SILVIO PIRES GOMES

*ASPECTOS MORFOQUANTITATIVOS DA
NEUROPLASTICIDADE INDUZIDA POR
DESNUTRIÇÃO NO GÂNGLIO CELÍACO
DE RATOS*

SÃO PAULO

2006

Silvio Pires Gomes

ASPECTOS MORFOQUANTITATIVOS DA NEUROPLASTICIDADE INDUZIDA POR DESNUTRIÇÃO NO GÂNGLIO CELÍACO DE RATOS

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 obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro

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

T.1807
FMVZ

Gomes, Silvio Pires

Aspectos morfoquantitativos da neuroplasticidade induzida por desnutrição no gânglio celíaco de ratos / Silvio Pires Gomes. – São Paulo: S. P. Gomes, 2006.

71 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: Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro.

1. Estereologia. 2. Desnutrição. 3. Gânglio celíaco. 4. Ratos.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da desnutrição pré e pós-natal no número total de neurônios do gânglio celíaco em ratos", protocolado sob o nº897/2006, utilizando 08 (oito) ratos de laboratório, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, 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 17/05/2006.

(We certify that the Research "Effects of pre and post natal nutrition in the total number of neurons of the celiac ganglion in rats", protocol number 897/2006, utilizing 08 (eight) rats, under the responsibility of Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, 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 of the day 05/17/2006).

São Paulo, 18 de maio de 2006

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GOMES, Silvio Pires

Título: Aspectos morfoquantitativos da neuroplasticidade induzida por desnutrição no gânglio celíaco de ratos

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 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: _____

CARTA AO SER HUMANO

Fui criado pelo mesmo Deus que criou você.

Sinto frio, fome, sede, medo, dor, assim como você.

Por favor, não me use para se divertir, não me exponha ao ridículo, não me humilhe, não me maltrate e nem abuse de mim. Só o que quero é sua amizade e carinho.

Não peço que goste de mim, mas somente que me respeite.

Olhe nos meus olhos e depois olhe nos seus e verá como somos parecidos. No meu olhar você pode ver doçura, alegria, tristeza, desespero, amor ou sofrimento, e isso eu também posso ver no seu olhar!

Por capricho do nosso criador, não posso falar e nem me defender da brutalidade e crueldade dos seus semelhantes, mas se eu pudesse falar agora, diria a todos que eu também mereço viver e sou digno de respeito, assim como você....

Com carinho, Um animal.

(Autora: Martha Marganha)

Anjos Caninos

Existem pessoas que não gostam de cães,

Estas, com certeza, nunca tiveram em sua vida um amigo de quatro patas.

Ou, se tiveram, nunca olharam dentro daqueles olhos, para perceber quem estava ali.

Um cão é um anjo que vem ao mundo ensinar amor.

Quem mais pode dar amor incondicional, amizade, sem pedir nada em troca,

Afeição sem esperar retorno, proteção sem ganhar nada, fidelidade vinte e quatro horas por dia?

Ah, não me venham com essa de que os pais fazem isso,

Porque os pais são humanos se irritam, se afastam...

Um cão não se afasta, mesmo quando você o agride,

Ele retorna cabisbaixo pedindo desculpas por algo que talvez não fez, lambendo suas mãos a suplicar perdão.

Alguns anjos não possuem asas,

Possuem quatro patas, um corpo peludo, nariz de bolinha, orelhas de atenção,

Olhar de aflição e carência.

Apesar dessa aparência, são tão anjos quanto os outros (aqueles com asas) e,

Dedicam-se aos seus humanos tanto quanto qualquer anjo costuma dedicar-se.

Que bom seria se todos os humanos pudessem ver a humanidade perfeita de um cão!

(autoria desconhecida)

Ao que sempre me mostrou que os caminhos são longos e tempestuosos, mas que com muita fé podemos fazer da dor um sorriso e saber que com sua ajuda nada é impossível. Ainda mais quando é ele que decide e trilha nossos melhores caminhos. Ele sabe que é difícil ir atrás dos sonhos, mas nunca deixa ninguém destruir aquilo que nos trilhou, pois nos mantém firme como se não houve amanhã, pois no tempo certo nos faz encontrar o caminho. Pois só ele consegui olhar o herói que possuímos dentro de nós, nos fortalecendo e deixando nossos medos de lado.

A **Deus** eu dedico.

Aos meus pais **Joaquim Gomes** e **Zulmira Pires** e meus irmãos **Fátima Gomes** e **José Gomes** e aos meus cunhados **Evandro Bertoncin** e **Cláudia Gomes** e meu sobrinho **Gabriel Gomes** por estarem perto de mim nas horas mais difíceis e é de onde posso tirar forças e esperanças para atingir meus objetivos e passando por vários obstáculos sem medo e descobrir que tudo irá passar logo. Já que sem a minha família não teria suportado todas as dificuldades. E agradeço a minha mãe por sempre acreditar nos meus sonhos e a ela hoje dedico a minha tese de mestrado.

Ao meu cachorro, **Xuxo**, onde quer que esteja que ele saiba que tudo que aconteceu em minha vida acadêmica é uma homenagem a ele e por isso lhe dedico tudo de bom que aconteceu comigo até hoje. Saiba que sinto muito a sua falta e você foi e ainda é muito importante para mim. Eu Amo Muito Você.

A minha cachorrinha **Odara** por fazer cada dia da minha vida mais feliz. Por saber que não me sinto só, pois sei que ela está sempre ao meu lado nas horas que mais preciso dela. Sei que você é um Anjo que Deus enviou para alegrar-me em todos e mais importantes momentos de minha vida. Eu Te Amo muito minha cachorrinha. E ao **Hércules** por fazer da minha cachorra a sua felicidade.

AGRADECIMENTOS

Significado da palavra Agradecimento: Ato ou efeito de agradecer; Reconhecimento e declaração de se estar grato por algo dado ou feito por outrem; Gratidão.
(Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa)

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, por proporcionar meu desenvolvimento científico, profissional e pessoal.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro**, pela amizade, confiança e aprendizado e por me mostrar o quanto é importante uma pesquisa científica com seriedade e por estar sempre presente quando se precisa dele, seja a qualquer hora do dia ou da noite e por ter me aceitado como seu orientado. Agradeço a Deus por hoje poder ter feito e estar fazendo parte da sua equipe profissional o que me honra muito. Novamente agradeço por esta e por outras oportunidades que poderão vir a ocorrer.

A Professora Doutora **Maria Angélica Miglino**, pela oportunidade única de ter me aceitado como aluno de seu Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Universidade de São Paulo e pela oportunidade de crescer profissionalmente me tornando um mestre em ciências.

Aos Professores Doutores do setor de Anatomia, **Francisco Javier H. Blasquez, José Roberto Kfoury Júnior, Paula de Carvalho Papa, Pedro Primo Bombonato, Tatiana Carlesso e Carlos Ambrósio** pelo aprendizado durante as aulas de Pós-Graduação.

A Professora Doutora **Patrícia Castelucci** pela ajuda essencial no protocolo de desnutrição e pelo oferecimento dos animais utilizados em minha tese e pela cooperação e apoio na realização deste trabalho e por aceitar o convite de participar da minha banca.

Ao Prof. Dr. **Romeu Rodrigues de Souza** pela amizade, confiança e por aceitar o convite de participar da minha banca.

A minha grande amiga **Tais H. de Castro Sasahara** pela ajuda incondicional nesta minha tese e pelos longos anos de amizades que fizeram com que a nossa amizade ficasse ainda mais sincera. Agradeço a você pelo incentivo dado para que eu prosseguisse sem medo até o final deste trabalho. Saiba que você pode contar sempre comigo.

Ao meu amigo **Fernando V. L. Ladd** por tudo que convivemos juntos durante este período de tese e pela sua amizade que faz dia acreditar que existem amigos para todas as ocasiões fora e dentro do campo profissional. Obrigado pela sua ajuda importantíssima em minha tese e sei que posso contar sempre com você e saiba que você também pode contar comigo para o que der e vier.

A minha amiga **Andrea Bogoslavsky** por ter um coração grandioso e saber que uma amizade sobrevive a todos os momentos, seja qual for à circunstância e sei que hoje você se faz necessária em minha vida. Obrigado pela sua amizade. E vamos juntos encarar mais uma etapa em nossas vidas. Conte comigo para tudo que você precisar, sempre!!!!!!!!!!

A minha amiga **Elizangela dos Anjos Silva** por tudo que vivemos juntos, por esses dois anos de convivência, pelos momentos de luta, garra, força, dedicação e descontração que passamos juntos e pelos altos papos que sempre tivemos independente do horário ou momento. Sempre estivemos juntos em todos esses momentos únicos e especiais. E tenho a certeza que ainda teremos mais pela frente e você sabe disso.

Ao meu amigo **Roberto Hatayde** pelo apoio, ajuda e por sempre estender a mão para me ajudar em qualquer momento que eu precisar. Obrigado por tudo.

Aos meus **amigos Ana Rita de Lima, Emerson Fioretto, Josy Cal, Joel Alves, Vivian Samoto e Ronaldo Augustinho da Silva** pela amizade e convivência ao longo desses dois anos de tese e aos demais que com certeza haverá.

Aos meus amigos e companheiros do L.S.S.C.A. (Laboratory of Stochastic Stereology and Chemical Anatomy): **Tais Sasahara, Fernando Ladd, Andrea Bogoslavsky, Luciana Abrahão, Aliny Ladd, Valquiria Mariotti, Regina Bolina, Lynda Tamayo, Procássia Lacerda, Horácio Tommasi Júnior, Cauê Toscano, Renato Cavalcanti, Samanta Melo, Bruno Mesquita, André**

Gonçalves, Felipe Oliveira e Wanderley Guidi (in memoriam) pelo companheirismo e saiba que hoje nos tornamos mais que companheiros de trabalhos, mas grandes amigos. Obrigado também pelos momentos de descontração e por me aturarem.

Aos meus amigos de graduação da Uni-FMU **Eunice M. F. Leite, Samanta Saraiva, Aline Yoshii e Paulo Ferreira** e pelo incentivo e apoio emocional oferecido e aos meus professores de graduação da Uni-FMU: **Antonio Assis Neto, Flávia Verechia, Alexandre Lourenço e Gustavo Sabatini**.

Aos **amigos** de Pós-Graduação deste departamento agradeço por fazer parte integrante dos momentos passados aqui na Anatomia, pois de uma forma direta ou indireta fizeram parte da minha vida.

Aos funcionários da FMVZ-USP, pela consideração, atenção e respeito dado durante esta minha estada neste programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, em especial: **Maicon, Jackeline, Cauê, Edinaldo (Índio), Diogo, Ronaldo, João, Raimundo, Natália (Branca), Deyse, Claudia e Joana**.

RESUMO

GOMES, S. P. **Aspectos morfoquantitativos da neuroplasticidade induzida por desnutrição no gânglio celíaco de ratos.** [Morphoquantitative aspects of undernourishment-induced neuroplasticity in the rat's celiac ganglion neurons]. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O gânglio celíaco pertence ao plexo celíaco que consiste numa rede de nervos e tecidos de suporte. Os gânglios celíacos, pares, são alongados e situam-se ao longo da face caudal da origem da artéria celíaca. No lado esquerdo o gânglio está ligado por um ramo interganglionar. Ele está intimamente em contato com a superfície da aorta. A inervação autônoma da maioria dos órgãos abdominais faz-se pelo plexo celíaco e estes incluem o pâncreas, fígado, rim, vesícula biliar, epíplon, mesentério, estômago, intestino delgado e porções ascendente e transversa do cólon. A desnutrição protéico-calórica é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, representando nas nações subdesenvolvidas cerca de 40% das causas dos pacientes hospitalizados. Desta forma o estudo da inervação extrínseca do trato gastrointestinal (representada pelo gânglio celíaco) de ratos, sob os aspectos estereológicos e morfométricos, durante estados de desnutrição protéica será fundamental para aferir objetivamente (e não empiricamente) os possíveis danos neuronais ocasionados pela mesma. Ainda, o conhecimento destas informações quantitativas pode ser útil no entendimento da patogênese da neuropatia autonômica hipoproteica e conseqüentemente no seu tratamento, melhorando a qualidade de vida de pacientes animais e humanos. No decorrer deste estudo foram utilizados seis gânglios celíacos esquerdos provenientes de ratos Albinus Wistar neonatos machos provenientes de acasalamento durante um período de sete a dez dias. Três dos ratos eram desnutridos e três clinicamente saudáveis (ausência clínica de neuropatias) que foram usados como controle. Para os animais foram oferecida água sem restrições e uma dieta protéica (20% de proteína-caseína) para as fêmeas que gerarem o grupo controle constituído por três animais que serão denominados nutridos (N) e uma dieta hipoproteica (5% de caseína) para as fêmeas que gerarem o grupo desnutrido também composto por de três animais (D). A amostragem foi realizada de modo uniforme, sistemático e aleatório, volume

ganglionar ou volume do gânglio (vg), número total de neurônios (n), densidade neuronal (nv), volume neuronal (vn), densidade de volume neuronal (vv). Todos os parâmetros estereológicos apresentaram valores superiores (bastante significativos). Os resultados sugerem a existência de diferenças biológicas, ou seja, os animais desnutridos apresentavam neurônios maiores e em maior número, mas distribuídos e mais afastados uns dos outros, já os desnutridos possuíam neurônios menores, menos numerosos e distribuídos em um número menor no gânglio.

Palavras-chave: Estereologia. Desnutrição. Gânglio celíaco. Ratos

ABSTRACT

GOMES, S. P. **Morphoquantitative aspects of undernourishment-induced neuroplasticity in the rat's celiac ganglion neurons.** [Aspectos morfoquantitativos da neuroplasticidade induzida por desnutrição no gânglio celíaco de ratos]. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The celiac ganglion belongs to the celiac plexus which consists of a net of nerves and supportive tissues. The celiac ganglia, even, are elongated and located along the caudal face of the origin of the celiac artery. On the left side the ganglion is linked by an interganglionic branch. It is intimately in contact with the surface of the aorta. The autonomous innervation of most of the abdominal organs is made by the celiac plexus and these include the pancreas, liver, kidney, gall bladder, epíplon, mesentery, stomach, small intestine and ascendant and transversal portions of the colon. The proteic-caloric undernourishment is one of the largest problems of public health in the world, representing about 40% of the hospitalized patients in underdeveloped nations. Thus, the study of the extrinsic innervation of the gastrointestinal tract (represented by the celiac ganglion) of rat, under the stereological and morphometric aspects, during states of proteic denutrition will be fundamental to objectively precise (and not empirically) the possible neuronal damages caused by the undernourishment. Still, the knowledge of these quantitative information can be useful in the understanding of the pathogenesis of the autonomous hypoproteic neuropathy and consequently in its treatment, improving the quality of life of patients, animals and humans. During this study, six left celiac ganglia of newborn male rats Albinus Wistar coming from coupling during a period from seven to ten days were used. Three of the mice were undernourished and three clinically healthy (clinical absence of neuropathies) were used as control. For the animals it was offered water with no restrictions and a proteic diet (20% of protein-casein) for the females that generated the group of control constituted by three animals which will be denominated nurtured (N) and a hypoproteic diet (5% of casein) for the females that generate the undernourished group also composed of three animals (D). The sampling was accomplished uniformly, systematic and aleatory, ganglionic volume or volume of the ganglion (V_{ref}), total number of neurons (N), neuronal density (N_V), neuronal volume ($\bar{v}_N$), density of neuronal volume (V_v). All

stereological parameters presented superior values (quite significant). The results suggest the existence of biological differences, in other words, the undernourished animals presented larger neurons and in larger number, but distributed one far from the other, the undernourished ones presented smaller and less neurons, and distributed in a smaller number in the ganglion.

Key word: Stereology. Undernourishment. Celiac ganglion. Rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	24
3 REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1 MACROSCOPIA	26
3.1.1 Localização e Distribuição	26
3.2 ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS	27
3.3 GÂNGLIOS AUTÔNOMOS	28
3.4 GÂNGLIOS PARAVERTEBRAIS	29
3.5 GÂNGLIOS PRÉ-VERTEBRAIS	30
3.6 MICROESTRUTURA DOS GÂNGLIOS SIMPÁTICOS	31
3.7 NEURÔNIOS GANGLIONARES PRINCIPAIS	31
3.8 ASPECTOS NUTRICIONAIS	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 MATERIAIS	36
4.1.1 Animais	36
4.2 MÉTODOS	37
4.2.1 Indução da Desnutrição	37
4.2.2 Estudo Histológico	37
4.2.3 Estudo Estereológico	39
4.2.3.1 - Volume do Gânglio (V_g)	39
4.2.3.3 - Número Total de Neurônios (N)	40
4.2.3.2 - Densidade Neuronal (N_v):	41
4.2.3.4 - Volume Neuronal ($\bar{v}_N$)	42
4.2.3.5 - Densidade de volume (V_v)	43
4.2.4 - Análise Estatística	43
5 RESULTADOS	45
5.1 MACROESTRUTURA	45
5.2 MICROESTRUTURA	45
5.3 ESTUDO ESTEREOLÓGICO	48
5.3.1 Volume do Gânglio (V_{ref})	49
5.3.2 Densidade Neuronal (N_v)	49
5.3.3 Número Total de Neurônios (N)	52
5.3.4 Densidade de Volume (V_v)	54
5.3.5 Volume médio Neuronal ($\bar{v}_N$)	54
6 DISCUSSÃO	57
6.1 MACROESTRUTURA	57
6.2 MICROESTRUTURA	58
6.3 ESTUDO ESTEREOLÓGICO	59
6.3.1 Volume ganglionar (V_{ref})	60
6.3.2 Densidade Neuronal (N_v)	60
6.3.3 Número total de Neurônios (N)	61
6.3.4 Densidade de volume neuronal (V_v)	62
6.3.5 Volume neuronal médio ($\bar{v}_N$)	62
7 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	67

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso Autônomo do rato, como de outros animais mamíferos consiste em um extenso arranjo de nervos e gânglios conectados ao sistema nervoso central representado pelo cérebro e medula espinhal por um lado e as vísceras pelo outro lado, e está organizado em grupos de gânglios que são divididos esquematicamente em paravertebrais, pré-vertebrais, paraviscerais e intramurais. Os gânglios autônomos, em sua maioria, são facilmente reconhecidos ao longo da cadeia simpática através de espessamentos e/ou emaranhado de nervos. Os gânglios pré-vertebrais estão em sua maioria dispostos em amplos nervos, o plexo abdominal que inclui o gânglio celíaco e o gânglio mesentérico superior localizados próximos à aorta abdominal (GABELLA, 1995).

O gânglio celíaco pertence ao plexo celíaco que consiste numa rede de nervos e tecidos de suporte (GABELLA, 2004; GASPAR; LOPES, 2002). Os gânglios celíacos, pares, são alongados e situam-se ao longo da face caudal da origem da artéria celíaca. No lado esquerdo o gânglio está ligado por um ramo interganglionar (GETTY, 1986). Ele está intimamente em contato com a superfície da aorta. A inervação autônoma da maioria dos órgãos abdominais faz-se pelo plexo celíaco e estes incluem o pâncreas, fígado, rim, vesícula biliar, epíplon, mesentério, estômago, intestino delgado e porções ascendente e transversa do cólon (GASPAR; LOPES, 2002).

Em alguns casos os gânglios celíaco e mesentérico superior constituem uma única massa difusa situada na parede dorsal da cavidade abdominal ao nível da primeira vértebra lombar (GHOSHAL, 1986).

Léránth e Ungváry (1980) determinaram o termo “cérebro abdominal” para o gânglio celíaco devido a sua complexa função e em acordo com os relatos de Baron e Janing (1988) relacionam um acúmulo de neurônios esplênicos no gânglio celíaco do gato através da implantação de neurotraçadores. Sendo um componente do complexo ganglionar celíaco mesentérico superior, Miller et al. (1996) definiram que o gânglio mesentérico superior é um centro de integração dos reflexos gastrintestinais, entretanto detalhes de sua estrutura permanecem obscuros devidos à escassez de informações.

Um importante papel no mecanismo de regulação atuando como uma ligação entre o sistema nervoso central e periférico é participando na coordenação dos reflexos periféricos desenvolvido pelo gânglio celíaco (SIMMONS, 1985).

A desnutrição protéico-calórica é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, representando nas nações subdesenvolvidas cerca de 40% das causas dos pacientes hospitalizados. Considerando que o processo normal metabólico precisa de proteínas, acredita-se que todos os tecidos serão afetados por um estado precário de nutrição protéica embora não apresentem o mesmo grau e severidade de modificação. O primeiro tecido a sofrer alterações com a perda de proteína são aqueles que exibem uma alta taxa de renovação celular, como a mucosa intestinal enquanto que os últimos a sofrerem são aqueles que mostram uma baixa taxa de renovação celular, tal como o sistema nervoso. Muitos autores estudaram as conseqüências da desnutrição protéica no Sistema Nervoso Central (SANT'ANA et al., 1997).

Sant'ana et al. (1997), descreveram as alterações celulares dos neurônios do SNC de ratos durante o desenvolvimento, sujeitos a desnutrição protéica. Além das alterações no SNC as deficiências nutricionais trazem alterações no SNP e no trato digestório, as quais normalmente resultam numa absorção deficiente e alterações na motilidade gastrointestinal.

Santer e Conboy (1987) reportaram uma diminuição no tamanho de neurônios e gânglios de animais submetidos à desnutrição protéica durante a vida intra-uterina. Santer e Conboy (1987), analisando o material preparado com técnicas histoquímicas, demonstraram uma diminuição na inervação simpática dos ratos submetidos à desnutrição protéica durante a gestação, e uma diminuição de 27% no número de neurônios entéricos jejunais desses animais.

Além das alterações no Sistema Nervoso Central as deficiências nutricionais provocam alterações no Sistema Nervoso Periférico e no Trato Digestório (YUCEL et al., 1994).

A desnutrição no início da vida pode afetar profundamente o corpo e o cérebro de ratos adultos. Alguns desses efeitos são permanentes enquanto outros desaparecem quando os animais são submetidos ao processo de renutrição (YUCEL et al., 1994).

Analisando a literatura especializada verifica-se que embora os autores, realizando experimentos em animais submetidos à desnutrição, têm demonstrado

algumas preocupações com a incidência desta condição durante o período de gestação e lactação, mencionando seus efeitos no Sistema Nervoso Central e nervos periféricos. Constata-se uma carência principalmente de publicações enfocando os efeitos da desnutrição nos gânglios simpáticos para e pré-vertebrais, principalmente no que tange aos seus aspectos morfoquantitativos.

Desta forma o estudo da inervação extrínseca do trato gastrintestinal (representada pelo gânglio celíaco) de ratos, sob os aspectos quantitativos, estereológicos e morfométricos, durante estados de desnutrição protéica será fundamental para aferir objetivamente (e não empiricamente) os possíveis danos neuronais ocasionados pela mesma.

Ainda, o conhecimento destas informações quantitativas pode ser útil no entendimento da patogênese da neuropatia autonômica hipoproteica e conseqüentemente no seu tratamento, melhorando a qualidade de vida de pacientes animais e humanos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Neste estudo, estudaram-se os aspectos morfoquantitativos da neuroplasticidade induzida por desnutrição no gânglio celíaco de ratos.

Sendo assim, os seguintes parâmetros foram avaliados:

- MACROESTRUTURA E MICROESTRUTURA
- VOLUME GANGLIONAR OU VOLUME DO GÂGLIO (V_g)
- DENSIDADE NEURONAL (N_v)
- NÚMERO TOTAL DE NEURÔNIOS (N)
- VOLUME NEURONAL ($\bar{v}_N$)
- DENSIDADE DE VOLUME NEURONAL (V_v)

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

As literaturas consultadas para embasamento científicos mais relevantes serão percorridas a seguir.

3.1 MACROSCOPIA

A seguir relatamos os aspectos sobre a macroscopia do gânglio celíaco.

3.1.1 Localização e Distribuição

A vascularização do complexo ganglionar celíaco-mesentérico superior e sua composição foi tema dos estudos desenvolvidos por Hammer e Santer (1981), onde os autores relatam que sua formação é bem complexa. Macroscopicamente foi possível determinar o contingente de ambos antímeros, assim sendo, o antímero esquerdo era composto por três principais componentes, o gânglio supra-renal esquerdo em continuidade o nervo celíaco esquerdo e o tronco esplâncnico esquerdo. O gânglio celíaco esquerdo e o gânglio mesentérico superior esquerdo apresentavam-se fundidos e nas proximidades era possível de se identificar o gânglio aórtico-renal. Quanto ao antímero direito, o complexo ganglionar celíaco-mesentérico superior era formado pelo nervo esplâncnico principal em continuidade com o gânglio supra-renal direito. Contrastando com o contralateral, o antímero direito não apresentava os gânglios celíaco e mesentérico superior fundidos sendo apenas ligados por poucos e finos feixes nervosos. O complexo situava-se entre as duas glândulas supra-renais, acima da metade do rim esquerdo e no terço médio do rim direito. A relação vascular do complexo celíaco-mesentérico superior é visualizadas através das artérias frênicas inferiores, artérias ovarianas, artérias paravasculares pós-ganglionares e um conjunto de vasos independentes ao longo do tecido adiposo circundante. A drenagem venosa é realizada por uma veia que

deixa cada um dos gânglios celíacos e desemboca na veia cava inferior através das veias frênicas, não obstante, o antímero esquerdo ainda conta com um suporte de drenagem através da veia supra-renal inferior.

O plexo celíaco, em ratos, está situado em torno e entre a artéria celíaca e artéria mesentérica superior e estende-se dorsalmente entre as glândulas adrenais e a metade cranial dos rins. O gânglio celíaco esquerdo tem o formato de meia lua e está localizado lateralmente a artéria celíaca e a artéria mesentérica superior. O gânglio celíaco direito apresenta forma triangular, menor que o seu contralateral e está localizada no lado oposto as mesmas artérias, dorsalmente a veia cava inferior. Ambos estende-se caudalmente, sem limites distintos, em direção ao gânglio mesentérico superior (GABELLA, 1995).

Miller et al. (1996) em seus estudos sobre o gânglio mesentérico superior em camundongos observou que macroscopicamente, este se apresentava com um gânglio de aparência oval localizado na adventícia, sob a face ventral da artéria aorta, próxima a origem da artéria renal esquerda. Dois ou mais troncos nervosos esplâncnicos eram observados se interligando a gânglios paravertebrais oposta a artéria aorta. Muitos troncos nervosos pequenos conectavam a porção rostral do gânglio mesentérico superior ao gânglio celíaco.

Promwikom et al. (1988) referiu que o complexo ganglionar celíaco tem sido descrito como um par de amplos gânglios simpáticos pré-vertebrais de formato irregular que inclui o gânglio celíaco, gânglio mesentérico superior, gânglio supra-renal, gânglios aórtico-renais e seus plexos nervosos. O bloqueio do gânglio celíaco tem sido aplicado como terapia para o tratamento da dor de vísceras abdominais não-responsivas a terapia rotineira.

3.2 ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS

Vários experimentos têm sido conduzidos em diferentes espécies para avaliar os efeitos morfoquantitativos da desnutrição nos neurônios do plexo mientérico de ratos adultos (SANT'ANA et al., 1997).

O gânglio celíaco é um gânglio simpático pré-vertebral que recebe a sua entrada pré-gangliônica da coluna vertebral e projeta suas fibras pós-ganglionares

para diversos órgãos abdominais, incluindo o fígado e o pâncreas. A ativação dessas fibras nervosas aumenta a produção de glicose hepática direta e indiretamente (TABORSKY et al., 2001).

Para avaliar as atividades dos nervos simpáticos innervando o pâncreas e o fígado, foram medidos a noroepinefrina pancreática e hepática presente em grandes animais (TABORSKY et al., 2001).

O sistema nervoso autônomo periférico dos mamíferos é constituído por uma extensiva rede de nervos e gânglios conectados ao Sistema Nervoso Central de um lado, e às vísceras de outro. As vísceras incluem os órgãos das cavidades torácica, abdominal e pélvica, vasos sanguíneos, órgãos da cabeça e do pescoço e componentes da pele.

O sistema nervoso autônomo tem um plano estrutural comum em todos os mamíferos sendo o rato a espécie mais estudada. Desta forma, o sistema compreende neurônios motores que innervam toda a musculatura lisa do corpo e as glândulas, e neurônios aferentes (sensoriais) que transportam os reflexos e sensações dos órgãos viscerais (GABELLA, 2004).

3.3 GÂNGLIOS AUTÔNOMOS

Muitos gânglios autônomos podem ser reconhecidos a “olho nú” e podem vistos como protusões ao longo dos troncos nervosos ou no interior de plexos nervosos. Alguns gânglios são conectados formando cadeias (gânglios paravertebrais) enquanto outros possuem um arranjo plexiforme (plexo pélvico e o plexo abdominal).

O sistema nervoso autônomo é organizado em grupos de gânglios que podem ser sistematicamente subdivididos em quatro grupos denominados: paravertebral, prevertebral, paravisceral e intramural. Outros gânglios são localizados na cabeça e

fornece inervação motora para as glândulas salivares, vasos sanguíneos craniais e olho.

Os gânglios paravertebrais são conectados entre si e formam duas cadeias ou troncos simpáticos que se encontra em ambos os lados da coluna vertebral e estão conectados aos nervos espinais (portanto conectados à medula espinhal) por meio de curtos troncos nervosos denominados ramos comunicantes brancos.

Os gânglios pré-vertebrais são conectados entre si de maneira plexiforme (plexo abdominal que inclui os gânglios celíacos e mesentérico cranial) junto à aorta abdominal.

Os gânglios paraviscerais encontram-se na proximidade de algumas vísceras; os principais grupos estão no plexo cardíaco e no plexo pélvico e outros pequenos gânglios estão num plexo próximo da traquéia e brônquios.

Finalmente, os gânglios intramurais, que são muito pequenos para serem vistos a “olho nú”, estão situados dentro da parede do trato gastrintestinal e nas vias biliares. Os gânglios intramurais do intestino não são nem simpáticos e nem parassimpáticos, embora estejam conectados com ambos os sistemas e constituem o sistema nervoso entérico (LANGLEY, 1921) que se apresenta como um componente relativamente independente do Sistema Nervoso Autônomo.

As vísceras têm um abundante suprimento de inervação sensorial e se estas fibras estão inseridas no Sistema Nervoso Autônomo estas não podem estar inseridas nem no Simpático e nem no Parassimpático, constituindo uma parte nova do sistema nervoso autônomo (GABELLA, 2004).

3.4 GÂNGLIOS PARAVERTEBRAIS

O tronco simpático é uma estrutura bilateral simétrica estendendo-se da base do crânio até o sacro. No pescoço, o tronco simpático cervical encontra-se dorsal ao nervo vago e à artéria carótida comum e ventral ao processo transversos das vértebras e músculos epitaxiais.

Cada tronco tem no mínimo dois gânglios proeminentes, o gânglio cervical superior (ou cranial) e o gânglio cervical inferior (ou caudal) que está fundido ao primeiro ou segundo gânglio torácico, sendo denominado então de cervicotorácico

ou estrelado. Esporadicamente pode ocorrer o gânglio cervical médio (BALJET; DRUKKER, 1979; HEDGER; WEBBER, 1976; EVANS; SURPRENANT, 1993).

Os gânglios paravertebrais são conectados entre si e formam duas cadeias ou nervos ganglionares, as cadeias simpáticas, que se sustentam na coluna vertebral e são conectadas aos nervos espinhais (conseqüentemente conectadas à medula espinhal) separadas por troncos de nervos curtos, os ramos comunicantes “brancos” (GABELLA, 2004).

3.5 GÂNGLIOS PRÉ-VERTEBRAIS

Constituem o plexo abdominal que se apresenta como um emaranhado de gânglios e troncos nervosos que se encontram junto à aorta abdominal e seus principais ramos. Os vasos sanguíneos são as principais estruturas para a identificação dos gânglios pré-vertebrais.

Dois principais componentes podem ser reconhecidos no plexo abdominal: o plexo celíaco (PAXINOS et al. 1991) e o plexo mesentérico inferior ou caudal e o plexo intermesentérico entre os mesmos (GABELLA, 2004).

O plexo celíaco está situado ao longo e entre as artérias celíacas e mesentérica cranial e se estende dorsalmente entre as glândulas adrenais e a extremidade e a metade cranial dos rins. O gânglio celíaco esquerdo é alongado e se encontra na face lateral das artérias celíaca e mesentérica cranial. O gânglio celíaco direito é triangular, menor que o esquerdo e encontra-se na face lateral direita destas mesmas artérias e dorsal à veia cava caudal.

Os dois gânglios celíacos estendem-se caudalmente em direção ao gânglio mesentérico cranial. A expansão dorsal do gânglio celíaco forma o gânglio aórtico-renal (HAMMER; SANTER, 1981) ou gânglios aórtico-renais.

Os principais troncos nervosos originando-se do plexo celíaco e direcionado aos órgãos abdominais percorrem seus trajetos junto às artérias celíaca, mesentérica cranial, renais e frênicas caudais. Caudalmente o plexo celíaco continua-se no plexo intermesentérico que é um conjunto de troncos nervosos e pequenos gânglios que se encontram nas faces laterais e ventrais da aorta.

3.6 MICROESTRUTURA DOS GÂNGLIOS SIMPÁTICOS

Além de células ganglionares (neurônios ganglionares principais) os gânglios simpáticos contêm outros tipos celulares, como por exemplo: células granulares pequenas e intensamente fluorescentes (SIF Cells), células gliais (células satélites e células de Schwann), células vasculares (especialmente células endoteliais), mastócitos, fibroblastos (na cápsula ganglionar e nos septos finos de tecido conjuntivo). A cápsula ganglionar, continuação da bainha que envolve os nervos relacionados ao gânglio, é relativamente espessa e age como uma barreira eficiente para a difusão de substâncias (ARVIDSON, 1979). Em ratos, a cápsula do gânglio cervical superior apresenta uma espessura de 15-30 μm e está constituída por fibras colágenas e fibroblastos (RIBEIRO et al. 2004).

3.7 NEURÔNIOS GANGLIONARES PRINCIPAIS

Os neurônios ganglionares principais são multipolares e têm em média 50 μm de diâmetro no rato (a maioria entre 25-40 μm) (TAMARIND; QUILLIAM, 1971). Comparativamente a outras espécies animais especialmente aquelas de grande tamanho corporal a arborização dendrítica do rato é menos extensiva e o volume de neurópilo é menor. Há pouca ou nenhuma evidência de diferenças estruturais na população de neurônios ganglionares.

Neurônios ganglionares são individualmente envolvidos por células satélites que produzem uma cápsula glial contínua ao longo do corpo neuronal. Em algumas áreas está reduzida a processos citoplasmáticos muito finos interpostos entre o neurônio de um lado e a membrana basal e tecido conjuntivo de outro. A cápsula glial entende-se sobre os dendritos.

3.8 ASPECTOS NUTRICIONAIS

A desnutrição no início da vida pode afetar profundamente o corpo e o cérebro de ratos. Alguns desses efeitos são permanentes enquanto outros desaparecem durante o período de reabilitação nutricional (YUNCEL et al., 1994).

A subnutrição de ratos durante o início da vida é conhecida como causadora de déficits permanentes no número total de células cerebrais determinados por arranjos bioquímicos do conteúdo do DNA cerebral. Se isso é devido a uma perda de neurônios ou uma falha de proliferação de células gliais permanece incerto a partir dessas medidas bioquímicas (BEDI, 1991).

Pesquisas em animais revelaram que uma nutrição inadequada no período pré-parto, como por exemplo, uma restrição severa de comida para a mãe, redução severa do conteúdo em proteína da dieta da mãe, conduz a deficiências nutricionais a um aumento de liberação de noroadrenalina no cérebro de animais (ZANIN et al., 2003).

O estado nutricional é determinado por um balanço entre o suprimento de nutrientes e a utilização destes pelo organismo. A desnutrição está relacionada com o desequilíbrio do estado nutricional e ocorre sob diversas formas, podendo ter conseqüências reversíveis ou irreversíveis. Estudos específicos sobre os efeitos da desnutrição nos neurônios evidenciaram uma redução de 27% no número de neurônios no intestino delgado de ratos cujas mães sofreram restrição protéica durante as duas últimas semanas de gestação. Em trabalhos realizados com o jejuno de ratos desnutridos nos períodos de gestação e lactação e submetidos à dieta com teor protéico normal (22%), no período de desmame, não foi verificada a redução da população de neurônios. Verificou-se também que em ratos renutridos aos 21 dias de vida extra-uterina, cujas mães sofreram restrições protéicas durante a gestação, não foram observadas, no intestino como um todo, diferenças estatisticamente significativas com relação à densidade neuronal, o que sugere que com a renutrição foi possível recuperar-se o número total de neurônios (ZANIN et al., 2003).

Efeitos da desnutrição pré e pós-natal em ratos também demonstraram, no intestino delgado, diminuição do comprimento das vilosidades, o que sugere que pode ter havido importante mecanismo de adaptação em resposta à desnutrição (ZANIN et al., 2003).

O sistema nervoso mientérico exhibe grandes complexidades anatômicas, bioquímicas e funcionais, abrangendo redes neuronais intrínsecas formadas por neurônios sensitivos, interneurônios e neurônios motores. Esta complexa organização neuronal desempenha importante função na homeostase, por controlar a tonicidade dos vasos sanguíneos e do tubo digestório, sua motilidade, o transporte de líquidos e a secreção das células endócrinas intrínsecas (FURNESS, 2000; ZANIN et al., 2003).

Segundo Castelucci et al. (2002), a privação protéica da mãe durante a gravidez, e dos recém-nascidos nos primeiros 21 dias reduziu o peso dos filhotes em aproximadamente 50%. O tamanho do cólon também foi reduzido em aproximadamente 40%. Apesar disso o número de neurônios do colón não foi reduzido. Contudo houve uma pequena, mas significativa, redução de 15% no tamanho dos neurônios estimado pela área de seus corpos celulares.

Pode-se observar que após o nascimento, os filhotes foram removidos de suas mães e mantidos sob dieta controlada privada de proteínas, ou mudado de uma dieta privada de proteína para uma dieta normal (grupo realimentado). Os animais realimentados apresentaram um peso 20% a baixo do controle. E também se notou que após um total de 42 dias de privação protéica, o número de células nervosas não sofreu redução significativa (CASTELUCCI et al., 2002).

Castelucci et al. (2002), notaram que os realimentados entre 21 e 42 dias recuperaram a morfologia normal dos neurônios. E concluiu-se que os neurônios entéricos são protegidos da perda mesmo quando há uma substancial redução no peso do corpo e tamanho do órgão causado pela privação protéica. Os Neurônios tornam-se menores (atrofia), mas recuperam seus tamanhos após a realimentação.

Segundo Castelucci et al. (2002), em uma análise quantitativa os animais do grupo normalmente alimentado tiveram pesos corpóreos quase dobrados em relação àqueles privados de proteínas aos 21 dias após o nascimento.

O peso do corpo dos animais alimentados normalmente foi de aproximadamente 60% maior do que o grupo subnutrido aos 42 dias, contudo

realimentando os ratos subnutridos entre 21 e 42 dias reestabeleceu-se o peso em 20% do normal aos 42 dias (CASTELUCCI et al., 2002).

Segundo Miranda-Miranda-Neto et al. (2003), uma dieta hipoproteica não conseguiu alterar a organização dos neurônios miontéricos; nadh-diaforese positivo do jejuno de ratos. Entretanto, isto levou à menor desenvolvimento corporal nos animais desnutridos, contribuindo para que os neurônios destes sofressem menor dispersão e apresentasse maior densidade.

Recentemente desenvolvidos, os métodos estereológicos têm sido usados em experimentos para examinar os efeitos de dois níveis de subnutrição durante o início da vida pós-natal no número total de células granulares de ratos. Esse estudo tem mostrado que ratos submetidos previamente à subnutrição apresentam déficits no número total de neurônios (BEDI, 1991).

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais utilizados e os métodos empregados neste trabalho serão apresentados em detalhes para obtenção dos resultados.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Animais

Foram utilizados seis gânglios celíacos esquerdos provenientes de seis ratos Albinus Wistar, com 21 dias de idade, machos provenientes de acasalamento durante um período de sete a dez dias. De acordo com o tratamento empregado e o tipo de dieta disponibilizada, os animais foram divididos em dois grupos:

- a) Nutridos com três animais tendo peso médio de 67.5 gramas (CV = 0.03)
- b) Desnutrido com três animais tendo peso médio de 9.7 gramas (CV = 0.19)

Os animais foram provenientes do Biotério do Laboratório Multidisciplinar de Distúrbios Metabólicos do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Indução da Desnutrição

Para todas as ratas prenhes que geravam ratos nutridos foi oferecida uma dieta protéica (20% de proteína-caseína) e para as fêmeas que geravam os animais desnutridos receberam uma dieta hipoproteica (5% de Proteína-caseína). As rações de acordo com o protocolo de Castelucci et al (2002); Brandão et al., (2003). Mesmo depois que os animais nasceram foi introduzido à mesma dieta que foi oferecida as ratas quando prenas. A partir do primeiro dia de gestação a dietas foram introduzidas nos animais.

Após o nascimento, as progenitoras dos ratos nutridos (N) e desnutridos (D), foram mantidas com as respectivas dietas até que a prole atingisse 21 dias de vida pós-natal, época em que o desmame foi realizado.

Os animais não foram escolhidos das mesmas ninhadas, isto quer dizer que, os animais escolhidos não possuíam o mesmo parentesco.

Aos 21 dias de vida os filhotes foram pesados e identificados através de numeração na cauda, sendo três animais de cada grupo escolhidos sistemática e aleatoriamente.

4.2.2 Estudo Histológico

Aos 21 dias os animais serão ortoeutanasiados com uma overdose intraperitoneal de Tiopental Sódico (10mg/100g de peso corpóreo) aplicados por via intraperitoneal.

A cavidade torácica foi aberta e uma cânula inserida dentro do ventrículo esquerdo do coração até atingir a aorta ascendente. Primeiramente 100 ml de uma solução de lavagem composta de tampão fosfato salino (PBS) e 1% de heparina foi perfundida. Posteriormente, foram perfundidos 100ml de solução fixadora composta por glutaraldeído (5%) e formolaldeído (1%) em tampão cacodilato de sódio (pH 7,4)

(0,125M) à temperatura de 10 a 15 °C. Para a evidência do gânglio celíaco foi promovida uma celiotomia pré-umbilical e para costal esquerda para a retirada da musculatura de parede abdominal e rebatimento do intestino e do rim esquerdo. A seguir a aorta abdominal foi seguida até a emergência das artérias celíaca e mesentérica cranial que referenciam a localização do gânglio celíaco esquerdo. Uma vez identificado o gânglio celíaco esquerdo promoveu-se a microdissecação do mesmo sob o microscópio cirúrgico Leica® M651 (6-40x) e conseqüentemente a coleta do material. Todos os nervos que se conectavam ao gânglio também foram dissecados e todo o conjunto foi removido e contendo a mesma solução fixadora em tampão cacodilato onde permaneceu por 72 horas.

Em seguida, foi pós-fixado em solução de tetróxido de Ósmio (2%), o material foi lavado em água destilada e a seguir desidratado em série crescentes de etanóis (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%) dez minutos cada e óxido de propileno (MERCK®) por dez minutos. Depois da desidratação, realizou-se a embebição do material em solução de óxido de propileno e resina Araldite® (502 Polyscience Inc®) por 1 hora e foram embebidos em resina Araldite pura (por 2 horas), foram isotropizados pelo método do “rotator” (MATTFELDT et al, 1990) e, finalmente, reembebidos em resina Araldite pura e polimerizada em estufa (60-70°C) por dois dias.

A partir de cada bloco, foram feitos cortes semi-finos (1µm) sistematicamente espessados com o uso de navalha de vidro no ultramicrotomo RMC® modelo MTXL. As secções foram coradas com solução de azul de toluidina e montadas sobre lâmina e lamínula para visualização.

A amostragem de cada gânglio celíaco foi sistematicamente e uniformemente aleatória (SURS) ao longo de todo o material (GUNDERSEN et al, 1999; NYENGAARD, 1999).

4.2.3 Estudo Estereológico

Para a aplicação do disector físico (vide secção posterior a esta), estimamos o tamanho neuronal (eixo curto). As secções foram observadas com uso de microscópio Leica® DMR com uso de software de Análise de Imagem Leica QWIN (Leica® Microsystem Imaging Solution Ltda, Cambridge, UK), sendo as imagens capturadas com uso de câmera digital Leica® DC 300F e projetadas na tela do computador.

Para obter imparcialmente a população de neurônios bem como estimar seus tamanhos, um sistema teste contendo uma frame, cuja área total foi de 13.188,9 μm^2 , foi selecionada em cada secção histológica, e linhas de exclusão e de inclusão foram aplicadas nos planos bi e tridimensionais (GUNDERSEN, 1977; HOWARD; REED, 2005).

4.2.3.1 - Volume do Gânglio (Vg)

Para estimar o volume do gânglio (Vref) foi utilizado o Princípio de Cavalieri utilizando as mesmas secções histológicas, utilizadas para o método do disector (Veja detalhes adiante) da seguinte forma:

Utilizando o microscópio, foram capturadas imagens das secções de referências ao longo de todo o gânglio.

O volume referência (Vref) foi estimado de acordo com a seguinte fórmula (RIBEIRO; DAVIS; GABELLA, 2004):

$$Vg = \sum P \times (a/p) \times T \times K$$

Onde: Vg = Volume do gânglio

T = espessura média das fatias do gânglio.

P = pontos que foram contados ao longo de todo o gânglio.

a/p = área associada a cada ponto do sistema teste.

K = distância entre cortes histológicos.

O coeficiente de erro (CE) para a estimativa de volume pelo Princípio de Cavalieri foi estimado de acordo com Gundersen et al (1999), foi obtido empregando-se a seguinte fórmula: $\{(1/\Sigma A) \times [1/1/2 \times (3^a - 4B + C)]\}$ e o coeficiente de variação foi expresso pela fórmula $CV = \text{Desvio padrão} / \text{média}$. A precisão de estimativas individuais é indicada pelo coeficiente de erro (CE).

4.2.3.3 - Número Total de Neurônios (N)

O número total de neurônios (N) foi estimado pelo método disector (HOWARD; REED 2005; PAKKENBERG; GUNDERSEN 1988, 1989; POVER; COGGESHALL 1991; MAYHEW; GUNDERSEN 1996; STERIO 1984) associado ao Princípio de Cavalieri, multiplicando-se a densidade numérica (N_v) pelo volume do gânglio (V_g):

$$N = N_v \times V_g$$

Onde: N = número total de neurônios

N_v = densidade numérica

V_g = volume ganglionar

Para calcular o coeficiente de erro (N), foi usada a seguinte fórmula:

$$CE = \frac{1}{\sqrt{Q-}}$$

4.2.3.2 - Densidade Neuronal (N_V):

A densidade numérica (N_V) é a relação entre número total de objetos discretos (neste caso, os neurônios do gânglio) contados (amostrados) em um volume conhecido.

No presente estudo foi aplicado o “one-way” disector físico, que permite contar partículas independentemente do tamanho, forma, distribuição ou orientação (disectors), utilizando um volume conhecido que é obtido através de pares de secções provenientes de cortes seriados (RIBEIRO; DAVIS; GABELLA, 2004; STERIO, 1984).

Este método consiste na contagem do número de partículas (Q^-) dos neurônios do gânglio celíaco, que estão presentes na seção de referência, mas não na seção “look up” ou vice-versa. Cada disector é constituído por duas secções idênticas separadas por uma altura conhecida, sendo estas secções denominadas respectivamente de “reference-section” e “look-up section”.

Posteriormente a soma número de “Q” foi dividida pela soma dos volumes dos disectors (o volume do disector refere-se ao produto da área teste utilizada na “reference section” pela altura do disector) (HOWARD; REED, 2005), obtivemos dessa forma a densidade neuronal (N_V).

As secções de referência cobriram toda a extensão do gânglio e foram espaçadas dentro de um intervalo (k). Este intervalo foi variável para cada animal, tendo como base para sua determinação o tamanho de cada gânglio.

Animais		Animais Nutridos	Animais Desnutridos
01	Disectors	60	58
	Q^-	218	210
02	Disectors	56	58
	Q^-	213	208
03	Disectors	58	54
	Q^-	208	211

Tabela 1 – Representação do número de “disectors” e número total de perfis neuronais encontrados em cada animal de cada grupo – São Paulo, 2006.

A seguinte fórmula foi utilizada:

$$N_V = \Sigma Q^- / \Sigma V(\text{dis}) = t \cdot a$$

Onde: t = altura de cada disector. Para os grupos 1 o t = 7 μm ou $7 \cdot 10^{-3} \text{ mm}$ e para o grupo 2 o t = 4 μm ou $4 \cdot 10^{-3} \text{ mm}$

a = área teste bidimensional imparcial usada para a amostragem das partículas a serem contadas. A área neste caso era de: 13.188,9 μm^2 .

Q^- = número de neurônios amostrados (presente na secção referência, mas ausente na secção vizinha).

4.2.3.4 - Volume Neuronal ($\bar{v}_N$)

O volume neuronal foi estimado pelo método do “nucleator” (Gundersen, 1988). Este método é uma ferramenta estereológica desenvolvida para estimar o volume médio e a distribuição de volume das partículas independentemente da sua forma, distribuição ou orientação.

A amostragem das partículas envolve o uso sistemático de disectors, sejam eles físicos ou ópticos, como descrito por Gundersen (1986, 1988) e Cruz-Orive (1987).

A estimativa do nucleator baseia-se na seguinte fórmula:

$$\text{Volume Neuronal} = 4\pi/3 \times I_n^3$$

Onde I_n é medido a partir de um ponto fixo, arbitrariamente escolhido, até o limite da partícula.

4.2.3.5 - Densidade de volume (Vv)

Expressa a fração do volume total de um compartimento (no nosso caso um gânglio) que é ocupada pelos seus respectivos neurônios. Um sistema teste constituído por pontos aleatórios e sistemáticos foi utilizado para estimar a densidade de volume neuronal. Então o número total de pontos atingindo o espaço referência foi calculado P (“reference space” - rs), assim como o total de pontos atingindo os corpos celulares de neurônios P(ncb). A estimativa da densidade de volume vai de zero a um, porém é expressa em porcentagem (RIBEIRO; DAVIS; GABELLA, 2004; RIBEIRO, 2006).

$$Vv(ncb, rs) = \Sigma P(ncb) / \Sigma P(rs)$$

4.2.4 - Análise Estatística

A distribuição de frequência dos parâmetros estereológicos estimados foi analisada pelo “one-way” ANOVA, usando o software MINITAB®. Quando diferenças significativas entre grupos foram detectadas ($p < 0.05$), o teste post-hoc Tukey de comparações múltiplas foi utilizado.

Os resultados serão apresentados como média (CV), sendo CV = desvio padrão/média e quando pertinente à variância (CE) de cada estimativa será fornecida.

Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados são oriundos de dois grupos (animais nutridos e animais desnutridos) sobre o gânglio celíaco esquerdo. Desta forma os métodos empregados serão relacionados neste capítulo.

5.1 MACROESTRUTURA

Localização e Distribuição:

A localização do gânglio celíaco esquerdo nos animais dos dois grupos de estudo não sofreu alterações macroscópicas. Desta forma, o gânglio celíaco esquerdo foi identificado lateralmente e sobreposto à artéria celíaca e ventralmente à glândula adrenal esquerda.

5.2 MICROESTRUTURA

O gânglio celíaco estava envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo que emitia septos intraganglionares que se ramificavam em septos interunidades, pois determinavam o arranjo espacial dos neurônios ganglionares em agrupamentos, ou seja, em unidades ganglionares, caracterizando um complexo ganglionar, que se dispunha em várias direções nos animais nutridos ou controles e animais desnutridos.

As unidades ganglionares eram compostas, em ambos os grupos: nutrido e desnutrido. Nos animais do grupo nutrido, as unidades ganglionares dispunham-se de maneira mais heterogêneas, portanto, os neurônios ganglionares se apresentavam mais dispersos com relação ao tecido conjuntivo. Já nos animais desnutridos foi possível observar que as unidades ganglionares dispunham-se de

maneira mais homogenias, ou seja, compacta umas às outras e, portanto, os neurônios ganglionares também se apresentavam mais próximos entre si.

Os perfis dos neurônios ganglionares puderam ser facilmente identificados devido ao seu padrão morfológico (Figura 1).

Figura 1 - Fotomicrografia do Gânglio Celíaco Esquerdo de Rato Wistar (Foto (A) Animal Nutrido e Foto (B) Animal Desnutrido, exibindo perfis de neurônios, corpo celular (→), núcleos (→), nucléolos (→). Azul de Toluidina. Escala de barra 10μm.

5.3 ESTUDO ESTEREOLÓGICO

Neste estudo os resultados são apresentados na seguinte ordem: volume do gânglio, densidade neuronal, número total de neurônios, volume neuronal e densidade de volume neuronal.

Os animais foram subdivididos em dois grupos dependendo da disponibilidade de nutrientes oferecidos:

Grupo I – Animais Nutridos ou Controle (N). Esses gânglios mediram:

Animal 1: 4,59 mm de comprimento (C); 1,36 mm de largura (L) e 1,44 mm de espessura (E).

Animal 2: 4,39 mm de comprimento (C); 1,88 mm de largura (L); 1,65 mm de espessura (E).

Animal 3: 4,64 mm de comprimento (C) ; 1,89 mm de largura (L); 1,76 mm de espessura (E).

Grupo II – Animais Desnutridos (D) nos períodos Pré e Pós-Natal. Esses gânglios mediram:

Animal 1: 1,39 mm de comprimento (C); 0,62 mm de largura (L) e 0,64 mm de espessura (E).

Animal 2: 1,35 mm de comprimento (C); 1,0 mm de largura (L); 0,80 mm de espessura (E).

Animal 3: 1,05 mm de comprimento (C) ; 0,96 mm de largura (L); 0,79 mm de espessura (E).

5.3.1 Volume do Gânglio (Vref)

O volume do gânglio celíaco esquerdo foi estimado sendo que os animais nutridos apresentaram volume de $1,025 \text{ mm}^3$ (CV = 0.19). Tendo seu coeficiente de erro médio de 1,46%. O volume total no grupo de desnutrido foi de $0,21 \text{ mm}^3$ (CV = 0.24). Tendo seu coeficiente de erro médio de 1,60% (Figura 4). As diferenças entre o grupo nutrido e o grupo desnutrido foram altamente significantes, tendo seu $P < 0.01$.

5.3.2 Densidade Neuronal (N_V)

A densidade numérica dos neurônios do gânglio celíaco foi de $40.971,61 \text{ mm}^{-3}$ o grupo nutrido (CV = 0.03). Tendo seu coeficiente de erro médio de 1.46%. Enquanto que a densidade neuronal para o grupo desnutrido foi de $70.180,33 \text{ mm}^{-3}$ (CV = 0.04). Tendo seu coeficiente de erro médio de 1.6%. As diferenças entre o grupo nutrido e o grupo desnutrido foram altamente significantes, tendo seu $P < 0.000$. (Figuras 2, 3 e 4).

Figura 2 (A-B) -Fotomicrografia mostrando um disector utilizado para estimar a densidade numérica dos neurônios no grupo de nutridos. Secção referência (A) e “look up” (B), espaçadas em 2 μm . (A) As setas em preto indicam um nucléolo visualizado na secção referência e a seta em vermelho indica a ausência desse nucléolo na secção “look-up”. (B) As setas em preto indicam um corpo celular visualizado na secção referência e a seta em vermelho indica a ausência desse corpo celular nas secções “look-up”. Altura dos disectors: 7 μm , técnica de coloração: azul de toluidina e escala de barra: 20 μm .

Figura 3 (A-B) - Fotomicrografia mostrando um disector utilizado para estimar a densidade numérica dos neurônios no grupo desnutrido. Secção referência (A) e “look up” (B), espaçadas em $1\mu\text{m}$. (A) As setas em preto indicam um nucléolo visualizado na secção referência e a seta em vermelho indica a ausência desse nucléolo na secção “look-up”. (B) As setas em preto indicam um corpo celular visualizado na secção referência e a seta em vermelho indica a ausência desse corpo celular nas secções “look-up”. Altura do disector: $4\mu\text{m}$, técnica de coloração: azul de toluidina e escala de barra: $20\mu\text{m}$.

5.3.3 Número Total de Neurônios (N)

O número total de neurônios foi 41.858 (CV = 0.17) para o grupo nutrido. Tendo seu coeficiente de erro médio de 6,80%. Enquanto que para o grupo de desnutridos o número total foi de 15.366 (CV = 0.22). Tendo seu coeficiente de erro médio de 6,90%. As diferenças entre o grupo nutrido e o grupo desnutrido foram altamente significantes, tendo seu $P < 0.005$. (Figura 4).

Figura 4 - Volume referência ($p < 0,002$), densidade numérica neuronal ($p < 0,000$) e número total de neurônios ($p < 0,005$) do gânglio celíaco de animais desnutridos e nutridos. Diferenças entre grupos estão indicadas por asteriscos (*). Barras horizontais indicam médias de grupos.

5.3.4 Densidade de Volume (Vv)

A densidade de volume (Vv) dos neurônios do gânglio celíaco foi de 15,1% (CV= 0.03) para o grupo nutrido Para os animais desnutridos 17,8% (CV= 0.05). As diferenças entre o grupo nutrido e o grupo desnutrido foram altamente significantes, tendo seu $P < 0.014$. (Figura 5).

5.3.5 Volume médio Neuronal ($\bar{v}_N$)

O volume médio neuronal foi de 51.912,85 $\mu^3\text{m}$ (CV = 0.05) o grupo nutrido Para o grupo de animais desnutridos foi de 22.169,90 $\mu^3\text{m}$ (CV = 0.04). As diferenças entre o grupo nutrido e o grupo desnutrido foram altamente significantes, tendo seu $P < 0.000$. (Figura 5).

Figura 5 - Densidade de volume ($p < 0,014$), volume médio neuronal ($p < 0,000$) do gânglio celíaco de animais desnutridos e nutridos. Diferenças entre grupos estão indicadas por asteriscos (*). Barras horizontais indicam médias de grupos.

Discussão

6 DISCUSSÃO

A discussão será dividida nos seguintes tópicos para melhor compreensão: macroestrutura, microestrutura e estudo estereológico.

6.1 MACROESTRUTURA

Hammer e Santer (1981) reportaram que, macroscopicamente, o gânglio celíaco esquerdo de ratos é formado por três principais componentes, o gânglio supra-renal esquerdo em continuidade com o nervo celíaco esquerdo e com o nervo esplâncnico maior esquerdo. O gânglio celíaco esquerdo e o gânglio mesentérico superior esquerdo, segundo estes autores, apresentavam-se fusionados e nas proximidades era possível identificar o gânglio aórtico-renal.

Já os relatos de Ghoshal (1986) em equinos, revelam que o plexo celíaco-mesentérico e os gânglios celíaco e mesentérico cranial podem estar variavelmente fundidos em uma massa difusa na parede dorsal da cavidade abdominal, circundando as origens das artérias celíaca e mesentérica cranial, sendo contínua com o plexo mesentérico caudal.

Quanto à forma do gânglio celíaco esquerdo de ratos, segundo Gabella (2004), ele tem aspecto semi - lunar, localizando-se lateralmente à artéria celíaca e à artéria mesentérica superior. E o gânglio celíaco é separado do mesentérico cranial.

Nos resultados observados concordamos com Ghoshal (1986), Gabella (2004), com pequenas alterações individuais, que a localização do gânglio celíaco esquerdo ocorreu junto à origem da artéria celíaca esquerda. Quanto ao aspecto do gânglio, nossos resultados aproximam-se mais significativamente aos relatos de Promwikosn et al. (1998), ou seja, um formato irregular.

Em todos os animais observados, o gânglio celíaco estava isolado do gânglio mesentérico cranial esquerdo, que se localizava junto à origem da artéria homônima e, portanto caudalmente ao gânglio celíaco esquerdo.

O que se pôde notar nos animais nutridos foi que o gânglio celíaco esquerdo estava isolado do gânglio mesentérico cranial esquerdo. Sendo assim pode-se

identificar facilmente o gânglio celíaco esquerdo. Nos animais desnutridos a morfologia geral do gânglio celíaco esquerdo foi similar àquela dos nutridos.

O volume do gânglio nos animais nutridos foi de 1.025 mm^3 e o volume dos animais desnutridos foi de 0.21 mm^3 . Sendo 4.88 vezes maior o nutrido que o desnutrido o volume do gânglio.

6.2 MICROESTRUTURA

O gânglio celíaco estava envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo que emitia septos intraganglionares que se ramificavam em septos interunidades, pois determinavam o arranjo espacial dos neurônios ganglionares em agrupamentos, ou seja, em unidades ganglionares, difusamente caracterizando um complexo ganglionar, que se dispunha em varias direções nos animais nutridos e animais desnutridos.

Schmidt (1996) relata que uma cápsula colágena envolve o gânglio cervical e o gânglio mesentérico superior em humanos, sendo que ocasionalmente emite septos para o interior do mesmo conferindo-lhe apresentação nodular e mais particularmente no gânglio mesentérico superior.

Miller et al. (1996) à microscopia de luz, verificou que o gânglio mesentérico superior era envolvido por uma fina camada capsular e contendo densos conjuntos de corpos neuronais e células satélites. Os neurônios eram geralmente ovais e facilmente identificados pelos seus núcleos únicos, periféricos, arredondados contendo de um a dois nucléolos.

As unidades ganglionares eram compostas, em ambos os grupos: nutrido e desnutrido. Nos animais do grupo nutrido, as unidades ganglionares dispunham-se de maneira mais heterogênea, portanto, os neurônios ganglionares se apresentavam mais dispersos com relação ao tecido conjuntivo. Já nos animais desnutridos foi possível observar que as unidades ganglionares dispunham-se de maneira mais homogênea, ou seja, compacta umas às outras e, portanto, os neurônios ganglionares também se apresentavam mais próximos entre si.

6.3 ESTUDO ESTEREOLÓGICO

À seguir discursaremos sobre os parâmetros encontrados neste trabalho, mas sabendo que há poucos trabalhos utilizando quantificação estereológica em gânglio celíaco de ratos nutridos e desnutridos.

O que se pode encontrar na literatura, foram publicações relacionadas ao sistema nervoso entérico em animais submetidos à desnutrição utilizando quantificação morfométrica para calcular a densidade por área, e com diferente protocolo para induzir a desnutrição. E essa desnutrição fez com que houvesse uma diminuição de 45% no intestino delgado do animal. (BRANDÃO et al., 2003). Muitos modelos usados eram eficientes e os animais no grupo nutridos pesavam aproximadamente 60% a mais do que ratos desnutridos, segundo Castelucci et al. (2002).

Neste estudo pode-se observar que a densidade dos animais desnutridos foi de $70.180.33 \text{ mm}^{-3}$ e nos nutridos de $40.971,61 \text{ mm}^{-3}$. Sendo os desnutridos 1.71 vezes maiores que os nutridos. Já observando seu número total o desnutrido foi de 15.366 e nos animais nutridos de 41.858. Sendo então os nutridos 2.77 vezes maiores que os desnutridos. Sendo assim podemos observar que no método morfométrico a densidade teve uma diminuição real de 0.45 vezes e no método estereológico um aumento de 2.77 vezes. A densidade por área (morfometria) não pode ser extrapolada e não significativa para número total. Por exemplo, Brandão et al., 2003 encontrou uma diminuição de 0.45 vezes na densidade de neurônios no cólon de animais desnutridos enquanto que no presente estudo foi encontrado uma diminuição de 2.77 vezes no número total de neurônios do gânglio celíaco de animais desnutridos, embora no primeiro caso tratava-se de neurônios entéricos e no nosso caso estudamos neurônios extrínsecos que também inervam o intestino delgado.

6.3.1 Volume ganglionar (V_{ref})

O volume do gânglio (V_{ref}) apresentou-se 4,85 vezes nos animais nutridos em relação aos animais desnutridos. Isso foi corroborado pelas dimensões dos eixos macromorfométricos dos gânglios (vide resultados).

Segundo Zanin et al. (2003) uma nutrição inadequada no período pré-parto, com uma restrição severa de proteína para a mãe, conduz a deficiências nutricionais irreversíveis. Sendo assim, neste caso, o volume do órgão, é menor em relação ao que obteve uma dieta rica em proteína (animais controles).

Já que segundo Castelucci et al. (2002), em uma análise quantitativa os animais do grupo normalmente alimentados tiveram pesos corpóreos quase dobrados em relação àqueles privados de proteína aos 21 dias após o nascimento.

6.3.2 Densidade Neuronal (N_V)

Vale ressaltar que o N_V do grupo desnutrido é 1,72 vezes maior que os nutridos. Valendo ressaltar que isso ocorreu devido ao aumento do volume neuronal médio $\bar{v}_N$ no grupo nutrido. Uma vez que o volume neuronal médio geralmente é inversamente proporcional à densidade numérica.

A densidade neuronal dos animais desnutridos demonstram que seus neurônios são menores estando mais condensados.

Segundo Wester et al. (1999), utilizando de morfometria com neurônios nitrérgicos de ceco de camundongos estimou aproximadamente que estes neurônios representam 34 % do número total de neurônios entéricos.

Segundo Sant'ana et al. (1997), utilizando de morfometria, em estudos com cólon de ratos observaram um grande número de neurônios na região intermediária quando comparado com a região antimesocólica (31.62% maior em ratos desnutridos comparados a ratos controles – com alimentação normal), porém esta diferença foi atribuída a presença de camada densa de fibras musculares encontradas na região intermediária que podia 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, utilizando técnicas de coloração de Giemsa, histoquímica de NADH-d, NADPH-d e acetilcolinesterase, de 18 ratos Wistar, com idade de 7 meses, observaram que no íleo é mais distante da margem mesentérica a densidade neuronal apresentou-se menor, ou seja, na região da borda mesentérica, ao passo que uma ampla densidade neuronal foi observada, na região oposta (margem antimesentérica) uma pequena densidade neuronal foi verificada.

Gagliardo (2006) pesquisou os neurônios do plexo mioentéricos, NADH-d e NADPH – d reativos, das porções ascendentes e descendentes do cólon de ratos wistar, sedentários e submetidos à atividade física. Os resultados referentes à densidade neuronal por área dos neurônios NADH-d reativos não diferiram significativamente na comparação entre os grupos ou porções do cólon.

6.3.3 Número total de Neurônios (N)

O número total de neurônios celíacos foi 2,7 vezes maior em comparação aos animais desnutridos. Os resultados deste estudo sugerem que a dieta protéica hipoproteica conduz à diminuição do número total de neurônios celíacos provavelmente correlacionados aos déficits de proteína em sua alimentação, uma vez que um dos territórios de inervação do gânglio celíaco inclui o intestino delgado (Gabella, 2004).

Segundo Castelucci et al. (2002), a privação protéica da mãe durante a gravidez, e dos recém-nascidos nos primeiros 21 dias reduziu o peso dos filhotes em aproximadamente 50%. O tamanho do cólon também foi reduzido em aproximadamente 40%. Apesar disso o número de neurônios do colón não foi reduzido. Contudo houve uma pequena, mas significativa, redução de 15% no tamanho dos neurônios estimado pela área de seus corpos celulares. No entanto acreditamos que os resultados podem ser diferentes se métodos estereológicos foram empregados em estudos similares.

Recentemente desenvolvidos, os métodos estereológicos têm sido usados em experimentos para examinar os efeitos de dois níveis de subnutrição durante o início da vida pós-natal no número total de células granulares de ratos. Bedi (1991)

demonstrou que ratos submetidos previamente à subnutrição apresentam déficits no número total de neurônios (BEDI, 1991).

Gabella (1971) indicou diminuição da população de neurônios NADH – d reativos em ratos adultos, comparativamente aos jovens.

Santer e Baker (1988) em experimento com rato wistar macho com idade 6-24 meses referiram o menor número total de neurônios mioentéricos NADH – d reativos em animais com 24 meses por todo o trato intestinal com diminuição pronunciada (64,0%) no cólon quando comparado com outras regiões.

6.3.4 Densidade de volume neuronal (Vv)

Pode-se verificar que nos animais desnutridos a densidade de volume neuronal foi de 0,84 vezes maior que nos animais nutridos. Por que apresentou uma maior quantidade de neurônios ocupada em uma mesma região por estarem mais agregados uns ao outros, porém sem aumentar do número total de neurônios. Sendo assim não houve uma alta significância entre os grupos.

Segundo Miranda - Neto et al. (2003), através de um estudo morfométrico, uma dieta hipoproteica não conseguiu alterar a organização dos neurônios mioentéricos; NADH-d positivo do jejuno de ratos. Entretanto, isto levou à menor desenvolvimento corporal nos animais desnutridos, contribuindo para que os neurônios destes sofressem menor dispersão e apresentasse maior densidade.

6.3.5 Volume neuronal médio ($\bar{v}_N$)

O volume neuronal mensura neste caso o volume médio das células (neurônios).

Os neurônios dos animais nutridos foram de 2,34 vezes maiores em relação aos neurônios de animais desnutridos.

Miranda - Neto et al. (2005), classificaram os neurônios do jejuno de ratos Wistar em pequenos, médios e grandes. Os neurônios com área menor do que

113,96 μm^2 foram considerados pequenos; aqueles com valor acima de 266,64 μm^2 (neurônios grandes), sendo que com os valores entre 113,96 e 266,64 μm^2 (neurônios médios). Agrupando os neurônios em classe de 100 μm^2 referiram maior número nos intervalos entre 101 e 400 μm^2 .

Schoffen et al. (2005) avaliaram os neurônios mioentéricos (técnicas imunohistoquímicas da miosina – V) do cólon de 10 ratos Wistar machos com 360 dias de idade, submetidos à restrição protéica, comparativamente com animais controles (sem restrição). Os neurônios foram distribuídos em classes, obedecendo aos intervalos de 100 μm^2 em ambos os grupos os neurônios apresentavam grande diversidade de tamanho (de 51,12 a 840,43 μm^2). Nos dois grupos, a maioria dos neurônios encontravam-se nas classes 101 a 200 μm^2 e de 201 a 300 μm^2 . Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos pelo teste T-student ($p < 0,05$).

Já neste trabalho realizado usando o “one-way” ANOVA, usando o software MINITAB®, obtivemos diferenças altamente significantes.

Uma vez que os métodos estereológicos são utilizados para estimar volumes de partículas sem assumir forma, tamanho, orientação ou distribuição das células (GUNDERSEN et al., 1988). E o volume médio se revela muito mais acurado do que estimativa de tamanho baseado simplesmente em uma área seccional.(TANDRUP, 2004).

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos métodos empregados, pôde se concluir que:

- Não houve variação na localização na posição do gânglio celíaco entre os animais nutridos e desnutridos.
- Referente à parte de microestrutura o tamanho do corpo celular é diminuído devido à falta de proteína na alimentação do animal.
- O protocolo de desnutrição empregado no presente estudo causou os seguintes efeitos no gânglio celíaco de ratos:
 - redução do volume ganglionar
 - aumento na densidade numérica
 - redução no número total destes neurônios
 - aumento do volume neuronal assim como na densidade de volume dos mesmos

Referências

REFERÊNCIAS

- ARVIDSON, B . A study of the peripheral diffusion barrier of a peripheral ganglion. **Acta Neuropathologica**, v. 46, p. 139-144, 1979.
- BALJET, B.; DRUKKER, J. The extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat. **Acta Anatomica**, v. 104, p. 243-267, 1979.
- BEDI, K. S. Early-life undernutrition causes deficits in rat dentate gyrus granule cell number. **Experientia**, v. 4, p.1073-1074, 1991.
- BRANDÃO M.C.S., DE ANGELIS R.C., DE SOUZA R.R., LIBERTI E.A. Effects of pre- and postnatal protein deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric study in weaning rats. **Nutrition Research**, v. 23, p. 215-223, 2003.
- CASTELUCCI, P.; SOUZA, R. R.; ANGELIS, R. C.; FURNESS, J. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pré-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, p. 1-7, 2002.
- CONBOY, V. B; SANTER, R. M.; SWIFT, G. L. Effects of prenatal undernutrition on prevertebral sympathetic neurons in the rat: a morphological and fluorescence histochemical study. **Journal of Anatomy**, n. 154, p. 47-53, 1987.
- CRUZ-ORIVE, L. M. Particle number can be estimated using a disector of unknown thickness: the selector. **Journal of Microscopy**, v. 145, p. 121-142, 1987.
- EVANS, R. J.; SURPRENANT, A. P2X receptors in autonomic and sensory neurons. **Neuroscience**, v. 8, p. 217-223, 1993.
- FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **Journal of Autonomic Nervous System**, v. 8, n. 11, p. 387-396, 2000.
- GABELLA, G. Autonomic nervous system. In: Gabella G: Ed. **The rat nervous system**. London: Academic Press, 2004. p. 81-103.
- GABELLA, G. Development and ageing of intestinal musculature and nerves: the guinea-pig taenia coli. **Journal of Neurocytology**, v. 30, n. 9-10, p. 733-766, 2001.
- GABELLA, G. **The rat autonomic nervous system**. London: Academic Press, 1995, p. 81-93.
- 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.
- GAGLIARDO, K. M. Efeitos do exercício físico no envelhecimento inicial do plexo mioentérico do colo de tão wistar: estudo quantitativo, morfométrico e ultraestrutural. 2006. 123f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

- GHOSHAL, N. G. Inervação autônoma abdominal, pélvica e caudal. In: _____ SISSON; GROSSMAN; GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986, p. 650-654.
- GUNDERSEN, H. J.; BAGGER, P.; BENDTSEN, T.; EVANS, S. M.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F. B.; VESTERBY, A.; WEST, M.J. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS**, v. 96, n. 10, p. 858-881, 1988.
- GUNDERSEN, H. J. G. Notes of the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. **Journal of Microscopy**, v. 111, p. 219-223, 1977.
- GUNDERSEN, H. J. G. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. **Journal of Microscopy**, v. 143, p. 3-45, 1986.
- GUNDERSEN, H. J. G. The nucleator. **Journal of Microscopy**, v.151, p. 3-21, 1988.
- GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **Journal of Microscopy**, v. 147, p. 229-263, 1987.
- HAMMER, D. W.; SANTER, R. M. Anatomy and blood supply of the celiac-superior mesenteric ganglion complex of the rat. **Anatomy and Embryology**, v. 162, n. 3, p. 206-217, 1981.
- HEDGER J. H.; WEBBER R.H. Anatomical study of the cervical sympathetic trunk and ganglia in albino rat (*Mus novergicus albinos*). **Acta Anatomica**, v. 96, p. 206-217, 1976.
- HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy**. Bios Scientific Publishers, Oxford: 2004, p. 125-143.
- HOWARD, C.V.; REED, M.G. **Three-dimensional measurement in microscopy**. In: _____ Unbiased Stereology. Oxford: Bios Scientific Publishers, 2005, p. 246.
- HULSEBOSCH, C. E.; COGGESHALL, R. E. An analysis of axon populations in the nerves to the pelvic viscera in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 211, p. 1-10, 1982.
- LANGLEY, J. N. **The autonomic nervous system**. Cambridge, Heffer: 1921, p. 89-105.
- MARNER, L.; NYENGAARD, J. R.; TANG, Y.; PAKKENBERG, B. Marked loss of myelinated nerve fibers in the human brain with age. **Journal of Comparative Neurology**, v. 462, p. 144-152, 2003.

MATTFELDT, T.; MALL, G.; GHAREHBAGHI, H.; MOLLER, P. Estimation of surface area and length with the orientador. **Journal of Microscopy**, v. 159, p. 301-317, 1990.

MAYHEW, T. M. Stereological studies on rat spinal neurons during postnatal development: estimates of mean perikaryal and nuclear volumes free from assumptions about shape. **Journal of Anatomy**, v. 172, p. 191-200, 1989.

MAYHEW, T. M.; GUNDERSEN, H. J. G. 'If you assume you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. **Journal of Anatomy**, v. 188, p. 1-15, 1996.

MAYHEW, T.M.; OLSEN, D.R. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle. **Journal of Anatomy**, v. 178, p. 133-144, 1991.

MILLER, S. M.; HANANI, M.; KUNTZ, S. M.; SCHMALZ, P. F.; SZURSZEWski, J. H. Electron and Confocal Microscopic study of the mouse superior mesenteric ganglion. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 365, p. 427-444, 1996.

MIRANDA - NETO, M. H.; DEFANI, M. A.; FREGONESI, C. E. P. T.; NATALI, M. R. M.; PEREIRA, A. Morphometric and quantitative evaluation of the NADPH-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.; ARAÚJO, E. J. A.; SANT'ANA, D. M. G.; MOLINARI, S. L. Regional differences in the number and type of myenteric neurons in the descending colon of rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, p. 220-225, 2003.

MIRANDA - NETO, M. H.; ZANIN, S. T. M.; MOLINARI, S. L.; SANT'ANA, D. M. G. Neurônios NADH-Diaforase positivos do jejuno de ratos adultos (RATTUS NORVEGICUS) desnutridos. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, p. 650-653, 2003.

MIRANDA - NETO, M. H.; MOLINARI, S. L.; NATALI, M.R.M.; SANT'ANA, D. M. G. Regional difference 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.

NYENGAARD, J. R.; GUNDERSEN, H. J. G. The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens. **Journal of Microscopy**, v. 165, p. 427-431, 1992.

NYENGAARD, J.R. Stereologic methods and their application in kidney research. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 10, n.5, p. 1100-1123, 2005.

- PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN, H. J. G. New stereological method for obtaining unbiased and efficient estimates of total nerve cell number in human brain areas. **APMIS**, v. 97, p. 677-681, 1989.
- PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN, H. J. G. Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and fractionator. **Journal of Microscopy**, v. 150, p.1-20, 1988.
- PAXINOS, G.; TORK, F.; TEECOT, L.H.; VALENTINO, K. L. **Atlas of the developing rat brain**. San Diego, Academic Press: 1991, p. 865-8.
- POVER, C. M.; COGGESHALL, R. E. Verification of the disector method for counting neurons, with comments on the empirical method. **The Anatomical Record**, v. 231, p. 573-578, 1991.
- PROMWIKORN, W.; THONGPILA, S.; PRADIDARCHEEP, W.; MINGSAKUL, T.; CHUNHABUNDIT, P.; SOMANA, R. Angioarchitecture of the celiac sympathetic ganglion complex in the common tree shrew (*Tupaia glis*). **Journal of Anatomy**, v. 193, p. 409-416, 1998.
- RIBEIRO, A. A. C. M.; DAVIS, C.; GABELLA, G. Estimate of size and total number of neurons in superior cervical ganglion of rat, capybara and horse. **Anatomy and Embryology**, v. 208: p. 367-380, 2004.
- RIBEIRO, A. A. C. M. Size and number of binucleate and mononucleate superior cervical ganglion neurons in young capybaras. **Anatomy and Embryology**, September Issue 1, 2006.
- SANT'ANA, D. M. G.; NETO, M. H.; SOUZA, R. E.; MOLINARI, S. L. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon of rats subjected to proteic desnutrition. **Arquivo de Neuropsiquiatria**, v. 4, n. 55, p. 687-695, 1997.
- SANTER, R. M.; BAKER, D. M. Enteric neurons numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adults and aged rats. **Journal of Autonomic Nervous System**, v. 25, n. 1, p. 59-67, 1988.
- SCHMIDT, R. E. The neuropathology of human sympathetic autonomic ganglia. **Microscopy Research**, v. 35, p. 107-121, 1996.
- SCHOFFEN, J. P. F.; SOARES, A.; DE FERITA, 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: Basical & Clinical**, v. 122, n. 1-2, p. 77-83, 2005.
- SOTO-MOYANO, R.; FERNANDEZ, V.; SANHUEZA, M.; BELMAR, J.; KUSCH, C.; PEREZ, H.; RUIZ, S.; HERNANDEZ, A. Effects of mild protein prenatal malnutrition and subsequent postnatal nutritional rehabilitation on noradrenaline release and neuronal density in the rat occipital cortex. **Research Report**, v. 1, n. 116, p. 51-58, 1999.

- SOURANDER, P.; OLDFORS, A. The effect of Undernutrition on Spinal Ganglion Nerve Cell Size: A Morphometric Study on Rat. **Acta Neuropathology**, n. 39, p. 75-80, 1977.
- STERIO, D. C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. **Journal of Microscopy**, v. 134, p. 127-136, 1984.
- TABORSKY, J.R.; MEI, Q.I.; MUNINGER, T. O.; KUNG, D.; BASKIN, D. G. Fos expression in rat ganglion: an index of the activation of postganglionic sympathetic nerves. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolic**, v. 281, p. 655-664, 2001.
- TAMARIND, D.L.; QUILLIAM, J. P. Local vesicle populations in rat superior cervical ganglia and the vesicle hypothesis. **Journal of Neurocytology**, v. 2, p. 59-75, 1971.
- TANDRUP, T. Unbiased estimates of number and size of rat dorsal root ganglion cells in studies of structure and cell survival. **Journal of Neurocytology**, v. 33, n. 5, p. 173-192, 2004.
- TANDRUP, T.; GUNDERSEN, H. J. G.; VEDEL-JENSEN, E. B. The Optical Rotator, **Journal of Microscopy**, v. 186, p. 108-120, 1997.
- TANG, Y.; PAKKENBERG, B.; NYENGAARD, J. R. Myelinated nerve fibers in the subcortical white matter of cerebral hemispheres are preserved in alcoholic subjects. **Brain Research**, v. 1029, p. 162-167, 2004.
- TIMMERMANS, J. P.; ADRIAENSEN, D.; LESEBRIRE, R. Post-natal development of nitrergic neurons in the myenteric plexus of rat stomach. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 111, n. 6, p. 429-434, 1999.
- VEDEL-JENSEN, E. B.; GUNDERSEN, H. J. G. The Rotator. **Journal of Microscopy**, v. 171, p. 35-44, 1993.
- WESTER, T.; O'BRIEN, D.S. PURI, P. Notable post natal alterations in the myenteric plexus of normal human bowel. **GUT**, v. 44, n. 5, p. 666-674, 1999.
- YUCEL, F.; WARREN, A.; GUMUSBURUN, E. The effects of undernutrition on connectivity in the cerebellar cortex of adult rats. **Journal of Anatomy**, v. 184, p. 59-64, 1994.
- ZANIN, S. T.; MOLINARI, S. L.; SANT'ANA, D. M.; DE MIRANDA, NETO, M. H. NADH-diaphorase positive neurons of the jejunum of disnurtured adult rats (*Rattus norvegicus*): quantitative aspects. **Arquivo de Neuropsiquiatria**, v. 61, n. 3A, p. 650-653, 2003.