

ANGÉLICA CRISTINA MILAN MARESE

**Imunohistoquímica e não-histoquímica
de neurônios mioentéricos do
duodeno de ratos em diferentes
idades: população neuronal total?**

Maringá - PR

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANGÉLICA CRISTINA MILAN MARESE

**Imunohistoquímica e não-histoquímica de
neurônios mioentéricos do duodeno de ratos em
diferentes idades: população neuronal total?**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de Concentração - Biologia Celular), da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Raquel Marçal Natali

Maringá - PR
2006

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M325i Marese, Angélica Cristina Milan
Imunohistoquímica e não-histoquímica de neurônios
mioentéricos do duodeno de ratos em diferentes idades
: população neuronal total? / Angélica Cristina Milan
Marese. -- Maringá : [s.n.], 2006.
76 [7] f. : il.figs., tabs.

Orientadora : Prof. Dr. Maria Raquel Marçal Natali.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá. Curso de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, 2006.

1. Duodeno. 2. Neurônios mioentéricos. 3. Corantes
azulados. 4. Miosinas. 5. Envelhecimento celular. I.
Universidade Estadual de Maringá. Curso de Pós-
graduação em Ciências Biológicas

CDD 21.ed. 573.37828

Aprendendo a Viver

“Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença, entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança. E começa a aprender que beijos não são contratos, e que presentes não são promessas. E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de uma criança e não com a tristeza de um adulto. E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.

Depois de algum tempo você aprende que o Sol queima, se ficar exposto a ele muito tempo. E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam. E aceita que, não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-la de vez em quando, e você precisa perdoá-la por isso. Aprende que falar pode aliviar dores emocionais. Descobre que se levam anos para construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer, mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher. Aprende que não temos que mudar de amigos, se compreendermos que os amigos mudam. Percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos. Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso, sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pois pode ser a última vez que as vejamos.

Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas que nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não deve se comparar com os outros, mas com o melhor que você pode ser. Descobre que leva muito tempo para se tornar a pessoa que você quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que não importa onde já chegou, mas aonde está indo, mas que, se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve. Aprende que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não

importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados. Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências.

Aprende que paciência requer muita prática. Descobre que, algumas vezes, a pessoa que você espera que o chute quando você cai, é uma das poucas que o ajudam a levantar. Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que se aprendeu com elas, do que quantos aniversários você celebrou. Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha. Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens, poucas coisas são tão humilhantes, e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso. Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não lhe dá o direito de ser cruel.

Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer, não significa que esse alguém não o ame com todas as forças, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso. Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes, você tem que aprender a perdoar a si mesmo. Aprende que, com a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado. Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você junte os seus cacos.

E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir mais longe depois de pensar que não pode mais. Que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida! E aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores”.

Autor desconhecido

Aos meus pais que tanto amo, José e Lourdes, que sempre foram meus amigos, companheiros e confidentes, que se doaram inteiros e muitas vezes renunciaram seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. A vocês, que compartilharam meus ideais e os alimentaram, incentivando-me a prosseguir nesta jornada, mostrando-me que meu caminho deveria ser seguido sem medo, fossem quais fossem os obstáculos, dedico este trabalho. Foi por vocês que cheguei até aqui e é por vocês que seguirei em frente.

À minha orientadora Dr^a. Maria Raquel Marçal Natali por guiar sabiamente meus passos e transmitir os segredos desta caminhada. Pela amizade, pelo companheirismo, pelo exemplo de dedicação, de doação e de dignidade pessoal.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu grande e eterno amigo, fonte de luz e sabedoria.

Ao meu Anjo da Guarda, que esteve ao meu lado em todos os momentos – “os Anjos se fazem notar apenas para aqueles que acreditam na sua existência, embora sempre estejam presentes”.

Aos meus pais, José e Lourdes, pelo exemplo de vida, pelo amor e apoio incondicionais em cada segundo da minha existência, fornecendo uma base sólida para o meu presente e futuro. Esta vitória também pertence a vocês! Minha infindável gratidão!

À minha irmã Poliana, meu sobrinho Eduardo e meu cunhado Marcos pelo carinho, apoio, companheirismo e paciência. Muito obrigada!

Aos meus avós João e Vergínia, aos meus tios João Gilberto e Tatiana, Denardi e Célia e à minha prima Mariana, que me acolheram carinhosamente em tantos momentos, pelo amor, pela dedicação e atenção. Se não fosse também por vocês, eu não teria chegado até aqui!

Aos meus “filhotes gatinhos” Milka, Mike, Lu, Garfield, Toffy, Gatuxa, Cindy, Oggy e Lenny que me proporcionaram muitos momentos de alegria e distração, especialmente quando eu mais precisava. Vocês tornaram meus dias mais divertidos e menos solitários!

À minha orientadora e “segunda mãe” Raquel que sempre esteve presente e que nunca mediu esforços para me auxiliar, incentivar e orientar. Sem a sua presença, dedicação e seu conhecimento este trabalho jamais seria realizado e concluído!

A elas, que também foram minhas “mãezinhas”, Eurides e Dos Anjos (técnicas do laboratório de Histotécnica Animal), pelos seus valiosos ensinamentos, companheirismo e pela paciência durante o desenvolvimento deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos, também, por compartilharem comigo momentos de risos e lágrimas, por me acolherem quando mais precisei e por me ensinarem que, mesmo com as dificuldades da vida, é possível recomeçar.

À Priscila, minha grande e eterna amiga, que contribuiu imensamente para a realização deste trabalho, agradeço pela amizade conquistada e pelos preciosos ensinamentos. Minha eterna admiração e gratidão à minha companheira de “camelagem” a qualquer dia, a qualquer hora, em qualquer lugar... que nunca se negou a prestar qualquer auxílio e o fez sempre sorrindo e com uma simplicidade ímpar. Pri, este trabalho tem muito de você, amiga!

À minha grande amiga e companheira Angélica, pela amizade e parceria que construímos ao longo desta etapa tão difícil das nossas vidas, sempre me acompanhando, apoiando, ajudando e me erguendo, não me deixando desistir. Amiga, obrigada por estar sempre por perto!

Aos queridos amigos Eleandro, Cristiano e João Paulo pela amizade, atenção, cumplicidade, companheirismo e por transformarem as ocasiões mais difíceis em momentos mais agradáveis. Vocês serão sempre lembrados!

À minha psicóloga Dra. Ivone pelo apoio profissional e amigo que, em ocasiões tão complicadas, organizou minhas idéias e orientou meus passos, fazendo-me acreditar que eu chegaria até aqui e venceria. Meus sinceros e profundos agradecimentos!

Aos admiráveis amigos Angela e Éder, que foram meus primeiros “pais científicos” e que, portanto, construíram comigo este sonho. A vocês, que tanto me incentivaram e acompanharam cada momento, meus profundos agradecimentos.

Aos sempre amigos André, Renata e Henrique, por estarem sempre presentes, pelo carinho, atenção e companheirismo.

À amiga Renata da Rosa que estudou e comemorou comigo nossa aprovação no mestrado e, mesmo distante fisicamente, esteve sempre presente durante esta conquista.

À amiga e companheira de laboratório Vera, que me ensinou a dar os primeiros passos no laboratório de Histologia, ainda durante a graduação, e continua me acompanhando, ajudando e ensinando.

Às amigas Márcia, Luciana, Elis, Luciana Patrícia e Juliana pela amizade e por tantos momentos agradáveis compartilhados no laboratório.

Aos amigos e colegas de laboratório que sempre auxiliaram durante os experimentos: Débora, Gustavo, Rodrigo, Lívia, Fernando, João, Diego, Juliano, Renata, Ivan, Priscila, Dani e Janine.

Aos amigos que, de alguma forma, participaram e estiveram presentes nesta etapa tão importante da minha vida: Graça, Sônia, Carina, Luciana, Cleuza, Simone, Evandro, Geisa, Sandro, Fernanda, Guilherme, Vladimir, Beto, Luis Felipe, Gione, Cassiano, Katy, Marcos, Eliana, Michael e Lucinéia.

Às professoras de Histologia e Embriologia: Luzmarina, Jacqueline, Tânia, Nilza, Marli, Elaine e Eneri, que sempre me acolheram e me ajudaram.

Aos funcionários Valdir, Elizete e Valéria do laboratório de Fisiologia do Departamento de Ciências Morfofisiológicas, pelo suporte técnico durante as coletas e no Biotério Setorial.

À Cleonira (Kita) pelo auxílio nas atividades desenvolvidas no laboratório de Anatomia do Departamento de Ciências Morfofisiológicas

Ao José Antônio de Souza pelo suporte técnico na obtenção das imagens analisadas neste estudo.

À Dr^a. Eliana Valéria Patussi, pelos seus valiosos ensinamentos, paciência e atenção.

Ao Wanderley Alves Damasceno, pelo brilhante desenho que ilustra a capa deste trabalho.

Ao Fabrício e à Anne, que também colaboraram com figuras e desenhos.

Ao Peter Jeremy Grimshaw e à Thais Brogio pela tradução dos textos para o inglês.

A todos os colegas do Curso de Pós-graduação com quem dividi muitos momentos de estudo. Em especial, agradeço pela amizade e companheirismo de Fernanda, Anderson, Aneliz, Cristiane, Kellen, Débora, Dionízia, Valério e Leandro.

Aos alunos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná dos cursos de Fisioterapia (turma VII), Farmácia (turmas VII e VIII), Odontologia (turmas X e XI), e Enfermagem (turma XXVIII), e aos alunos da Unipan do curso de Educação Física (turma I) pela compreensão, colaboração e incentivo.

Aos docentes e funcionários da Universidade Estadual de Maringá, especialmente do Departamento de Ciências Morfofisiológicas, pelo apoio e colaboração.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná pelo fornecimento de equipamentos necessários para parte dos estudos e análises desenvolvidas neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá pela oportunidade e suporte para a realização e conclusão do curso de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo, necessária para a execução deste estudo.

APRESENTAÇÃO

Em consonância com a Resolução Nº 01/2003-CCPBC do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, esta dissertação de mestrado é composta por um artigo científico completo (*full paper*), redigido de acordo com as normas exigidas pela revista científica em que pretendemos publicá-lo, assim sendo:

Angélica Cristina Milan Marese, Priscila de Freitas, Maria Raquel Marçal Natali.
Imunohistoquímica e não-histoquímica de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos em diferentes idades: população neuronal total? / Immunohistochemistry and non-histochemistry of myenteric neurons from the duodenum of rats of different ages: total neuronal population? Este artigo será submetido à apreciação do corpo editorial da revista *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* (ISSN 1566-0702), visando sua publicação Pág. 02

RESUMO

O Sistema Nervoso Entérico (SNE) é considerado uma rede altamente complexa de fibras nervosas e corpos celulares de neurônios organizados em plexos. Está localizado ao longo de toda a parede do trato gastrointestinal e é responsável pela modulação de funções como a digestão e a absorção de nutrientes, secreção e motilidade intestinal.

O plexo mioentérico, um dos principais plexos ganglionados que compõem o SNE, localiza-se entre as camadas musculares circular interna e longitudinal externa do tubo digestório, é responsável, entre outras funções, pelo controle do peristaltismo.

Mudanças na estrutura e função do trato gastrointestinal podem ser decorrentes de um processo fisiológico natural, o envelhecimento. A principal alteração fisiológica decorrente do envelhecimento é a redução do número de células funcionantes, a qual pode acarretar alterações morfoquantitativas dos neurônios entéricos, o que pode comprometer o funcionamento normal dos órgãos inervados.

Deste modo, a incidência de problemas gastrointestinais como disfagia, distúrbios no refluxo gastro-esofágico, dores abdominais, diarreia, constipação e incontinência fecal aumentam drasticamente com a idade.

Vários métodos para estimar a população neuronal total presente em diferentes segmentos do trato digestório têm sido utilizados. Dentre eles, destacam-se os corantes básicos, como o corante de Giemsa e, mais recentemente, a técnica imunohistoquímica Miosina V.

Apesar das duas técnicas serem conhecidas como marcadores de populações neuronais totais, divergências nos resultados obtidos são observadas na literatura pertinente, não havendo consenso de qual método seria mais adequado.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi de avaliar os efeitos da idade sobre o comportamento morfoquantitativo da população total de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos Wistar, através de análise comparativa das técnicas de evidenciação neuronal: não-histoquímica de Giemsa e imunohistoquímica Miosina V.

Foram utilizados 60 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) com as idades de 21, 60, 90, 210, 345 e 428 dias, os quais foram pesados e anestesiados para retirada e mensuração do intestino delgado, com subsequente coleta do duodeno. Os resultados demonstram aumento gradativo do peso corporal com o desenvolvimento da idade, além de aumento do comprimento do intestino delgado até a idade de 60 dias, o qual foi mantido até 210 dias, com redução neste parâmetro a partir de 345 dias.

Para análise da população mioentérica, amostras do duodeno foram submetidas à elaboração de preparados de membrana para as técnicas de evidenciação neuronal não-histoquímica de Giemsa e imunohistoquímica Miosina V. Análises morfoquantitativas realizadas revelaram que, durante o desenvolvimento, houve redução na média da população de neurônios em ambas as técnicas empregadas, sendo que, a utilização da técnica de Miosina V expressou uma média reduzida do número de neurônios quando comparada ao método de Giemsa, em todas as idades avaliadas. A morfometria do perfil celular revelou, em ambas as técnicas, o predomínio de neurônios menores em animais jovens, e de neurônios maiores em animais com maior faixa etária.

Para análise morfométrica da túnica muscular externa amostras do duodeno foram submetidas ao processamento histológico padrão, sendo coradas pelo método de

Hematoxilina-Eosina. Os resultados obtidos demonstram que, independente da faixa etária considerada, a espessura da túnica muscular foi mantida.

Concluimos que a idade avançada é um fator determinante na redução do número de neurônios mioentéricos e que a inervação intrínseca intestinal é mantida através dos neurônios remanescentes. Além disso, concluimos que a utilização da técnica não-histoquímica de Giemsa revelou-se mais adequada para marcação da população neuronal total.

Palavras-chave: envelhecimento; duodeno; neurônios mioentéricos; Giemsa; Miosina V.

ABSTRACT

The Enteric Nervous System (ENS) is considered a high complex net of nervous fibers and neurons cellular bodies organized in plexus. It is located along the whole intestinal wall and it is responsible for modulating functions such as: digestion and nutrients absorption, secretion and intestinal motility.

The myenteric plexus, one of the main ganglionated plexus which compose the ENS, it is located between the internal circular layer and external longitudinal of the digestory tube, it is responsible, among other functions, for the peristaltism control.

Changes in the structure and function of the gastrointestinal tract can be due to a natural physiological process, the aging. The main physiological alteration due to the aging is the decrease in number of functionally cells, which can led to morphoquantitatives alterations in myenteric neurons, what can compromise the functioning of the enervated organs.

In this way, the incidence of gastrointestinal problems such as dysphasia, disorders in gastroesophagic reflux, abdominal pains, diarrhea, constipations and fecal incontinence increases dramatically with age.

Several methods in order to estimate the total neuronal population presented in different segments in the digestory tract have been performed. Among these, it is evidenced the basic dyings, as the Giemsa dying and, more recently, the Myosin V immunohistochemistry technique.

Despite both techniques been well-know as markers of total neuronal population, disagreements about the obtained results are observed in the pertinent literature, and there has not been an agreement about which method would be the most appropriate.

So, the aim of this study was evaluate the aging effect over the morphoquantitative behavior of the total myenteric neurons population from duodenum of Wistar rats, trough comparative analysis between the non-histochemistry Giemsa technique and the immunohistochemistry Myosin V one.

It was used 60 Wistar male rats (*Rattus norvegicus*) with age of 21, 60, 90, 210, 345 e 428 days, which were weighted and anesthetized in order to remove the small intestine, and subsequent collect of the duodenum. The results demonstrated a gradative increase of body weight along aging development and also the length increasing of the small intestine until 60 days, which was kept to 210 days, after that, the decreasing of this parameter was observed from 345 days.

To analyze the myenteric population, duodenum samples were submitted to performance of whole mount preparations for the non-histochemistry Giemsa and the immunohistochemistry Myosin V neuronal evidentiatio. Morphoquantitatives analyses performed revealed that, during development, there was a reduction in the mean of neuron population in both technique employed, being that, the Myosin V technique expressed a decreased mean in neurons numbers when compared to Giemsa method, in all evaluated ages. The morphometry of the cellular profile revealed, in both techniques, the predominance of smaller neurons in younger animals and bigger neurons in higher age animals.

For morphometric analyses of the external muscular tunic duodenum samples were submitted to a pattern histological processing, being dyed with Hematoxilin-Eosin.

The obtained results demonstrated that, no matter the age considered, the tunic thickness was kept.

We concluded that the advanced age is a determinant factor in reduction in number of myenteric neurons and the intestinal intrinsic enervation is kept by the remainders neurons. Besides that, we concluded that the use of the non-histochemistry technique Giemsa revealed being more adequate for marking the total neuronal population.

Keywords: aging, duodenum, myenteric neurons, Giemsa, Myosin V.

SUMÁRIO

Imunohistoquímica e não-histoquímica de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos em diferentes idades: população neuronal total?	2
RESUMO	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. MATERIAIS E MÉTODOS	7
2.1. Obtenção dos grupos	7
2.2. Evidenciação neuronal – método não-histoquímico de Giemsa	7
2.3. Evidenciação neuronal – imunolocalização de miosina V	8
2.4. Análise quantitativa e morfométrica neuronal	9
2.5. Análise morfométrica da túnica muscular	10
2.6. Análise estatística	11
3. RESULTADOS	12
3.1. Desenvolvimento intestinal	12
3.2. Quantificação neuronal	12
3.3. Morfometria do corpo celular neuronal	13
4. DISCUSSÃO	14
4.1. Desenvolvimento intestinal	14
4.2. Quantificação neuronal	15

4.3. Morfometria do corpo celular neuronal	20
5. CONCLUSÕES	23
6. AGRADECIMENTOS	24
7. REFERÊNCIAS	25
8. TABELAS E FIGURAS	32

SUMMARY

Immunohistochemistry and non-histochemistry of myenteric neurons from the duodenum of rats of different ages: total neuronal population?	40
ABSTRACT	41
1. INTRODUCTION	42
2. MATERIALS AND METHODS	45
2.1. Preparation of samples	45
2.2. Neuronal evidencing – Giemsa non-histochemical method	45
2.3. Neuronal evidencing – immunolocalization of the myosin V	46
2.4. Quantitative analysis and neuronal morphometry	47
2.5. Morphometric analysis of the muscular tunica	48
2.6. Statistical analysis	49
3. RESULTS	50
3.1. Intestinal development	50
3.2. Neuronal quantification	50
3.3. Morphometry of the neuronal cellular body	50
4. DISCUSSION	52
4.1. Intestinal development	52
4.2. Neuronal quantification	53

4.3. Morphometry of the neuronal cellular body	58
5. CONCLUSIONS	61
6. ACKNOWLEDGEMENTS	62
7. REFERENCES	63
8. TABLES AND FIGURES	70

Imunohistoquímica e não-histoquímica de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos em diferentes idades: população neuronal total?

Angélica Cristina Milan Marese, Priscila de Freitas, Maria Raquel Marçal Natali

Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Laboratório de Neurônios Entéricos, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

Autor para correspondência: Angélica Cristina Milan Marese. Rua Araucária, 103, Parque Verde, CEP 85807-670, Cascavel, Paraná, Brasil - Tel.: +55 45 3226 2013.

E-mail: angelicamarese@yahoo.com.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi de verificar o comportamento morfoquantitativo dos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com as idades de 21, 60, 90, 210, 345 e 428 dias, utilizando preparados de membrana da túnica muscular obtidos pela dissecação das túnicas intestinais para evidenciação neuronal, através da técnica não-histoquímica de Giemsa e a técnica imunohistoquímica Miosina V. Os neurônios foram quantificados em 80 campos microscópicos (14,832 mm²/animal) e a morfometria do corpo celular neuronal foi realizada em 100 neurônios/animal. Amostras do duodeno foram submetidas ao processamento histológico padrão, sendo coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina para análise morfométrica da túnica muscular externa. Aumento do comprimento do intestino delgado foi observado até a idade de 60 dias, o qual foi mantido até 210 dias, com redução neste parâmetro a partir de 345 dias. A espessura da túnica muscular foi mantida independente da idade do animal. Durante o desenvolvimento, houve uma redução na média da população de neurônios com ambas as técnicas empregadas. Entretanto, em todas as idades avaliadas, a utilização da técnica de Miosina V expressou uma média reduzida do número de neurônios quando comparada ao método de Giemsa. A morfometria do perfil celular revelou, em ambas as técnicas, o predomínio de neurônios menores em animais jovens, e de neurônios maiores em animais com maior faixa etária. Concluímos que a idade avançada é um fator determinante na redução do número de neurônios mioentéricos, com manutenção da inervação intrínseca intestinal, através dos neurônios remanescentes e que a utilização da técnica não-histoquímica de Giemsa revelou-se mais adequada para determinação da população neuronal total.

Palavras-chave: duodeno; envelhecimento; Giemsa; Miosina V; neurônios mioentéricos.

1. Introdução

O envelhecimento é um processo fisiológico natural que envolve mudanças na estrutura e função do trato gastrointestinal, podendo levar ao comprometimento de suas funções (Horowitz et al., 1984; Hosoda et al., 1992). Uma complexa rede de fibras nervosas e corpos celulares de neurônios, denominada Sistema Nervoso Entérico (SNE), localiza-se ao longo de toda a parede do trato gastrointestinal e está diretamente relacionada com o controle normal destas funções, tais como a digestão e absorção de nutrientes, secreção e motilidade do intestino, respondendo, portanto, pela inervação intrínseca do mesmo, através da modulação dessas funções (Schäfer et al., 1999; Wade e Cowen, 2004).

Alterações na função da mucosa e/ou na motilidade do trato gastrointestinal, resultantes de uma disfunção do SNE devido à idade, podem levar a distúrbios que, dependendo da região afetada, incluem disfagia, distúrbios no refluxo gastro-esofágico, dores abdominais, diarreia, constipação e incontinência fecal (Wade e Cowen, 2004).

Essa disfunção poderia estar diretamente relacionada a alterações morfoquantitativas do contingente neuronal entérico, visto que, a redução do número de células funcionantes é a principal alteração fisiológica decorrente do envelhecimento, o que acarreta em lentidão dos processos metabólicos (Mitchell et al., 1978) e abordagens experimentais utilizando ratos em diferentes fases do desenvolvimento relatam alterações no SNE com a idade (Gabella, 1971; Phillips e Powley, 2001).

O plexo mioentérico, um dos principais plexos ganglionados que compõem o SNE, localiza-se entre as camadas musculares circular interna e longitudinal externa do tubo digestório, é responsável, entre outras funções, pelo controle do peristaltismo (Gabella, 1987).

Análises morfoquantitativas de neurônios do plexo mioentérico do intestino delgado de ratos em diferentes idades revelam alterações morfométricas dos corpos celulares e uma significativa diminuição na densidade neuronal (Gabella, 1971; Santer e Baker, 1988; Phillips e Powley, 2001).

Gabella (1987) ressalta que alterações no número e no tamanho dos corpos celulares dos neurônios do plexo mioentérico podem estar relacionadas também a variações na espessura da túnica muscular, tecido-alvo responsável pela manutenção, desenvolvimento e plasticidade destes neurônios.

Vários métodos têm sido utilizados para estimar a população neuronal total, bem como sub-populações específicas em diferentes segmentos do trato digestório. Nas investigações que envolvem o estudo de população neuronal total, o emprego de corantes básicos, como o corante de Giemsa, azul de toluidina, azul de metileno e azul cuprolínico, os quais têm afinidade pelas organelas ácidas presentes no citoplasma, tem se revelado eficiente (Bor-Seng-Shu, et al., 1994; Liberti et al., 1994; Natali e Miranda-Neto, 1996; Schäfer et al., 1999; Natali et al., 2003).

Recentemente, a técnica imunohistoquímica para detectar Miosina V tem sido utilizada como marcador neuronal (Drengk et al., 2000; Buttow et al., 2003; Zanoni et al., 2003; Schoffen et al., 2005). A proteína miosina V está presente especificamente no citoplasma neuronal, o que confere especificidade à técnica, permitindo a visualização dos corpos celulares e suas projeções (Drengk et al., 2000; Zanoni et al., 2003). Está relacionada com a dinâmica de membranas (endocitose e exocitose), transporte axoplasmático e liberação de neurotransmissores, graças a sua capacidade de converter energia química, na forma de ATP, em energia motora, gerando movimento através dos filamentos de actina (Hasson e Mooseker, 1997; Langforf e Molyneaux, 1998).

Apesar das duas técnicas serem conhecidas como marcadores de populações neuronais totais e, portanto, deveriam resultar em valores quantitativos semelhantes, divergências nos resultados obtidos são observadas na literatura, não havendo consenso de qual método seria o mais adequado.

Deste modo, a proposição deste trabalho foi realizar a análise comparativa dos métodos de coloração com corante de Giemsa e método imunohistoquímico com o anticorpo miosina V, para estudo morfoquantitativo dos neurônios mioentéricos do duodeno, utilizando como modelo ratos Wistar em diferentes idades.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção dos grupos

Foram utilizados segmentos do duodeno de 60 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), mantidos em biotério com temperatura constante de 22 ± 2 °C e alternância de ciclos de iluminação de claro e escuro de 12 horas, durante o período de vida correspondente, sendo mortos com as idades de 21, 60, 90, 210, 345 e 428 dias. Com exceção do grupo de 21 dias (desmame), os animais receberam ração padronizada para roedores NUVILAB-NUVITAL[®] (recomendada pelo National Research Council & National Health Institute - USA), com teor protéico de 22 %, e água “ad libitum”.

Para cada idade foram utilizados 10 animais, os quais foram pesados e anestesiados intraperitonealmente com tiopental sódico (Thionembutal[®]), na dosagem de 40 mg/kg de peso corporal.

Os procedimentos realizados neste estudo estiveram de acordo com princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

2.2. Evidenciação neuronal – método não-histoquímico de Giemsa (modificado por Barbosa, 1978)

Para este estudo foram utilizados 30 animais (5 animais/idade correspondente). Após serem submetidos à laparotomia, foi retirado e mensurado o intestino delgado e realizada a subsequente coleta do duodeno (porção inicial). Os segmentos foram lavados

com solução salina 0,9 %, inflados e imersos em solução fixadora de Giemsa (30 ml de formaldeído, 15 ml de ácido acético, 9 g de cloreto de sódio e 55 ml de água destilada) por 48 horas. Em seguida, para a obtenção dos preparados de membrana, os segmentos foram microdissecados sob estereomicroscópio com trans-iluminação, para remoção das túnicas mucosa e submucosa, preservando-se a túnica muscular externa e serosa.

Esse material foi corado com solução corante de Giemsa, à base de azul de metileno, em tampão fosfato de Sorensen 0,1 N (pH 6,9), durante 24 horas à temperatura ambiente e sob agitação. Para a montagem das lâminas, os preparados de membrana foram desidratados em série de concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e montados com resina sintética Permount[®] (Fisher Chemical, New Jersey, USA).

Para a segurança na contagem padronizamos as análises de acordo com as características morfológicas dos neurônios, identificando e quantificando células com citoplasma bastante corado, com limites bem definidos, núcleo em posição geralmente excêntrica, grande e claro, além de presença de um ou mais nucléolos. Em contrapartida, o corpo celular das células da glia apresentou-se bem reduzido em relação ao corpo celular dos neurônios, com citoplasma claro, núcleo pequeno e escuro.

2.3. Evidenciação neuronal – imunolocalização de miosina V (Drengk et al., 2000)

Para este estudo, outros 30 animais (5 animais/idade correspondente) foram perfundidos com solução salina 1,1 % (1 ml/g de peso corporal), seguido de solução fixadora (1 ml/g de peso corporal) contendo periodato de sódio 10 mM, lisina 75 mM e paraformaldeído 1 % em tampão fosfato 37 mM, pH 7,4 (McLean e Nakane, 1974).

Imediatamente após a perfusão, foi realizada a laparotomia, mensuração do

intestino delgado e coleta da porção inicial do duodeno. Os segmentos foram lavados com solução salina 1,1 %, inflados e imersos em solução fixadora por uma hora. Em seguida foram desidratados em séries de concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e reidratados em etanol, sendo, posteriormente, armazenados em etanol 70 %. Após serem microdissecados sob estereomicroscópio com trans-illuminação através da remoção das túnicas mucosa e submucosa, foram obtidos preparados totais de membrana da túnica muscular. Estes preparados foram lavados em tampão fosfato salinado (PBS) 0,1 M, pH 7,4 e bloqueados por duas horas com PBS contendo soro bovino albumina 2 %, soro de cabra 2 % e Triton X-100 0,5 %, à temperatura ambiente.

Seqüencialmente, os segmentos foram incubados em uma solução contendo 0,86 mg/ μ l do anticorpo primário anti-miosina V cauda medial purificado e extraído de coelhos, diluído em PBS contendo soro albumina bovina 1 %, Triton X-100 0,1 % e soro de cabra 2 %, à temperatura ambiente e sob agitação, por um período de 48 horas. Depois da incubação, os tecidos foram lavados em PBS 0,1 M, Triton X-100 0,1 % e em solução de PBS 0,1 M acrescida de Tween-20 0,05 %. Em seguida, os tecidos foram incubados no anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1 μ g/ml), à temperatura ambiente sob agitação, por 24 horas e lavados, durante 15 minutos, com PBS 0,1 M acrescido de Tween-20 0,05 %.

A imuno-reação com anticorpo conjugado com peroxidase foi revelada por incubação com 0,75 mg/ml de diaminobenzidina (DAB) e 0,03 % de H₂O₂ em água (1 ml) e PBS 0,1 M (1 ml) por 15 minutos, em temperatura ambiente sob agitação. Amostras foram montadas em meio de glicerol gel.

2.4. Análise quantitativa e morfométrica neuronal

A análise morfoquantitativa dos neurônios mioentéricos foi realizada em ambas as técnicas. Para a quantificação, foram realizadas contagens por amostragem em 80 campos microscópicos por animal, nas regiões intermediária e antimesentérica da circunferência intestinal, sob microscópio de luz (Olympus BX40), e objetiva de 40X.

Considerou-se como região intermediária as partes da circunferência intestinal localizadas entre 60° e 120°, e entre 240° e 300° em relação à inserção do mesentério, e como região antimesentérica a parte localizada entre 120° e 240° (Miranda-Neto et al., 2001). Cada campo microscópico correspondeu a uma área de 0,185 mm², perfazendo um total de 14,832 mm².

Para a análise morfométrica, foram mensuradas áreas (μm²) de 100 corpos celulares de neurônios aleatórios por animal (1000 neurônios por faixa etária), utilizando-se o sistema de análises de imagens (Image Pró Plus[®] 4.5 – Media Cybernetics, Inc.). Os neurônios foram classificados de acordo com seu tamanho, em intervalos de classes de 100 μm².

2.5. Análise morfométrica da túnica muscular

Para este estudo, segmentos do duodeno de cinco animais de cada idade foram abertos na borda mesentérica, fixados em Bouin (750 ml de solução saturada de ácido pícrico, 250 ml de formol e 50 ml de ácido acético glacial), desidratados em séries de concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina para obtenção de cortes histológicos semi-seriados com 6 μm de espessura, em micrótomo Leica RM 2145, e subsequente coloração pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE).

Os cortes foram utilizados para a realização da morfometria da túnica muscular (100 medidas por animal), através do sistema de análises de imagens (Image Pró Plus[®] 4.5 – Media Cybernetics, Inc.), com resultados expressos em μm .

2.6. Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism[®] 3.0 (GraphPad Software, Inc.). Os dados referentes à comparação entre as técnicas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste *t* de Student. Os dados referentes à comparação entre as idades foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e como pós-teste para comparação de médias, o teste de Tukey. Para ambos os testes o nível de significância foi de 5 %. Os resultados foram reportados como média \pm desvio padrão.

3. Resultados

3.1. Desenvolvimento intestinal

Os dados apresentados na Tabela 1 indicam valores médios do peso corporal, comprimento intestinal e espessura da túnica muscular externa dos ratos em diferentes idades. Verificamos que no intestino delgado ocorreu um aumento significativo do comprimento até a idade de 60 dias, seguido de manutenção deste parâmetro até a idade de 210 dias. A partir de 345 dias percebe-se uma redução significativa neste comprimento. A espessura da túnica muscular foi mantida independente da faixa etária considerada, e o peso corporal apresentou um gradativo aumento conforme o desenvolvimento.

3.2. Quantificação neuronal

Os valores médios do número de neurônios quantificados pelas técnicas de Giemsa e Miosina V estão expressos na Tabela 2 e Fig. 1. Os dados obtidos demonstram que, durante o processo de envelhecimento dos animais, houve uma redução na média da população de neurônios, detectado por ambas as técnicas empregadas.

Além disso, com os valores contidos na Tabela 2, é possível observar que a utilização da técnica de Miosina V expressa uma média reduzida significativa do número de neurônios quando comparada ao método de Giemsa, em todas as idades avaliadas.

3.3 Morfometria do corpo celular neuronal

Os neurônios mioentéricos analisados a partir de preparados de membrana, apresentaram organização ganglionar, agregando corpos celulares que variavam de tamanho independente da técnica empregada ou faixa etária considerada.

Verificamos que nos gânglios mioentéricos dos animais com 21 e 60 dias, a população celular predominante era de neurônios com área na faixa de 101-200 μm^2 , sendo que, na idade de 21 dias, foi possível observar um contingente neuronal expressivo na faixa entre 0-100 μm^2 , a qual deixa de existir nas idades mais avançadas. Nos animais com 90 dias começa a haver um pareamento entre as classes de 101-200 μm^2 e 201-300 μm^2 . A partir dos 210 dias até a idade de 428 dias, apesar de predominar a classe de 201-300 μm^2 , é nítida a elevação na população de neurônios nas maiores faixas (Fig. 2, 3 e 4).

As diferenças na distribuição da população neuronal quanto ao seu tamanho são comprovadas estatisticamente quando se estima a média da área do perfil celular com ambas as técnicas (Tabela 3), que indica menor área média para neurônios de animais com 21 dias e maior área média para neurônios dos animais com 428 dias.

Conforme os valores contidos na Tabela 3, é possível observar que, na avaliação do perfil celular neuronal, a utilização de técnicas distintas não interferiu na média obtida.

4. Discussão

4.1. Desenvolvimento intestinal

O padrão de desenvolvimento intestinal no que se refere ao comprimento do intestino delgado verificado neste experimento revelou aumento estatisticamente significativo até a idade de 60 dias, o qual foi mantido até 210 dias. A partir da idade de 345 dias, houve uma redução significativa no comprimento intestinal.

No estabelecimento de quais fatores estariam implicados na determinação do comprimento intestinal existem controvérsias. Hounnou et al. (2002) destaca a existência de uma correlação do comprimento do intestino delgado com o peso corpóreo, e não com altura individual. Já Schäfer et al. (1999) consideram que o comprimento intestinal e a espessura da túnica muscular estão relacionados com o desenvolvimento da inervação intrínseca, e o aumento destes parâmetros provocam mudanças na densidade e tamanho neuronal.

Ao compararmos nossos dados de comprimento intestinal com o peso dos animais, podemos observar a existência de relação direta entre ganho de peso e comprimento do intestino até a idade de 210 dias, similar às observações de Hounnou et al. (2002). Discordamos, porém, desta correlação para idades mais avançadas, onde provavelmente a hipótese de Schäfer et al. (1999) que relaciona variações no comprimento intestinal com variações na densidade neuronal, seria a mais adequada.

Quando consideramos o desenvolvimento no período de 21 a 210 dias, nossos resultados assemelham-se parcialmente aos de Johnson et al. (1998) e Phillips et al. (2003) em ratos da linhagem Sprague Dawley e Fischer, respectivamente, os quais verificaram a ocorrência de gradativo aumento do comprimento intestinal com a idade.

Esses autores compararam ratos com idade de 3-4 e 24 meses, e verificaram um aumento significativo do comprimento intestinal entre elas. Johnson et al. (1998) destacam que a linhagem e o período de vida do animal são de fundamental importância neste tipo de avaliação, e que existem diferenças entre as linhagens Sprague Dawley e Wistar com relação à idade, visto que a mortalidade dos ratos Wistar é significativamente menor do que ratos Sprague Dawley de mesma idade. Também deve ser considerado que estes autores trabalharam com períodos extremos e que, se aplicássemos o mesmo raciocínio para nossa menor idade (21 dias) e maior idade (428 dias), teríamos o resultado semelhante.

Dentro da linhagem Wistar, nosso estudo revelou que idades mais avançadas promovem redução significativa do comprimento intestinal. Por outro lado, a espessura da túnica muscular externa, independente da faixa etária analisada, não apresentou diferença estatisticamente significativa. Apesar da dificuldade de correlacionar estes valores com dados da literatura em decorrência de possíveis distensões no momento da coleta, valores encontrados em nosso estudo se assemelham aos de Weaver et al. (1998), Meilus et al. (1998) e Gurmini et al. (2005) para comprimento intestinal, e aos de Hernandez et al. (2000), Natali et al. (2000; 2005) e Won et al. (2006) para a espessura da túnica muscular externa.

A nosso ver, a manutenção da espessura da túnica muscular poderia ser justificada pela condição de desenvolvimento normal imposta aos animais inclusive com manutenção de dieta normoprotéica, independente do fator idade. Redução da espessura da túnica muscular externa (Torrejais et al., 1995; Natali et al., 2005) são verificados em estudos com roedores alimentados com dietas hipoprotéicas.

4.2. Quantificação neuronal

Os resultados obtidos demonstraram que a idade é um fator significativo na redução do número de neurônios mioentéricos. Quando comparamos os extremos, ou seja, o número médio de neurônios entre 21 e 428 dias, verificou-se uma redução neuronal na ordem de 85,4 % para a técnica não-histoquímica de Giemsa e 82,7 % para técnica imunohistoquímica Miosina V, respectivamente.

Mesmo sendo realizada a contagem por regiões (intermediária e antimesentérica), verificamos que não houve diferenças significantes entre elas, por esta razão nossos resultados foram apresentados em conjunto. Resultado semelhante foi observado por Santer (1994) investigando a distribuição dos neurônios mioentéricos na região média do intestino delgado de ratos em diferentes idades, e por Natali et al. (2003) no duodeno de ratos adultos. No entanto, são discordantes dos resultados obtidos por Gabella (1972) e Miranda-Neto et al. (2001), os quais observaram diferenças estatisticamente significante entre essas regiões.

Santer e Baker (1988) estudaram os efeitos da idade sobre os neurônios do plexo mioentérico no intestino delgado e grosso de ratos com 6 e 24 meses. Verificaram perda neuronal de 40 % no jejuno, 43 % no íleo, 64 % no colo e 42 % no reto em ratos idosos. Os autores ressaltaram que esta perda seria acompanhada de uma concomitante reorganização dos elementos restantes, e por esta razão não poderia ser considerada um processo degenerativo, já que os elementos ganglionares remanescentes teriam sua eficiência aumentada.

Considerações semelhantes foram observadas por Gabella (1989) no tubo digestório de cobaias. Em condições de envelhecimento, houve uma diminuição de 40 a 60 % na densidade neuronal do intestino delgado, quando comparou jovens adultos (3-4 meses) com animais velhos (26-30 meses).

Phillips e Powley (2001) investigaram os efeitos da idade sobre a inervação vagal do trato gastrointestinal e sobre os neurônios mioentéricos, evidenciados pelo azul cuprolínico, presentes no estômago, intestino delgado e intestino grosso de ratos com 3, 12, 21, 24 e 27 meses de idade. Da mesma forma, observaram uma diminuição linear no número de neurônios com o avanço da idade em todos os segmentos do intestino delgado, sendo que o duodeno apresentou uma redução de até 30 %. A possível causa desta redução foi atribuída à diminuição da integridade da inervação vagal extrínseca, que pode deixar a rede intrínseca mais susceptível aos efeitos do avanço da idade. A perda de células neuronais no duodeno pode ser explicada já que aproximadamente 20 % dos neurônios mioentéricos do duodeno possuem uma inervação vagal aferente.

Redução no número de neurônios do SNE relacionadas à idade também foi observada em ratos, cobaias e camundongos (Santer, 1994; Johnson et al., 1998; Schäfer, et al., 1999; Wade, 2002; Phillips et al., 2003; Schoffen et al., 2005), e no tubo digestório de humanos (Meciano Filho et al., 1995; Gomes et al., 1997).

Ao analisarmos o número de neurônios do duodeno de ratos com 21 dias (13.250 com a técnica de Giemsa e 8.805 com a técnica Miosina V) e compararmos com a idade de 60 dias (7.092 com a técnica de Giemsa e 4.537 com a técnica Miosina V), verificamos uma redução de 46,48 % e 48,48 %, respectivamente. Isso poderia significar que cerca de metade do contingente neuronal foi reduzido, entretanto, ao associarmos estes resultados com o comprimento intestinal, em ambas as idades, temos proporcionalmente um aumento de 45,99 %, o que nos possibilita inferir que não houve perda e sim distribuição dos gânglios e seus prolongamentos em uma maior área intestinal.

A partir dos 60 dias até a idade de 210 notamos uma tendência à estabilização deste quadro: de 60 para 90 dias houve redução neuronal de 14,49 % para Giemsa e

5,15 % para Miosina V. Aos 210 dias a perda neuronal verificada foi de 26,22 % e 21,93 % para as mesmas técnicas, respectivamente, quando comparado a animais de 90 dias. É importante ressaltar que, nessas idades, não houve diferença no comprimento intestinal.

Aos 345 dias e 428 dias ocorreu redução significativa no comprimento intestinal e acentua-se a alteração no número de neurônios, o que nos permite considerar que a perda neuronal é gradativa e progressiva, na ordem de 56,75 % para Giemsa e 54,56 % para Miosina V, quando consideramos as idades de 210 dias e 428 dias.

Nossas considerações são corroboradas pelos trabalhos de Schäfer et al. (1999) referente ao comprimento intestinal e desenvolvimento da inervação intrínseca, e por Phillips e Powley (2001) que, ao realizarem uma investigação do número de neurônios em ratos com as idades de 3 até 27 meses, estimaram que a perda neuronal inicia-se a partir dos 12 meses de idade, e que o alcance da estabilidade neuronal ocorreria a partir dos 3 meses.

A morte neuronal atribuída à idade poderia estar relacionada ao aumento de radicais livres. Estudos em neurônios entéricos relacionados com radicais livres indicam que espécies de oxigênio reativo endógeno aumentam nesses neurônios com o avanço da idade, (Thrasivoulou et al., 2000). Deve-se considerar que o intestino delgado é um órgão que apresenta uma grande área de superfície de absorção, e possivelmente, esteja exposto a altos níveis de espécies reativas que podem causar processos oxidativos (De Giorgio et al., 2004). Outra hipótese para a vulnerabilidade dos neurônios entéricos com o envelhecimento seria a redução de fatores neurotróficos derivados de algumas células da glia, os quais são importantes não somente no desenvolvimento dos neurônios, mas também na sua manutenção com o avanço da idade (Dolatshad et al., 2001).

Segundo Santer e Baker (1988) e Phillips e Powley (2001) a inervação extrínseca também oferece algum suporte trófico aos neurônios presentes da região superior do trato gastrointestinal durante o processo de envelhecimento, indicando que a interação entre neurônios extrínsecos e intrínsecos é indispensável para a manutenção de um circuito neuronal normal.

Apesar da redução neuronal com a idade ser um resultado freqüente na literatura pertinente, deve-se considerar que alguns neurônios podem ser mais susceptíveis do que outros (Wade, 2002). Os neurônios NADPH-diaforase positivos que expressam a atividade do óxido nítrico (neurônios nitrérgicos) são menos vulneráveis em processo de envelhecimento (Jonhson et al., 1998; Phillips et al., 2003; Wade e Cowen, 2004). Desta forma, a técnica de evidenciação neuronal empregada é fundamental para subsidiar discussões que envolvem redução neuronal com a idade.

Em nosso estudo, optamos por utilizar técnicas que evidenciaríamos populações neuronais totais, sem categorizar sub-populações. A utilização do método de Giemsa, em todas as idades avaliadas, expressou uma média significativamente mais elevada do número de neurônios quando comparada à da técnica Miosina V.

Acreditamos que esta diferença decorra do fato de que estruturas celulares ácidas, encontradas em grande quantidade no corpo celular neuronal, como o retículo endoplasmático rugoso e ribossomos livres, apresentam afinidade pelo azul de metileno empregado na técnica de Giemsa (Bor-Seng-Shu, et al., 1994; Liberti et al., 1994; Natali e Miranda-Neto, 1996; Buttow et al., 1997; Natali et al., 2003), corando, portanto, todas as células presentes, mesmo aquelas com baixa atividade.

Críticas a esta técnica são feitas no sentido de que poderia haver uma dificuldade do observador em quantificar apenas neurônios, e que possíveis células gliais poderiam

ser quantificadas como neurônios, comprometendo o resultado (Heinicke et al., 1987; Young et al., 1993) (Fig. 4).

A técnica imunohistoquímica Miosina V é altamente restrita ao citoplasma dos neurônios, incluindo corpos celulares e fibras nervosas, sendo utilizada por vários autores como marcador específico para neurônios (Drengk et al., 2000; Buttow et al., 2003; Zanoni et al., 2003; Schoffen et al., 2005), o que impediria a marcação das células gliais. Esta proteína está relacionada com a endocitose e exocitose, transporte axoplasmático e liberação de neurotransmissores, gerando movimento através dos filamentos de actina (Hasson e Mooseker, 1997; Langfor e Molyneaux, 1998).

O menor número de neurônios expressando miosina V por nós observado, quando comparado à técnica de Giemsa, poderia ser justificada pelo menor envolvimento temporário de algumas células na dinâmica deste transporte. Estudos recentes demonstraram que o mesmo tipo celular, em condições fisiológicas diferentes, apresenta duas localizações distintas para a miosina V, dependentes da dinâmica da membrana plasmática. Nas células com uma membrana altamente dinâmica a miosina V está especificamente concentrada nas bordas onduladas da membrana; por outro lado nas células cujas membranas estão menos dinâmicas, a miosina V encontra-se enriquecida no centróssomo (Lionne et al., 2001). Também deve ser considerado que a clivagem da cauda medial poderia impedir o seu reconhecimento pelo anticorpo utilizado para a marcação da miosina V (Nascimento et al., 1996).

4.3 Morfometria do corpo celular neuronal

Os resultados obtidos através da média do perfil celular, em ambas as técnicas, demonstraram predomínio de neurônios com menor área (0-200 μm^2) em animais mais

jovens (21 e 60 dias), enquanto neurônios com maior área (200-600 μm^2) predominavam em animais com maior faixa etária, mantendo-se a organização ganglionar em todas as idades.

Dados semelhantes foram observados por Gabella (1971) analisando a relação entre o tamanho do corpo celular e o período do desenvolvimento do animal no plexo mioentérico do intestino delgado de ratos recém-nascidos e adultos. Este autor concluiu que, durante o crescimento, existe um aumento no tamanho neuronal e que a população predominante nos animais recém-nascidos é a de neurônios pequenos. Embora os neurônios pequenos estivessem presentes, os neurônios maiores constituíam o principal componente da população ganglionar em animais adultos.

Este comportamento não se restringe ao intestino delgado, visto que Phillips et al., (2003) obtiveram resultados similares, analisando o tamanho dos neurônios no intestino grosso de ratos com 3 e 24 meses de idade. Este fato é justificado pelos autores através da associação de perda neuronal em decorrência do estresse que ocorre com a idade e consideram que os neurônios remanescentes em animais mais velhos, podem suprir a redução quantitativa, já que maior demanda funcional é exigida destes neurônios, o que poderia refletir num estado de hipertrofia celular. Santer e Baker (1988) também analisaram o perfil celular dos neurônios do intestino delgado e grosso de ratos com 6 e 24 meses verificando aumento do perfil celular nos ratos velhos.

Orr e Chen (2002) descrevem que os processos degenerativos decorrentes do avanço da idade, podem ser compensados pela plasticidade do SNE, e que alterações como a redução do número de neurônios e disfunções na motilidade gastrointestinal aparecem somente quando as reservas funcionais dos neurônios são exauridas.

Evidências da plasticidade neuronal entérica, as quais estariam relacionadas com a grande capacidade de reorganização adaptativa dos plexos, são descritas por vários

autores (Santer e Baker, 1988; Gabella, 1989; Gabella, 1990; Saffrey e Burnstock, 1994; Gavazzi e Cowen, 1996; Hanani et al., 2003), envolvendo inclusive um ajuste da cápsula ganglionar, com aumento na densidade de fibras do sistema elástico e colágeno em indivíduos idosos (De Souza, 1993; Meciano Filho, 1995).

A interpretação de nossos resultados permite inferir que, na perda de neurônios associada ao envelhecimento, houve um predomínio dos neurônios maiores, considerando que estes estariam mais aptos a garantir a manutenção da inervação intrínseca nesta condição, possivelmente pela maior capacidade de síntese (Giemsa) e transporte (Miosina V).

5. Conclusões

Baseados na metodologia executada, concluimos:

1. O fator idade é determinante em análises quantitativas de população neuronal, existindo uma perda neuronal mioentérica para ratos Wistar a partir dos 210 dias de idade.

2. Ratos Wistar jovens (21-60 dias) apresentam um contingente neuronal formado predominantemente por neurônios pequenos.

3. O método de Giemsa revelou-se mais adequado para quantificar populações neuronais totais.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem à Dr^a. Enilza Maria Espreafico (USP - Ribeirão Preto, Brasil) pelo fornecimento do anti-corpo anti-miosina V, Maria Euride do Carmo Cancino, Maria dos Anjos Fortunato, Valdir Trombeli e José Antônio de Souza (UEM - Maringá, Brasil) pelo excelente suporte técnico, e Peter Grimshaw pela tradução do texto. Este trabalho foi financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

7. Referências

- Barbosa, A.J.A., 1978. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. *Rev. Bras. Pesqui. Méd. Biol.* 11, 95-7.
- Bor-Seng-Shu, E., Chadi, G., Bor-Jiun-Shu, F., Ferraz de Carvalho, C. A., De Souza, R.R., 1994. Myenteric neurons of the mouse small intestine. Morphometry and acetylcholinesterase activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 101-108.
- Buttow, N.C., Miranda-Neto, M.H., Bazotte, R.B., 1997. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the duodenum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arq. Gastroenterol.* 34, 34-41.
- Buttow N.C., Zucoloto, S., Espreafico, E.M., Gama, P., Álvares, E.P., 2003. Substance P enhances neuronal area and epithelial cell proliferation after colon denervation in rats. *Dig. Dis. Sci.* 48, 2069-2076.
- De Giorgio, R., Guerrini, S., Barbara, G., Stanghellini, V., De Ponti, F., Corinaldesi, R., Moses, P.L., Sharkey, K.A., Mawe, G.M., 2004. Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system. *Gastroenterology.* 126, 1872-1883.
- De Souza, R.R., Moratelli, H.B., Borges, N., Liberti, E.A., 1993. Aged-induced nerve cells loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. *Gerontology.* 183-188.
- Dolatshad, N.F., Silva, A.T., Soubeyre, V., Hoyle, C.H.V., Cowen, T., Saffrey, M.J., 2001. Expression of the GDNF and its receptors in the ageing gut. *Soc. Neurosci. Abstr.* 27, 861-864.
- Drengk, A.C., Kajiwara, J.K., Garcia, V.S., Carmo, V.S., Larson, R.E., Zucoloto, S., Espreafico, E.M., 2000. Immunolocalisation of myosin-V in the enteric nervous system of the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 78, 109-112.

- Gabella, G., 1971. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J. Anat.* 109, 81-94.
- Gabella, G., 1972. Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J. Anat.* 111, 69-97.
- Gabella, G., 1987. Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract. In: Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 2nd edition. Raven Press, New York, pp. 335-381.
- Gabella, G., 1989. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. *Gastroenterology*. 96, 1487-1493.
- Gabella, G., 1990. On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 30, 59-66.
- Gavazzi, I., Cowen, T., 1996. Can the neurotrophic hypothesis explain degeneration and loss of plasticity in mature and ageing autonomic nerves? *Journal of the Autonomic Nervous System*. 58, 1-10.
- Gomes, O.A., Souza, R.R., Liberti, E.A., 1997. A preliminary investigation of the effects aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. *Gerontology*. 43, 210-217.
- Gurmini, J., Cecílio, W.A.C., Schuler, S.L., Olandoski, M., Noronha, L., 2005. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 41, 271-278.
- Hanani, M., Ledder, O., Yutkin, V., Abu-Dalu, R., Huang, T.Y., Hartig, W., Vannuchi, M.G., Faussone-Pellegrini, M.S., 2003. Regeneration of myenteric plexus in the mouse colon after experimental denervation with benzalkonium chloride. *J. Comp. Neurol.* 462, 315-327.

- Hasson, T., Mooseker, M.S., 1997. The growing family of myosin motors and their role in neurons and sensory cells. *Current Opinion in Neurobiology* 7, 615-623.
- Heinicke, E.A., Kiernan, J.A., Wijsman, J., 1987. Specific, selective, and complete staining of neurons of the myenteric plexus, using Cuproline blue. *Journal of Neuroscience Methods*. 21, 45-54.
- Hernandes, L., Zucoloto, S., Alvares, E.P., 2000. Effect of myenteric denervation on intestinal epithelium proliferation and migration of suckling and weanling rats. *Cell Prolif.* 33, 127-138.
- Horowitz, M., Maddern, G.J., Chatterton, B.E., Collins, P.J., Harding, P.E., Shearman, D.J., 1984. Changes in gastric emptying rates with age. *Clinical Science*. 67, 213-218.
- Hosoda, S., Bamba, T., Nakago, S., Fujiyama, Y., Senda, S., Hirata, M., 1992. Age-related changes in the gastrointestinal tract. *Nutrition Reviews*. 50, 374-377.
- Hounnou, G., Estrieux C., Desme, J., Bertrand, P., Velut, S., 2002. Anatomical study of the length of the human intestine. *Surg. Radiol. Anat.* 24, 290-294.
- Johnson, R.J.R., Schemann, M., Santer, R.M., Cowen, T., 1998. The effects of age on the overall population and on sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J. Anat.* 192, 479-488.
- Langford, G.M., Molyneaux, B.J., 1998. Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defects. *Brain Research Reviews* 28, 1-8.
- Liberti, E.A., Queiroz, L.M., Popeu, E., Perito, M.A.M., Minarelli, A.M., Moraes, J.O.R., De-Souza, R.R., 1994. A quantitative and comparative study of the ganglionic neurons in the myenteric and submucous plexuses of the small intestine and the intramural plexus of the gall bladder the guinea-pig. *Rev. Bras. Cienc. Morfol.* 11, 106-114.

- Lionne, C., Buss, F., Hodge, T., Ihrke, G., Kendrick-Jones, J., 2001. Localization of myosin Va is dependent on the cytoskeletal organization in the cell. *Biochem. Cell Bioll.* 29, 93-106.
- McLean, I.W., Nakane, P.K., 1974. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative, a new fixation for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1077-1083.
- Meciano Filho, J., Carvalho, V.C., De Souza, R.R., 1995. Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age: A preliminary investigations. *Gerontology.* 41, 18-21.
- Meilus, M., Natali, M.R.M., Miranda Neto, M.H., 1998. Study of the myenteric plexus of the ileum of rats subjected to proteic undernutrition. *Rev. Chil. Anat.* 16, 9-14.
- Miranda-Neto, M.H., Molinari, S.L., Natali, M.R.M., Sant'ana, D.M.G., 2001. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of the neuronal evidentiatio. *Arq. Neuropsiquiatr.* 59, 54-59.
- Mitchell, S.H., Ryndbergen, H.J., Anderson, L., Dibble, M.V., 1978. *Nutrição.* 16^a Edição. Interamericana, Rio de Janeiro. 1246 pp.
- Nascimento, A.A.C., Cheney, R.E., Tauhata, S.B.F., Larson, R.E., Mooseker, M.S., 1996. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. *J. Biol. Chem.* 271, 17561-17569.
- Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., 1996. Effect of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of the duodenum of rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 54, 273-279.
- Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., Orsi, A.M., 2000. Effects of hypoproteic diet supply on adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*). *Acta Scientiarum.* 22, 567-571.

- Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., Orsi, A.M., 2003. Morphometry and quantifications of the myenteric neurons of the duodenum of adult rats fed with hypoproteic chow. *Int. J. Morphol.* 21, 273-277.
- Natali, M.R.M., Molinari, S.L., Valentini, L.C., Miranda-Neto, M.H., 2005. Morphoquantitative evaluation of the duodenal myenteric neuronal population in rats fed with hypoproteic ration. *Biocell.* 29, 39-46.
- Orr, W.C., Chen, C.L., 2002. Aging and neural control of the GI tract IV. Clinical and physiological aspects of gastrointestinal motility and aging. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, 1226-1231.
- Phillips, R.J., Kieffer, E.J., Powley, T.L., 2003. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* 106, 69-83.
- Phillips, R.J., Powley, T.L., 2001. As the gut ages: timetables of aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. *J. Comp. Neurol.* 434, 358-377.
- Saffrey, M.J., Burnstock, G., 1994. Growth factors and the development and plasticity of the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System.* 49, 183-196.
- Santer, R.M., 1994. Survival of population of NADH-diaforase stained myenteric neurons in small intestine of aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 49, 115-121.
- Santer, R.M., Baker, D.M., 1988. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and intestine of adult and aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 25, 59-67.
- Schäfer, K.H., Hänsgen, A., Mestres, P., 1999. Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *The Anatomical Record.* 256, 20-28.

- Schoffen, J.P.F., Soares, A., Freitas, P., Buttow, N.C., Natali, M.R.M., 2005. Effects of a hypoproteic diet on myosin-V immunostained myenteric neurons and the proximal colon wall of aging rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 122, 77-83.
- Thrasivoulou, C., Ridha, H., Soubeyre, V., Hoyle, C.H.V., Saffrey, M.J., Cowen, T., 2000. Free radical buffering in rat enteric neurons: effects of age and neurotrophic factors. *Eur. J. Neurosci.* 12, 33.
- Torrejais, M.M., Natali, M.R.M., Conegero, C.I., Miranda Neto, M.H., 1995. Effects of proteic malnutrition after breast-feeding on the morphology of the intestinal wall and myenteric neurons of the ileum of rats. *Revista Unimar.* 17, 315-327.
- Wade, P.R., 2002. Aging and neural control of the GI tract. I Age-related changes in the enteric nervous system. *Am. J. Physiol.* 283, 489-495.
- Wade, P.R., Cowen, T., 2004. Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. *Neurogastroenterol. Motil.* 16, 19-23.
- Weaver, L.T., Desai, M., Austin, S., Arthur, H.M.L., Lucas, A., Hales, C.N., 1998. Effects of protein restriction in early life on growth and function of gastrointestinal tract of the rat. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 27, 553-559.
- Won, K-J., Suzuki, T., Hori, M., Ozaki, H., 2006. Motility disorder in experimentally obstructed intestine: relationship between muscularis inflammation and disruption of the ICC network. *Neurogastroenterol. Motil.* 18, 53-61.
- Young, H.M., Furness, J.B., Sewell, P., Burner, E.F., Kandiah, C.J., 1993. Total numbers of neurons in myenteric ganglia of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* 272, 197-200.
- Zanoni, J.N., Buttow, N.C., Bazotte, R.B., Miranda-Neto, M.H., 2003. Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the

ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid. *Auton. Neurosc. Bas. Clin.* 104, 32-38.

Tabela 1: Peso corporal (PC) (g), comprimento do intestino delgado (CID) (cm) e espessura da túnica muscular externa (TME) (μm) do duodeno de ratos em diferentes idades (n=10). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

Idade dos animais (dias)	PC (g)	CID (cm)	TME (μm)
21	49,7 \pm 2,07 e	61,9 \pm 6,93 c	101,9 \pm 4,87 a
60	245,5 \pm 18,91 d	114,6 \pm 10,21 a	109,1 \pm 6,96 a
90	389,2 \pm 26,25 c	118,9 \pm 11,29 a	99,8 \pm 34,22 a
210	447,0 \pm 45,82 ab	121,2 \pm 6,12 a	86,3 \pm 21,43 a
345	463,7 \pm 25,38 b	103,3 \pm 18,84 b	118,0 \pm 30,90 a
428	521,1 \pm 65,80 a	94,3 \pm 16,17 b	119,3 \pm 21,06 a

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2: Quantificação neuronal pelo método não-histoquímico de Giemsa e pela técnica imunohistoquímica Miosina V (n=10) em uma área de 14,832 mm² do duodeno de ratos e valores convertidos para cm². Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

Idade dos animais (dias)	GIEMSA		MIOSINA V	
	Nº médio de neurônios (14,832 mm ²)	Densidade neuronal (cm ²)	Nº médio de neurônios (14,832 mm ²)	Densidade neuronal (cm ²)
21	13.250 ± 1.362 a A	89.335	8.805 ± 587,2 a B	59.364
60	7.092 ± 1.069 b A	47.814	4.537 ± 223,2 b B	30.291
90	6.064 ± 931,5 b A	40.885	4.303 ± 220,4 b B	29.010
210	4.474 ± 341,2 c A	30.164	3.359 ± 288,0 c B	22.646
345	3.418 ± 91,2 c A	23.046	2.447 ± 96,2 d B	16.499
428	1.935 ± 173,3 d A	13.047	1.526 ± 115,4 e B	10.287

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa; teste de Tukey (p<0,05). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa; teste *t* de Student (p< 0,05).

Tabela 3: Área do perfil celular (μm^2) pelo método não-histoquímico de Giemsa e pela técnica de imunohistoquímica Miosina V (n=10). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

Idade dos animais (dias)	GIEMSA	MIOSINA V
21	142,9 \pm 6,37 c A	151,3 \pm 15,87 c A
60	219,0 \pm 9,23 b A	225,6 \pm 19,32 b A
90	247,3 \pm 19,16 ab A	244,5 \pm 17,67 b A
210	232,1 \pm 14,61 ab A	261,3 \pm 25,11 ab A
345	237,6 \pm 20,25 ab A	238,3 \pm 21,89 b A
428	254,0 \pm 21,14 a A	295,3 \pm 37,87 a A

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa; teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa; teste t de Student ($p < 0,05$).

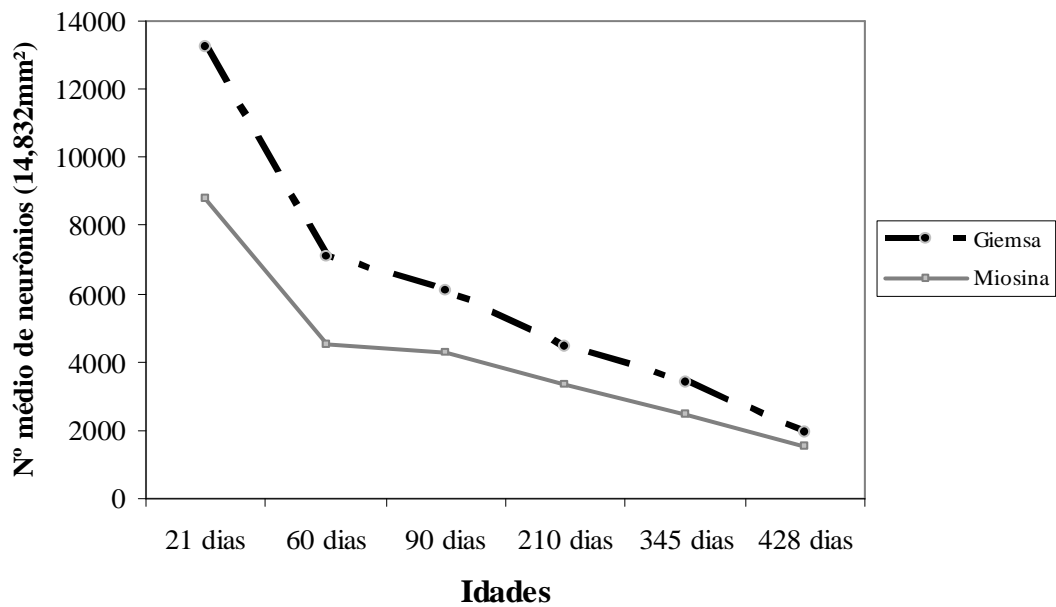


Fig. 1: Número médio de neurônios quantificados pelo método não-histoquímico de Giemsa e pela técnica imunohistoquímica Miosina V em uma área de 14,832 mm² do duodeno de ratos (n=10).

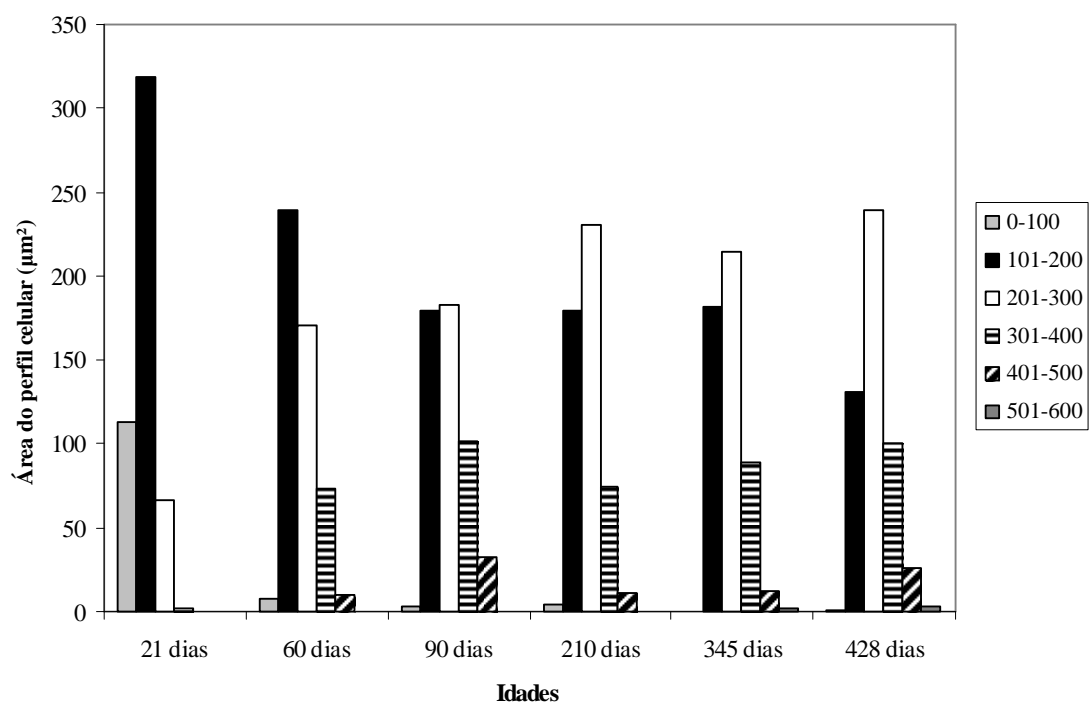


Fig. 2: Distribuição dos neurônios mioentéricos por área do perfil do corpo celular, evidenciados pelo método de Giemsa, em intervalos de classes de $100 \mu\text{m}^2$.

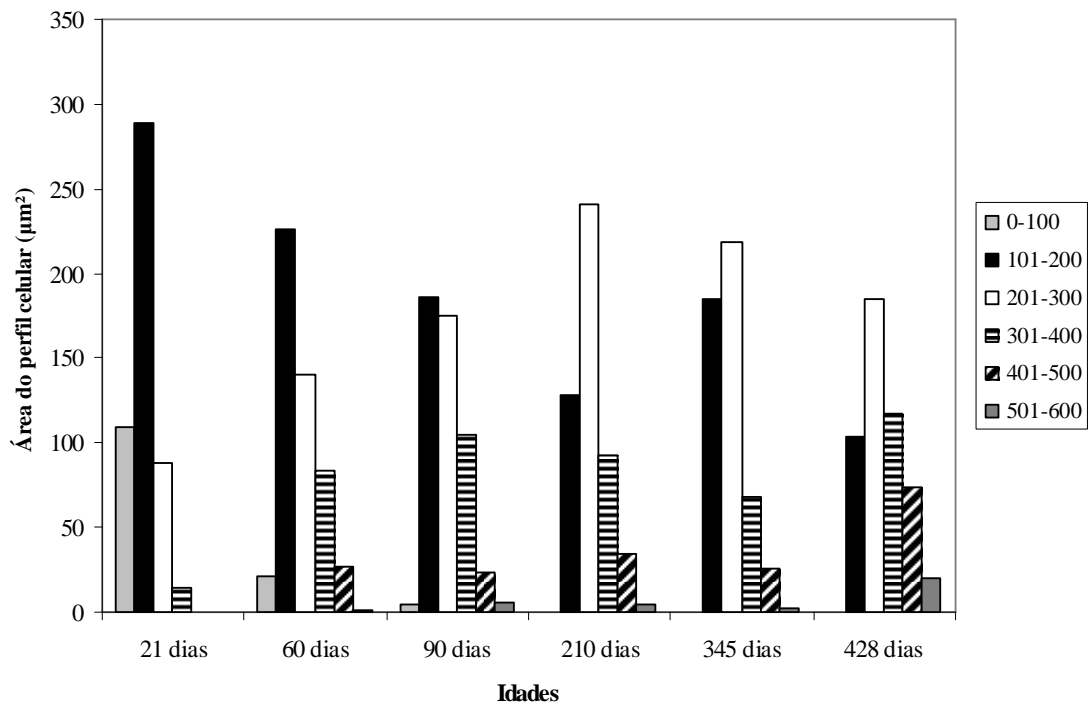


Fig. 3: Distribuição dos neurônios mioentéricos por área do perfil do corpo celular, evidenciados pela técnica imunohistoquímica Miosina V, em intervalos de classes de $100 \mu\text{m}^2$.

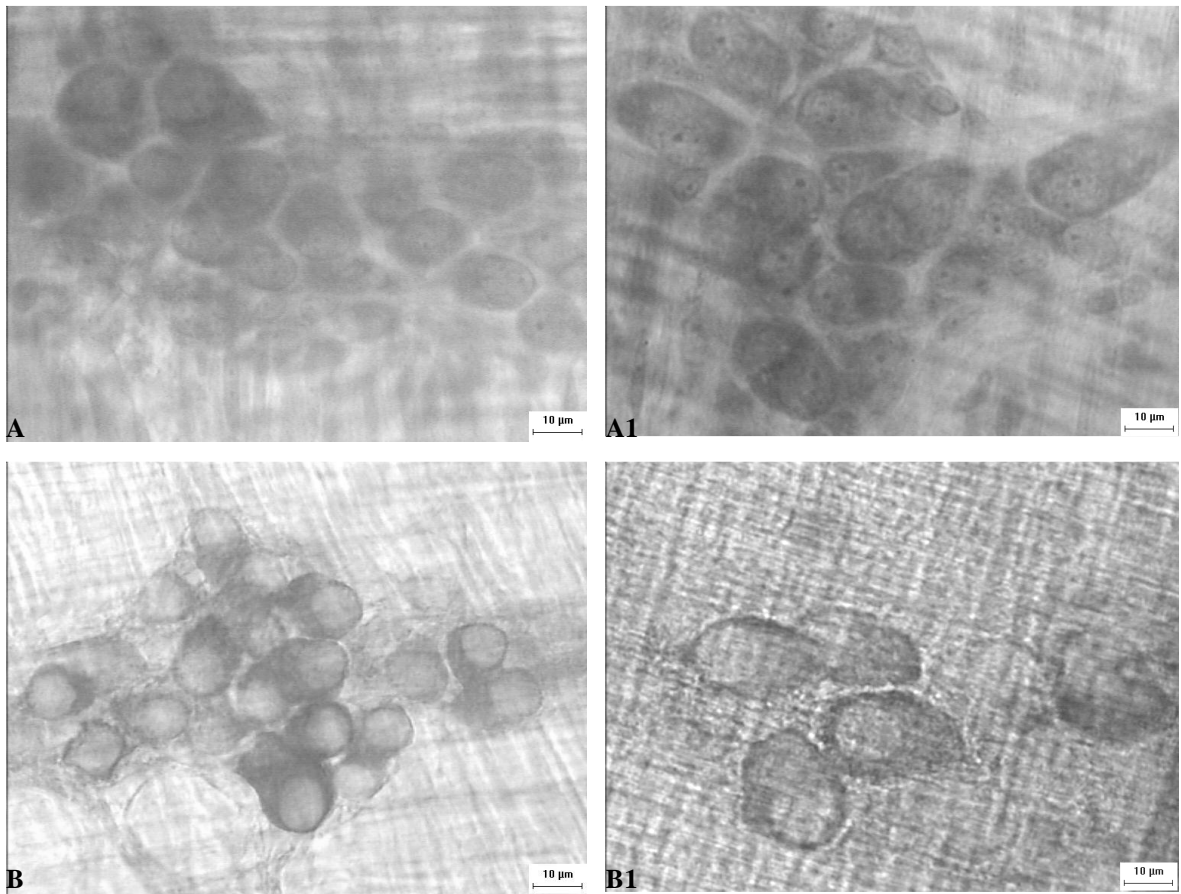


Fig. 4: Neurônios mioentéricos do duodeno evidenciados pelas técnicas de Giemsa (A) e Miosina V (B). Ratos com 21 dias (A e B) e ratos com 428 dias (A1 e B1).

**Immunohistochemistry and non-histochemistry of myenteric neurons
from the duodenum of rats of different ages: total neuronal
population?**

Angélica Cristina Milan Marese, Priscila de Freitas, Maria Raquel Marçal Natali

Department of Morphophysiological Sciences, Enteric Neurons Laboratory, State University of Maringá, Avenida Colombo, 5790, ZIP CODE 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil.

Author address: Angélica Cristina Milan Marese. Rua Araucária, 103, Parque Verde, CEP 85807-670, Cascavel, Paraná, Brazil - Tel.: +55 45 3226 2013.

E-mail: angelicamarese@yahoo.com.br

Abstract

The objective of this study was to analyze the morphoquantitative behaviour of myenteric neurons from the duodenum of Wistar rats (*Rattus norvegicus*), aged 21, 60, 90, 210, 345 and 428 days, using membrane preparations of the muscular tunica obtained by dissection of the intestinal tunica for neuronal evidencing, through the Giemsa non-histochemical and the Myosin V immunohistochemical techniques. The neurons were quantified in 80 microscopic fields (14.832 mm²) for each animal and neuronal cell body morphometry was carried out on 100 neurons/animal. Duodenum samples were submitted to routine histological processing, being stained by the hematoxylin-eosin method in order to carry out a morphometric analysis on the external muscular tunica. An increase in the length of the small intestine was observed up to the age of 60 days, which was maintained up to 210 days, with a reduction in this parameter from 345 days. The thickness of the muscular tunica was maintained independently of the age of the animal. During the course of the study, there was a reduction in the mean neuron population in both the techniques used. However, in all of the ages evaluated, the use of the Myosin V technique lead to a reduced mean number of neurons compared to the Giemsa method. The morphometry of the cellular profile revealed, with both techniques, the predominance of smaller neurons in young animals, and of larger neurons in animals of higher age groups. It was concluded that advanced age is a determining factor in the reduction in the number of myenteric neurons, with maintenance of the intrinsic intestinal innervation by the remaining neurons and that the use of the Giemsa non-histochemical technique showed itself to be more adequate for the determination of the total neuronal population.

Keywords: aging; duodenum; myenteric neurons; Giemsa; Myosin V.

1. Introduction

Aging is a natural physiological process that involves changes in the structure and function of the gastrointestinal tract, which can affect its functions (Horowitz et al., 1984; Hosoda et al., 1992). A complex network of nerve fibers and neuron cell bodies, called the Enteric Nervous System (ENS), located along the entire wall of the gastrointestinal tract and directly related to the normal control of its functions, such as digestion and absorption of nutrients, secretion and motility of the intestine, responds, therefore, to its intrinsic innervation, through the modulation of these functions (Schäfer et al., 1999; Wade and Cowen, 2004).

Alterations in the function of the mucosa and/or in the motility of the gastrointestinal tract, resulting from a dysfunction of the ENS due to age, may lead to disturbances that, depending on the region affected, include dysphagia, gastro-esophageal reflux disorders, abdominal pains, diarrhea, constipation and fecal incontinence (Wade and Cowen, 2004).

This dysfunction may be directly related to morphoquantitative alterations of the enteric neuronal contingent, in as much as a reduction in the number of functioning cells is the main physiological alteration deriving from aging, which causes slowness in metabolic processes (Mitchell et al., 1978). Experimental approaches using rats in different phases of development report alterations in the ENS with age (Gabella, 1971; Phillips and Powley, 2001).

The myenteric plexus, one of the main ganglionated plexuses which make up the ENS, located between the internal circular muscular and external longitudinal layers of the digestive tube, is responsible, among other functions, for the control of peristalsis (Gabella, 1987).

Morphoquantitative analyses of the myenteric plexus neurons of the small intestine of rats of different ages reveal morphometric alterations of the cellular bodies and a significant reduction in neuronal density (Gabella, 1971; Santer and Baker, 1988; Phillips and Powley, 2001).

Gabella (1987) stated that alterations in the number and size of the cellular bodies of the myenteric plexus neurons might also be related to variations in the thickness of the muscular tunica, the target tissue responsible for the maintenance, development and plasticity of these neurons.

Various methods have been used to estimate the total neuronal population, as well as specific subpopulations in different segments of the digestive tract. In investigations that involve the study of the total neuronal population, the employment of basic stains, such as Giemsa, toluidine blue, methylene blue and Cuproline Blue stains, which have an affinity for the acidic organelles present in cytoplasm, have revealed themselves to be efficient (Bor-Seng-Shu, et al., 1994; Liberti et al., 1994; Natali and Miranda-Neto, 1996; Schäfer et al., 1999; Natali et al., 2003).

Recently, the immunohistochemical technique to detect the Myosin V has been used as a neuronal marker (Drengk et al., 2000; Buttow et al., 2003; Zanoni et al., 2003; Schoffen et al., 2005). The Myosin V protein is particularly present in neuronal cytoplasm, conferring specificity to the technique, enabling visualization of the cellular bodies and their delineation (Drengk et al., 2000; Zanoni et al., 2003). It is connected to the dynamics of the membranes (endocytosis and exocytosis), axoplasmic transport and release of neurotransmitters, due to its ability to convert chemical energy, in the form of ATP, into motive energy, generating movement through the actin filaments (Hasson and Mooseker, 1997; Langford and Molyneaux, 1998).

Despite the fact that the two techniques are known as markers of total neuronal populations and, therefore, should result in quantitatively similar values, differences in the results obtained are observed in literature, without there being a consensus of which method is the more adequate.

Under these circumstances, the objective of this study was to perform the comparative analysis between Giemsa dying method and the immunohistochemical method with the myosin-V antibody, for the morphoquantitative study of myenteric neurons from duodenum, using as model Wistar rats of different ages.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of samples

Segments of the duodenum from 60 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used. The animals were kept in an animal laboratory with a constant temperature of 22 ± 2 °C and alternating 12 h cycles of light and dark for their corresponding periods of life, being put down at the ages of 21, 60, 90, 210, 345 and 428 days. With the exception of the 21-day group (weaning), the animals received standard rations of NUVILAB-NUVITAL[®] for rodents (recommended by the National Research Council & National Health Institute - USA), with a proteic content of 22%, and water *ad libitum*.

For each age, 10 animals were used, which were weighed and intraperitoneally anesthetized with thiopental sodium (Thionembutal[®]) (40 mg/kg of body weight).

The procedures carried out in this study were in accord with the ethic principles adopted by the Brazilian School of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the State University of Maringá (UEM).

2.2. Neuronal evidencing – Giemsa non-histochemical method (modified by Barbosa, 1978)

For this study, 30 animals were used (5 animals per age group). After being submitted to a laparotomy, the small intestine was removed and measured and the duodenum (the initial portion) was then collected. The segments were washed with 0.9% saline solution, inflated and immersed in a fixing solution of Giemsa (30 ml

formaldehyde, 15 ml acetic acid, 9 g sodium chloride and 55 ml distilled water) for 48 hours. Next, to obtain the whole mount preparations, they were microdissected under a stereomicroscope with trans-illumination for the removal of the mucosal and submucosal tunicae, preserving the external muscular and serosal tunica.

This material was stained with Giemsa staining solution, made with methylene blue, in a Sorensen phosphate 0.1 N (pH 6.9) buffer for 24 hours at ambient temperature with agitation. For mounting onto laminas, the prepared membranes were dehydrated in a series of increasing concentrations of ethanol, diaphanized in xylol, and mounted with Permount[®] synthetic resin (Fisher Chemical, New Jersey, USA).

For accuracy in the count, the analyses were standardized according to the morphological characteristics of the neurons, identifying and counting cells with strongly stained cytoplasm, with well-defined limits, a nucleus in a generally eccentric position, large and clear, as well as the presence of one or more nucleolus. In contrast, the cellular bodies of neuroglia cells show themselves to be much reduced in relation to the cellular bodies of neurons, with clear cytoplasm and a small dark nucleus.

2.3. Neuronal evidencing – immunolocalization of the myosin V (Drengk et al., 2000)

For this study, the other 30 animals (5 animals/age group) were perfused with saline 1.1% solution (1 ml/g of body weight), then with fixing solution (1 ml/g of body weight) containing 10 mM sodium periodate, 75 mM lysine and 1% paraformaldehyde in 37mM phosphate buffer, pH 7.4 (McLean and Nakane, 1974).

Immediately after the perfusion, the laparotomy, measurement of the small intestine and collection of the initial part of the duodenum was carried out. The segments were washed with 1.1% saline solution, inflated and immersed in fixing solution for one hour. They were then dehydrated in a series of increasing

concentrations of ethanol, diaphanized in xylol and rehydrated in ethanol, finally being stored in 70% ethanol. They were later microdissected under a stereomicroscope with transillumination by the removal of the mucosal and submucosal tunicae. Whole samples of the muscular tunica membranes were obtained. These samples were washed in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, and blocked for two hours with PBS containing 2% bovine serum albumin, 2% goat serum and 0.5% Triton X-100 at ambient temperature.

Sequentially, the segments were incubated in a solution containing 0.86 mg/ μ l of purified medial-tail anti-myosin V primary antibodies extracted from rabbits, diluted in PBS containing 1% bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100 and 2% goat serum, at ambient temperature and under agitation for 48 hours. After incubation, the tissues were washed in 0.1 M PBS with 0.1% Triton X-100, and in a solution of 0.1 M PBS with the addition of 0.05% Tween-20. Then, the tissues were incubated in the secondary antibody together with peroxidase (1 μ g/ml), at ambient temperature and under agitation for 24 hours and washed, for 15 minutes, with 0.1 M PBS with the addition of 0.05% Tween-20.

The immuno-reaction with the antibody together with peroxidase was revealed by incubation with 0.75 mg/ml of diaminobenzidine (DAB), 0.03% H₂O₂ in water (1 ml) and 0.1 M PBS (1 ml) for 15 minutes at ambient temperature under agitation. The samples were mounted in a medium of glycerol gel.

2.4. Quantitative analysis and neuronal morphometry

The morphoquantitative analysis of myenteric neurons were performed for both techniques. For the quantification, counts in 80 random microscopic fields for each

animal were carried out, in the intermediate and antimesenteric regions of the intestinal circumference, with a light microscope (Olympus BX40) and a 40X objective.

The parts of the intestinal circumference located between 60° and 120°, and between 240° and 300° in relation to the insertion of the mesentery, were considered as the intermediate region, and the part located between 120° and 240° was considered as the antimesenteric region (Miranda-Neto et al., 2001). Each microscopic field corresponded to an area of 0.185 mm², making a total area of 14.832 mm².

For the morphometric analysis, the areas (µm²) of 100 random neuron cellular bodies per animal (1000 neurons for each age group) were measured, using an image analysis system (Image Pro Plus[®] 4.5 – Media Cybernetics, Inc.). The neurons were classified according to their size, in class intervals of 100µm².

2.5. Morphometric analysis of the muscular tunica

For this study, segments of the duodenum of five animals from each age group were opened at the mesenteric border, fixed in Bouin (750 ml saturated picric acid, 250 ml formaldehyde and 50 ml glacial acetic acid), dehydrated in a series of increasing concentrations of ethanol, diaphanized in xylol and inserted in paraffin to obtain the 6-µm-thick semi-seriate histological sections, in a Leica RM 2145 microtome, and subsequently stained using the haematoxylin-eosin method (HE).

The sections were used in the morphometric assessment of the muscular tunica (100 measurements per animal), using an image analysis system (Image Pro Plus[®] 4.5 – Media Cybernetics, Inc.), with the results expressed in µm.

2.6. Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using the software GraphPad Prism[®] 3.0 (GraphPad Software, Inc.). The data relating to the comparison between the techniques was submitted to an analysis of variance (ANOVA), followed by a student's *t* test. The data relating to the comparison among the ages was submitted to an analysis of variance (ANOVA) and, as a post-test for the comparison of means, a Tukey test. For both the tests, the level of significance was 5%. The results were reported as mean \pm standard deviation.

3. Results

3.1. Intestinal development

The data presented in Table 1 shows values for body weight, intestinal length and thickness of the external muscular tunica of rats of different ages. It was confirmed that a significant increase in the length of the small intestine occurred up to the age of 60 days, followed by the maintenance of this parameter up to 210 days. From 345 days, a significant reduction in length was observed. The thickness of the muscular tunica was maintained independently of age, and body weight showed a gradual increase according to development.

3.2. Neuronal quantification

The mean number of neurons counted by the Giemsa and Myosin V techniques are shown in Table 2 and Fig. 1. The data obtained shows that during the aging process of the animals, there was a reduction in the neuron population mean, detected by both employed techniques.

Furthermore, with the values contained in Table 2, it is possible to observe that using the Myosin V technique results in a significantly reduced mean number of neurons compared to the Giemsa method, in all the ages evaluated.

3.3. Morphometry of the neuronal cellular body

The myenteric neurons analyzed from the membrane samples showed ganglionic organization, aggregating cellular bodies that varied in size independently of the technique used or of the age group.

It was confirmed that in the myenteric ganglions of the animals of 21 and 60 days, the predominant cellular population was the neurons in the range of 101-200 μm^2 , and that at the age of 21 days, it was possible to observe a significant neuronal contingent in the range of 0-100 μm^2 , which ceased to exist at more advanced ages. In the animals at 90 days, there started to be parity between the 101-200 μm^2 and 201-300 μm^2 classes. From 210 until 428 days, even though the 201-300 μm^2 class predominated, the increase in the neuron populations of larger ranges is clear (Fig. 2, 3 and 4).

The differences in the distribution of the neuronal populations in terms of their size are confirmed statistically when the mean area of the cellular profile is estimated with both the techniques (Table 3), which show a smaller mean area for the neurons of animals at 21 days and a larger mean area for the neurons of animals at 428 days.

Furthermore, according to the values shown in Table 3, it is possible to observe that, in the evaluation of the neuronal cellular profile, the use of different techniques did not interfere with the mean obtained.

4. Discussion

4.1. Intestinal development

The standard of intestinal development used in this study, the length of the small intestine, revealed a statistically significant increase up to the age of 60 days, at which point it was maintained until 210 days. From 345 days, there was a significant reduction in intestinal length.

The establishment of which factors are implicated in the determination of intestinal length are controversial. Hounnou et al. (2002) highlighted the existence of a correlation between the length of the small intestine and body weight, and not with the height of the individual. Schäfer et al. (1999) thought that intestinal length and the thickness of the muscular tunica are related to the development of the intrinsic innervation, and that the increase in these parameters causes changes in neuronal density and size.

Comparing the data on intestinal length with the weight of the animals in this study, a direct relationship between weight gain and intestinal length up to the age of 210 days can be observed, similar to the observations of Hounnou et al. (2002). The data of this study does not agree, however, with this correlation for more advanced ages, where the hypothesis of Schäfer et al. (1999) that relates variations in intestinal length to variations in neuronal density is probably more adequate.

With regard to development in the period of 21 to 210 days, the results of this study partially resemble those of Johnson et al. (1998) and Phillips et al. (2003) with rats of Sprague Dawley and Fischer lineage, respectively, which confirmed the occurrence of a gradual increase in intestinal length with age.

These authors compared rats of ages 3-4 and 24 months, and confirmed a significant increase in intestinal length between them. Johnson et al. (1998) stated that the lineage and the life period of the animal are of fundamental importance in this type of evaluation, and that there are differences between the Sprague Dawley and Wistar lineages in relation to age, as the mortality of Wistar rats is significantly lower than that of Sprague Dawley rats of the same age. It should also be considered that these authors worked with extreme periods and that, if we apply the same reasoning to the lowest (21 days) and highest (428 days) ages in this study, a similar result would be obtained.

Within the Wister lineage, this study revealed that more advanced ages promote a significant reduction in intestinal length. On the other hand, the thickness of the external muscular tunica, independent of age group, did not show a statistically significant difference. In spite of the difficulty of correlating these results with data in previous literature, as a consequence of possible distention at the time of collection, the values found in this study are similar to those of Weaver et al. (1998), Meilus et al. (1998) and Gurmini et al. (2005) for intestinal length and to those of Hernandez et al. (2000), Natali et al. (2000; 2005) and Won et al. (2006) for the thickness of the external muscular tunica.

To our understanding, the maintenance of the muscular tunica may be justified by the condition of normal development imposed on the animals, including the maintenance of a normoproteic diet, independent of the factor of age. A reduction in the external muscular tunica (Torrejais et al., 1995; Natali et al., 2005) has been confirmed in studies on rodents fed with hypoproteic diets.

4.2. Neuronal quantification

The results obtained demonstrate that age is a significant factor in the reduction in the number of myenteric neurons. When comparing the extremes of the ages, that is, the mean number of neurons in the 21- and 428-day groups, a neuronal reduction in the order of 85.4% was confirmed by the Giemsa non-histochemical technique and of 82.7% by the Myosin V immunohistochemical technique.

Even with the count being carried out by regions (intermediate and antimesenteric), it was confirmed that there were no significant differences between them; for this reason, the results were presented together. A similar result was observed by Santer (1994) investigating the distribution of myenteric neurons in the middle region of the small intestine of rats of different ages and by Natali et al. (2003) in the duodenum of adult rats. However, they are not in accord with the results obtained by Gabella (1972) and Miranda-Neto et al. (2001), those that observed significant statistical difference between these regions.

Santer and Baker (1988) studied the effects of age on the neurons of the myenteric plexus in the small and large intestines of rats of 6 and 24 months. They reported a neuronal loss of 40% in the jejunum, 43% in the ileum, 64% in the colon and 42% in the rectum of the elderly rats. The authors stated that this loss would be accompanied by a concomitant reorganization of the remaining elements, and that for this reason it could not be considered a degenerative process, as the remaining ganglion elements would have their efficiency increased.

A similar situation was observed by Gabella (1989) in the digestive tube of guinea pigs. Due to the condition of aging, there was a reduction of 40 to 60% in the neuronal density of the small intestine when young adults (3-4 months) were compared to older animals (26-30 months).

Phillips and Powley (2001) investigated the effects of age on the vagal innervation of the gastrointestinal tract and on the myenteric neurons, evidenced by Cuprolinic Blue, present in the stomach and the small and large intestines of rats of 3, 12, 21, 24 and 27 months of age. Similarly, they observed a linear reduction in the number of neurons with the advance of age in all the segments of the small intestine, with the duodenum showing a reduction of up to 30%. The probable cause of this reduction was attributed to the reduction in the integrity of the extrinsic vagal innervation, which may make the intrinsic network more susceptible to the effects of the advance of age. The loss of neuronal cells in the duodenum may be explained since approximately 20% of the myenteric neurons of the duodenum have afferent vagal innervation.

An age-related reduction in the number of neurons of the ENS has also been observed in rats, guinea pigs and mice (Santer, 1994; Johnson et al., 1998; Schäfer, et al., 1999; Wade, 2002; Phillips et al., 2003; Schoffen et al., 2005), and in the digestive tube of humans (Meciano Filho et al., 1995; Gomes et al., 1997).

Analyzing the number of neurons in the duodenum of 21-day-old rats (13,250 by the Giemsa technique and 8,805 by the Myosin V technique) and comparing them with 60-day-old rats (7,092 by Giemsa and 4,537 by Myosin V), a reduction of 46.48% and 48.48%, respectively, was found. This could mean that around half of the neuronal population was lost. However, associating these results to intestinal length, in both the ages, there is a proportional increase of 45.99%, from which it can be inferred that there is no loss, but a distribution of the ganglions and their prolongamentos over a greater intestinal area.

From the age of 60 until 210 days, a tendency to stabilize into this pattern was noticed: from 60 to 90 days there was a neuronal reduction of 14.49% by Giemsa and

5.15% by Myosin V. Up to 210 days, the confirmed neuronal loss was 26.22% and 21.93%, respectively, compared to the animals at 90 days. It is important to state that, at these ages, there was no difference in intestinal length.

Up to 345 and 428 days, a significant reduction in intestinal length occurred and increased the alteration in the number of neurons, which enables us to consider that the neuronal loss is gradual and progressive, in the order of 56.75% by Giemsa and 54.56% by Myosin V when considering ages from 210 to 428 days.

The findings of this study are corroborated by those of the studies of Schäfer et al. (1999) with regard to intestinal length and development of intrinsic innervation, and of Phillips and Powley (2001) who, when carrying out an investigation into the number of neurons in 3 to 27 month old rats, estimated that neuronal loss starts from the age of 12 months and that the attainment of neuronal stability occurred from 3 months.

Neuronal death attributed to age might be related to the increase in free radicals. Studies on enteric neurons related to free radicals indicate that species of endogenous reactive oxygen increase these neurons with the advance of age (Thrasivoulou et al., 2000). It should be considered that the small intestine is an organ that has a large absorption surface area and is, possibly, exposed to high levels of reactive species that can cause oxidative processes (De Giorgio et al., 2004). Another hypothesis for the vulnerability of enteric neurons with age is the reduction of neurotrophic agents derived from various neuroglia cells, which are important not only in the development of neurons, but also for their maintenance with the advance of age (Dolatshad et al., 2001).

According to Santer and Baker (1988) and Phillips and Powley (2001), the extrinsic innervation also offers some trophic support to the neurons present in the upper region of the gastrointestinal tract during the process of aging, indication that the

interaction between the extrinsic and intrinsic neurons is indispensable for the maintenance of a normal neuronal circuit.

Even though neuronal reduction with age is a frequent result in pertinent previous literature, the fact that some neurons might be more susceptible than others should be taken into consideration (Wade, 2002). Positive NADPH-diaphorase neurons, which express nitric oxide activity (nitroergic neurons), are less vulnerable to the process of aging (Jonhson et al., 1998; Phillips et al., 2003; Wade and Cowen, 2004). Therefore, the technique of neuronal evidencing used is fundamental in aiding discussions involving neuronal reduction with age.

In this study, it was decided for using techniques which would evidence total neuronal populations without categorizing sub-populations would be used. The use of the Giemsa method, in all ages evaluated, produced a significantly higher mean number of neurons than the Myosin V technique.

It is believed that this difference derives from the fact that acidic cell structures, found in large quantities in the neuronal cellular body, as well as the rugose endoplasmic reticulum and free ribosomes, show affinity for the methylene blue used in the Giemsa technique (Bor-Seng-Shu, et al., 1994; Liberti et al., 1994; Natali and Miranda-Neto, 1996; Buttow et al., 1997; Natali et al., 2003), staining, therefore, all the cells present, even those with low activity.

Criticisms of this technique are made about the fact that there might be difficulties for the observer in quantifying only the neurons, and that neuroglia cells might possibly be counted as neurons, compromising the result (Heinicke et al., 1987; Young et al., 1993) (Fig. 4).

The Myosin V immunohistochemical technique is highly restricted to the cytoplasm of neurons, including cellular bodies and nerve fibers, being used by various

authors as a marker for myenteric neurons (Drengk et al., 2000; Buttow et al., 2003; Zanoni et al., 2003; Schoffen et al., 2005), which blocks the marking of neuroglia cells. This protein is related to endocytosis and exocytosis, axoplasmatic transport and the liberation of neurotransmitters, it generates movements through the actin filaments (Hasson and Mooseker, 1997; Langforf and Molyneaux, 1998).

The lower number of neurons expressing myosin-V compared to the Giemsa technique, observed in this study might be justified by the lower temporary involvement of some cells in the dynamics of this transport. Recent studies have demonstrated that the same cellular type, in different physiological conditions, shows two distinct locations for Myosin V, dependent on the plasmatic membrane dynamics. In cells with a highly dynamic membrane, Myosin V is specifically concentrated in the undulated edges of the membrane. On the other hand, in cells whose membranes are less dynamic, Myosin V is found enriched in the centrosome (Lionne et al., 2001). It should also be taken into account that the cleavage of the medial-tail might impede its recognition by the antibody used for the marking of Myosin V (Nascimento et al., 1996).

4.3. Morphometry of the neuronal cellular body

The results obtained through the means of the cellular profiles, in both techniques, demonstrate a predominance of neurons with a smaller area (0-200 μm^2) in younger animals (21 and 60 days), while neurons with a larger area (200-600 μm^2) predominated in animals of higher age groups, maintaining ganglionic organization in all the age groups.

Similar data was achieved by Gabella (1971), analyzing the relationship between the size of the cellular body and the period of development of the animal, in the

myenteric plexus of the small intestine of newborn and adult rats. This author concluded that, while growing up, there was an increase in neuronal size and that the predominant population in the newborn animals was that of the small neurons. Although small neurons were present, the larger neurons were the main component of the ganglionic population in adult animals.

This behaviour does not restrict itself to the small intestine, as Phillips et al., (2003) obtained similar results analyzing the size of neurons in the large intestine of rats of 3 and 24 months of age. This occurrence is explained by the authors through the association of neuronal loss as a consequence of the stress that occurs with age, and they believed that the remaining neurons in older animals are able to compensate for the quantitative reduction, as greater functional demand is required from these neurons, which may reflect a state of cellular hypertrophy. Santer and Baker (1988) also analyzed the cellular profile of neurons of the large and small intestines of 6- and 24-month-old rats, confirming an increase in the cellular profile in the older rats.

Orr and Chen (2002) stated that the degenerative processes resulting from the advance of age might be compensated by the plasticity of the ENS, and that alterations such as a reduction in the number of neurons and dysfunctions in gastrointestinal motility appear only when the functional reserves of the neurons are exhausted.

Evidence of enteric neuronal plasticity, which is related to the great capacity of adaptive reorganization of the plexuses, has been given by various authors (Santer and Baker, 1988; Gabella, 1989; Gabella, 1990; Saffrey and Burnstock, 1994; Gavazzi and Cowen, 1996; Hanani et al., 2003), which also involves an adjustment of the ganglionic capsule, with an increase in the density of the elastic system fibers and collagen in elderly individuals (De Souza, 1993; Meciano Filho, 1995).

The interpretation of the results of this study permit the inference that, in the loss of neurons associated with aging, there was a predominance of the biggest neurons, as these will be the most apt for guaranteeing the maintenance of the intrinsic innervation in this condition, possibly by the greater capacity of synthesis (Giemsa) and transport (Myosin V).

5. Conclusions

Based on the methodology used, it is concluded that:

1. The factor of age is determinant in quantitative analyses of neuronal population, with there being a myenteric neuronal loss for Wistar rats from 210 days of age.

2. Young Wistar rats (21-60 days) present a neuronal population formed predominantly by small neurons.

3. The Giemsa technique revealed itself to be the most suitable for quantifying total neuronal populations.

6. Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Enilza Maria Espreafico (USP - Ribeirão Preto, Brazil) for supplying the Myosin V antibody, Maria Euride do Carmo Cancino and Maria dos Anjos Fortunato, Valdir Trombeli and José Antônio de Souza (UEM, Brazil) for their excellent technical support, and Peter Grimshaw for translating the text. We gratefully acknowledge CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) for financing this research.

7. References

- Barbosa, A.J.A., 1978. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. *Rev. Bras. Pesqui. Méd. Biol.* 11, 95-7.
- Bor-Seng-Shu, E., Chadi, G., Bor-Jiun-Shu, F., Ferraz de Carvalho, C. A., De Souza, R.R., 1994. Myenteric neurons of the mouse small intestine. Morphometry and acetylcholinesterase activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 101-108.
- Buttow, N.C., Miranda-Neto, M.H., Bazotte, R.B., 1997. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the duodenum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arq. Gastroenterol.* 34, 34-41.
- Buttow N.C., Zucoloto, S., Espreafico, E.M., Gama, P., Álvares, E.P., 2003. Substance P enhances neuronal area and epithelial cell proliferation after colon denervation in rats. *Dig. Dis. Sci.* 48, 2069-2076.
- De Giorgio, R., Guerrini, S., Barbara, G., Stanghellini, V., De Ponti, F., Corinaldesi, R., Moses, P.L., Sharkey, K.A., Mawe, G.M., 2004. Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system. *Gastroenterology.* 126, 1872-1883.
- De Souza, R.R., Moratelli, H.B., Borges, N., Liberti, E.A., 1993. Aged-induced nerve cells loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. *Gerontology.* 183-188.
- Dolatshad, N.F., Silva, A.T., Soubeyre, V., Hoyle, C.H.V., Cowen, T., Saffrey, M.J., 2001. Expression of the GDNF and its receptors in the ageing gut. *Soc. Neurosci. Abstr.* 27, 861-864.
- Drengk, A.C., Kajiwara, J.K., Garcia, V.S., Carmo, V.S., Larson, R.E., Zucoloto, S., Espreafico, E.M., 2000. Immunolocalisation of myosin-V in the enteric nervous system of the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 78, 109-112.

- Gabella, G., 1971. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J. Anat.* 109, 81-94.
- Gabella, G., 1972. Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J. Anat.* 111, 69-97.
- Gabella, G., 1987. Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract. In: Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 2nd edition. Raven Press, New York, pp. 335-381.
- Gabella, G., 1989. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. *Gastroenterology*. 96, 1487-1493.
- Gabella, G., 1990. On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 30, 59-66.
- Gavazzi, I., Cowen, T., 1996. Can the neurotrophic hypothesis explain degeneration and loss of plasticity in mature and ageing autonomic nerves? *Journal of the Autonomic Nervous System*. 58, 1-10.
- Gomes, O.A., Souza, R.R., Liberti, E.A., 1997. A preliminary investigation of the effects aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. *Gerontology*. 43, 210-217.
- Gurmini, J., Cecílio, W.A.C., Schuler, S.L., Olandoski, M., Noronha, L., 2005. Desnutrição intra-uterina e suas alterações no intestino delgado de ratos Wistar ao nascimento e após a lactação. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 41, 271-278.
- Hanani, M., Ledder, O., Yutkin, V., Abu-Dalu, R., Huang, T.Y., Hartig, W., Vannuchi, M.G., Faussone-Pellegrini, M.S., 2003. Regeneration of myenteric plexus in the mouse colon after experimental denervation with benzalkonium chloride. *J. Comp. Neurol.* 462, 315-327.

- Hasson, T., Mooseker, M.S., 1997. The growing family of myosin motors and their role in neurons and sensory cells. *Current Opinion in Neurobiology* 7, 615-623.
- Heinicke, E.A., Kiernan, J.A., Wijsman, J., 1987. Specific, selective, and complete staining of neurons of the myenteric plexus, using Cuproline blue. *Journal of Neuroscience Methods*. 21, 45-54.
- Hernandes, L., Zucoloto, S., Alvares, E.P., 2000. Effect of myenteric denervation on intestinal epithelium proliferation and migration of suckling and weanling rats. *Cell Prolif.* 33, 127-138.
- Horowitz, M., Maddern, G.J., Chatterton, B.E., Collins, P.J., Harding, P.E., Shearman, D.J., 1984. Changes in gastric emptying rates with age. *Clinical Science*. 67, 213-218.
- Hosoda, S., Bamba, T., Nakago, S., Fujiyama, Y., Senda, S., Hirata, M., 1992. Age-related changes in the gastrointestinal tract. *Nutrition Reviews*. 50, 374-377.
- Hounnou, G., Estrieux C., Desme, J., Bertrand, P., Velut, S., 2002. Anatomical study of the length of the human intestine. *Surg. Radiol. Anat.* 24, 290-294.
- Johnson, R.J.R., Schemann, M., Santer, R.M., Cowen, T., 1998. The effects of age on the overall population and on sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J. Anat.* 192, 479-488.
- Langford, G.M., Molyneaux, B.J., 1998. Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defects. *Brain Research Reviews* 28, 1-8.
- Liberti, E.A., Queiroz, L.M., Popeu, E., Perito, M.A.M., Minarelli, A.M., Moraes, J.O.R., De-Souza, R.R., 1994. A quantitative and comparative study of the ganglionic neurons in the myenteric and submucous plexuses of the small intestine and the intramural plexus of the gall bladder the guinea-pig. *Rev. Bras. Cienc. Morfol.* 11, 106-114.

- Lionne, C., Buss, F., Hodge, T., Ihrke, G., Kendrick-Jones, J., 2001. Localization of myosin Va is dependent on the cytoskeletal organization in the cell. *Biochem. Cell Bioll.* 29, 93-106.
- McLean, I.W., Nakane, P.K., 1974. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative, a new fixation for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1077-1083.
- Meciano Filho, J., Carvalho, V.C., De Souza, R.R., 1995. Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age: A preliminary investigations. *Gerontology.* 41, 18-21.
- Meilus, M., Natali, M.R.M., Miranda Neto, M.H., 1998. Study of the myenteric plexus of the ileum of rats subjected to proteic undernutrition. *Rev. Chil. Anat.* 16, 9-14.
- Miranda-Neto, M.H., Molinari, S.L., Natali, M.R.M., Sant'ana, D.M.G., 2001. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of the neuronal evidentiatio. *Arq. Neuropsiquiatr.* 59, 54-59.
- Mitchell, S.H., Ryndbergen, H.J., Anderson, L., Dibble, M.V., 1978. *Nutrição.* 16^a Edição. Interamericana, Rio de Janeiro. 1246 pp.
- Nascimento, A.A.C., Cheney, R.E., Tauhata, S.B.F., Larson, R.E., Mooseker, M.S., 1996. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. *J. Biol. Chem.* 271, 17561-17569.
- Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., 1996. Effect of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of the duodenum of rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 54, 273-279.
- Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., Orsi, A.M., 2000. Effects of hypoproteic diet supply on adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*). *Acta Scientiarum.* 22, 567-571.

- Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., Orsi, A.M., 2003. Morphometry and quantifications of the myenteric neurons of the duodenum of adult rats fed with hypoproteic chow. *Int. J. Morphol.* 21, 273-277.
- Natali, M.R.M., Molinari, S.L., Valentini, L.C., Miranda-Neto, M.H., 2005. Morphoquantitative evaluation of the duodenal myenteric neuronal population in rats fed with hypoproteic ration. *Biocell.* 29, 39-46.
- Orr, W.C., Chen, C.L., 2002. Aging and neural control of the GI tract IV. Clinical and physiological aspects of gastrointestinal motility and aging. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, 1226-1231.
- Phillips, R.J., Kieffer, E.J., Powley, T.L., 2003. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* 106, 69-83.
- Phillips, R.J., Powley, T.L., 2001. As the gut ages: timetables of aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. *J. Comp. Neurol.* 434, 358-377.
- Saffrey, M.J., Burnstock, G., 1994. Growth factors and the development and plasticity of the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System.* 49, 183-196.
- Santer, R.M., 1994. Survival of population of NADH-diaforase stained myenteric neurons in small intestine of aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 49, 115-121.
- Santer, R.M., Baker, D.M., 1988. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and intestine of adult and aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 25, 59-67.
- Schäfer, K.H., Hänsgen, A., Mestres, P., 1999. Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *The Anatomical Record.* 256, 20-28.

- Schoffen, J.P.F., Soares, A., Freitas, P., Buttow, N.C., Natali, M.R.M., 2005. Effects of a hypoproteic diet on myosin-V immunostained myenteric neurons and the proximal colon wall of aging rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 122, 77-83.
- Thrasivoulou, C., Ridha, H., Soubeyre, V., Hoyle, C.H.V., Saffrey, M.J., Cowen, T., 2000. Free radical buffering in rat enteric neurons: effects of age and neurotrophic factors. *Eur. J. Neurosci.* 12, 33.
- Torrejais, M.M., Natali, M.R.M., Conegero, C.I., Miranda Neto, M.H., 1995. Effects of proteic malnutrition after breast-feeding on the morphology of the intestinal wall and myenteric neurons of the ileum of rats. *Revista Unimar.* 17, 315-327.
- Wade, P.R., 2002. Aging and neural control of the GI tract. I Age-related changes in the enteric nervous system. *Am. J. Physiol.* 283, 489-495.
- Wade, P.R., Cowen, T., 2004. Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. *Neurogastroenterol. Motil.* 16, 19-23.
- Weaver, L.T., Desai, M., Austin, S., Arthur, H.M.L., Lucas, A., Hales, C.N., 1998. Effects of protein restriction in early life on growth and function of gastrointestinal tract of the rat. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 27, 553-559.
- Won, K-J., Suzuki, T., Hori, M., Ozaki, H., 2006. Motility disorder in experimentally obstructed intestine: relationship between muscularis inflammation and disruption of the ICC network. *Neurogastroenterol. Motil.* 18, 53-61.
- Young, H.M., Furness, J.B., Sewell, P., Burner, E.F., Kandiah, C.J., 1993. Total numbers of neurons in myenteric ganglia of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* 272, 197-200.
- Zanoni, J.N., Buttow, N.C., Bazotte, R.B., Miranda-Neto, M.H., 2003. Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the

ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid. *Auton. Neurosc. Bas. Clin.* 104, 32-38.

Table 1: Body weight (BW) (g), length of small intestine (LSI) (cm) and thickness of the external muscular tunica (EMT) (μm) of the duodenum of rats of different ages (n=10). The results are expressed as mean \pm standard deviation.

Animal age (days)	BW (g)	LSI (cm)	EMT (μm)
21	49.7 \pm 2.07 e	61.9 \pm 6.93 c	101.9 \pm 4.87 a
60	245.5 \pm 18.91 d	114.6 \pm 10.21 a	109.1 \pm 6.96 a
90	389.2 \pm 26.25 c	118.9 \pm 11.29 a	99.8 \pm 34.22 a
210	447.0 \pm 45.82 ab	121.2 \pm 6.12 a	86.3 \pm 21.43 a
345	463.7 \pm 25.38 b	103.3 \pm 18.84 b	118.0 \pm 30.90 a
428	521.1 \pm 65.80 a	94.3 \pm 16.17 b	119.3 \pm 21.06 a

Means followed by letters in the same column indicate statistically significant differences. Tukey test ($p < 0.05$).

Table 2: Neuronal quantification by the Giemsa non-histochemical and the Myosin V immunohistochemical techniques (n=10) in an area of 14.832 mm² of the duodenum of rats, and values converted into cm². The results are expressed as mean ± standard deviation.

Animal age (days)	GIEMSA		MYOSIN V	
	Mean N° of neurons (14.832 mm ²)	Neuronal Density (cm ²)	Mean N° of neurons (14.832 mm ²)	Neuronal Density (cm ²)
21	13,250 ± 1,362 a A	89,335	8,805 ± 587.2 a B	59,364
60	7,092 ± 1,069 b A	47,814	4,537 ± 223.2 b B	30,291
90	6,064 ± 931.5 b A	40,885	4,303 ± 220.4 b B	29,010
210	4,474 ± 341.2 c A	30,164	3,359 ± 288.0 c B	22,646
345	3,418 ± 91.2 c A	23,046	2,447 ± 96.2 d B	16,499
428	1,935 ± 173.3 d A	13,047	1,526 ± 115.4 e B	10,287

Means followed by small letters in the same column indicate statistically significant differences. Tukey test (p<0.05). Means followed by capital letters in the same line indicate statistically significant differences. Student's *t* test (p<0.05).

Table 3: Area of the cellular profile (μm^2) by the Giemsa non-histochemical and the Myosin V immunohistochemical techniques (n=10). The results are expressed as mean \pm standard deviation.

Animal age (days)	GIEMSA	MYOSIN V
21	142.9 \pm 6.37 c A	151.3 \pm 15.87 c A
60	219.0 \pm 9.23 b A	225.6 \pm 19.32 b A
90	247.3 \pm 19.16 ab A	244.5 \pm 17.67 b A
210	232.1 \pm 14.61 ab A	261.3 \pm 25.11 ab A
345	237.6 \pm 20.25 ab A	238.3 \pm 21.89 b A
428	254.0 \pm 21.14 a A	295.3 \pm 37.87 a A

Means followed by small letters in the same column indicate statistically significant differences. Tukey test ($p < 0.05$). Means followed by capital letters in the same line indicate statistically significant differences. Student's t test ($p < 0.05$).

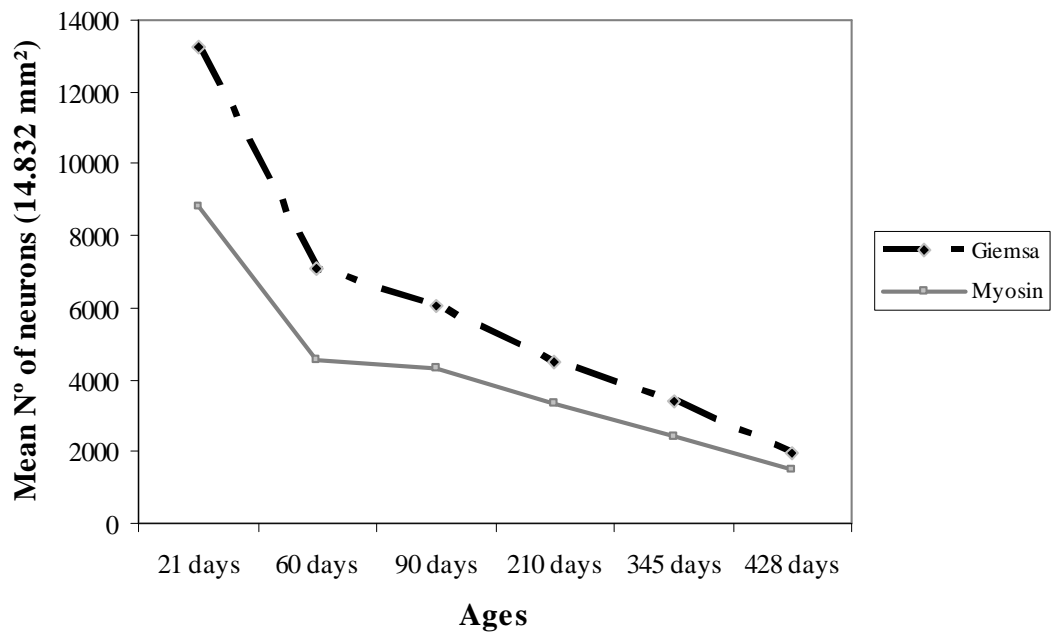


Fig. 1: Mean number of neurons quantified by the Giemsa non-histochemical and Myosin V immunohistochemical techniques in an area of 14.832 mm² of the duodenum of rats (n=10).

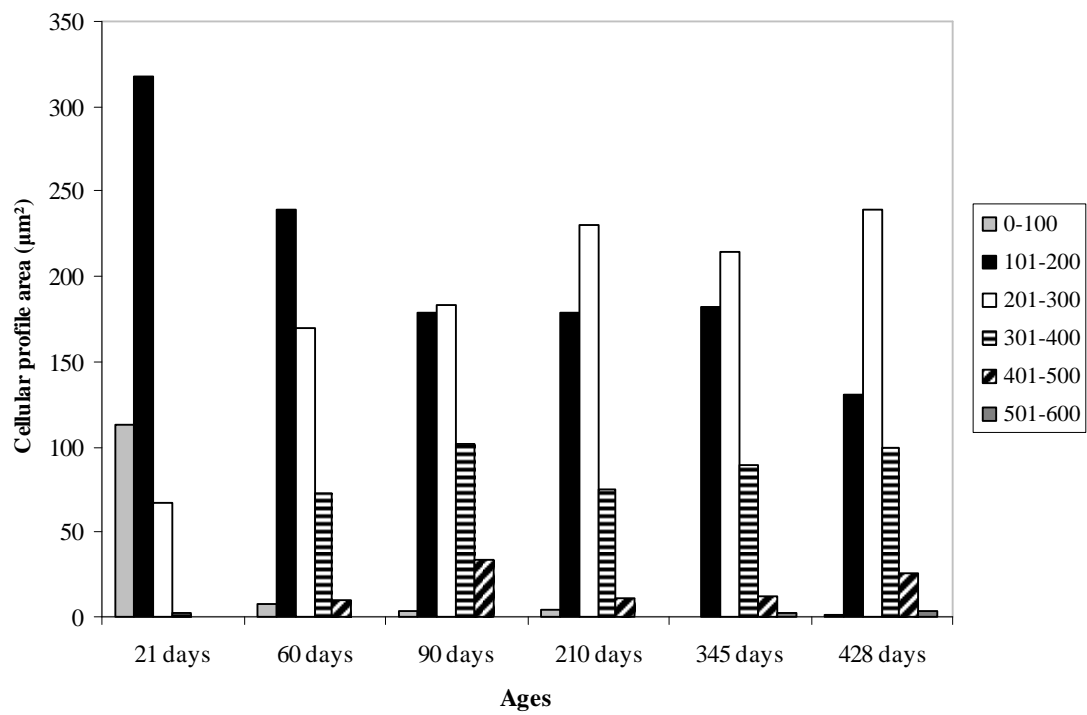


Fig. 2: Distribution of the myenteric neurons by cellular profile area, evidenced by the Giemsa non-histochemical technique, in intervals of classes of 100 μm^2 .

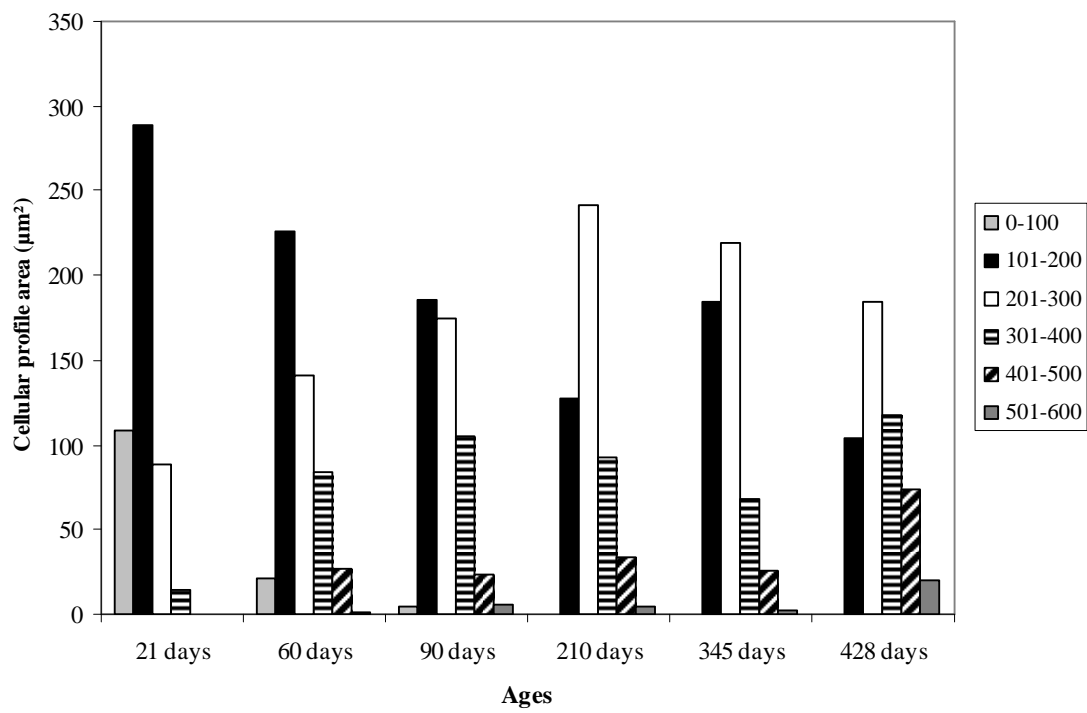


Fig. 3: Distribution of the myenteric neurons by cellular profile area, evidenced by the Myosin V immunohistochemical technique, in intervals of classes of 100 μm^2 .

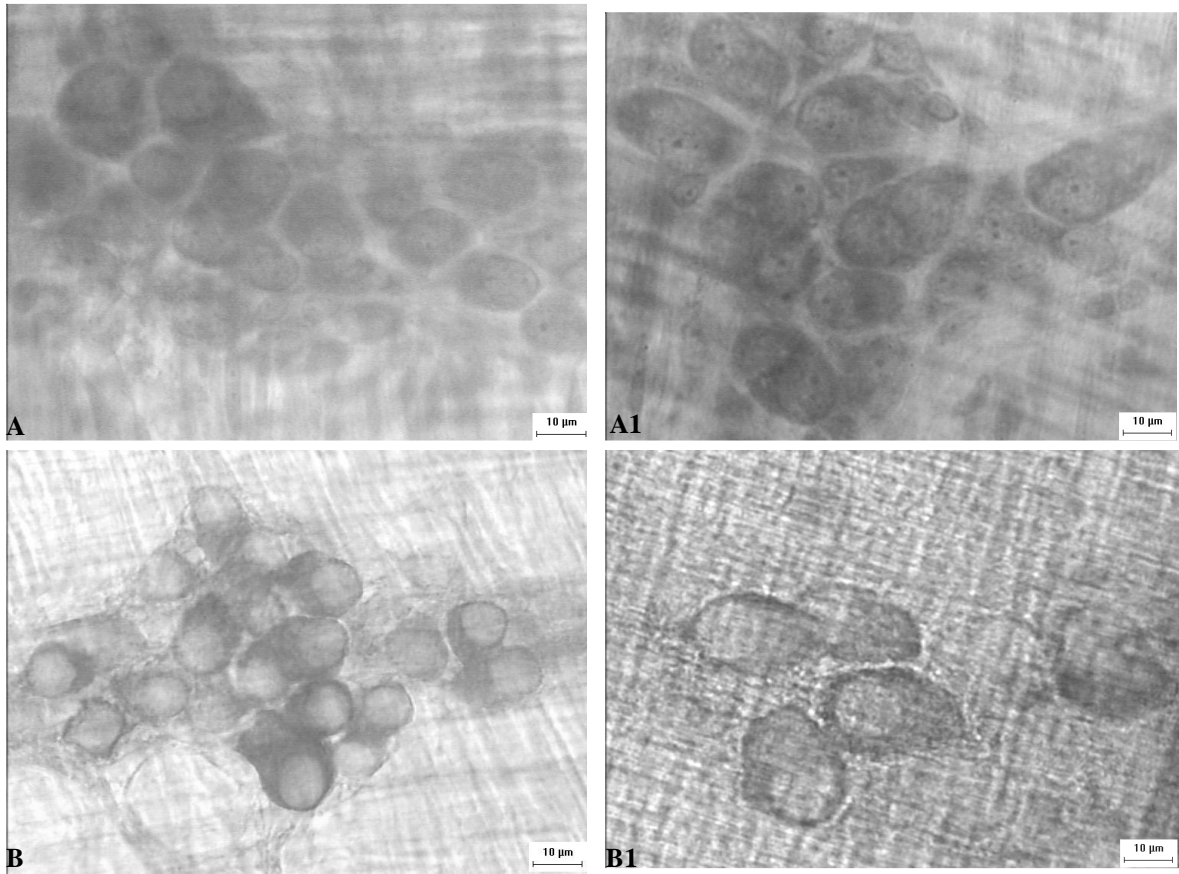


Fig. 4: Myenteric neurons of the duodenum evidenced by the Giemsa (A) and Myosin V (B) techniques. 21-day-old rats (A and B) and 428-day-old rats (A1 and B1).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)