

RENATA DE BRITTO MARI

**Efeitos do exercício sobre o envelhecimento dos neurônios
mioentéricos do duodeno de ratos Wistar**

SÃO PAULO

2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

RENATA DE BRITTO MARI

**Efeitos do exercício sobre o envelhecimento dos neurônios
mioentéricos do duodeno de ratos Wistar**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza

SÃO PAULO

2006

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1784
FMVZ

Mari, Renata de Britto
Efeitos do exercício sobre o envelhecimento dos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos Wistar / Renata de Britto Mari. – São Paulo: R. B. Mari, 2006.
103 f. : il.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador: Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza.

1. Atividade física. 2. Envelhecimento. 3. Plexo mioentérico. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

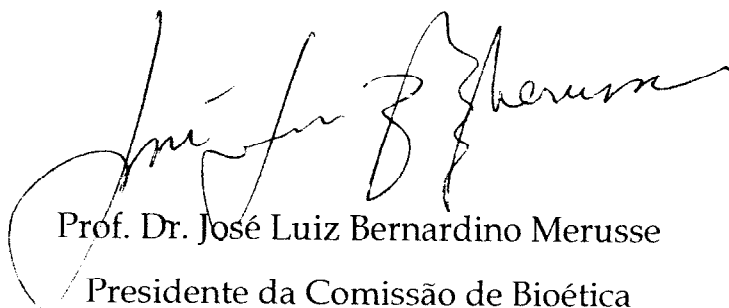
PARECER

Interessado: Renata de Britto Mari

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 734/2005, intitulado: "Efeitos do exercício sobre o envelhecimento dos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos Wistar", utilizando 45 cadáveres de ratos Wistar, (utilização do material do projeto nº 416/04), sob responsabilidade do Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza (ICB/USP), constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 13 de setembro de 2006



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

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARI, Renata de Britto

Título: Efeitos do exercício sobre o envelhecimento dos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos Wistar

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*Obrigada, Senhor,
pelas oportunidades e sabedoria,
pela presença do Espírito Santo em minha vida, por me tomar pela mão e me ensinar
a confiança e a coragem.*

*Obrigada, Senhor,
por me revelar que a compaixão é a chave da compreensão, por me ensinar
que ternura é o sabor de me relacionar com os outros.*

*Obrigada, Senhor,
por me fazer crer, por me amar de forma tão respeitosa, pela esperança
que é a força para continuar perseverando.*

*Obrigada, Senhor,
por ensinar-me acolher a pessoa em sua riqueza pessoal e original,
por ensinar-me a escutar e acolher a dor e a esperança de cada um,
caminhar lado a lado, olhando para o mesmo horizonte.*

*Obrigada, Senhor,
pela esperança que sinto tomar conta de meu coração,
pela presença contínua em minha vida a fim de que meu caminho
seja seguro e sereno.*

*Obrigada, Senhor,
pela vida e poder vivê-la em plenitude, por existir pessoas que apostam na vida e
conseguem sonhar com um mundo mais digno e justo.*

*Obrigada, Senhor,
pelo caminho percorrido, pelo tempo,
pelas pessoas que apostaram no meu crescimento, pelas dificuldades superadas e os
desafios que virão, pelos momentos incertos que me fizeram confiar mais em Ti.*

Amém!

*Aos meus pais Hélio Mari e Sirlei de Fátima Britto
Mari, pelo amor e confiança que sempre depositaram
em mim, dedico este trabalho. Agradeço, pois mesmo
em meio às dificuldades, vocês nunca mediram
esforços para me ajudar e sempre caminharam junto
comigo, acreditaram nos meus sonhos e me apoiaram.
Não existem palavras que expressem o quanto sou
grata por tudo que vocês fizeram e fazem por mim,*

*Posso apenas dizer que
AMO MUITO VOCÊS!*

*Aos meus familiares em especial ao
meu irmão **Fernando de Britto Mari**,
agradeço pelo carinho, ajuda e
incentivo em todos os momentos da
minha vida, em especial nestes últimos
anos em que estive longe.*

MUITO OBRIGADA!

*Ao Prof. Romeu Rodrigues de Souza, pela
orientação, respeito, ensinamentos e
principalmente pela confiança depositada.*

MUITO OBRIGADA!

*A Profa. Sandra Regina Stabile, que me
"adotou" desde a graduação e até hoje
muito tem me ajudado, não apenas como
orientadora, mas sim como amiga. Muito
obrigada por tudo, você é uma pessoa
muito especial para mim!*

TE ADORO!

*As minhas **GRANDES** amigas*

***Janaína Munuera Monteiro** ("Janinha"),*

***Juliana Plácido Guimarães** ("Juca"), **Karina Martines Gagliardo** ("Kaká"),*

***Priscilla Teixeira de Barros Moraes** ("Prica") e **Naianne Kelly Clebis** ("Nay").*

Pessoas tão diferentes e ao mesmo tempo muito especiais...

Meninas, muito obrigada por todo apoio que sempre me deram, por estarem sempre

ao meu lado me ajudando de forma incondicional

e principalmente pela amizade de vocês!

Vocês são muito importantes para mim, amigas para vida toda!

EU ADORO MUITO VOCÊS!

Amigos são irmãos que a vida nos deu de presente, para caminhar conosco ao longo da nossa jornada espiritual, extrapolando os limites do tempo, continuando quando e onde Deus assim o permitir.

(S. Bernardelli)

AGRADECIMENTOS

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

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo apoio financeiro (Processo 04/11179-2).

À Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, pela oportunidade concedida para a realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Francisco J. H. Blasquez pelos ensinamentos e pela ajuda na elaboração desta tese. Muito Obrigada!

A Naianne Kelly Clebis e Karina Martinez Gagliardo, pelo tempo dedicado a este experimento e material cedido para realização desta pesquisa.

Ao técnico Diogo Palermo pela ajuda nas fases iniciais do experimento. Obrigada!

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia, área de concentração em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Maicon Barbosa da Silva, Jaqueline Martins Santana, Ronaldo Agostinho da Silva e Edinaldo Ribas Farias, por toda ajuda prestada.

Ao Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá por ter disponibilizado o laboratório para realização de parte desta pesquisa.

Aos Profs. Paula de Carvalho Pappa, Pedro Primo Bombonato, José Roberto Kfoury Júnior, Sônia Lucy Molinari, pelos ensinamentos.

A Iracema Clebis, Wilkerson Clebis, Sandra Regina Matinez Gagliardo, Irena Fateeva, Sueli Plácido Guimarães, Claudemiro Guimarães Neto, Priscila Plácido Guimarães, Cláudia Teixeira de Barros Moraes, agradeço pelo carinho que dedicaram a mim.

A minha amiga Inês Ajita e as minhas "meninas" Camilla Ariane Ajita Picironi e Cláudia Aline Ajita Picironi, pelo carinho e apoio que vocês me deram mesmo de longe! Vocês são muito especiais para mim, adoro vocês!

A todos os meus amigos "maringaenses", em especial ao Armando Barrozo da Silva, Francisco Burali Rosa, Fernanda de Araújo Quevedo ("Fer"), Carla Possani Cirilo e Daniela Gasparini ("Dani"), que mesmo distantes estiveram torcendo por mim. Muito Obrigada!

Aos Amigos Ana Paula Vidotti ("Vi"), Patrícia Orlandini Gonçalves ("Paty"), Carlos Eduardo Bezerra de Moura ("Cadu"), Rosemary Viola Bosch ("Rosoca"), Gisele Salviani ("Gi"), Camila Ercolini Barrozo ("Ka"), Ana Rita Lima, Renata Stecca, Gerlaine de Medeiros Costa, Fernanda Rodrigues Agreste ("Fê"), Arlei José Birck, Haley Silva de Carvalho, Franklin Spíndola, Hildebrando Benedicto ("Hill"), Carlos Eduardo Seyfert, Silvio Pires Gomes, Elizangela dos Anjos Silva, Joel Alves de Souza, pela amizade. Adoro todos vocês!

A todos os colegas de pós-graduação do curso de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pelo companheirismo.

*Sem sonhos, as pedras se tornam insuportáveis,
as pedras no caminho se tornam montanhas,
os fracassos se transformam em golpes fatais.*

*Mas, se você tiver grandes sonhos...
seus erros produzirão crescimento,
seus desafios produzirão oportunidades,
seus medos produzirão coragem.*

*Por isso, **NUNCA DESISTA DE SEUS SONHOS!***

(Augusto Cury)

RESUMO

MARI, R. B. **Efeitos do exercício sobre o envelhecimento dos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos Wistar.** [Effects of the exercise on the ageing of the myenteric neurons in the duodenum of Wistar rats]. 2006. 103 f. Tese (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Com o envelhecimento há aumento da incidência de problemas gastrointestinais relacionados com a motilidade intestinal. A atividade física pode promover mudanças funcionais significantes, atuando como minimizadora dos efeitos deletérios do processo de envelhecimento. O controle das funções gastrointestinais é feito pelo sistema nervoso entérico composto por um conjunto de neurônios intramurais, entretanto, nada se sabe sobre os efeitos da atividade física regular sobre o envelhecimento dos neurônios mioentéricos. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo analisar as alterações quantitativas e morfométricas causadas pelo envelhecimento e pela atividade física nos neurônios mioentéricos NADH e NADPH-diaforase positivos do duodeno de ratos de meia idade. E ainda verificar em microscopia de luz e eletrônica de transmissão as possíveis alterações na morfologia e ultraestrutura do plexo, e na espessura da túnica muscular. Para tanto, foram utilizados 45 ratos Wistar distribuídos em três grupos: C (seis meses de idade sedentário), S (doze meses de idade sedentário) e T (doze meses de idade submetidos à atividade física). Os animais do grupo T realizaram atividade física cinco vezes por semana, durante seis meses. Nenhuma alteração morfológica foi encontrada entre os grupos, entretanto verificou-se a membrana basal mais bem delineada e fibras colágenas mais agrupadas nos gânglios dos animais dos grupos C e T em relação aos animais do grupo S. Na análise

quantitativa observou-se diminuição dos neurônios NADPH-diaforase positivos com o envelhecimento e com a prática de atividade física. Os neurônios NADH-diaforase positivos diminuíram com o envelhecimento, porém aumentaram com a atividade física ($P>0,05$). Nenhuma alteração significativa ($P>0,05$) foi verificada na área do perfil neuronal dos neurônios NADPH e NADH-diaforase positivos com o envelhecimento. Em relação à atividade física, observou-se, somente nos neurônios NADPH-diaforase positivos, diminuição significativa na área do perfil celular. Nenhuma alteração significativa ($P>0,05$) foi constatada na espessura da camada muscular do duodeno.

Palavras-chave: Plexo mioentérico. Envelhecimento. Atividade física.

ABSTRACT

MARI, R. B. **Effects of the exercise on the ageing of the myenteric neurons in the duodenum of Wistar rats.** [Efeitos do exercício sobre o envelhecimento dos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos Wistar]. 2006. 103 f. Tese (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

With ageing, there is an increase in the incidence of gastrointestinal problems related to intestinal motility. Physical activity may promote significant functional alterations, acting to minimize the deleterious effects of the ageing process. The control of gastrointestinal functions is carried out by the enteric nervous system, composed of a network of intramural neurons. However, nothing is known about the effects of regular physical activity on the ageing of myenteric neurons. Therefore, the object of this study was to analyze the quantitative and morphological alterations caused by ageing and physical activity on the NADH and NADPH-diaphorase positive myenteric neurons in the duodenum of middle-aged rats and, furthermore, to verify, through light and transmission electron microscopy, any alterations in the morphology and ultrastructure of the plexus and the thickness of the muscular tunica. To this end, 45 Wistar rats were divided into three groups: group C (six months old – sedentary), group S (twelve months old – sedentary) and group T (twelve months old – submitted to physical activity). The animals of group T underwent physical activity five times a week for six months. No morphological alteration was found among the groups. However, it was found that the basal membrane had a stronger outline and collagen fibers were more grouped in the ganglia of the animals of groups C and T, compared to those of group S. In the quantitative analysis, a reduction in NADPH-diaphorase positive neurons with ageing and with the practice of physical exercise was observed. There was also a decrease in

NADH-diaphorase positive neurons with ageing, although there was a slight increase with physical activity ($P>0.05$). No significant alteration was observed in the area of the neuronal profiles of the NADPH and NADH-diaphorase positive neurons with ageing ($P>0.05$). With regards to physical activity, a significant reduction in cellular profile area was only found in the NADPH-diaphorase positive neurons. No significant alteration was found in the thickness of the muscular layer of the duodenum ($P>0.05$).

Key words: Myenteric plexus, ageing, physical activity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	24
3 REVISÃO DE LITERATURA	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAL.....	37
4.2 MÉTODOS.....	38
4.2.1 Protocolo Experimental	38
4.2.2 Eutanásia dos Animais	41
4.2.3 Processamento do Material para Análise Microscópica (Microscopia de Luz e Eletrônica de Transmissão)	41
4.2.3.1 Microscopia de Luz	42
4.2.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão	43
4.2.4 Espessura da Túnica Muscular	44
4.2.5 Técnica Histoquímica de NADPH-diaforase (SCHERER-SINGLER et al., 1983)	45
4.2.6 Técnica Histoquímica de NADH-diaforase (GABELLA, 1969)	45
4.2.7 Obtenção dos Preparados de Membrana	46
4.2.8 Fator de Correção	47
4.2.9 Quantificação Neuronal	47
4.2.9.1 Densidade Neuronal	48
4.2.9.2 Estimativa do número total de neurônios	49
4.2.10 Análise Morfométrica	49
4.2.11 Análise Estatística	50
5 RESULTADOS	52
5.1 ATIVIDADE FÍSICA.....	52
5.2 PESO CORPÓREO.....	53
5.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO PLEXO MIOENTÉRICO	55
5.4 ESPESSURA DA TÚNICA MUSCULAR	64
5.5 ÁREA DA SUPERFÍCIE INTESTINAL	65

5.6 QUANTIFICAÇÃO NEURONAL	66
5.6.1 Densidade Neuronal	67
5.6.2 Estimativa do Número Total de Neurônios	70
5.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	72
6 DISCUSSÃO	78
6.1 ATIVIDADE FÍSICA	78
6.2 PESO CORPÓREO	80
6.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO PLEXO MIOENTÉRICO	81
6.4. ESPESSURA DA TÚNICA MUSCULAR.....	86
6.5 ANÁLISE QUANTITATIVA E MORFOMÉTRICA DO PLEXO MIOENTÉRICO.	87
7 CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS	97

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a ONU (Organização das Nações Unidas) a expectativa da média de vida da população mundial ao nascer aumentou de 46,5 anos (1950-1955) para 65 anos (1995-2000). Esse crescimento gerou o aumento populacional de oito milhões de pessoas idosas por ano. Estima-se que em 2050 a população idosa seja de 1.900 milhões, montante equivalente à população infantil atual de zero a 14 anos (IBGE, 2000).

No Brasil, de acordo com os dados do último censo demográfico realizado em 2000, os idosos já representam 8,6% da população total (IBGE, 2000).

O envelhecimento é um processo lento, progressivo e inevitável caracterizado pela diminuição de adaptação ao meio externo e, principalmente, da atividade funcional que leva a alterações nos diferentes tecidos corpóreos, acumulando-se processos degenerativos com o passar dos anos (OLIVEIRA; FURTADO, 1999). Porém, vários fatores podem influir nesse processo acelerando-o ou, então, como no caso da prática regular de exercícios físicos, minimizando-o.

É sabido que a atividade física, quando realizada regularmente, por um longo período, pode promover alterações fisiológicas benéficas em relação ao envelhecimento, em diversos tecidos e órgãos, como os dos sistemas circulatório e respiratório. No trato gastrointestinal, entretanto, poucos são os relatos da influência da atividade física relacionados ao envelhecimento.

No trato gastrointestinal (TGI) dos seres humanos, o processo de envelhecimento pode acarretar o aumento na incidência de problemas como a diminuição na motilidade esofágica (HOLLINS; CASTELL, 1974; SOERTEL et al.,

1964) e colônica (BUTT et al., 1993; MADSEN, 1992), retardo do esvaziamento gástrico (BROGNA et al., 1999; CLARKSTON et al., 1996; HOROWITZ et al., 1984; SMITS; LEFEBVRE, 1996) e aumento no trânsito intestinal (ANURAS; LEONING-BAUCKE, 1984; BROCKLEHURST, 1985; MCDOUGLAS et al., 1984).

No rato são descritas alterações semelhantes, dentre as quais, o retardo no esvaziamento gástrico (SMITS; LEFEBVRE, 1996), o aumento no trânsito intestinal (McDOUGLAS, 1984) e a diminuição da produção fecal (SMITS; LEFEBVRE, 1996).

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

Para controle da motilidade, da secreção e do fluxo sanguíneo, há uma rede nervosa ao longo de todo tubo digestório representada pelo sistema nervoso entérico (GABELLA, 1979; GRUNDY; SCHEMANN, 2005; SCHEMANN; NEUNLIST, 2004). Alterações nesta rede, representadas por mudanças morfológicas e quantitativas dos neurônios, comprometem a função desse sistema. Assim, por exemplo, durante o envelhecimento foi verificada significativa diminuição da densidade neuronal nas diferentes regiões do TGI em diversas espécies animais (EL-SALLY et al., 1999; GABELLA, 1989; GOMES et al., 1997; PHILLIPS; POWLEY, 2001; SANTER; BAKER, 1998; SOUZA et al., 1993).

Embora sejam escassos os relatos sobre a influência da atividade física sobre segmentos específicos do TGI, como o duodeno, recentes estudos têm demonstrado

que a atividade física minimiza os distúrbios gastrointestinais (PETERS et al., 2001). A literatura mostra que o envelhecimento dos neurônios de várias regiões do sistema nervoso entérico é influenciado pela atividade física. Assim, por exemplo, no sistema nervoso autônomo verificou-se diminuição da atividade simpática (KRIEGER et al., 1999; LIU et al., 2002) e aumento do tônus parassimpático (FOX et al., 1991; KRIEGER et al., 1999; LIU et al., 2002). Estes efeitos também foram observados no sistema nervoso central, ocorrendo aumento do número de células nervosas (neurogênese) no hipocampo (VAN PRAAG et al., 1999).

Entretanto, nada se sabe sobre os efeitos da atividade física, durante o processo de envelhecimento, sobre os gânglios e neurônios mioentéricos do duodeno. Desta maneira, estudos quantitativos e morfométricos dos neurônios do plexo mioentérico de ratos submetidos a programa de atividade física, poderiam esclarecer se a atividade física regular, iniciada na idade adulta, tem efeito nos neurônios do plexo mioentérico.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Visando contribuir para o esclarecimento das alterações causadas pelo envelhecimento inicial nos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos e os efeitos de exercício físico sobre estas alterações, o presente trabalho teve como objetivo analisar em ratos sedentários e praticantes de atividade física durante o envelhecimento os seguintes parâmetros:

- morfologia dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase e NADPH-diaforase positivos por meio de preparados de membrana;
- ultraestrutura do plexo mioentérico;
- espessura da túnica muscular intestinal;
- número e área do perfil celular dos neurônios NADH-diaforase e NADPH-diaforase positivos.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

O intestino delgado é a porção do tubo digestório onde ocorrem os processos finais da digestão iniciada na boca e no estômago e é o principal sítio da absorção dos produtos digeridos (HEATH; YOUNG, 2001). Suas três porções, duodeno, jejuno e íleo mantêm uma estrutura básica comum ao longo de toda sua extensão. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

A parede do intestino delgado é constituída pela sobreposição de camadas ou túnicas de diferentes tecidos. A túnica mais interna, a túnica mucosa, é constituída por epitélio colunar prismático, uma lâmina própria de sustentação e uma camada delgada de músculo liso denominada muscular da mucosa, que produz movimento local e permite o pregueamento da mucosa. Esta se apresenta toda pregueada, formando vilos que se projetam para a luz do tubo. As vilosidades do duodeno tendem a serem mais longas, estendendo-se até a muscular da mucosa, de maneira que se tornam mais curtas à medida que se aproximam do íleo (HEATH; YOUNG, 2001).

Sobre a mucosa está tela submucosa constituída por tecido conjuntivo frouxo, contendo vasos sanguíneos e linfáticos, bem como nervos que suprem à mucosa. Na porção inicial do duodeno, a submucosa apresenta acúmulo de glândulas, cujo produto de secreção é alcalino e protege a mucosa duodenal contra a acidez do suco gástrico, além de manter o pH ideal para ação das enzimas pancreáticas que atuam na digestão (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). Distribuídos por toda a submucosa encontram-se gânglios nervosos que constituem o plexo submucoso ou de Meissner (GABELLA, 1979; WADE, 2002).

A terceira camada é a túnica muscular do intestino delgado constituída por um estrato interno circular e um estrato externo longitudinal. Entre os dois estratos encontra-se outro conjunto de células nervosas, o plexo mioentérico ou de Auerbach (GABELLA, 1979).

Por fim, encontra-se a última túnica que é a serosa constituída por uma delgada camada de tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos e tecido adiposo, revestida externamente por mesotélio (HEATH; YOUNG, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

A motilidade do intestino delgado ocorre em duas fases distintas: uma durante o período absorptivo iniciado após a ingestão do alimento, e outra durante o período interdigestivo quando pouco alimento está presente no intestino. Durante a digestão, há dois padrões de motilidade primária: o propulsivo e o não-propulsivo (CUNNINGHAM, 1993).

O padrão não-propulsivo é conhecido como segmentação, que resulta de contrações localizadas da musculatura circular, promovendo o retardo do movimento aboral de material, devido ao fechamento do lume intestinal nos segmentos constrictos. A atividade propulsora durante a digestão consiste em contrações peristálticas que migram para trás no intestino em fase com ondas lentas e curtas, de maneira que junto ao movimento de segmentação promova a atividade de mistura do quimo, para facilitar a digestão e absorção.

A fase interdigestiva da motilidade do intestino delgado caracteriza-se por ondas de contrações peristálticas vigorosas, que percorrem grande extensão do intestino delgado. Estas ondas começam no duodeno e migram para diante por todo intestino, empurrando o material não digerido para fora do intestino.

O estiramento da parede intestinal tem como resposta contrações do músculo liso. Normalmente a peristalse ocorre numa lentidão suficiente para permitir a absorção de nutrientes. As contrações musculares rapidamente propagadas podem percorrer todo o intestino. A diminuição resultante no tempo do transporte pode provocar diarreia, absorção deficiente ou má-digestão.

Embora as contrações peristálticas ocorram independentemente de inervação extrínseca, a inervação intrínseca (plexos submucoso e mioentérico) deve estar intacta. Os plexos submucoso e mioentérico constituem parte do sistema nervoso entérico. A inervação extrínseca influencia a força e frequência da atividade intestinal intrínseca. A estimulação parassimpática aumenta a atividade da musculatura lisa do intestino, enquanto que a estimulação simpática diminui ou inibe completamente a atividade (BANKS, 1992).

Na verdade, a regulação nervosa do TGI é um mecanismo bastante complexo, mediado pelo sistema nervoso entérico o qual, por muito tempo, foi encarado como a porção pós-ganglionar da divisão parassimpática do sistema nervoso autônomo. Atualmente, é conhecido como uma divisão autonômica própria, juntamente com o sistema simpático e parassimpático (POWLEY, 1999) e apresenta-se formando dois grandes plexos: plexo submucoso ou de Meissner e mioentérico ou de Auerbach. (GABELLA, 1979; 1987).

Acredita-se que, embriologicamente, os neurônios do sistema nervoso entérico têm origem, principalmente, de células da crista neural. Estas células localizadas no segmento vagal migram para a porção cranial do TGI, e desta para todo o canal alimentar (FURNESS; COSTA, 1987; GABELLA, 1990). Porém, é importante ressaltar que nem todas as células derivadas da crista neural que colonizam o tubo digestório formam neurônios. Certamente, algumas originam as

células da glia (FURLAN, 2000). Mesmo depois de colonizarem o todo digestório, as células nervosas entéricas continuam sofrendo modificações numéricas e morfológicas (GABELLA, 1971).

O sistema nervoso entérico é conhecido há longo tempo e desde então, os pesquisadores realizaram importantes descobertas sobre esse sistema. Georg Meissner (1829-1903) e Leopold Auerbach (1828-1897) descreveram pela primeira vez a existência dos plexos ganglionados do sistema nervoso entérico, na tela submucosa e entre as camadas musculares do intestino, respectivamente. Mais tarde, Alexander Dogiel (1852-1922) reconheceu e classificou morfológicamente os neurônios entéricos e propôs que as variações na forma dos neurônios indicavam diferenças funcionais (FURNESS, 2000).

De modo mais amplo, o sistema nervoso entérico é formado por um conjunto de neurônios e células de suportes encontrados na espessura da parede do TGI e da vesícula biliar e no pâncreas (FURNES, 2000), formando plexos ganglionados ou não, relativamente independentes do sistema nervoso central, e que agem coordenando funções complexas (FURNESS; COSTA, 1987; HANSEN, 2003). Ao que parece, os neurônios mioentéricos estão relacionados com o controle da motilidade e os neurônios submucosos seriam responsáveis pelo controle da secreção glandular e do fluxo sanguíneo na parede do TGI (GUYTON; HALL, 2002). Por meio das interconexões com o restante do sistema nervoso autônomo, o sistema nervoso entérico permite que a função digestiva se integre harmoniosamente com as demais funções do organismo.

A independência do sistema nervoso entérico em relação ao sistema nervoso central é relativa, pois os neurônios motores finais do sistema nervoso autônomo pertinentes a inervação do TGI localizam-se também no interior dos gânglios

entéricos, juntamente com aqueles do plexo mioentéricos (COSTA; SIMON; BROOKS, 1994; FURNESS; COSTA, 1987).

O plexo mioentérico está localizado entre os estratos circular e longitudinal da túnica muscular (BROOKES, 2001; GABELLA, 1979; 1987). Pode ser dividido em plexo primário, secundário e terciário. O primário é formado por gânglios interconectados por fibras nervosas e dispostos de forma transversal e longitudinal a musculatura do TGI. O secundário é constituído por delgadas fibras nervosas que comunicam os troncos primários entre si. O plexo terciário é composto por pequenos ramos que ocupam espaços entre o plexo primário (HANSEN, 2002; SANTER; BAKER, 1993;).

Enquanto o plexo mioentérico estende-se desde o esôfago até o canal anal, o plexo submucoso é encontrado apenas na submucosa dos intestinos delgado e grosso (HANEN, 2003). Além disso, o plexo mioentérico apresenta maior densidade neuronal que o plexo submucoso, assim como, um maior número de gânglios (FURNESS, 2000; GABELLA, 1995; HANSEN, 2002).

Em mamíferos, os neurônios situam-se em sua maior parte em formações ganglionares. Entretanto neurônios isolados também são encontrados (GABELLA, 1987), e são mais comuns no jejuno-íleo que no duodeno e em animais mais velhos (FURLAN, 2000).

Os gânglios do plexo mioentérico são revestidos externamente por uma lâmina basal e por tecido conjuntivo (GABELLA, 1990). Fibras colágenas e fibroblastos são encontrados no espaço periganglionar e não penetram no interior do gânglio (GABELLA, 1995).

Segundo Gabella (1990), ao longo do TGI, diferentes densidades neuronais podem ser encontradas, sendo que o duodeno apresenta maior densidade neuronal

que o íleo e o colo uma densidade maior que o intestino delgado. Em geral, a densidade neuronal é maior nas espécies com dimensões corporais menores do que nas grandes.

Os plexos entéricos formam circuitos neuronais, com neurônios heterogêneos no que diz respeito a sua morfologia, a produção de neurotransmissores e a sua atuação no TGI (SAFFREY, 2004). O tamanho, a forma, a disposição e o número dos neurônios variam muito entre os plexos mioentérico e submucoso, dentro do mesmo plexo nas diferentes partes do TGI, assim como, entre as diferentes espécies animais (FURNESS; COSTA, 1980; GABELLA, 1979; 1990).

A primeira classificação morfológica dos neurônios mioentéricos foi elaborada por Dogiel, no final do século XIX, que organizou os neurônios em três grupos: neurônios do tipo I, que apresentam corpo celular achatado, um axônio irregular e longo e numerosos dendritos curtos na base do pericário e do axônio; neurônios do tipo II, com corpo celular liso e oval, contendo somente um processo celular longo; e neurônios do tipo III com corpo celular oval ou retangular, axônio longo e dendritos irregulares pequenos e numerosos. (STERNINI, 1988; WOOD, 1994).

De maneira geral, os neurônios entéricos podem ser classificados em: a) neurônios sensitivos que monitoram fatores como a tensão da parede do intestino; b) interneurônios que interligam as informações entre os neurônios entéricos; e c) neurônios motores que regulam a atividade intestinal como a contração muscular, a dilatação de vasos ou o transporte de água e eletrólitos (FURNESS; COSTA, 1987; HANSEN, 2002).

Os neurônios entéricos podem ser tipificados também como motores excitatórios e inibitórios para a musculatura lisa da parede gastrointestinal, secretórios-motores para o controle na mucosa da função de secreção e absorção e

vasomotores relacionados com a musculatura lisa dos vasos sanguíneos e controle do seu fluxo (COSTA; SIMON; BROOKS, 1994; FURNESS; COSTA, 1987; STERNINI, 1988).

Com o desenvolvimento das técnicas empregadas no estudo do sistema nervoso entérico, incluindo a microscopia eletrônica e de luz, histoquímica, imunohistoquímica, outras classificações surgiram. Tais estudos têm identificado uma série de neurônios. Furness (2000) descreveu 17 tipos diferentes de neurônios, sendo que destes, apenas 14 tipos foram identificados no intestino delgado.

O plexo mioentérico é o mais evidente plexo ganglionado do sistema nervoso entérico. Devido a sua acessibilidade, as investigações sobre sua estrutura e função, usando os mais diferentes tipos de abordagens e técnicas experimentais, são muito mais numerosas do que aquelas referentes ao plexo submucoso (FURLAN, 2001).

Dentre as técnicas histoquímicas mais empregadas no estudo do plexo mioentérico, está a técnica que utiliza a enzima NADH-diaforase. Esta se baseia na oxidação catalisada pela enzima mitocondrial NADH-diaforase. Para que esta reação ocorra é fornecido, como substrato, o β -NADH e o aceptor artificial de elétrons Nitro Blue Tetrazolium (NBT). Ao receber os elétrons, o β -NADH precipita-se formando grânulos de formazana de cor azul que são insolúveis, evidenciando deste modo o corpo celular de neurônios com maior atividade da enzima NADH-diaforase. Porém esta técnica permite evidenciar somente parte da densidade neuronal total (MIRANDA-NETO et al., 2000; YOUNG et al., 1993).

No plexo mioentérico tem-se identificado mais de 30 tipos de neurotransmissores (FURNESS, 2000). Dentre eles, o óxido nítrico (NO) é o principal responsável por mediar a maioria das respostas inibitórias no TGI, permitindo o relaxamento da musculatura lisa gastrointestinal. Os neurônios que

liberam NO são denominados NANC (não adrenérgicos e não colinérgicos) (FURNESS, 2000; GELDRE; LEFEBVRE, 2004; SANTER, 1994).

O NO é formado a partir do aminoácido L-arginina, pela ação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), um mecanismo NADPH, Ca^{+2} ou calmodulina dependente (CRACCO; FILOGAMO, 1994; WADE, 2002). Os neurônios nitrérgicos podem ser identificados imunohistoquimicamente com a utilização de anticorpo para a enzima NOS, ou com a utilização da técnica histoquímica da NADPH-diaforase, uma vez que a enzima NOS co-existe com a NADPH-diaforase (BELAI; COOPER; BURNSTOCK, 1995; FURNESS et al., 1994; SAFFREY, 2004). Desta maneira, a NOS pode, na presença de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), reduzir o NBT, formando os grânulos de formazana, permitindo a marcação do neurônio NOS reativo (SCHERER-SINGER et al., 1983).

Alterações dos neurônios entéricos podem comprometer a motilidade, absorção, secreção e o fluxo sanguíneo do TGI (GABELLA, 1979; GRUNDY; SCHEMANN, 2005; SCHEMANN; NEUNLIST, 2004; STERNINI, 1988). Dentre os fatores que alteram as funções gastrointestinais, ressalta-se o envelhecimento. Ao longo desta etapa de vida há um declínio natural do funcionamento dos diversos sistemas, da mesma forma que também há o comprometimento dos neurônios entéricos (MECIANO et al., 1995; SOUZA et al., 1993; SWEDA et al., 2003; WILEY, 2002).

Embora os neurônios e fibras nervosas que compõe o sistema nervoso entérico dos vertebrados apresentem mudanças significativas desde sua origem na crista neural até a maturidade, a dinâmica morfofuncional dos neurônios não cessa. O envelhecimento é responsável por uma considerável redução numérica e reorganização dos neurônios mioentéricos. Até certo ponto isso é resultante da

eliminação de alguns neurônios e redistribuição de tarefas entre os neurônios remanescentes (FURLAN, 2000).

Ratos possuem vida média de 24 meses, sendo que aos seis anos de idade são considerados adultos, com 12 meses são denominados meia-vida e a partir de 18 meses são considerados idosos (SANTER; BAKER, 1988; JOHNSON et al., 1998; PHILLIPS; POWLEY, 2001; SAFFREY, 2004).

Gabella (1979) relatou a diminuição no número total de neurônios com a idade no plexo mioentérico do intestino delgado de ratos. Santer e Baker (1988), ao comparar ratos jovens e adultos, demonstraram redução de 40% no número de neurônios do intestino delgado e de 60% no colo do intestino grosso. Wade (2002) verificou uma diminuição neuronal de 20-30% no duodeno, 15-20% no jejuno-íleo e de 30-40% no colo e reto de ratos.

Ao estudar diferentes regiões do TGI, outros pesquisadores têm também reportado diminuição no número de neurônios entéricos em humanos (MECIANO, et al., 1995; SOUZA et al, 1993), cobaias (GABELLA, 1989) e camundongos (EL-SALLY et al., 1999) com o avanço da idade.

Um gradiente para a perda neuronal é observado nas regiões do TGI do sentido oral para anal, isto é, a perda celular no estômago é menor que no intestino delgado, que é menor que no intestino grosso. Ainda, dentro de um órgão, há graus regionais de perda neuronal e estes não são uniformes (PHILLIPS et al., 2003).

Com o envelhecimento há aumento da incidência de problemas gastrointestinais associados com a motilidade intestinal, incluindo retardo do esvaziamento gástrico (MOORE et al., 1983), retardo da motilidade esofágica e colônica (SANTER; BAKER, 1993), aumento do trânsito intestinal

(McDOUGLAS, 1984), assim como diminuição na sua função absorptiva (SANTER; BAKER, 1993) e diminuição na produção fecal (SMITS; LEFEBVRE, 1996).

Ainda não se conhece o efeito da atividade física sobre o duodeno, contudo, tem sido demonstrado que a atividade física minimiza os distúrbios de motilidade do colo característicos da constipação intestinal (PETERS et al., 2001). Embora sejam relatados na literatura possíveis benefícios do exercício físico na constipação intestinal, os efeitos desta terapêutica ainda não são bem estabelecidos, sendo os resultados muitos controversos (ROBERTSON et al., 1993; SIMREN, 2002; PETERS et al., 2001).

A atividade física regular pode promover mudanças funcionais significantes para o organismo, minimizando os efeitos deletérios do processo de envelhecimento. De maneira geral, o treinamento diminui a atividade simpática (KRIEGER et al., 1999; LIU et al., 2002) e aumenta o tônus parassimpático durante o exercício (FOX et al., 1991; KRIEGER et al., 1999; LIU et al., 2002). Além disso, Van Praag et al. (1999) relatam que no sistema nervoso central, mais especificamente, no hipocampo, a atividade física estimula a neurogênese. Entretanto, nada se sabe sobre os efeitos da atividade física regular sobre o envelhecimento dos neurônios mioentéricos, especialmente os do duodeno.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODOS

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

4.1 MATERIAL

Para realização deste estudo foram utilizados 45 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Estes animais foram distribuídos em três diferentes grupos:

- **Grupo Controle (C):** 15 ratos adultos (seis meses de idade).
- **Grupo Sedentário (S):** 15 ratos de meia idade (doze meses de idade) sedentários.
- **Grupo Treinado (T):** 15 ratos de meia idade (doze meses de idade) submetidos à atividade física.

Os duodenos destes animais foram coletados e submetidos às técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão (cinco animais de cada grupo) e as técnicas histoquímicas utilizando as enzimas NADH-diaforase (cinco animais de cada grupo) e NADPH-diaforase (cinco animais de cada grupo), para evidenciar os neurônios do plexo mioentérico.

Os animais, durante todo experimento, foram mantidos em caixas de polipropileno e receberam água e ração comercial Nuvilab® *ad libitum*. As caixas foram mantidas em sala com condições ambientais de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (12 horas claro/12 horas escuro) controlados.

4.2 MÉTODOS

Os métodos utilizados neste trabalho obedeceram as seguintes etapas: protocolo experimental, eutanásia dos animais, processamento do material para análise microscópica (microscopia de luz e eletrônica de transmissão), espessura da túnica muscular, técnica histoquímica de NADPH-diaforase, técnica histoquímica de NADH-diaforase, obtenção dos preparados de membrana, análise quantitativa (densidade neuronal e estimativa do número total de neurônios), análise morfométrica e análise estatística.

4.2.1 Protocolo Experimental

Antes de iniciar o período de experimentação, os animais foram submetidos à adaptação ao exercício físico (corrida em esteira ergométrica) durante duas semanas e foram classificados conforme a performance na esteira em: (1) animais que se recusaram a correr; (2) corredores esporádicos; (3) corredores médios; (4) corredores consistentes; e (5) excelentes corredores (DISHMAN et al., 1988). Desta

maneira, apenas os animais classificados nas categorias de 3 a 5 participaram deste experimento.

Após, os animais foram distribuídos de forma homogênea em dois grupos: S (sedentário) e T (treinado). Aos seis meses (180 dias) de idade, estes animais iniciaram o período experimental que teve duração de seis meses.

O protocolo de exercício foi elaborado a partir da realização de testes de esforço máximo (TEM), onde a média da velocidade máxima em que cada animal conseguiu correr na esteira correspondeu à intensidade máxima média do exercício. Desta maneira, o protocolo de atividade física variou mensalmente de acordo com os resultados obtidos nos TEMs.

Para instituição do protocolo inicial foi necessário um primeiro TEM, onde a velocidade inicial estipulada na esteira foi de 0,3 Km/h e a cada quatro minutos a velocidade foi aumentada nesta mesma proporção, conforme o protocolo de Silva et al. (1997). Desta forma, sete TEMs foram realizados, sendo um por mês e um antes do início do experimento.

Os animais do grupo S desenvolveram a atividade física uma vez por semana e com duração de dez minutos, apenas para não perderem a habilidade de correr em esteira ergométrica. Para este grupo foi estabelecida a velocidade de 0,3 Km/h.

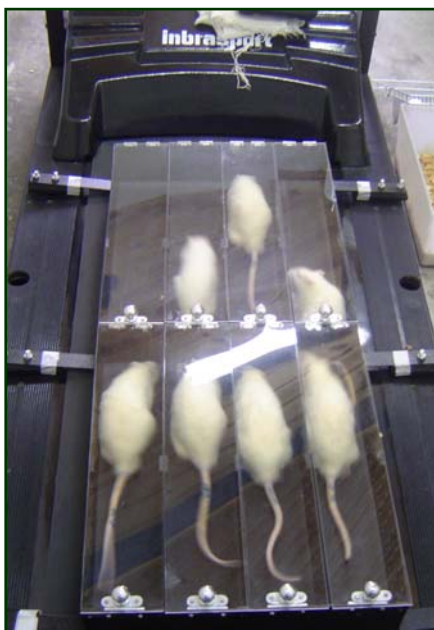


Figura 1 - Animais realizando atividade física (corrida em esteira)

Os animais do grupo T foram submetidos ao programa de atividade física cinco vezes por semana. O tempo que estes animais realizaram exercício variou semanalmente, sendo que na primeira semana os animais realizaram o exercício durante 30 minutos, e este tempo foi aumentado em dez minutos por semana, de maneira a chegar a 60 minutos na quarta semana. A velocidade máxima estipulada no protocolo de atividade física correspondeu a 60% da intensidade média máxima conseguida no teste de esforço.

Os animais foram pesados a cada TEM e, também, antes de serem sacrificados, totalizando sete pesagens.

4.2.2 Eutanásia dos Animais

O protocolo de sacrifício dos animais foi submetido e aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo n° 734/2005).

Os animais foram sacrificados, após jejum de 12 horas, com dose letal de anestésico (Tiopental® 40 mg/kg de peso corpóreo) via endovenosa. Posteriormente, seguiu-se a laparotomia, por meio de uma incisão mediana na parede abdominal, para retirada do duodeno, adotando-se como limite cranial a porção caudal da região pilórica do estômago e como limite caudal a flexura duodeno-jejunal.

Os duodenos tiveram seu comprimento mensurado, com o auxílio de régua milimetrada e foram decalcados em papel branco, para a determinação de sua área. Os desenhos obtidos foram escaneados, juntamente com uma régua, e a área do segmento foi determinada por meio do analisador de imagem Image Pro-Plus 3.0.1®.

Posteriormente, dependendo da técnica a ser utilizada, os duodenos foram submetidos aos diferentes protocolos descritos a seguir.

4.2.3 Processamento do Material para Análise Microscópica (Microscopia de Luz e Eletrônica de Transmissão)

Os animais submetidos à técnica de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de luz tiveram o sistema circulatório lavado e fixado antes da retirada do

duodeno da cavidade abdominal. A lavagem procedeu-se por meio da inserção de uma cânula no ventrículo esquerdo, onde uma solução contendo salina tamponada fosfatada (PBS) a 0,1 M e pH 7,4 e heparina a 2% foi perfundida. As veias jugulares foram seccionadas transversamente para permitir a completa lavagem do sistema. Após a lavagem, uma solução fixadora constituída por glutaraldeído a 5% e formoldeído a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,125M e pH 7,4 (solução fixadora de Karnovsky modificada) foi perfundida nos animais. A perfusão se deu por meio do mesmo orifício já utilizado para a lavagem do sistema circulatório. Porém, para a perfusão das soluções fixadoras, as veias jugulares foram laqueadas. A seguir, o duodeno de cada animal foi retirado do abdome, lavado com solução salina para a remoção das fezes, seccionado e imerso na mesma solução fixadora. Após 72 horas de fixação, cada duodeno obtido foi dividido, por secção transversal, em segmentos proximal e distal para serem processados de acordo com as técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão, respectivamente.

4.2.3.1 Microscopia de Luz

Da extremidade do segmento proximal de cada duodeno, foi isolado um fragmento de um cm de comprimento, o qual foi submetido ao tratamento rotineiro para inclusão em parafina e obtenção de cortes histológicos.

Os fragmentos foram lavados em álcool etílico a 70%, desidratados em uma série crescente de álcoois até o absoluto e diafanizados em xilol. Após inclusão em Paraplast (Sigma[®]), foram obtidos cortes transversais de cinco μm de espessura,

corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina e montados entre lâmina e lamínula com resina Permout (Synth®). Estas lâminas foram utilizadas para a análise da espessura da túnica muscular.

4.2.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após então fixados, o segmento distal de cada duodeno foi seccionado em fragmentos menores que foram lavados em solução tampão de cacodilato de sódio a 0,125 M e pH 7,4 e imersos em uma solução aquosa de tetróxido de ósmio a 2%. As amostras permaneceram nesta solução durante 60 minutos, no escuro e sob agitação constante. Posteriormente, foram lavados na mesma solução tampão de cacodilato anteriormente referida e, após, em água destilada, para serem contrastados em blocos com a solução aquosa saturada de acetato de uranila durante 60 minutos sob agitação constante e em recipiente escuro. Os fragmentos foram novamente lavados com água destilada e desidratados em série crescente de álcoois de 50% ao absoluto, sendo depois desidratados em óxido de propileno por dez minutos. As amostras foram embebidas com solução de óxido de propileno e resina Araldite, sempre em constante agitação. Após estas etapas, os fragmentos foram inclusos em resina Araldite pura e mantidos em estufa (60°C) por um período mínimo de dois dias. Os blocos de resina formados foram trimados e seccionados com 70-90 nm de espessura por navalha de diamante. As secções foram colocadas em placas de cobre e coradas com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo e, posteriormente, analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão.

4.2.4 Espessura da Túnica Muscular

Nos cortes histológicos, a espessura da túnica muscular (camadas longitudinal e circular), foi mensurada com o auxílio do analisador de imagem Image-Pro-Plus 3.0.1[®]. As imagens foram capturadas com o auxílio do microscópio Olympus BX60[®] (objetiva 20X) acoplado a uma câmera digital Axio Cam HRc - Zeiss[®], e transferidas para a tela do computador.

Considerando a forma tubular dos segmentos intestinais, o duodeno foi dividido em quadrantes, considerando a borda mesentérica como 0° (figura 2). Em cada fragmento foram capturados quatro diferentes campos (0°, 90°, 180°, 270°). Cada lâmina continha dois cortes histológicos totalizando, assim, oito campos capturados por duodeno. Dentro de cada campo, a maior espessura foi mensurada.

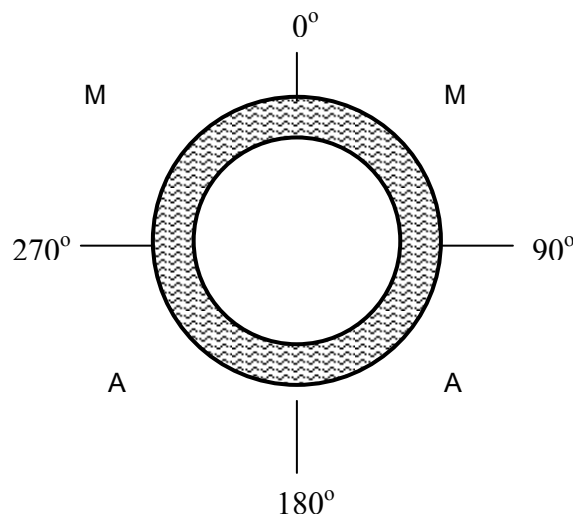


Figura 2 - Esquema de corte transversal do duodeno, indicando as regiões mesentérica (M), e antimesentérica (A). A indicação de 0° corresponde à inserção do mesentério.

4.2.5 Técnica Histoquímica de NADPH-diaforase (SCHERER-SINGLER et al., 1983)

Os duodenos dos animais destinados a esta técnica (cinco animais de cada grupo) foram lavados, preenchidos com solução de Krebs (pH 7,3) composta de 1,3g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 0,44g de cloreto de potássio (KCl), 0,24g de cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,165g de hipofosfato de sódio (NaH_2PO_2), 7,05g de cloreto de sódio (NaCl) e 0,27g de cloreto de cálcio (CaCl_2) dissolvido em um litro de água destilada e tiveram suas extremidades amarradas com fio de sutura. Após, os duodenos foram submetidos a duas lavagens de dez minutos em solução de Krebs e, em seguida, por mais dez minutos em Krebs contendo Triton X-100 a 0,3% dissolvido em tampão fosfato de sódio (pH 7,3). Depois, foram realizadas mais duas lavagens em solução salina tamponada fosfatada (PBS) durante dez minutos. Após as lavagens, os duodenos foram incubados por duas horas em meio de reação composto por 50mg de NBT, 100mg de β -NADPH e 0,3% de Triton X-100[®] em tampão Tris-HCl (0,1M pH 7,6). O tempo de reação histoquímica foi acompanhado visualmente ao estereomicroscópio (Micronal). A seguir, foram imersos em solução de paraformaldeído 4% para a fixação e armazenagem.

4.2.6 Técnica Histoquímica de NADH-diaforase (GABELLA, 1969)

Os duodenos foram lavados e preenchidos com solução de Krebs (pH 7,3) composta por 1,3g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 0,24g de cloreto de magnésio

($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,44g de cloreto de potássio (KCl), 0,165g de hipofosfato de sódio (NaH_2PO_2), 7,05g de cloreto de sódio (NaCl) e 0,27g de cloreto de cálcio (CaCl_2) dissolvido em um litro de água destilada. Após a lavagem, os segmentos foram submetidos ao procedimento para evidenciar neurônios. Para tanto, os segmentos passaram por duas lavagens de dez minutos cada em solução de Krebs, e foram incubados em solução de Krebs contendo Triton X-100 a 0,3% durante cinco minutos. Mais duas lavagens de dez minutos em cada solução de Krebs foram realizadas, para posterior incubação em meio de reação constituído por 25ml de solução estoque de Nitro Blue Tetrazolium (NBT, solução estoque com concentração de 0,5 mg/ml), 25 ml de tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7,3), 0,05 g de β -NADH em 50ml de água destilada. O tempo de incubação foi estabelecido em 45 minutos e a reação histoquímica foi acompanhada em estereomicroscópio (Micronal). Após, os segmentos foram fixados em solução de formolaldeído a 10% em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,3).

4.2.7 Obtenção dos Preparados de Membrana

Após período de 48 horas de fixação, foram obtidos preparados de membrana dos segmentos processados segundo as técnicas histoquímicas de NADH e NADPH-diaforase. Para tanto, após secções ao longo do eixo longitudinal na margem mesentérica, os segmentos foram microdissecados sob estereomicroscópio (Micronal) com transluminação para retirada das túnicas mucosa e tela submucosa,

e preservação das túnicas muscular e serosa. Estes preparados de membrana foram montados entre lâmina e lamínula com glicerina (Synth[®]) tamponada.

4.2.8 Fator de Correção

Tendo em vista as alterações que ocorrem nas dimensões dos segmentos intestinais (distensão ou retração da parede intestinal) quando submetidos às técnicas para evidenciar neurônios, optamos por aplicar um fator de correção nos resultados morfométricos e quantitativos. Este procedimento permitiu evitar que possíveis alterações na área do duodeno viessem a interferir nos resultados obtidos. Para a utilização deste fator, a área intestinal do duodeno foi previamente mensurada e após o processamento, foi mensurada novamente através dos preparados de membrana (GABELLA, 1971; SOUZA et al., 1993). Assim, foi possível constatar diferenças na área dos segmentos, ou seja, se houve aumento ou diminuição desta área no segmento processado em relação a área do segmento antes do processamento.

4.2.9 Quantificação Neuronal

A análise quantitativa foi realizada em duas etapas: densidade neuronal e estimativa do número total de neurônios.

4.2.9.1 Densidade Neuronal

A quantificação neuronal por área (mm^2) procedeu-se por meio dos preparados de membrana obtidos de cada duodeno, sendo um preparado de membrana por animal. A densidade neuronal foi obtida com o auxílio do microscópio OLYMPUS BX50, com objetiva de 40X, sendo as imagens capturadas por câmera digital de alta resolução (Axio Cam HRc-Zeiss[®]) e transferidas para o computador.

Em cada preparado de membrana foi adaptado um sistema teste constituído por 50 campos eqüidistantes, distribuídos em dez colunas com cinco linhas cada, amostrando todas as regiões (mesentérica, intermediária e antimesentérica) do duodeno.

Em virtude do duodeno, assim como todo o intestino, apresentar variações em sua circunferência, um sistema teste de amostragem retangular com dimensões fixadas não pôde ser adequado neste material. Assim um ajuste para cada coluna dentro do preparado de membrana foi necessário. Contudo, os pontos das colunas foram ajustados de maneira a manter a mesma distância entre si (JARVINEN; WOLLMANN; POWROZEK et al., 1999).

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

a quantificação foi de $0,056\text{mm}^2$, sendo que a área total analisada por preparado de membrana foi de $2,8\text{mm}^2$.

4.2.9.2 Estimativa do Número Total de Neurônios

O número total de neurônios foi estimado através do produto entre a densidade neuronal (neurônios/ mm^2), já com o fator de correção, pela área de superfície duodenal obtida antes do processamento das técnicas histoquímicas de NADH e NADPH-diaforase.

4.2.10 Análise Morfométrica

A mensuração da área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos do duodeno foi realizada pelo programa de análise de imagem computadorizado Image-Pro-Plus 3.0.1. (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, EUA). Para tanto, as imagens dos neurônios capturadas pela câmera digital para a quantificação neuronal também foram utilizadas para análise morfométrica. Foram mensurados os perfis dos corpos celulares (μm^2) de todos os neurônios quantificados. Posteriormente os valores foram distribuídos em histogramas de frequência de acordo com seu tamanho.

4.2.11 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism versão 4. Os dados referentes à quantificação, mensuração da área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase e NADPH-diaforase, área do duodeno e espessura da túnica muscular foram analisados pelo teste Tukey. Para a análise do peso corporal e do TEM foi utilizado o teste t de Student. Os resultados foram expressados como média \pm erro padrão. Para todos os testes o nível de significância foi $P < 0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho encontram-se apresentados e sistematizados nas seguintes etapas: atividade física, peso corpóreo, análise morfológica do plexo mioentérico, espessura da túnica muscular, área da superfície intestinal, quantificação neuronal e análise morfométrica.

5.1 ATIVIDADE FÍSICA

Os animais pertencentes aos grupos S (ratos de meia idade sedentários) e T (ratos de meia idade treinados) realizaram sete TEMs no decorrer do experimento.

Os resultados referentes aos TEMs estão representados na figura 3.

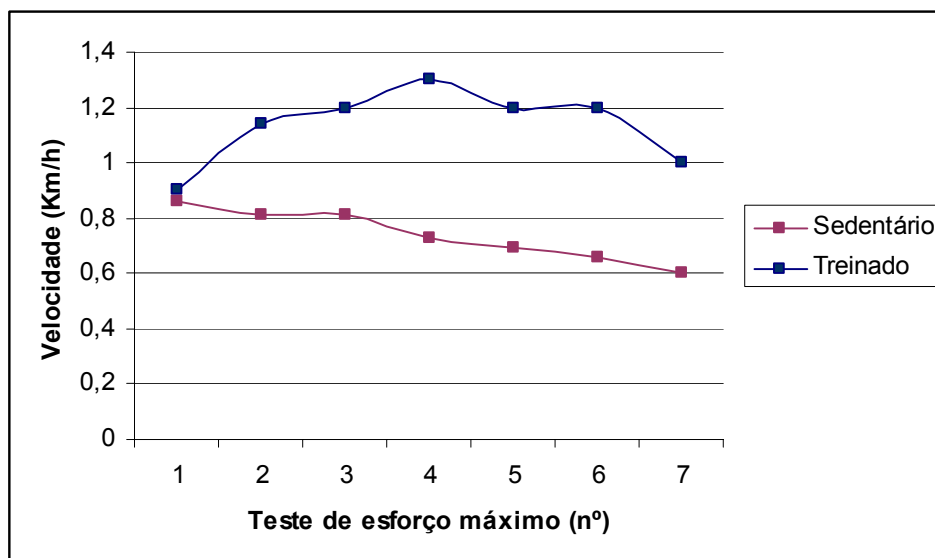


Figura 3 - Média da velocidade dos testes de esforço máximo (TEMs) realizados com os animais do grupo S (ratos de meia idade sedentários) e T (ratos de meia idade submetidos à atividade física)

Os resultados referentes aos TEMs diferiram significativamente ($P < 0,05$) entre os grupos S e T, a partir da realização do segundo TEM (Tabela 1).

Tabela 1 - Média da velocidade máxima (Km/h) obtida nos testes de esforço máximo dos animais do grupo S e T

	Teste de Esforço Máximo (km/h)						
	1	2	3	4	5	6	7
S (n=15)	0,86±0,03 ^a	0,81±0,04 ^a	0,81±0,03 ^a	0,73±0,04 ^a	0,69±0,04 ^a	0,66±0,04 ^a	0,6±0,04 ^a
T (n=15)	0,9±0,03 ^a	1,14±0,04 ^b	1,2±0,05 ^b	1,3±0,05 ^b	1,2±0,05 ^b	1,2±0,05 ^b	1,0±0,05 ^b

* as letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos, pelo teste T-Student.

Nos TEMs observou-se que os animais do grupo T tiveram um melhor desempenho do que os animais do grupo S. Apesar de ser verificado um decréscimo de ambos os grupos na velocidade média no último teste os animais treinados (grupo T) mantiveram, em todo o período de experimentação, velocidade média superior à dos animais sedentários (grupo S).

5.2 PESO CORPÓREO

Antes de cada TEM e no dia do sacrifício os animais foram pesados. As médias dos pesos dos animais dos grupos C, S e T estão apresentadas na figura 4. Os animais do grupo C foram pesados apenas antes do sacrifício. A média do peso corpóreo deste grupo foi $441,6 \pm 59$ g.

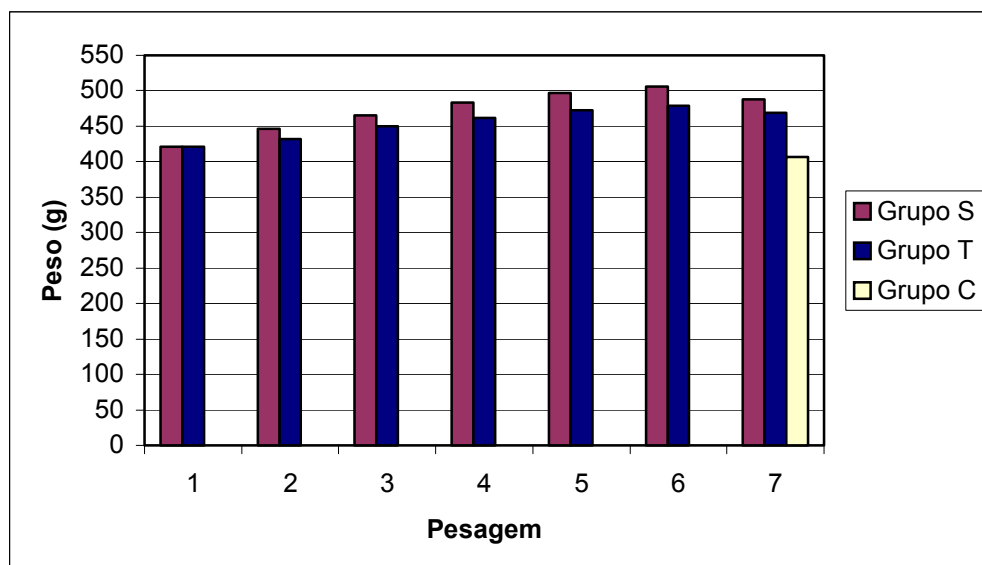


Figura 4 - Média do peso corpóreo (g) dos animais do grupo C (controle), S (sedentário) e T (treinado)

Observou-se que os animais treinados apresentaram menor peso corpóreo que os animais sedentários, porém estas médias diferiram significativamente ($P < 0,05$) somente a partir da quinta pesagem. O peso corpóreo dos animais do grupo C foi significativamente ($P < 0,05$) menor que o do grupo S, porém não se constatou diferença significativa no peso entre os animais do grupo C e T (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias de peso corpóreo (g) dos animais dos grupos controle (C), sedentário(S) e treinado (T)

	Peso (g)						
	1	2	3	4	5	6	7
C (n=15)							441,6 ± 59 ^a
S (n=15)	421±9,1 ^a	446,2±9,2 ^a	465,4±8,9 ^a	483,4±9,5 ^a	497,2±9,6 ^a	505,4±10,28 ^a	488±11,64 ^b
T (n=15)	421,3±7,9 ^a	431,9±7,0 ^a	449,7±7,7 ^a	461,2±7,7 ^a	472,2±7,6 ^b	478,5±8,8 ^b	468,5±9,9 ^{ab}

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05) pelo teste t-Student.

5.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO PLEXO MIOENTÉRICO

Na análise morfológica dos neurônios NADH e NADPH-diaforase positivos, não foram verificadas diferenças entre os grupos de animais estudados (grupos C, S e T). Os neurônios mioentéricos, normalmente com corpo celular de formato alongado com núcleo oval, foram localizados na túnica muscular, entre as camadas muscular longitudinal e circular, reunidos em gânglios, com número variado de neurônios por gânglio. Neurônios isolados, especialmente no trajeto das fibras nervosas, foram também encontrados (Figuras 5 e 6).

Por meio das técnicas de NADH e NADPH-diaforase, observou-se que os gânglios apresentavam-se conectados por fibras interganglionares, formando uma malha espessa de fibras nervosas (plexos primários), com feixes nervosos mais finos (plexos secundários) interligando os feixes primários, e com vários ramos ainda mais delgados (plexos terciários) conectados entre si (Figuras 5 e 6).

A disposição do plexo mioentérico mostrou algumas variações de acordo com a circunferência intestinal. Na região mesentérica observou-se o plexo com maior densidade neuronal, estando os neurônios mais próximos uns dos outros e conectados por espessas e densas fibras nervosas. Na região antimesentérica o plexo era composto por menor densidade neuronal, com neurônios mais dispersos e conectados por fibras nervosas mais delgadas do que na região mesentérica.

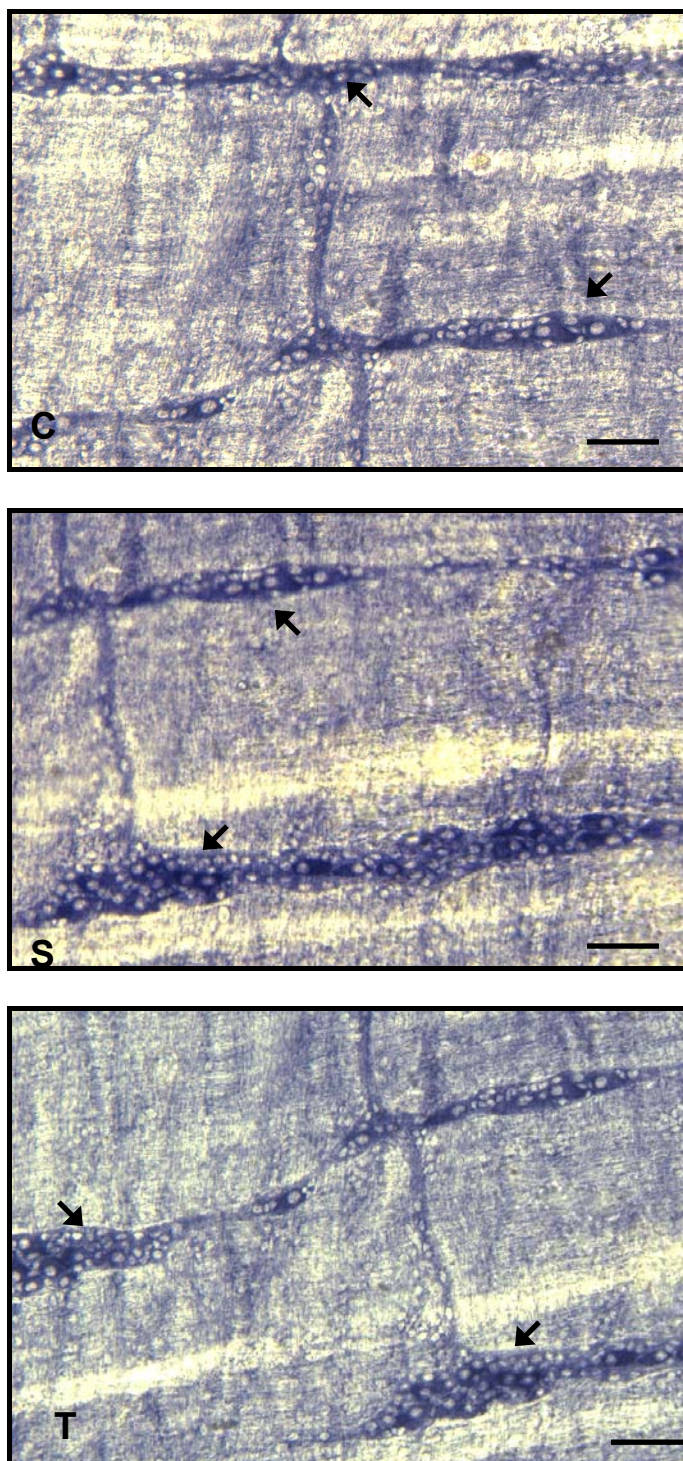


Figura 5 – Fotomicrografia dos gânglios do plexo mioentérico (seta) evidenciando os neurônios NADH-diaforase positivos do duodeno de ratos dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T). (Aumento 200X - barra, 100 μ m)

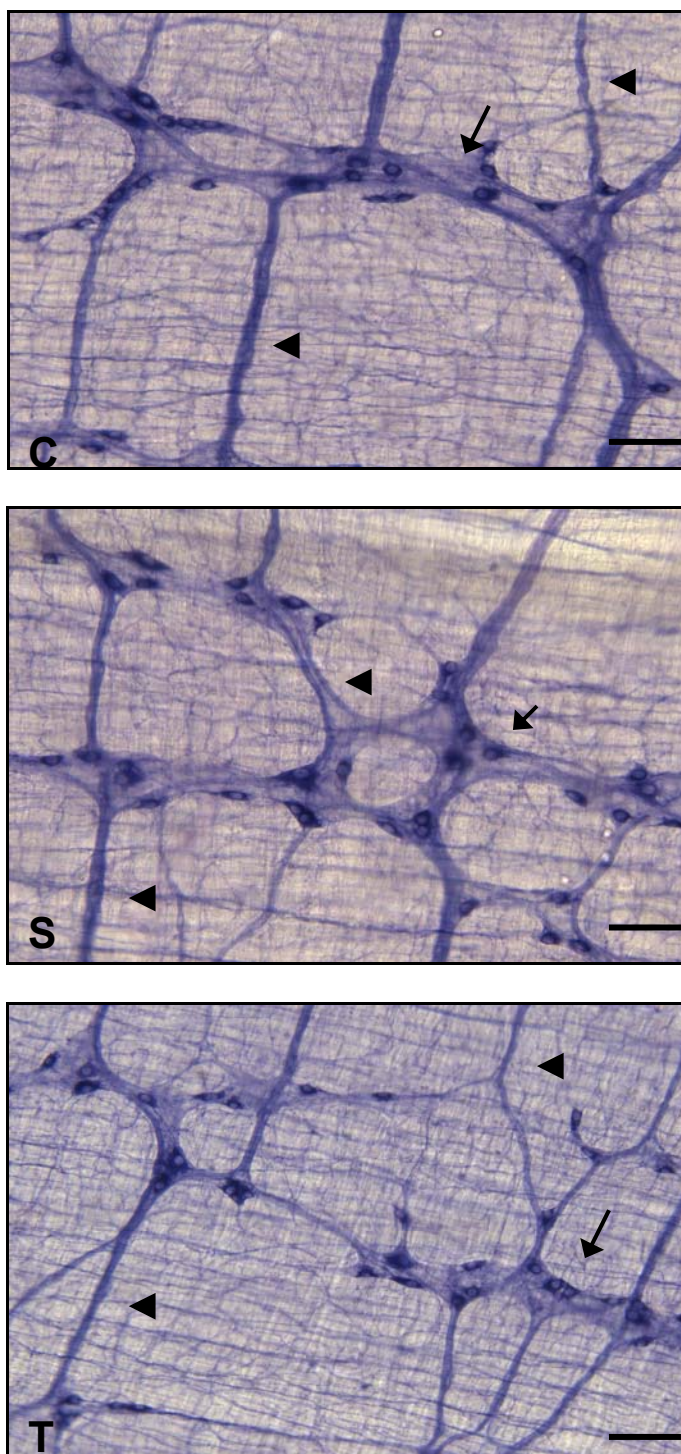


Figura 6 – Fotomicrografia dos gânglios do plexo mioentérico do duodeno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T), evidenciando os neurônios NADPH-diaforase positivos arranjados predominantemente no interior dos gânglios (seta) e fibras nervosas interganglionares com diferentes espessuras (cabeça de seta). (Aumento 200X – barra, 100 μ m)

Na análise ultraestrutural, nos três grupos estudados, os gânglios mioentéricos apresentaram-se circundados por tecido conjuntivo composto principalmente por fibras colágenas, as quais não foram encontradas no interior dos gânglios. Nos animais do grupo S, a disposição das fibras colágenas mostrou-se mais dispersa do que nos animais do grupo C e T (Figura 7). Envolvendo o gânglio também foi observada uma delgada membrana basal que nos animais dos grupos C e T estava mais bem delineada que nos animais do grupo S.

Os gânglios apresentaram-se separados das células musculares pelo espaço periganglionar, que não demonstrou variação de largura nos três grupos animais estudados. Fibroblastos e capilares foram evidenciados no espaço periganglionar em todos os grupos (Figura 8).

Foi observado nos gânglios de todos os grupos (C, S e T) neurópilo composto por diversos processos neurais e células da glia. Pôde-se notar a presença de numerosas vesículas sinápticas, arredondadas ou ovóides, nas terminações nervosas. Foram encontradas vesículas agranulares e vesículas granulares (Figura 9).

Os neurônios apresentaram as membranas citoplasmática e nuclear íntegras. O núcleo mostrou formato arredondado ou ovóide, fracamente contrastado, e com nucléolo bem evidente. A cromatina, em geral, estava esparsa (eucromatina), porém, em algumas regiões do núcleo observou-se cromatina mais densa (heterocromatina). Distribuídas pelo citoplasma evidenciaram-se várias organelas. Entre elas, complexo de Golgi, agregados de retículo endoplasmático rugoso, ribossomos livres ou aderidos às cisternas do retículo endoplasmático e abundantes mitocôndrias (Figura 10).

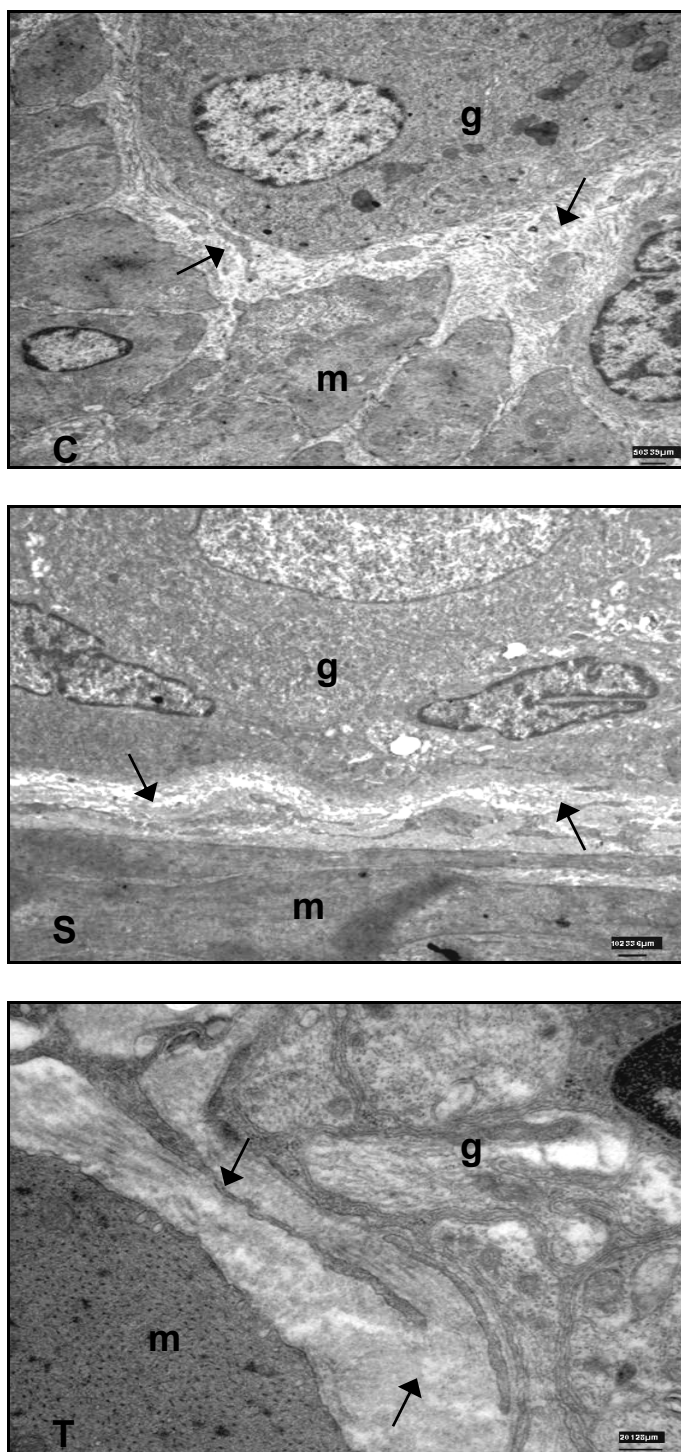


Figura 7- Eletrofotomicrografias do gânglio mioentérico (g) do duodeno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T), localizado na túnica muscular (m) e envolto por fibras colágenas (setas)

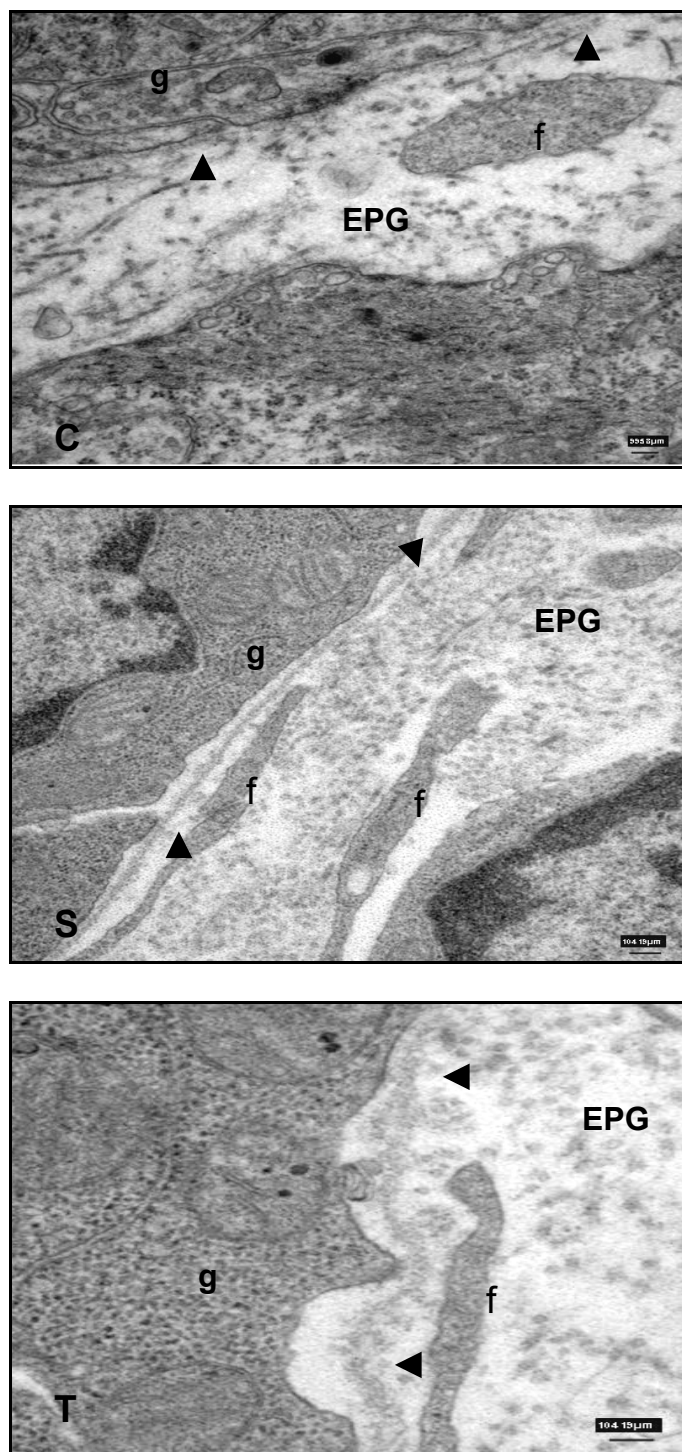


Figura 8 – Eletrofotomicrografias do gânglio mioentérico (g) do duodeno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T), evidenciando o espaço periganglionar (EPG) com fibroblastos (f) e membrana basal (ponta da seta) envolvendo o gânglio

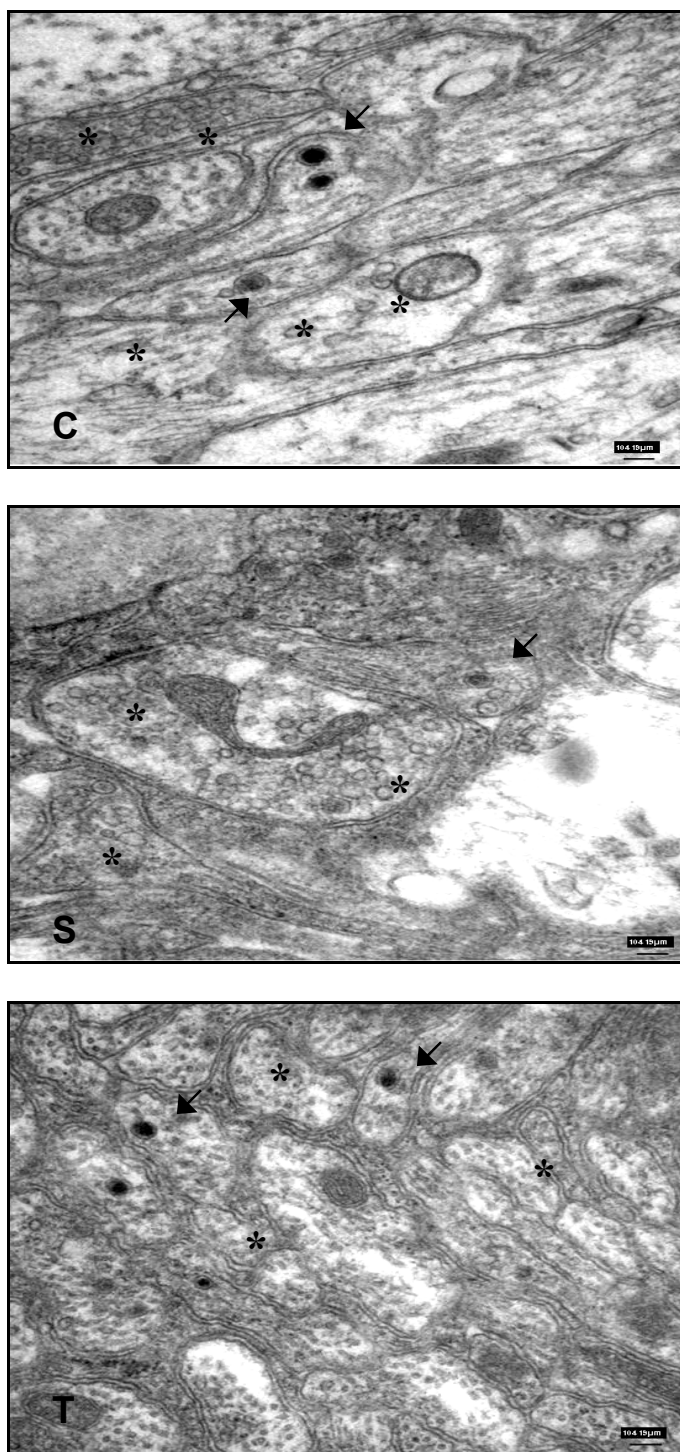


Figura 9 – Eletrofotomicrografias do duodeno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T) evidenciando neurópilo com presença de vesículas granulares (*) e agranulares (setas)

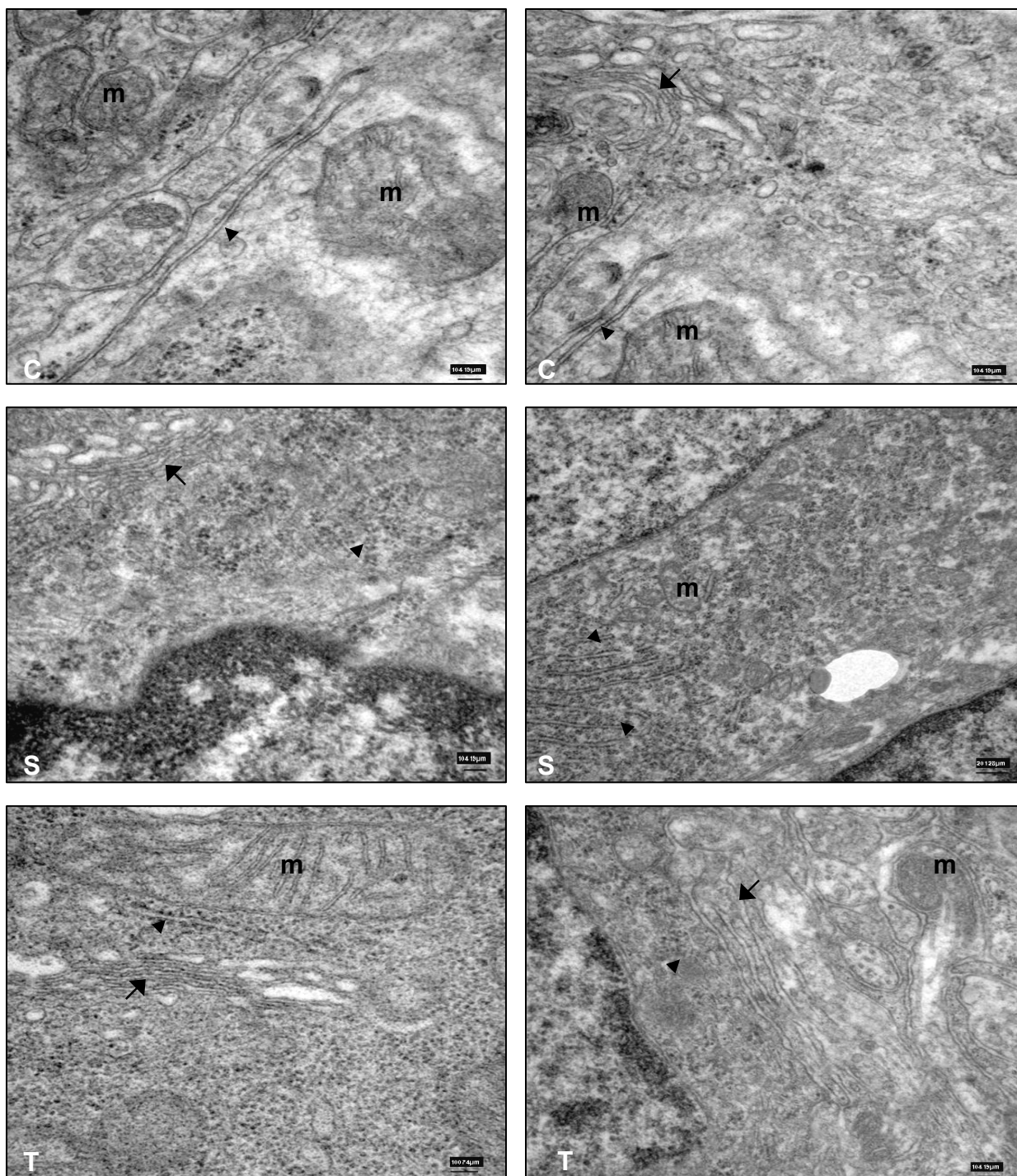


Figura 10 - Eletrofotomicrografias do duodeno dos animais dos grupos controle (C), sedentário(S) e treinado (T) evidenciando as organelas celulares: mitocôndria (M), retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta) e complexo de Golgi (seta)

5.4 ESPESSURA DA TÚNICA MUSCULAR

A espessura da túnica muscular compreendida pelas camadas musculares longitudinal e circular foi mensurada (μm) nos três grupos de animais (C, S e T) (Figura 11). A média da espessura da túnica muscular do grupo C foi $115,7 \pm 33$ mm, no grupo S $163,3 \pm 48$ mm e no grupo T a média foi $141,8 \pm 39$ mm. Os animais sedentários (grupo S) apresentaram maior espessura da túnica muscular que os animais dos grupos C (seis meses) e T (doze meses submetidos à atividade física), porém esta diferença não foi significativa ($P > 0,05$) (Figura 12).

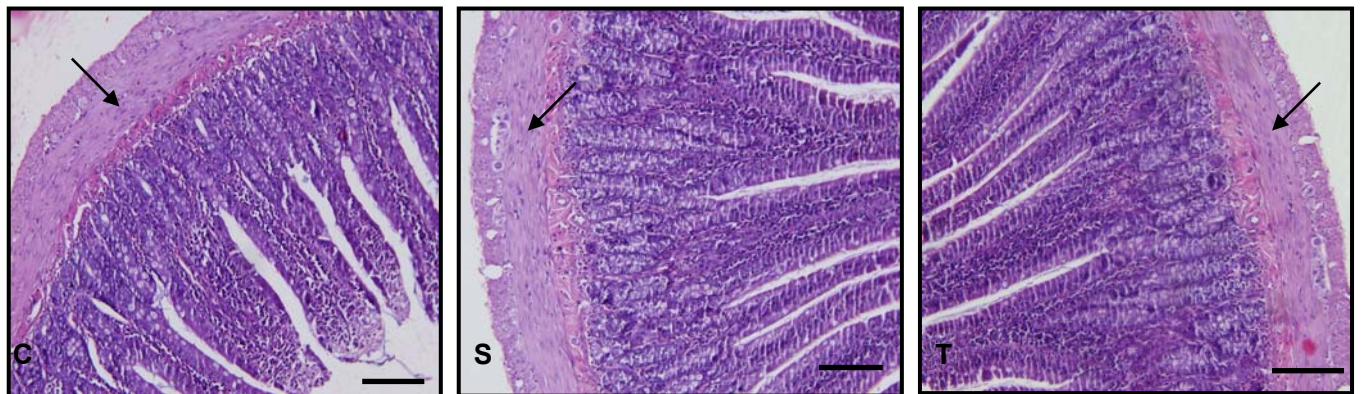


Figura 14 – Fotomicrografias de cortes transversais do duodeno evidenciando a túnica muscular (camada longitudinal e circular) dos animais dos grupos C (controle), S (sedentário) e T (treinado). Hematoxilina-eosina. (Aumento 200x – barra 100 μm)

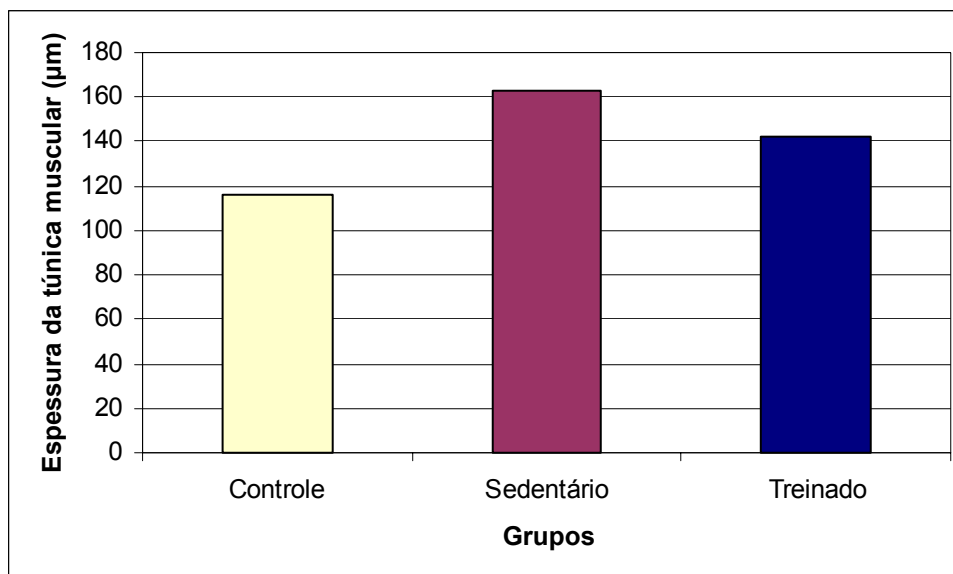


Figura 12 - Média da espessura da túnica muscular (μm) do duodeno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

5.5 ÁREA DA SUPERFÍCIE INTESTINAL

Os resultados referentes às médias das mensurações da área dos duodenos submetidos às técnicas de NADH e NADPH-diaforase encontram-se na tabela 3.

Os segmentos de duodeno submetidos à técnica de NADH-diaforase apresentaram dimensões maiores nos animais do grupo T quando comparados aos dos animais dos grupos C e S, tanto antes (a fresco) quanto após o processamento, porém, essa diferença não foi significativa ($P>0,05$). Os dados obtidos das mensurações dos segmentos submetidos à técnica de NADPH-diaforase demonstram que, antes do processamento, nos animais do grupo S a média das áreas foi maior que as verificadas nos demais grupos (C e T), apesar de não haver diferenças significativas entre as mensurações obtidas ($P>0,05$). Entretanto, após o processamento os segmentos dos animais do grupo T foram maiores que os grupos

C e S, sendo os segmentos do grupo C significativamente menores que os do grupo T ($P < 0,05$).

Tabela 3 – Média das mensurações (mm^2) da área do duodeno dos animais dos grupos C (controle), S (sedentário) e T (treinado), antes (a fresco) e após processamento do material e seus respectivos fatores de correção (%)

	Média da área do duodeno (mm^2) NADH-d			Média da área do duodeno (mm^2) NADPH-d		
	Fresco	Processado	Fator de correção (%)	Fresco	Processado	Fator de correção (%)
C (n=5)	550,1±121,9 ^a	637,5±76,64 ^a	18,38	730,2±84,93 ^a	931,8±59,3 ^a	28,48
S (n=5)	570,1±147,5 ^a	697,1±106,4 ^a	22,43	797,4±131 ^a	1065±68,1 ^{ab}	35,46
T (n=5)	642,7±123,8 ^a	722,1±158 ^a	13,83	710,7±90,7 ^a	1167±151,5 ^b	65,61

* Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey.

5.6 QUANTIFICAÇÃO NEURONAL

Os resultados referentes à análise quantitativa dos neurônios NADH e NADPH-diaforase positivos serão descritos em duas etapas: densidade neuronal e estimativa do número total de neurônios.

5.6.1 Densidade Neuronal

A densidade neuronal foi obtida por meio do número médio de neurônios, em uma área de 2,8 mm² do preparado de membrana, e pela média de neurônios por mm² de duodeno. Os resultados referentes à densidade dos neurônios NADPH-diaforase positivos estão apresentados na tabela 4 e figura 13.

A densidade neuronal dos neurônios NADPH-diaforase diminuiu com o envelhecimento, porém a diferença encontrada entre o grupo C, com seis meses de idades, não diferiu significativamente dos grupos S e T, com doze meses de idade (P>0,05). Foi constatada diminuição, ainda que não significativa (P>0,05), dos neurônios NADPH-diaforase positivos dos animais do grupo T quando comparados aos animais do grupo S.

Tabela 4 – Média do número de neurônios NADPH-diaforase positivos do duodeno dos animais do grupo controle (C), sedentário (S) e treinado (T), com seus respectivos fatores de correção (%)

Grupos	Número de neurônios NADPH-d/ 2,8mm ²	Número de neurônios/mm ²	Fator de correção (%)
C (n=5)	106,5±1,9 ^a	34,1±4,0 ^a	28,5
S (n=5)	96,1±1,7 ^a	30,7±3,6 ^a	35,5
T (n=5)	82,7±1,5 ^a	26,4±3,0 ^a	44,5

* Letras diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0,05)

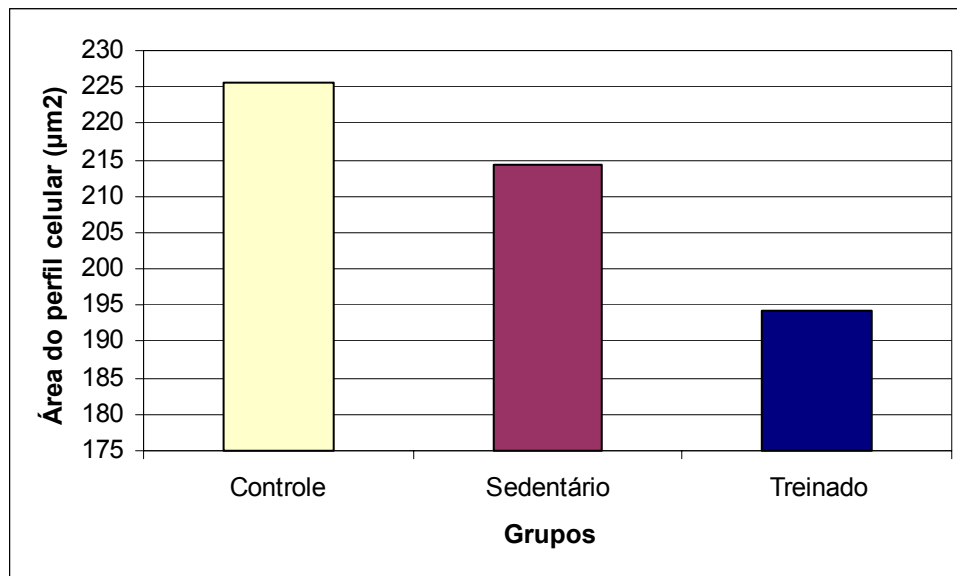


Figura 13 – Número médio de neurônios NADPH-diaforase positivos por mm^2 de duodeno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

A densidade dos neurônios NADH-diaforase também foi calculada por meio do número médio de neurônios, em uma área de $2,8 \text{ mm}^2$ do preparado de membrana, e pela média de neurônios por mm^2 de duodeno, conforme apresentado na tabela 5 e figura 14.

Constatou-se redução na densidade neuronal com o envelhecimento, embora não significativa ($P > 0,05$), ao compararmos os animais do grupo C com os animais do grupo S. Porém, os animais que realizaram atividade física (grupo T) apresentaram densidade neuronal maior ($P > 0,05$) que os animais dos grupos C e S.

Tabela 5 - Médias do número de neurônios NADH-diaforase positivos do duodeno dos animais do grupo controle (C), sedentário (S) e treinado (T), com seus respectivos fatores de correção

Grupos	Número de neurônios NADH-d/ 2,8mm ²	Número de neurônios/mm ²	Fator de correção (%)
C (n=5)	777,9±32,2 ^a	277,6±11,5 ^a	18,38
S (n=5)	745,6±39,5 ^a	262,7±14 ^a	22,41
T (n=5)	831,4±44,4 ^a	296,7±15,8 ^a	12,35

* Letras diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença significativa (P<0,05)

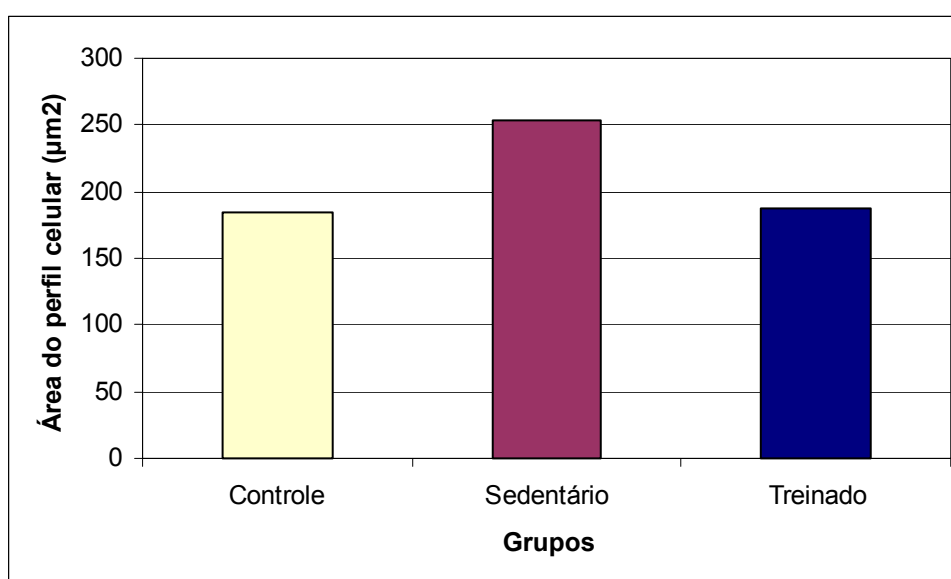


Figura 14 – Número médio de neurônios NADH-diaforase por mm² do duodeno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

4.6.2 Estimativa do Número Total de Neurônios

A estimativa do número total de neurônios dos duodenos, dos três grupos estudados, foi obtida através do produto da densidade neuronal média (mm^2) pela área da superfície do duodeno antes do processamento (a fresco), ambos já apresentados anteriormente.

Os dados referentes ao número total de neurônios NADH e NADPH-diaforase positivos estão apresentados na tabela 6 figura 15. Observou-se redução no número total de neurônios NADPH-diaforase positivos decorrente do envelhecimento, porém esta diferença não se mostrou significativa ($P > 0,5$), sendo que os animais do grupo T apresentaram redução maior no número total dos neurônios que os animais do grupo S.

Para a técnica da NADH-diaforase constatou-se redução do número total de neurônios ao se comparar os animais do grupo C com os animais do grupo S, porém essa diferença não foi significativa ($P > 0,05$). Os animais do grupo T apresentaram o número total de neurônios superior aos animais dos grupos C e S, porém a diferença também não foi significativa ($P > 0,05$).

Tabela 6 - Estimativa do número total dos neurônios (mm^2) NADH e NADPH-diaforase positivos do duodeno dos animais dos grupos C (ratos controle com seis meses), S (ratos de meia-idade sedentários) e T (ratos de meia idade submetidos à atividade física)

Grupos	Estimativa do número total de neurônios (mm^2)	
	NADH	NADPH
C (n=5)	152.709±6.329 ^a	24.903±2.907 ^a
S(n=5)	149.728±8.005 ^a	24.517±2.857 ^a
T(n=5)	174.144±8.041 ^a	18.795±2.191 ^a

* Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($P>0,05$) pelo teste de Tukey.

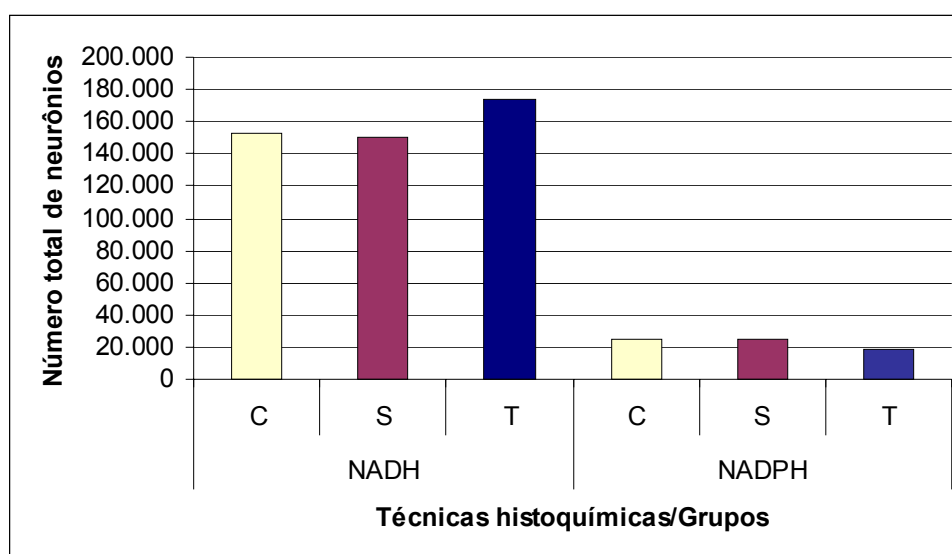


Figura 15 – Estimativa do número total médio dos neurônios NADH e NADPH-diaforase positivos do duodeno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T).

5.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

De acordo com as dimensões do perfil do corpo celular (PC) dos neurônios mioentéricos NADPH e NADH-diaforase positivos, estabeleceu-se a média das mensurações (μm^2) dos três grupos de animais (C, S e T). Os resultados obtidos com as mensurações foram distribuídos em um histograma de frequência de acordo com sua dimensão, utilizando-se intervalos de classe de $150 \mu\text{m}^2$.

A área do PC dos neurônios NADPH-diaforase dos animais do grupo C variou entre $103,019 \mu\text{m}^2$ e $762,6313 \mu\text{m}^2$ com média de $225,66 \pm 8,3 \mu\text{m}^2$. Os animais do grupo S apresentaram neurônios com área do PC variando entre $86,12 \mu\text{m}^2$ e $844,28 \mu\text{m}^2$, com média de $214,35 \pm 12 \mu\text{m}^2$. Já, nos animais do grupo T a média da área do PC foi $194,38 \pm 13,01 \mu\text{m}^2$, com a área do PC dos neurônios variando entre $109,39 \mu\text{m}^2$ e $939,69 \mu\text{m}^2$ (Tabela 7 e Figura 16). Nenhuma diferença significativa ($P > 0,05$) foi observada na área do perfil celular dos neurônios entre os animais dos três grupos estudados (C, S e T).

Tabela 7 - Média da área do perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios NADPH-diaforase positivos do duodeno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

Grupos	Área do perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios NADPH-diaforase positivos
C (n=5)	225,66±8,3 ^a
S(n=5)	214,35±12 ^a
T(n=5)	194,38±13,01 ^a

* Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($P>0,05$) pelo teste de Tukey.

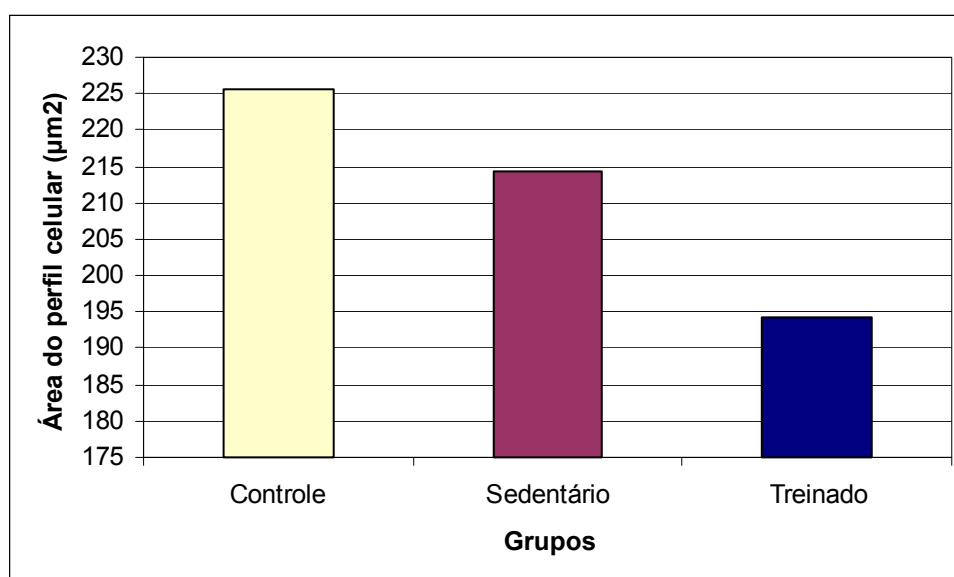


Figura 16 - Média da área do perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos do duodeno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

Nos animais dos grupos C e S predominaram neurônios com a área do PC entre 150 e 300 μm^2 , enquanto que nos animais do grupo T prevaleceram neurônios com área de PC entre 300 e 450 μm^2 (Figura 17).

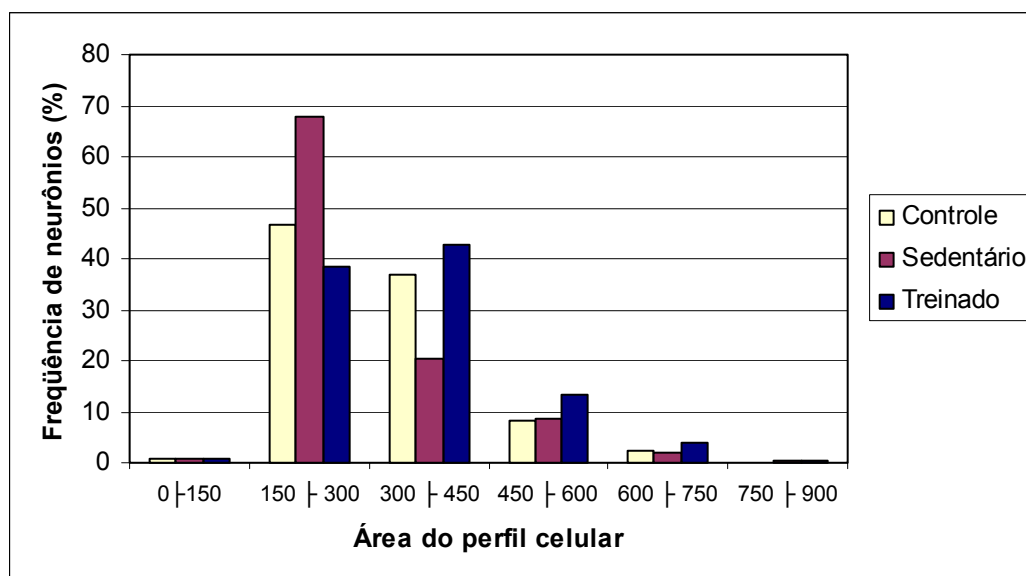


Figura 17 - Histograma de distribuição de frequência da área do perfil celular (%) dos neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos do duodeno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

Para os neurônios evidenciados na técnica da NADH-diaforase, as áreas médias do PC foram $185,14 \pm 7,2 \mu\text{m}^2$, $253,15 \pm 12,8 \mu\text{m}^2$ e $188,13 \pm 4,8 \mu\text{m}^2$ para os animais dos grupos C, S e T, respectivamente.

No grupo C, a área do PC dos neurônios variou entre $68,3 \mu\text{m}^2$ e $574,93 \mu\text{m}^2$. No grupo S a variação foi entre $73,37 \mu\text{m}^2$ e $897,41 \mu\text{m}^2$. Já, nos animais do grupo T a área do PC variou entre $47,61 \mu\text{m}^2$ e $897,41 \mu\text{m}^2$.

Os neurônios dos animais sedentários (grupo S) apresentaram aumento significativo na média da área do PC, quando comparados com os neurônios dos animais dos grupos C e T (Tabela 10 e Figura 18).

Tabela 10 - Média da área do perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios NADH-diaforase positivos do duodeno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

Grupos	Área do perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios NADH-diaforase
C(n=5)	185,14 \pm 7,2 ^a
S(n=5)	253,15 \pm 12,8 ^b
T(n=5)	188,13 \pm 4,8 ^a

* Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ($P>0,05$) pelo teste de Tukey.

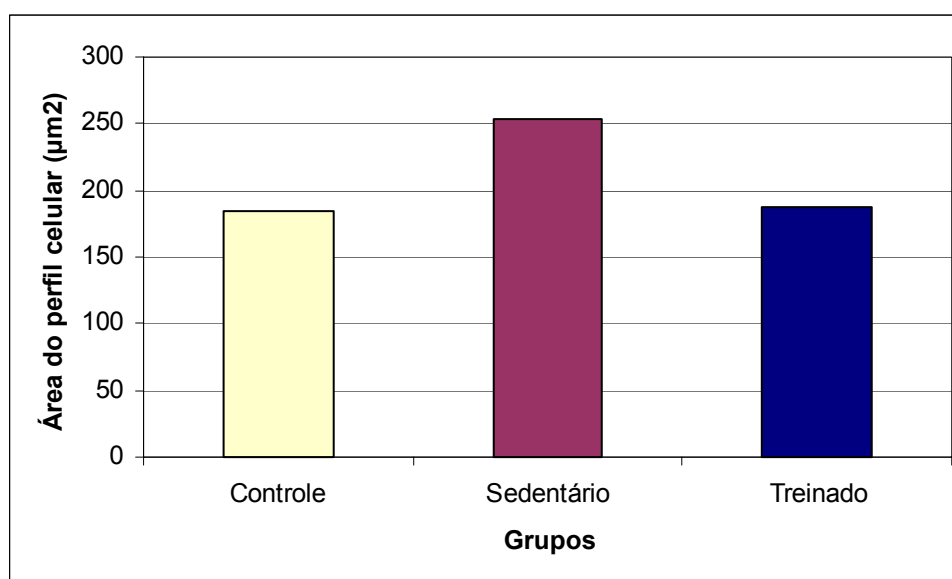


Figura 18 - Média da área do perfil do corpo celular (μm^2) dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos do duodeno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

Nos três grupos (C, S e T) predominaram neurônios NADH-diaforase positivos com área do PC entre 150 e 300 μm^2 (Figura 19).

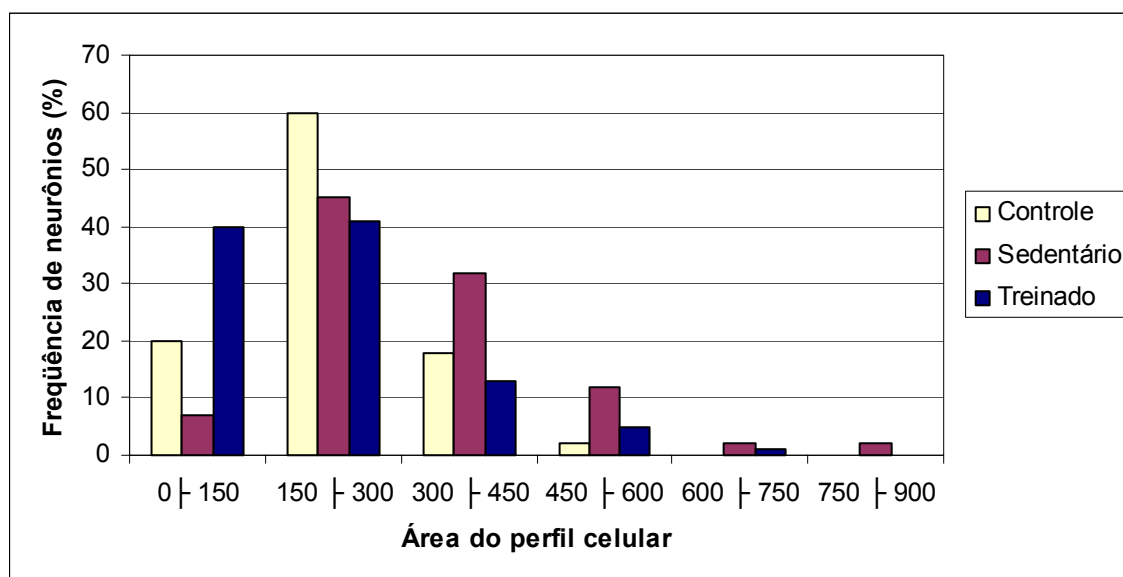


Figura 19 - Histograma de distribuição de frequência da área do perfil celular (%) dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos do duodeno dos animais dos grupos controle (C), sedentário (S) e treinado (T)

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A discussão dos resultados obtidos encontra-se sistematizada nos seguintes tópicos: atividade física, peso corpóreo, análise microscópica do plexo mioentérico, espessura da túnica muscular e da análise quantitativa e morfométrica do plexo mioentérico.

6.1 ATIVIDADE FÍSICA

Estudos com pessoas idosas têm revelado que a atividade física regular pode ser benéfica para a saúde e, conseqüentemente, contribui para a melhoria da qualidade de vida durante o envelhecimento. Na década de 90, os exercícios físicos mais adotados eram de alta intensidade, realizados de 20 a 60 minutos por três ou mais vezes por semana. Entretanto, atualmente, para que o exercício traga benefícios à saúde, recomendam-se programas de atividade física moderados, preferencialmente todos os dias da semana, por um período mínimo de 30 minutos (LIM et al., 2005).

Neste trabalho utilizamos um protocolo de atividade física, onde a intensidade máxima do exercício foi de 60% da carga máxima média obtida em TEMs, realizados em esteira ergométrica conforme Silva et al. (1997). Para tanto, os testes foram realizados mensalmente, sendo desta forma, as cargas ajustadas de acordo com cada

TEM. O tempo de treinamento variou de 30 a 60 minutos e a atividade física (corrida em esteira) foi realizada cinco vezes por semana durante seis meses.

A eficácia do treinamento físico durante o processo de envelhecimento foi verificada por meio do desempenho dos animais nos TEMs. Observamos que, à exceção do primeiro TEM, os animais do grupo T apresentaram melhor performance do que os animais do grupo S ($P < 0,05$). As médias das velocidades obtidas nos TEMs oscilaram de forma diferente nos grupos S e T. Nos animais do grupo S as médias declinaram do primeiro ($0,86 \pm 0,03$ km/h) ao último teste ($0,6 \pm 0,04$ km/h). Já, nos animais do grupo T observou-se inicialmente aumento na média do primeiro ($0,9 \pm 0,03$ km/h) ao quarto teste ($1,3 \pm 0,05$ km/h), seguido de declínio até o último teste ($1,0 \pm 0,05$ km/h).

O processo de envelhecimento promove diminuição no desempenho físico (McARDLE, 1998). Este declínio foi constatado nos TEMs de ambos os grupos (T e S), pois estes animais iniciaram o experimento com seis meses de idade (adultos) e concluíram aos doze meses de idade (meia idade). Contudo, pôde-se observar o efeito benéfico da atividade física na performance destes animais, uma vez que os animais submetidos à atividade física regular (grupo T) obtiveram um desempenho significativamente maior ($P < 0,05$) do que os animais sedentários (grupo S). Além disso, os animais do grupo T apresentaram resultados superiores ($1,0 \pm 0,5$) no último TEM àqueles obtidos no primeiro TEM ($0,9 \pm 0,03$), demonstrando a efetiva contribuição do exercício durante o envelhecimento.

6.2 PESO CORPÓREO

Para se estabelecer as possíveis alterações corporais (peso) decorrentes do exercício físico regular, antes de cada teste de esforço os animais foram pesados, totalizando sete pesagens. Com exceção da última pesagem, onde houve um decréscimo do peso corpóreo, tanto os animais do grupo S quanto os do grupo T ganharam peso durante o experimento. O grupo S teve um ganho de 13,7% no peso em relação ao início do experimento e no grupo T o ganho foi de 10,2%. Contudo, empiricamente, pôde-se observar que os animais do grupo T apresentaram musculatura mais definida, enquanto os animais do grupo S eram mais obesos.

A partir da quinta pesagem, o ganho de peso dos animais do grupo S foi significativamente superior ($P < 0,05$) aos dos animais do grupo T. Já, o peso corpóreo dos animais do grupo C ($439 \pm 13,1$ g) foi significativamente menor ($P < 0,05$) que o do grupo S ($488 \pm 11,6$ g), porém não diferiu do grupo T ($468,5 \pm 9,9$ g), indicando um efeito benéfico da atividade física regular no peso da massa corporal. Sabe-se que com o envelhecimento tem-se maior acúmulo de gordura no organismo, porém indivíduos que participam de programas de atividade física regular tendem a reduzir a “massa gorda” e ganharem “massa magra”, também em função do aumento da lipólise (McARDLE, 1998). Nossos resultados também sugerem que, com o envelhecimento, há aumento no peso corporal, provavelmente, por acúmulo de gordura.

Embora tenhamos observado que os animais do grupo T apresentavam musculatura mais definida do que os animais do grupo S, os resultados indicam que a atividade física realizada neste experimento não foi suficiente para promover aumento relevante na massa muscular. Menor ganho de peso corporal nos indivíduos treinados

em relação a indivíduos sedentários foi também verificada em humanos (KYLE et al., 2004).

6.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO PLEXO MIOENTÉRICO

O conhecimento da localização do plexo mioentérico na parede do órgão é de suma importância quando se pretende utilizar preparados de membrana para análises morfológicas dos neurônios intestinais, pois sinaliza quais túnicas podem ser dissecadas e desprezadas da parede do órgão (MOLINARI et al., 1994).

Desse modo, os cortes histológicos que utilizamos para mensuração da túnica muscular apenas confirmaram a localização do plexo mioentérico entre as camadas da túnica muscular como já amplamente relatada na literatura. Assim, foi possível remover a túnica mucosa e a tela submucosa, preservando as túnicas muscular e serosa, para obtenção de preparados de membrana sem a remoção parcial ou total do plexo mioentérico.

Ao analisarmos os preparados de membrana contendo neurônios NADH e NADPH-diaforase positivos nenhuma diferença entre os grupos estudados (C, S e T) foi encontrada. Os neurônios mioentéricos foram localizados na túnica muscular entre as camadas longitudinal e circular, como descrito para o intestino delgado de ratos (GABELLA, 1979; 1990; GUILFORD, 1990; SANTER; BAKER, 1993; MIRANDA-NETO et al., 2001; HANSEN, 2003), cobaias (IRWIN, 1931; MATSUO, 1934), aves (GABELLA;

HALASY, 1987; MOLINARI et al., 1994), peixes (STABILLE et al., 1998), entre outras espécies de animais.

Os neurônios encontraram-se organizados predominantemente em gânglios, porém neurônios isolados foram também observados. A rede nervosa que interconecta os gânglios apresentaram-se foram melhor visualizada pela técnica da NADPH-diaforase. Esta organização assemelha-se as descrições da organização do plexo mioentérico referidas para mamíferos, aves e roedores, entre outros animais (GABELLA, 1971; MOLINARI et al., 1994; NATALI; MIRANDA-NETO, 1996; SANT'ANA et al., 1997).

Entretanto, a presença de neurônios isolados identificados nesta pesquisa assemelha-se a disposição difusa dos neurônios entéricos relatados em peixes (BURNSTOCK, 1959; SOUZA et al., 1982; STABILLE et al., 1998) e roedores (GABELLA, 1987), sendo mais comuns no jejuno-íleo do que no duodeno e em animais mais velhos (FURLAN, 2000).

Constatamos que a distribuição dos gânglios mioentéricos não foi homogênea conforme a região da circunferência intestinal, sendo a densidade de neurônios maior na região próxima a inserção do mesentério do que na região antimesentérica. Diferenças regionais em outros segmentos intestinais foram relatadas no jejuno de ratos (ZANIN et al., 2001), colo ascendente de ratos (SANT'ANA et al., 1997), colo de cobaia (GABELLA, 1979; IRWIN, 1931), cão, gato e coelho (IRWIN, 1931).

Alterações ultraestruturais celulares relacionadas com o envelhecimento não foram encontradas entre os três grupos estudados (C, S e T), talvez pelo fato dos animais terem 12 meses de idade (meia-idade) ao final do experimento, fase de

processo inicial de envelhecimento. É possível que em animais mais idosos tais alterações sejam melhores evidenciadas.

Uma lâmina de tecido conjuntivo envolvendo cada gânglio foi observada, porém esta não se projetou para o interior do gânglio. Com algumas exceções como, por exemplo, em gatos, humanos e ovelhas nos quais foi constatada a presença de septos de tecido conjuntivo no interior do gânglio mioentérico, o tecido conjuntivo limita-se a periferia do gânglio (GABELLA, 1982; 1990). Acredita-se que a exclusão deste do interior dos gânglios dos plexos entéricos se dê durante o desenvolvimento (GABELLA, 1982).

A presença de tecido conjuntivo com seus feixes colágenos em torno dos gânglios, confere sustentação e proteção aos neurônios e aos vasos sanguíneos localizados na túnica muscular dos segmentos gastrintestinais (GABELLA; HALASY, 1987; MOLINARI et al., 1994).

Devido à localização entre as camadas da túnica muscular, o plexo mioentérico é afetado pela contração muscular, contudo o envoltório de tecido conjuntivo confere proteção aos glânglios. Assim, a presença de septos conjuntivos intra-ganglionares em vertebrados de grande porte, ausente em outros animais como os roedores, representa um reforço de proteção ao gânglio contra os vigorosos movimentos peristálticos realizados pelo intestino dos grandes mamíferos (GABELLA, 1982).

A lâmina de tecido conjuntivo, que representa o envoltório ganglionar, nos animais do grupo S apresentou fibras colágenas visivelmente mais dispersas do que nos grupos T e C. Embora a dispersão das fibras não tenha sido quantificada, ela não foi observada nos animais dos grupos T e C. Essas observações sugerem a ocorrência

de desorganização do envoltório conjuntivo ganglionar com o envelhecimento, que em animais mais idosos, do que os utilizados por nós, poderia ser mais evidente.

Por outro lado, pode-se sugerir que a atividade física moderada contribuiu para a manutenção das fibras colágenas, uma vez que os animais treinados mantiveram o envoltório ganglionar com características morfológicas semelhantes as dos animais adultos (grupo C).

No espaço periganglionar que separa os gânglios das fibras musculares foram evidenciados fibroblasto e capilares. A presença de capilares localizados externamente ao gânglio reforça as descrições da literatura que afirmam que o interior dos gânglios do plexo mioentérico é avascular (GABELLA, 1979; STERNINI, 1998).

Os capilares mioentéricos estão localizados fora dos gânglios (espaço periganglionar) e, segundo Gabella (1982), são semelhantes àqueles encontrados no sistema nervoso central, ou seja, não apresentam fenestrações parietais tornando-se, assim, menos permeáveis do que aqueles encontrados na mucosa intestinal. Gabella (1982) sugere a presença de barreira sanguínea mioentérica à semelhança da barreira hematoencefálica do sistema nervoso central, a qual promoveria maior proteção para os neurônios mioentéricos.

Em todos os grupos estudados observou-se um vasto neurópilo contendo processos neurais e células da glia. As terminações nervosas apresentavam vesículas sinápticas granulares e agranulares também descritas por Gabella (1990), Natali (1999) e Safrey (2004). Segundo Gabella (1982), no plexo mioentérico há predominância de vesículas agranulares, especialmente no intestino grosso, uma vez que a acetilcolina é responsável pela contração da musculatura, promovendo o peristaltismo intestinal.

A presença das vesículas sinápticas é de grande importância no tráfego de impulsos nervosos no interior do gânglio, uma vez que estas podem armazenar diferentes tipos de neurotransmissores os quais determinam a função neuronal a ser desempenhada (GABELLA, 1982).

A membrana plasmática dos neurônios mioentéricos está delineada externamente pela lâmina basal (GABELLA, 1982; 1990; SAFREY, 2004; STERNINI, 1988). Nos animais dos grupos C e T a membrana basal estava mais bem preservada do que nos animais sedentários (grupo S). Desta maneira, pode-se inferir a influência benéfica da atividade física na manutenção da membrana basal durante o processo de envelhecimento.

As organelas citoplasmáticas como mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e ribossomos, encontradas distribuídas pelo citoplasma, apresentaram-se íntegras nos grupos estudados, sugerindo que as células estavam metabolicamente ativas e viáveis, o que pode ser comprovado pela presença de eucromatina nos núcleos dos neurônios dos três grupos analisados. Ressalta-se que, quando em atividade de síntese protéica, o DNA nucléico encontra-se mais descompactado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

Ultraestruturalmente, foi possível constatar que a atividade física contribuiu para a preservação do tecido colágeno e da membrana basal dos neurônios mioentéricos, permitindo que os animais treinados apresentassem morfologia e organização das células nervosas semelhante aos animais adultos (grupo C).

6.4 ESPESSURA DA TÚNICA MUSCULAR

A musculatura lisa é responsável pela contração de vários órgãos, tais como: vasos sanguíneos, segmentos do TGI, vesícula biliar, bexiga e útero. No TGI, a principal função da musculatura é propulsionar e misturar o conteúdo intraluminal, para uma eficiente digestão e absorção (BITAR, 2005).

O envelhecimento influencia a contração da musculatura lisa dos diferentes órgãos e no TGI é responsável por redução no peristaltismo, que leva a disfunções na motilidade gastrointestinal.

Em nossos resultados observamos que houve aumento, ainda que não significativo ($P>0,05$), na espessura da túnica muscular dos animais dos grupos S ($163,3\pm 48$ mm) e T ($141,8\pm 39$ mm) quando comparada aos animais do grupo C ($115,7\pm 33$ mm). Contudo, em relação ao grupo C, nos animais do grupo S a espessura da túnica muscular aumentou 29,1% e nos do grupo T a espessura foi aumentada em 18,4%, valor inferior ao verificado no grupo S.

Durante o processo de envelhecimento ocorre uma desnervação parcial ou completa da musculatura lisa, levando a hipertrofia compensatória da mesma (SOUZA et al., 1993), o que justificaria o aumento na espessura da túnica muscular dos grupos S e T. Contudo, nos animais do grupo T a atividade física regular minimizou os efeitos do envelhecimento sobre a musculatura lisa intestinal, contribuindo para que o espessamento da túnica muscular fosse menor nos animais do grupo T (18,4%) quando comparados aos do grupo S (29,1%).

6.5 ANÁLISE QUANTITATIVA E MORFOMÉTRICA DO PLEXO MIOENTÉRICO

A análise quantitativa e morfométrica do plexo mioentérico foi realizada por meio de microscopia de luz e analisador computadorizado de imagens em preparados de membrana do duodeno. A elaboração de preparados de membrana permite estudo de um grande número de gânglios em uma pequena amostra de tecido. Entretanto, devido à distribuição dos neurônios variarem conforme a área da superfície intestinal utilizamos um sistema teste para capturar as imagens para as análises quantitativas e morfométricas, a fim de amostrar igualmente todas as regiões do preparado de membrana (mesentérica, intermediária e antimesentérica).

Ao longo do desenvolvimento, é verificado um aumento no comprimento e no diâmetro dos segmentos do TGI, provocando uma diluição da densidade neuronal que levaria a redução aparente no número dos neurônios entéricos (GABELLA, 1989). Para contornar esse problema, é descrita na literatura a utilização de um fator de correção para evitar erros nas análises quantitativas e morfométricas. Este fator é obtido pela razão entre a área do intestino de um animal jovem pela área de um animal senil (GABELLA, 1989; JOHNSON et al., 1998; PHILLIPS; KIEFFER; POWLEY, 2003; PHILLIPS; POWLEY, 2001). Entretanto, não utilizamos este fator de correção em nossas análises, pois não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) na área duodenal dos grupos estudados (grupos C, S e T).

Outro fator a ser considerado é que, durante as etapas de processamento dos segmentos intestinais, em que se utilizam diferentes soluções para marcação e fixação neuronal e, até mesmo, durante a microdissecção para obtenção de preparados de

membrana, podem ocorrer modificações na área intestinal, que levam a alterações na análise dos resultados (SOUZA et al., 1993). Por esse motivo, utilizamos neste trabalho um fator de correção obtido pela diferença encontrada entre a área do segmento antes (“a fresco”) e após processamento, a fim de eliminar possíveis interferências nos resultados obtidos.

Não verificamos diferenças significativas ($P > 0,05$) entre a área intestinal “a fresco” das amostras submetidas à técnica da NADH e NADPH-diaforase. Entretanto, após o processamento, observou-se apenas nos intestinos submetidos à técnica da NADPH-diaforase diferença significativa ($P < 0,05$) entre a área intestinal dos animais treinados ($1167 \pm 151,5 \text{ mm}^2$) em relação aos animais sedentários ($931,8 \pm 59,3 \text{ mm}^2$). Essa diferença reforçou a necessidade de aplicação do fator de correção, para eliminar interferências resultantes do processamento do material nos dados quantitativos e morfométricos obtidos.

Desde tempos remotos, foram desenvolvidos diferentes métodos para evidenciar neurônios como a impregnação por prata, as colorações com azul de metileno, as técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas são utilizados para avaliação da população neuronal mioentérica (GABELLA, 1969; SANTER, 1994).

Nesta pesquisa utilizamos as técnicas histoquímicas da NADH e NADPH-diaforase para marcação dos neurônios mioentéricos. A técnica da NADH-diaforase permite evidenciar cerca de 80% do número total de neurônios (YOUNG et al., 1993), marcando os neurônios metabolicamente ativos. Já a técnica da NADPH-diaforase evidencia os neurônios que sintetizam óxido nítrico (NO), um neurotransmissor inibitório da musculatura intestinal (FURNESS, 2000; FURNESS et al., 1992; SANDERS; WARD, 1992).

Os neurônios que expressam NO têm sido identificados também por meio das técnicas de imunohistoquímica para marcação da enzima oxido nítrico sintase (NOS), sendo que, a distribuição da atividade NADPH-diaforase nos neurônios entéricos tem-se mostrado idêntica a imunorreatividade a NOS (BELAI; COOPER; BURNSTOCK, 1995; FURNESS et al., 1994).

Na análise dos neurônios NADH-diaforase positivos não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) na densidade média dos neurônios (mm^2) entre os grupos, apesar da redução na densidade neuronal ao se compararem as médias obtidas nos animais do grupo S ($262,7 \pm 14$) com os animais do grupo C ($277,6 \pm 11,5$).

A perda de neurônios com o envelhecimento tardio foi verificada no intestino delgado de ratos (SANTER; BAKER, 1988) e cobaias (GABELLA, 1989) e no colo de ratos (PHILLIPS; KIEFFER; POWLEY, 2003; PHILLIPS; POWLEY, 2001). Souza et al. (1993) relatam a diminuição de 34% no número de neurônios mioentéricos do intestino delgado de humanos, sendo que no duodeno a redução na densidade mostrou-se maior que nos demais segmentos intestinais.

Nos animais de meia idade submetidos à atividade física regular (grupo T) constatamos, porém, que o número médio de neurônios NADH-diaforase positivos foi 7% maior que nos animais sedentários de mesma idade (grupo S). Não há relatos na literatura científica sobre o efeito da atividade física sobre os neurônios mioentéricos. Assim, nossos resultados, embora não significativos estatisticamente, sugerem que a atividade física regular ao longo do envelhecimento favoreça uma possível manutenção dos fatores neurotróficos como descrito por Wade; Cowen (2004), ou contribua para maior resistência dos neurônios aos radicais livres (JOHNSON et al., 1998).

A maioria dos neurônios NADH-diaforase do grupo T (41%), grupo S (45%) e C (60%) apresentaram área do PC variando entre 150-300 μm^2 . A média da área do PC dos neurônios dos animais dos grupos S ($253,1 \pm 12,8 \mu\text{m}^2$) e T ($188,13 \pm 4,8 \mu\text{m}^2$) foi maior do que a dos animais do grupo C ($182,14 \pm 7,2 \mu\text{m}^2$). Esta diferença mostrou-se significativa ($P < 0,05$) entre os grupos S e C, sugerindo que a atividade física atuou de forma benéfica sobre a área do PC dos neurônios NADH-diaforase positivos, uma vez que não houve diferença estatística significativa entre os animais treinados (grupo T) e os adultos (grupo C).

Segundo Gabella (1971), a redução na densidade neuronal resulta em aumento de tamanho dos neurônios devido à redistribuição de tarefas entre os neurônios remanescentes. Desta maneira, os neurônios aumentam sua taxa metabólica e, conseqüentemente, o volume citoplasmático. Portanto, o aumento da área do PC verificado no grupo S pode ser decorrente da redução de 5,4% na densidade neuronal em relação aos animais controle (grupo C).

A densidade dos neurônios nitrérgicos (mm^2) não revelou diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos, embora tenha ocorrido redução na densidade dos neurônios NADPH-diaforase positivos com o envelhecimento. Sendo que, os grupos T e S apresentaram reduções de 22,5% e de 10% em relação ao grupo C, respectivamente.

O processo de envelhecimento pode promover considerável redução numérica neuronal, acarretando a reorganização dos neurônios mioentéricos (GABELLA, 1989). Nossos resultados sugerem que a diminuição da densidade neuronal (neurônios NADPH-diaforase positivos) foi gradativa durante esse processo. Segundo Hall (2002),

mudanças na densidade neuronal são melhores observadas em animais com idade avançada (28 meses de idade). Este fato poderia explicar a ausência de diferenças estatísticas significativas da densidade dos neurônios nitrérgicos entre os grupos, uma vez que trabalhamos com animais adultos (seis meses – grupo C) e de meia idade (doze meses – grupos S e T).

No íleo e colo de ratos, Johnson et al. (1998) e Takahashi et al. (2000), respectivamente, verificaram diminuição significativa no número de neurônios nitrérgicos com o envelhecimento. Diminuição neuronal quantitativa também foi relatada no intestino delgado de suínos nas fases iniciais do desenvolvimento (VAN GINNEKEN et al., 2001). Entretanto, em roedores, algumas pesquisas com intestino delgado e grosso não mencionam redução no número de neurônios que expressam NO com o envelhecimento (PHILLIPS; KIEFFER; POWLEY, 2003; SANTER, 1994).

De maneira geral, a atividade dos neurônios simpáticos após a atividade física é diminuída (KRIEGER; BRUM; NEGRÃO, 1999; LIU; KULAKOFSKY; ZUCKER, 2002), contribuindo para estimular o peristaltismo intestinal. Do mesmo modo, a atividade física moderada também poderia inibir os neurônios mioentéricos nitrérgicos, diminuindo a síntese e expressão de NO nesses neurônios e tornando-os menos reativos à técnica da NADPH-diaforase, justificando a redução de 22,5% na densidade neuronal nos animais do grupo T quando comparados aos do grupo C.

Entre os neurônios NADPH-diaforase dos grupos C e S predominaram neurônios com área do PC entre 150 e 300 μm^2 . Já, os animais do grupo T apresentaram neurônios com área do PC variando entre 300 e 450 μm^2 . Não houve diferenças significativas ($P>0,05$) entre as médias das áreas do PC entre os grupos C

(225,66±8,3), S (214,35±12) e T (194,38±13,01). Contudo, ainda que não significativa ($P>0,05$), ocorreu redução na área do PC destes neurônios com o envelhecimento, porém o grupo T apresentou redução de 5% enquanto que no grupo S a diminuição foi de 14% quando comparado com os animais do grupo C, indicando, mais uma vez, os benefícios da atividade física moderada sobre as alterações decorrentes do envelhecimento.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Baseados nos resultados obtidos podemos concluir que:

- o arranjo do plexo mioentérico do duodeno não difere, quando comparados ratos adultos (seis meses) com ratos de meia idade (doze meses) sedentários e submetidos a programa de atividade física;
- a ultraestrutura celular dos neurônios mioentéricos do duodeno é preservada em ratos de doze meses de idade;
- a membrana basal é mais delineada e as fibras colágenas mais agrupadas nos gânglios mioentéricos do duodeno dos animais adultos e de meia idade treinados em relação aos animais de meia idade sedentários;
- a espessura da túnica muscular aumenta com o envelhecimento, porém o aumento é menor nos animais submetidos à atividade física regular;
- a densidade dos neurônios NADH-diaforase positivos do duodeno de ratos diminui com o envelhecimento e aumenta com a prática de atividade física;
- a densidade dos neurônios NADPH-diaforase positivos do duodeno de ratos diminui com o envelhecimento e com a prática de atividade física;

- a área do perfil celular dos neurônios NADH-diaforase positivos não é alterada com o envelhecimento, porém aumenta com a atividade física;
- a área do perfil celular dos neurônios NADPH-diaforase positivos não é alterada com o envelhecimento e com a prática de atividade física regular.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ANURAS, S.; LEONING-BAUCKE, V. Gastrointestinal motility in the elderly. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v. 32, p. 386-390, 1984.
- BANKS, W.J. **Histologia veterinária aplicada**. Editora Manole LTDA, 2ed, p 425-462, 1992.
- BELAI, A.; COOPER, S.; BURNSTOCK, G. Effect of age on NADPH-diaforase-containing myenteric neurones of rat ileum and proximal colon. **Cell Tissue Research**, v. 279, p. 379-383, 1995.
- BROCKLEHURST, J. C. Colonic disease in the elderly. In: JAMES, O.F.W. **Clinics in Gastroenterology**. p. 725-747, 1985.
- BROGNA, A.; FERRARA, R.; BUCCERI, A. M.; LANTERI, E.; CATALANO, F. Influence of aging on gastrointestinal transit time. **Invest. Radiol.**, v. 34, p. 357-359, 1999.
- BROOKES, S.J.H. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. **The Anatomical Record**. v. 262, p. 58-70, 2001.
- BURNSTOCK, G. The innervation of the gut of the brown trout (*Salmo trutta*). **Q. J. Microscopic. Sci.**, v.100, p. 109-120, 1959.
- BUTT, W. G.; WANG, I. S.; KAUFMAN, S. T.; RYAN, J. P.; COHEN, S. Age-related changes in rat colon mechanics. **Gastrointest. Mot.**, v. 5, p. 123-128, 1993.
- CLARKSTON, W. K.; PANTANO, M. M.; MORLY, J. E.; HOROWITZ, M.; LITTLEFIELD, J. M.; BURTON, F.R. Evidence for anorexia of aging. Gastrointestinal transit and hunger in healthy elderly vs. Young adults. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. 243-248, 1996.
- COSTA, M.; SIMON, F. A. A.; BROOKS, J. H. The enteric nervous system. **The American Journal of Gastroenterology**. v. 89, n. 8, p. 125-137, 1994.
- CRACCO, C.; FILOGRAMO, G. Quatitative study of the NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons of the rat ileum. **Neuroscience**. v.61, n. 2, p. 351-359, 1994.
- CUNNINGHAM, J.C. **Tratado de fisiologia veterinária**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. p. 177-182, 1993.
- DISHMAN, R. K.; ARMSTRONG, R. B.; DELP, M. D.; GRAHAM, R. E.; DUNN, A. L. Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats. **Physiol. Behav.**, v. 43, p. 541-546, 1988.

EL-SALHY, M; SANDSTRÖM, O.; HOLMLUND, F. Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 107, p. 93-103, 1999.

FOX, E.L.; BOWERS, R.W.; FOSS, M.L. **Bases fisiológicas da educação física e dos desportos.**, Guanabara Koogan, 1991.

FURLAN, M.M.D.P. Avaliação morfométria de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos normais e com diabetes experimental. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**. v. 5, n. 2, p. 141-147, 2001.

FURLAN, M.M.D.P. Ontogenia e filogenia do sistema nervoso entérico. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**. v. 4, n. 2, p. 149-57, 2000.

FURNESS, J. B.; BORNSTEIN, J. C.; MURPHY, R.; POMPOLO, S. Roles of peptides in transmission in the enteric nervous system. **TINS**, v. 15, p. 66-71, 1992.

FURNESS, J. B.; LI, Z. S.; YOUNG, H. M.; FORSTERMANN, U. Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. **Cell Tissue Research**, v. 277, p. 139-149, 1994.

FURNESS, J. B. Types of neurons in the myenteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**. v. 81, p. 87-96, 2000.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. The enteric nervous system. **Churchill Livingstone**, Edinburgh, 1987.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. Types of nerves in the enteric nervous system. **Neuroscience**. v. 5, p. 1-20, 1980.

GABELLA, G. **Autonomic nervous system**. In: The rat nervous system. (Paxinos, ed). London: Academic Press, 1995.

GABELLA, G. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea-pigs. **Gastroenterology**. v. 96, p.1487-1493, 1989.

GABELLA, G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. **Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 737-752, 1987.

GABELLA, G. Innervation of the gastrointestinal tract. **Intern. Rev. Cytol.**, New York, v. 59, p. 129-193, 1979.

GABELLA, G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. **J. Anat.**, v. 109, p. 81-95, 1971.

GABELLA, G. On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. **Journal of the Autonomic Nervous System**. v. 30, p. S59-S66, 1990.

GABELLA, G. On the ultrastructure of the enteric nerve ganglia. **Scand. J. Gastroenterol**. v. 71, p.15-25. 1982.

GABELLA, G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. **Experientia**, v. 25, p. 218-219, 1969.

GABELLA, R.; HALSY, K. On the nerve plexus of the chickens gizzard. **Anat. Embryol.**, v. 177, p. 97-103, 1987.

Geldre, L.A. V.; Lefebvre, R. A. Interaction of NO and VIP in Gastrointestinal Smooth Muscle Relaxation. **Current Pharmaceutical Design**, v.10, n. 20, p. 2483-2497, 2004.

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

GRUNDY, D.; SCHEMANN, M. Enteric nervous system. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 176-182, 2005.

GUILFORD, W. G. The enteric nervous system: function, dysfunction, and pharmacological manipulation. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery*. v. 5, n.1, p.46-56. 1990.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Princípios gerais da função gastrointestinal - motilidade, controle nervoso e circulação. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. 10ed. São Paulo: Guanabara Koogan, p. 668-676, 2002.

HALL, K. E. Aging and neural control of the GI tract II. Neural control of the aging gut: can an old dog learn new tricks? **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 283, p. G827-G832, 2002.

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

HANSEN, M. B. The enteric nervous system I: organisation and classification. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v. 92, p. 105-113, 2002.

HEATH, J. W.; YOUNG, B. O trato gastrointestinal. **Histologia funcional**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 4ed., p. 249-285, 2001.

HOLLINS, J. B.; CASTELL, D. O. Esophageal function in elderly men. A new look at presbyoesophagus. **Ann. Intern. Med.** v. 80, p. 371, 1974.

HOROWITZ, M.; MADDERN, G. J.; CHATTERTON, B. E.; COLLINS, P. J.; HARDING, P. E.; SHERMAN, D. J. Changes in gastric emptying with age. **Clin. Sci.**, v. 67, p. 213-218, 1984.

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

IRWIN, D.A. The anatomy of Auerbach's plexus. **Am. J. Anat.**, v. 49, p. 141-166, 1931.

- JARVINEN, M. K.; WOLLMANN, W. J.; POWROZEK, T. A.; SCHULTZ, J. A.; POWLEY, T. L. Nitric oxide synthase-containing neurons in the myenteric plexus of the rat gastrointestinal tract: distribution and regional density. **Anat. Embryol.**, v. 199, p. 99-112, 1999.
- JOHNSON, R. J. R.; SCHEMANN, M.; SANTER, R. M.; COWEN, T. The effects of age on the overall population and sub-population of myenteric neurons in the rat small intestine. **J. Anat.**, v. 192, p. 479-488, 1998.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. O Trato digestivo. In: **Histologia básica**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 10 ed. p. 284-314, 2004.
- KRIEGER, E.M.; BRUM, P.C.; NEGRÃO, C.E. Influence of exercise training on neurogenic control of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 34, p.720-723, 1999.
- KYLE, U. G.; GENTON, L.; GREMION, G.; SLOSMAN, D. O.; PICHARD, C. Aging, physical activity and height-normalized body composition parameters. **Clin. Nutr.**, v. 23, p. 79-88, 2004.
- LIERE, V. J. E.; HESS, H.H.; EDARDS, J. E. Effect of physical training on the propulsive motility of the small intestine. **Physical training on intestinal motility**, p. 186-187, 1954.
- LIM, B.E.K.; TAYLOR, L. Factors associated with physical activity among older people a population based study. **Preventive Medicine**. v. 40, p. 33-40, 2005.
- LIU, J.; KULAKOFSKY, J.; ZUCKER, I.H. Exercise training enhances baroreflex control of heart rate by a vagal mechanism in rabbits with heart failure. **J. Appl. Physiol.**, v. 92, p. 2403-2408, 2002.
- McARDLE, W. D. Atividade física, saúde e envelhecimento. In: _____. **Fisiologia do exercício**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.. p. 605-633,1998.
- McDOUGLAS, J. N.; MILLER, M. S.; BURKS, T. F.; KREULEN, D. L. Age-related changes in colonic function in rats. **American Journal of Physiology**. v. 247, p. 542-546, 1984.
- MADSEN, J. L.: Effect of gender, age and body mass index on gastrointestinal transit. **Times Dig. Dis. Sci.**, v. 37, p. 1548-1553, 1992.
- MATSUO, H. A contribution on the anatomy of auerbach's plexus. **Jap. J. Med. Sci. Anatomy**. v.4, p.417-428.1934.
- MECIANO-FILHO J.; CARVALHO, V.C.; de SOUZA, R.R. Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age: a preliminary investigation. **Gerontology**. v.41, p. 18-21, 1995.
- MIRANDA-NETO, M. H.; FURLAN, M. M. D. P.; SANT'ANA, D. M. G.; MOLINARI, S. L. Evaluation of the areas of neuronal cell bodies and nuclei in the myenteric plexus of the duodenum of adult rats. **Arq. Neuropsiquiatr**. v. 58, n. 2A, 2000.

MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L.; NATALI, M. R. M.; SANT'ANA, D. M. G. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of neuronal identification. **Arq. Neuropsiquiatria**, v. 59, n.1, p. 54-59, 2001.

MOLINARI *et al.* Estudo morfológico do plexo mioentérico do estômago glandular do pato (*Anas sp.*). Revista Unimar, v.16, n.2, p.419-426, 1994.

MOORE, J. G.; TWEEDY, C.; CHRISTIAN, P. E. Effect of age on gastric emptying of liquid-solid meals in man. **Dig. Sci.**, v. 28, p. 340-340, 1983.

NATALI, M. R. M. **Estudo morfoquantitativo e ultra-estrutural do plexo mioentérico do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos submetidos a carência protéica.** 1999. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Botucatu, 1999.

NATALI, M.R.M.; MIRANDA-NETO, M.H. Effect of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of the duodenum of rats. **Arq Neuropsiquiatria**. v.54, p. 273-279, 1996.

OLIVEIRA, R. J.; FURTADO, A. C. Envelhecimento, sistema nervoso e o exercício físico. <http://www.efdeportes.com/com/revistadigital>. Ano 4. n.15 Buenos Aires, 1999.

PETERS, H.P.; DeWRIES, W.R.; VANBERGE-HENEGOUWEN, G.P.; AKKERMANS, L.M. Potential benefits and hazards of physical activity and exercise on the gastrointestinal tract. **Gut**. v. 48, n.3, p. 435-439, 2001.

PHILLIPS, R. J.; KIEFFER, E. J.; POWLEY, T. L. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**. v. 106, p. 69-83, 2003.

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

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

ROBERTSON, G.; MESHKINPOUR, H.; VANDENBERG, K.; JAMES, N.; COHEN, A.; WILSON, A. effects of exercise on total and segmental colon transit. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 16, n. 4, p. 300-3003, 1993.

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

SANDERS, K. M.; WARD, S. M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. 379-G392, 1992.

SANT'ANA, D. M. G. *et al.* Neurons number in the myenteric plexus of the ascending colon of rats. A comparative study using two staining techniques. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 55, n.3, p.460-465, 1997.

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

SANTER, R. M.; BAKER, D. M. Enteric system In: AMENTA, F. **Aging of the autonomic nervous system**. CRC Press, p. 214-221, 1993.

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

SCHEMANN, M.; NEUROLIST, M. The Human enteric nervous system. v. 16, n. 1, p. 55-59, 2004.

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

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

SIMREN, M. Physical activity and the gastrointestinal tract. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.14, n.10, p. 1053-1056, 2002.

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

SOERGEL, K. H.; ZBORALSKE, F. F.; AMBERG, J. R. Presbyesophageal motility in nongenarians. **J. Clin. Invest.**, v. 43, p. 1472, 1964.

SOUZA, R.R. *et al.* Myenteric plexus in a fresh water teleost intestine. I-Quantitative study of nerve cells. **Anat. Anz.**, v.152, p. 359-362, 1982.

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

STABILLE, S. R.; LIMA, M. A.; GERMANO, R. M. Morphoquantitative characteristics of myenteric neurons of the terminal segment of the intestine of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) Osteichthyes, Cyprinidae. **Bras. J. Morphol. Sci.** v.16, n.1, p. 39-44, 1998.

STERNINI, C. Structural and chemical organization of the myenteric plexus. **Ann. Ver. Physiol.** v. 50, p. 81-93, 1988.

SZWEDA, P. A.; CAMOUSE, M.; LUNDBERG, K. C.; OBERLEY, T. D.; SZWEDA, L. I. Aging, lipofuscin formation, and free radical-mediated inhibition of cellular proteolytic systems. **Ageing Research Reviews**. v. 2, p. 383-405, 2003.

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

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

VAN PRAAG, H.; CHRISTIE, B.R.; SEJNOWSKI, T.J.; GAGE, F.H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **PNAS**, v. 96, n.23, p.13427-13431, 1999.

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

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

WILEY, J. W. Aging and neural control of the GI tract III. Senescent enteric nervous system: lessons from extraintestinal sites and nonmammalian species. **Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol**. v. 46, p. G1020-G1026, 2002.

WOOD, J. D. Application of classification schemes to the enteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**. v. 48, p. 17-29, 1994.

YOUNG, H. M.; FURNESS, J. B.; SEWELL, P.; BURCHER, E. F.; KANDIAH, C.J. Total numbers of neurons in myenteric ganglia of the guinea-pig small intestine. **Cell Tissue Research**. v. 272, p. 197-200, 1993.

ZANIN, S. M. T.; MOLINARI, S.L.; SANT'ANA, D.M.G.; MIRANDA-NETO, M. H. Densidade dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos do jejuno de ratos (*Rattus norvegicus*). **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**. V. 5, n. 1, p. 03-07, 2001.

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](#)