**, v. 96, n. 3, p. 938-941, 1989.

MIRANDA-NETO, M. H.; DEFANI, M. A.; FREGONESI, C. E. P. T.; NATALI, M. R. M.; PEREIRA, A. Morphometric and quantitative evaluation of the NADH-diaphorase positive myenteric neurons of the jejunum of streptozotocin-diabetic rats supplemented with acetyl-L-carnitine. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 34, n. 3, p. 154-158, 2005.

- MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L.; NATALI, M. R. M.; SANT'ANA, D. M. G. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of the neuronal evidentiatio. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 59, n. 1, p. 54-59, 2001.
- MITSUI, T.; KAGAMI, H.; KINOMOTO, H.; ITO, A.; KONDO, T.; SHIMAOKA, K. Small bowell bacterial overgrowth and rice malabsorption in healthy and physically disabled older adults. **Journal of Human Nutrition and Dietetics: The Official Journal of the British Dietetic Association**, v. 16, n. 2, p. 119-122, 2003.
- MOLINARI, S. L.; FERNANDES, C. A.; OLIVEIRA, L. R.; SANT'ANA, D. M. G.; MIRANDA-NETO, M. H. NADH-diaphorase positive myenteric neurons of the aglandular region of stomach of rats (*Rattus norvergicus*) subjected to desntrition. **Revista Chilena de Anatomia**, v. 20, n. 1, p. 19-23, 2002.
- MORIKAWA, S.; KOMURO, T. Distribution of myenteric NO neurons along the guinea-pig esophagus. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 74, n. 2-3, p. 91-99, 1998.
- NATALI, M. R. M.; MOLINARI, S. L.; VALENTINI, L. C.; MIRANDA-NETO, M. H. Morphoquantitative evaluation of the duodenal myenteric neuronal population in rats fed with hypoproteic ration. **Biocell: Official Journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopía Electronica**, v. 29, n. 1, p. 39-46, 2005.
- NICHOLS, K.; STAINES, W.; KRANTIS, A. Nitric oxide synthase distribution in the rat intestine: a histochemical analysis. **Gastroenterology**, v. 105, n. 6, p. 1651-1661, 1993.
- OETTLE, G. J. Effect of moderate exercise on bowel habit. **Gut**, v. 32, n. 8, p. 941-944, 1991.
- OLDS, R.; OLDS, J. R. **A color atlas of the rat**. London: Wolfe Medical Publications, 1991. 46-51 p.
- OLIVEIRA, L. R.; MOLINARI, S. L.; PEREIRA, M. A. S.; MIRANDA-NETO, M. H.; SANT'ANA, D. M. G. Localização dos neurônios mioentéricos no estômago aglandular e glandular de ratos (*Rattus norvergicus*). **Arquivo de Ciências da Saúde da Universidade Paranaense**, v. 4, n. 3, p. 215-220, 2002.
- PAPALÉO NETTO, M. **Gerontologia: a velhice e o envelhecimento em visão globalizada**. São Paulo: Atheneu, 1996. 5-61 p.
- PENG, X.; FENG, J. B.; YAN, H.; ZHAO, Y.; WANG, S. L. Distribution of nitric oxide synthase in stomach myenteric plexus of rats. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 7, n. 6, p. 852-854, 2001.
- PETERS, H. P.; De VRIES, W. R.; VANBERGE-HENEGOUWEN, G. P.; AKKERMANS, L. M. Potential benefits and hazards of physical activity and exercise on the gastrointestinal tract. **Gut**, v. 48, n. 3, p. 435-439, 2001.
- PETITH, M. M.; SCHEDL, H. P. Intestinal adaptation to dietary calcium restriction: in vivo cecal and colonic calcium transport in the rat. **Gastroenterology**, v. 71, n. 6, p. 1039-1042, 1976.
- RAYSSIGUIER, Y.; REMESY, C. Magnesium absorption in the caecum of rats related to volatile fatty acid production. **Annales de Recherches Vétérinaires. Annals of Veterinary Research**, v. 8, n. 2, p. 105-110, 1977.

- RAYSSIGUIER, Y.; REMESY, C. Magnesium absorption in the caecum of rats related to volatile fatty acids production. **Annales de Recherches Vétérinaires. Annals of Veterinary Research**, v. 8, n. 2, p. 105-110, 1977.
- REILLY, T.; WATERHOUSE, J.; ATKINSON, G. Aging, rhythms of physical performance, and adjustment to changes in the sleep-activity cycle. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 54, n. 11, p. 812-816, 1997.
- RERAT, A. Digestion and absorption of carbohydrates and nitrogenous matters in the hindgut of the omnivorous nonruminant animal. **Journal of Animal Science**, v. 46, n. 6, p. 1808-1837, 1978.
- ROGER, T.; CABANIE, P.; FERRE, J. P. Microscopic and functional anatomy of the ileal papilla and caecocolonic valve in the rat. **Acta Anatomica**, v. 142, n. 4, p. 299-305, 1991.
- SAFFREY, M. J.; BURNSTOCK, G. Growth factors and the development and plasticity of enteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 49, n. 3, p. 183-196, 1994.
- SANDGREN, K.; LIN, Z.; SVENNINGSSEN, A. F.; EKBLAD, E. Vasoactive intestinal peptide and nitric oxide promote survival of adult rat myenteric neurons in culture. **Journal of Neuroscience Research**, v. 72, n. 5, p. 595-602, 2003.
- SANT'ANA, D. M. G.; MIRANDA-NETO, M. H.; DE SOUZA, R. R.; MOLINARI, S. L. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon of rats subjected to proteic desnutrition. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 55, n. 4, p. 687-695, 1997.
- SANTER, R. M. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 49, n. 2, p. 115-121, 1994.
- SANTER, R. M.; BAKER, D. M. Enteric neurons numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 25, n. 1, p. 59-67, 1988.
- SANTER, R. M.; BAKER, D. M. Enteric system In : AMENTA, F. Aging of the autonomic nervous system, CRC Press., p. 214-221, 1993.
- SCHEMANN, M.; NEUNLIST, M. The human enteric nervous system. **Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 16, n. 1, p. 55-59, 2004.
- SCHERER-SINGLER, U.; VINCENT, S. R.; KIMURA, H.; McGEER, E. G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 9, n. 3, p. 229-234, 1983.
- SCHOFFEN, J. P. F.; SOARES, A.; De FREITAS, P.; BUTTOW, N. C.; NATALI, M. R. M. Effects of a hypoproteic diet on myosin-V immunostained myenteric neurons and the proximal colon wall of aging rats. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 122, n. 1-2, p. 77-83, 2005.
- SERFOZO, Z.; ELEKES, K. Nitric oxide level regulates the embryonic development of the pond snail *Lymnaea stagnalis*: pharmacological, behavioral, and ultrastructural studies. **Cell and Tissue Research**, v. 310, n. 1, p. 119-130, 2002.

SEYFERT, C. E. **Densidade e área do perfil celular dos neurônios mioentéricos reativos a acetilcolinesterase, NADH e NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos**. 2003. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SHANAHAN, F. Enteric neuro pathophysiology and inflammatory bowel disease. **Neurogastroenterology and Motility: the Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 10, n. 3, p. 185-187, 1998.

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

SIMMONS, S. F.; SCHNELLE, J. F. Effects of an exercise and scheduled-toileting intervention on appetite and constipation in nursing home residents. **The Journal of Nutrition, Health & Aging**, v. 8, n. 2, p. 116-121, 2004.

SIMREN, M. Physical activity and the gastrointestinal tract. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 10, p. 1053-1056, 2002.

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

SNIPES, R. L. Anatomy of the cecum of the laboratory mouse and rat. **Anatomy and Embryology**, v. 162, n. 4, p. 455-474, 1981.

STABILLE, S. R.; LIMA, E. A.; GERMANO, R. M. Morphoquantitative characteristics of myenteric neurons of the terminal segment of the intestine of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) (Osteichthyes, Cyprinidae). **Acta Scientiarum**, v. 20, n. 2, p. 217-220, 1998.

STAT SOFT, INC. STATISTICA (data analysis software system). Version 7. **www.statsoft.com**, 2004.

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

TIMMERMANS, J. P.; 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. P.; BARBIERS, M.; SCHEURMANN, D. W.; BOGERS, J. J.; ADRIAENSEN, D.; FEKETE, E.; MAYER, B.; van MARCK, E. A.; De GROODT-LASSEEL, M. H. 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.

TOOLE, L.; BELAI, A.; BURNSTOCK, G. A neurochemical characterisation of the golden hamster myenteric plexus. **Cell and Tissue Research**, v. 291, n. 3, p. 385-394, 1998.

van PRAAG, H.; CHRISTIE, B. R.; SEJNOWSKI, T. J.; GAGE, F. H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 23, p. 13427-13431, 1999.

- VISSING, J.; ANDERSEN, M.; DIEMER, N. H. Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilization in the rat. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 16, n. 4, p. 729-736, 1996.
- WADE, P. R. Aging and neural control of the GI tract: I. Age-related changes in the enteric nervous system. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, N. 3, p. G489-G495, September. 2002.
- WADE, P. R.; HORNBY, P. J. Age-related neurodegenerative changes and how they affect the gut. **Science of Aging Knowledge Environment: SAGE KE**, v. 2005, n. 12, p. 8, 2005.
- WESTER, T.; O'BRIAIN, D. S.; PURI, P. Notable postnatal alterations in the myenteric plexus of normal human bowel. **Gut**, v. 44, n. 5, p. 666-674, 1999.
- WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L. **Fisiologia do esporte e do exercício**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001, 479-483 p.
- WOOD, J. D. Physiology of the enteric nervous system. In: JOHNSON, L. R.; ALPERS, D. H.; JACOBSON, E. D.; WALSH, J. H. ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 3. ed. New York, Raven Press: 1994. p. 423-482.
- WU, M.; VAN NASSAUW, L.; KROESE, A. B. A.; ADRIAENSEN, D.; TIMMERMANS, J. P. Myenteric nitrergic neurons along the rat esophagus: evidence for regional and strain differences in age-related changes. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 119, n. 5, p. 395-403, 2003.
- YOUNG, H. M.; FURNESS, J. B.; SHUTTLEWORTH, C. W. R.; BREDET, D. S.; SNYDER, S. H. Co-localization of nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH diaphorase staining in neurons of the guinea-pig intestine. **Histochemistry**, v. 97, n. 4, p. 375-378, 1992.
- ZANONI, J. N.; De FREITAS, P.; PEREIRA, R. V. F.; Dos SANTOS PEREIRA, M. A.; MIRANDA-NETO, M. H. Effects of supplementation with ascorbic acid for a period of 120 days on the Myosin-V and NADPHd positive myenteric neurons of the ileum of rats. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 34, n. 3, p. 149-153, 2005.
- ZANONI, J. N.; MIRANDA-NETO, M. H.; BAZOTTE, R. B.; DE SOUZA, R. R. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin-induced diabetic rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 55, n. 4, p. 696-702, 1997.