



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

WAGNER NANNI

**AVALIAÇÃO MORFOQUANTITATIVA DE NEURÔNIOS
MIENTÉRICOS DO CÓLON PROXIMAL DE RATOS
TRATADOS COM O HERBICIDA ÁCIDO 2,4
DICLOROFENOXIACÉTICO**

UMUARAMA, 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



WAGNER NANNI

**AVALIAÇÃO MORFOQUANTITATIVA DE NEURÔNIOS
MIENTÉRICOS DO CÓLON PROXIMAL DE RATOS
TRATADOS COM O HERBICIDA ÁCIDO 2,4
DICLOROFENOXIACÉTICO**

Dissertação apresentada a Universidade Paranaense como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, sob a orientação da profa. Dra. Sandra Regina Stabile.

UMUARAMA, 2010



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR

Mestrado em Ciência Animal

WAGNER NANNI

**AVALIAÇÃO MORFOQUANTITATIVA DE NEURÔNIOS
MIENTÉRICOS DO CÓLON PROXIMAL DE RATOS TRATADOS COM
O HERBICIDA ÁCIDO 2,4 DICLOROFENOXIACÉTICO**

ORIENTADORA: Profa. Dra. SANDRA REGINA STABILLE

Aprovada em: 26/03/2010

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Sandra Regina Stabile - Presidente _____

Profa. Dra. Renata de Britto Mari _____

Profa. Dra. Sônia Trannin de Mello _____

Umuarama, 26 de Março de 2010

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, por toda força, ajuda e motivação, sendo muito importante nesse momento para mim.

AGRADECIMENTOS

À equipe do laboratório de pesquisa em Ciência Animal da Unipar – *campus* Paranavaí - pelo apoio, incentivo e auxílio na execução deste trabalho.

À professora Dra. Sandra Regina Stabille pela amizade e dedicação na orientação de nosso trabalho.

Ao professor Dr. Aristeu Vieira da Silva pela compreensão, paciência e estímulo.

Ao meu grande amigo Robson Ribeiro, por toda ajuda e motivação na conclusão desse trabalho.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Unipar pelos ensinamentos.

Aos funcionários da secretaria do programa de Pós-Graduação *stricto sensu* pela presteza e atenção.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que finalizássemos essa etapa.

“... Nada é fixo para aquele que
alternadamente pensa e sonha...”

Gaston Bachelard



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR

Mestrado em Ciência Animal

NANNI, W., STABILLE, S. R. **Avaliação morfoquantitativa de neurônios mientéricos do cólon proximal de ratos tratados com o herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético.** DISSERTAÇÃO (MESTRADO) MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL. UNIVERSIDADE PARANAENSE, 2010, 74 p.

RESUMO

Os sintomas decorrentes da neurotoxicidade do ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) incluem rigidez, letargia e anorexia, irritação gastrintestinal, náuseas, vômitos e diarréia e não se conhece seus efeitos no plexo mientérico. Considerando a utilização deste herbicida na agricultura, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da ingestão de 2,4-D sobre alguns aspectos quantitativos e morfométricos de neurônios mientéricos do cólon proximal de ratos. Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) Wistar de 60 dias de idade. Por 15 dias, foi fornecida, via gavagem, dose de 2,4-D (5 mg/kg/dia) diluída em 1 mL de água aos ratos (n = 5) do grupo experimental (grupo E). Um grupo controle de ratos (n = 5) permaneceu igual período sem receber 2,4-D. Os animais foram pesados diariamente para ajuste da dose de 2,4-D e receberam ração comercial Nuvital® e água sem restrição. Após eutanásia com dose letal de tiopental (40 mg/Kg), o cólon proximal foi retirado e, após ter a área mensurada, foi submetido aos procedimentos para obtenção de preparados de membrana corados pela técnica de Giemsa e histoquímica da NADPH-diaforase (NADPH-d) para evidenciar neurônios. Os preparados de membrana do cólon proximal foram analisados ao microscópio de luz (aumento de 400x). As imagens visualizadas em 120 campos de cada preparado de membrana foram capturadas por câmera digital acoplada ao microscópio. A área de cada campo visualizado ao microscópio equivaleu a 0,096 mm². Os neurônios mientéricos foram quantificados e tiveram a área do pericário mensurada por meio de programa de análise de imagens. A normalidade dos dados foi testada usando o teste de Shapiro Wilk. Os resultados obtidos na mensuração da área do cólon proximal e na análise morfoquantitativa dos neurônios dos grupos C e E foram comparados usando teste t de Student (dados com distribuição normal) ou teste de Mann-Whitney (dados com distribuição

livre). O peso dos animais e a área do cólon proximal não diferiram ($p>0,05$) entre os grupos E e C. Para a população total de neurônios, a densidade neuronal no grupo E ($78,21 \pm 12,57$ neurônios/ mm^2 de cólon) não diferiu ($p>0,05$) do grupo C ($77,84 \pm 7,54$ neurônios/ mm^2) e a área do pericário foi ~13,5% maior ($p<0,05$) para o grupo E. No grupo E, neurônios com área do pericário igual ou superior a $300 \mu\text{m}^2$ foram mais frequentes do que no grupo C. Para neurônios NADPH-d reativos, a densidade neuronal no grupo E ($40,5 \pm 5,88$ neurônios/ mm^2) se manteve equiparada a do grupo C ($41,0 \pm 3,58$ neurônios/ mm^2). Já, a área do pericário no grupo E diminuiu ($p>0,05$) ~7% em relação ao grupo C. Neurônios com área do pericário de dimensões igual ou inferior a $300 \mu\text{m}^2$ foram mais frequentes no grupo E do que no grupo C. Concluiu-se que no cólon proximal o 2,4-D na dose e tempo utilizados não altera a área do cólon proximal e nem a densidade neuronal mientérica, mas induz hipertrofia e atrofia nos neurônios da população total e da subpopulação reativa a NADPH-d, respectivamente.

Palavras chave: Herbicida, intestino, plexo mientérico, neurotoxicidade, 2,4-D.



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR

Mestrado em Ciência Animal

NANNI, W.; STABILLE, S. R. **Morpho-quantitative evaluation of myenteric neurons of the proximal colon of rats treated with 2,4 dichlorophenoxyacetic acid herbicide.** DISSERTAÇÃO (MESTRADO) MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL. UNIVERSIDADE PARANAENSE, 2010, 74 p.

ABSTRACT

The current symptoms of the neurotoxicity of the 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) include stiffness, lethargy, anorexia, gastrointestinal irritation, nausea, vomiting and diarrhea and it is not known its effects on the myenteric plexus. Considering the use of this herbicide in the agriculture, the objective of this study was to evaluate the effects of 2,4-D ingestion on some quantitative and morphometric aspects of myenteric neurons of the proximal colon of rats. Sixty days old male rats (*Rattus norvegicus*) Wistar were used. For 15 days, a dose of 2,4-D (5 mg/kg/day) diluted in 1 mL of water was supplied through gavage to rats (n = 5) in the experimental group (group E). A control group of rats (n = 5) remained the same period without receiving 2,4-D. The animals were weighed daily to adjust the dose of 2,4-D and received Nuvital[®] chow and water without restriction. The rats were euthanized with a lethal dose of thiopental (40 mg/kg). The proximal colon was removed and, after having the measured area, was subjected to the procedures for obtaining whole mount preparations stained by Giemsa technique and NADPH-diaphorase (NADPH-d) histochemistry to evidence neurons. The whole mount preparations of proximal colon were examined by light microscopy (400x increase). The images displayed in 120 fields of each whole mount preparation were captured by digital camera attached to a microscope. The area of each field viewed under a microscope amounted to 0.096 mm². The myenteric neurons were quantified and had the cell body area measured through an image analysis software. The normality of data was tested using the Shapiro-Wilk test. The results of measuring the proximal colon area and the morphoquantitative analysis of neurons in groups C and E were compared using Student's t test (normally distributed data) or Mann-Whitney test (data with free

distribution). The weight of the animals and the area of the proximal colon did not differ ($p > 0.05$) among the groups E and C. For the overall neurons population, the neuronal density in group E (78.21 ± 12.57 neurons/mm² of proximal colon) did not differ ($p > 0.05$) of the group C (77.84 ± 7.54 neurons/mm² of proximal colon) and the cell body area was ~13.5% larger ($p < 0.05$) in group E. In the group E, neurons of the cell body with an area less than 300 μm^2 were more frequent than in group C. For NADPH-d reactive neurons, the neuronal density in group E (40.5 ± 5.88 neurons/mm²) remained equivalent to group C (41.0 ± 3.58 neurons/mm²). Already, the area of the cell body in group E decreased ($p > 0.05$) ~7% in relation to the group C. Neurons of the cell body with an area of dimensions equal to or less than 300 μm^2 were more often in group E than in the group C. It was concluded that in the proximal colon the 2,4-D at a dose and time used does not alter the area of the proximal colon and not the myenteric neuronal density, but induces hypertrophy and atrophy in the neurons of the overall population and reactive NADPH-d subpopulation, respectively.

Key words: Herbicide, intestine, myenteric plexus, neurotoxicity, 2,4-D

SUMÁRIO / SUMMARY

RESUMO

ABSTRACT

1 Paper "I" – Morpho-quantitative evaluation of myenteric neurons of the proximal colon of rats treated with 2,4 dichlorophenoxyacetic acid herbicide	12
1.1 Introduction	13
1.2 Material and Methods	16
1.3 Results	20
1.4 Discussion	21
1.5 Conclusion	26
1.5 References	27
2 Artigo "I" – Avaliação morfoquantitativa de neurônios mientéricos do cólon proximal de ratos tratados com o herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético	39
2.1 Introdução	40
2.2 Material e Métodos	44
2.3 Resultados	48
2.4 Discussão	49
2.5 Conclusão	55
2.5 Referências	55
Instruções para autores do periódico Pesquisa Veterinária Brasileira	68
Classificação do periódico segundo lista QUALIS CAPES	72
Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal da Unipar	73
Comprovação de submissão do artigo ao periódico Pesquisa Veterinária Brasileira	74

Morpho-quantitative evaluation of myenteric neurons of the proximal colon of rats treated with 2,4 dichlorophenoxyacetic acid herbicide

Wagner Nanni^{1,2}, Renata de B. Mari², Ricardo de M. Germano², Gisele da S. Porto^{2,3}, Juliana R. Scoz², Juliana P. Guimarães², Sandra R. Stabille^{1,2*}

ABSTRACT: The symptoms caused by the neurotoxicity from 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) include stiffness, lethargy, anorexia, gastrointestinal irritation, nausea, vomiting and diarrhea, and its effects on the myenteric plexus are unknown. Because this herbicide is used in agriculture, the effects of 2,4-D on myenteric neurons in the proximal colon of rats were examined. For 15 days, a dose of 2,4-D (5 mg/kg/day) was given to Wistar rats (group E). A control group (C) received solvent (water) during the same period. After euthanasia, the proximal colon was removed, and whole mount preparation were subjected to Giemsa staining and histochemistry for NADPH-diaphorase (NADPH-d) to visualize neurons. The myenteric neurons were counted and measured for cell body cross-sectional area. The neuronal density in group E did not differ ($p>0.05$) from controls. In the total neuronal population, cell body area was greater ($p<0.05$) in group E. Among NADPH-d reactive neurons, the total cell body area in group E was lower ($p>0.05$) than in controls. It was concluded that in the proximal colon, the dose of 2,4-D given during the time period did not alter the myenteric neuronal density but rather induced hypertrophy and atrophy of the total population and the NADPH-d-reactive subpopulation of neurons, respectively.

INDEX TERMS: Herbicide; intestine; myenteric plexus; neurotoxicity, 2,4-D.

RESUMO- [Avaliação morfoquantitativa de neurônios mientéricos do cólon proximal de ratos tratados com o herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético] Os sintomas decorrentes da neurotoxicidade do ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) incluem rigidez, letargia e anorexia, irritação gastrintestinal, náuseas, vômitos e diarréia e não se conhece seus efeitos no plexo mientérico. Considerando a utilização deste herbicida na agricultura, foram verificados os efeitos do 2,4-D sobre neurônios mientéricos do cólon proximal de ratos. Por 15 dias, foi fornecida dose de 2,4-D (5 mg/kg/dia) a ratos Wistar (n = 5) (grupo E). Um grupo controle (n = 5) de ratos permaneceu igual período sem receber 2,4-D. Após eutanásia com tiopental (40 mg/Kg), o cólon proximal foi retirado e submetido aos procedimentos para obtenção de preparados de membrana corados pela técnica de Giemsa e histoquímica da NADPH-diaforase (NADPH-d) para evidenciar neurônios. Os neurônios mientéricos foram quantificados e tiveram a área do pericário mensurada. A densidade neuronal no grupo E não diferiu ($p>0,05$) do grupo C. Na população total de neurônios a área do pericário foi maior ($p<0,05$) para o grupo E. Para neurônios NADPH-d reativos a área do pericário no grupo E

¹ Post-graduate Programme in Animal Science, Universidade Paranaense, Umuarama, Paraná, Brazil

² Science Animal Research Laboratory, Department of Biological Sciences of the Universidade Paranaense, Paranavaí Campus, Paraná, Brazil.: Av. Huberto Bruning, 360, Jardim Santos Dumont, Paranavaí, Paraná, 87706-490 Brazil. *corresponding author: E-mail: srstabelle@wnet.com.br

³ Pibic/Unipar Fellow

diminuiu ($p > 0,05$) em relação ao grupo C. Concluiu-se que no cólon proximal o 2,4-D na dose e tempo utilizados não altera a densidade neuronal mientérica, mas induz hipertrofia e atrofia nos neurônios da população total e da subpopulação reativa a NADPH-d, respectivamente.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Herbicida, intestino, plexo mientérico, neurotoxicidade, 2,4-D.

INTRODUCTION

The indiscriminate use of chemical compounds such as herbicides is controversial, considering the benefits and the damage they cause. The lack of knowledge of the effects of acute or chronic exposure, coupled with inadequate management of residues, generates high ecotoxicological impact (Cox 1999).

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is the most used chlorophenoxy herbicide to control pests in plantations and is therefore widely studied (Bjørning-Oulsen et al. 2008).

Exposure of humans and other animals to 2,4-D, or to its residues, occurs through air, water, soil, or contaminated food during production and use of the herbicide (Aydin et al. 2005).

The effects of different concentrations of 2,4-D administered in a single dose or repeatedly to some animal organ systems have been analyzed. In rats, no-observed-adverse-effect level (NOAEL) was established at 1 mg/kg/day for renal, hepatic, and hematologic effects (Garabrant & Philbert 2002).

2,4-D is easily absorbed in the gastrointestinal tract, has rapid distribution throughout the body tissues, does not exhibit bioaccumulation and is excreted in the urine in an unaltered or conjugated form with amino acids or proteins. Like the 2,4-dichlorophenol metabolite, only minimal amounts reach the body tissues (Bradbery et al. 2000). However, a tendency of accumulation, especially in the kidneys, liver, adipose tissue and central nervous system has been observed (Aydin et al. 2005).

Acute intoxication by 2,4-D is characterized by digestive, cardiac, and respiratory

complications, as well as neuromuscular side-effects (Charles et al. 1996a, b). Studies that have reported the neurotoxicity of 2,4-D have focused their analyses on the central nervous system. However, the mechanism of neurotoxicity of this herbicide has not yet been fully clarified (Bongiovanni et al. 2007; Bjorling-Poulsen et al. 2008, Konjuh et al. 2008). The following mechanisms for the action of 2,4-D on the central nervous system have been reported: generating covalent modifications that affect protein structure and biological activity (Di Paolo 2001); inhibiting microtubule polymerization (Rosso et al. 2000); free radical production (Bongiovanni et al. 2007; Bjorling-Poulsen et al. 2008; Bokowska et al. 2008); changes in neuronal cellular membranes with the uncoupling of oxidative phosphorylation and disruption of the metabolism of acetyl coenzyme A (Bradbery et al. 2000). Bortolozzi et al. (1998) point out that serotonin levels increase due to increased biosynthesis, reuptake inhibition or monoamine oxidase (MAO) inhibition.

The enteric nervous system (ENS), with its myenteric and submucous ganglionic plexus, acts on the mechanisms of digestion and absorption of nutrients by controlling the movement, blood flow and secretions of the gastrointestinal tract (Phillips & Powley 2007). Through connections with other components of the autonomic nervous system, the ENS allows the function of the digestive tract to become harmoniously integrated with other bodily functions (Costa et al. 1994).

In the various segments of the digestive tract, the myenteric plexus is situated between the circular and longitudinal muscle layers and is mainly related to the control of motility for transporting luminal contents (Phillips & Powley 2007).

Changes in the neurons of the myenteric plexus are considered responsible for side-effects such as anorexia, constipation, diarrhea, weight loss, vomiting, and nausea present in different conditions such as diabetes (Silverio et al. 2008, 2009), malnutrition (Natali & Miranda-Neto 1996, Sant'Ana et al. 1997), aging (Marese et al. 2007, Gagliardo et al. 2008,

Mari et al. 2008, Silva et al. 2008), infections (Sugauara et al. 2008, 2009), Parkinson's disease (Anderson et al. 2007), Crohn's disease (Geboes & Collins 1998, Boyer et al. 2007), enteritis and colitis (Boyer et al. 2005, 2007, Lomax et al. 2006).

The ENS displays adaptive responses to different types of stimuli and conditions by changing its functional structure or its chemical phenotype to maintain homeostasis of the intestinal functions (Lomax et al. 2005). The neurons of the myenteric plexus express different types of neurotransmitters, with each neuron being able to release more than one type of neurotransmitter (Furness 2006).

Techniques that use methylene blue-based dyes, e.g., Giemsa stain (Barbosa 1978), can be used to highlight the general population of neurons. This methylene blue-based dye has an affinity for the acidic structures of cells and can be an indicator of cellular activity.

Among the general population of myenteric neurons are found motor neurons that express nitric oxide (NO) and vasointestinal peptide (VIP). NO is produced by nitric oxide synthase (NOS) from L-arginine, via an NADPH-, Ca^{2+} or calmodulin-dependent mechanism (Wade 2002). Neurons that express NO can be visualized by techniques that use antibodies for the NOS enzyme or nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase diaphorase (NADPH-d), as NOS co-exists with NADPH-d (Furness et al. 1994, Saffrey 2004).

The large intestine is the terminal region of the gastrointestinal tract, and it plays an important role in controlling electrolytes, in addition to controlling the rate of formation and elimination of feces (Christensen 1989). In rats, the large intestine is divided into the cecum, proximal colon, distal colon and rectum, with the proximal colon responsible for storing stools and the distal colon for eliminating them (Takahashi & Owyang 1998).

The functional differences between the regions of the colon are related to peristalsis, which includes events of coordinated contraction and relaxation of the muscular layer (Hasler et al. 1990). The proximal colon exhibits retroperistalsis, while the distal colon exhibits intense

peristaltic contraction for the propulsion of stool (Messenger et al. 1994).

Decreases in neuronal density of the colon can cause difficulty in defecation due to reduced frequency and amplitude of colonic contractions (Donald et al. 1985, Sarna 1991).

Because 2,4-D acts on the central nervous system, we expect it to act on the neurons of the enteric nervous system, given that the reported side-effects of 2,4-D poisoning are anorexia, gastrointestinal irritation, nausea, vomiting and diarrhea (EPA 1987). Therefore, Giemsa-stained whole mount preparations were used to show the total population of neurons. Furthermore, a histochemical technique was used to visualize NADPH-d-positive neurons (NADPH-d+). This study aimed to assess the effects of administering 2,4-D on some morphometric and quantitative aspects of the myenteric neurons of the rat proximal colon.

MATERIAL AND METHODS

This research was carried out in accordance with the ethical principles in animal experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Unipar Ethics in Research Committee Involving Animal Experimentation (CEPEEA/Unipar), protocol number 15620/2009.

Ten male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), 60 days old, were used. They were obtained from the Central Animal Vivarium of the Universidade Estadual de Maringá. The animals were maintained in individual plastic boxes in the vivarium sector room on a 12:12 h light–dark cycle, at a room temperature of 22°C. They remained in the vivarium sector for 22 days, with 7 days for the adaptation to the new vivarium and 15 days for the administration of 2,4-D. The animals were weighed daily during the experimental period. After the adaptation period, the animals, then 60 days old, were randomly divided into two groups (n = 5/group), as described below.

Group E: experimental group comprising animals that received 5 mg/kg body

weight/day of 2,4-D (Sigma, Steinheim, Germany) diluted in 1 mL of water for 15 days, through oral gavage;

Group C: control animals that did not receive 2,4-D but rather the same amount of distilled water for 15 days via oral gavage (1 mL).

All the animals were provided Nuvital® commercial animal feed and water ad libitum.

Euthanasia of animals, collection and measurement of colons

After the experimental period and a 12-hour fast to control the degree of gastrointestinal tract distention, the animals were euthanized with intravenous injection of a lethal dose of thiopental sodium (40 mg/kg). Afterwards, each animal was laparatomized by ventral midline incision to remove the proximal colon (cranial limit: junction of the ileum-cecum-colon; caudal limit: visualization by transillumination of the disappearance of the oblique mucosal folds).

The proximal colon had its outline traced on white paper. This tracing was subsequently scanned to determine the area of the intestinal segment (mm²) by means of the image analyzer Image-Pro Plus 3.0.1[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Immediately after being modeled, the proximal colon was divided into two segments of equal length. The proximal (cranial) segment was designated for Giemsa staining and the distal (caudal) for the NADPH-d histochemical stain. Whole-mount preparations were obtained (one preparation/animal/technique) after the technical procedures to show the neurons that were allocated for the quantitative and morphometric evaluations described below.

Giemsa technique (Barbosa 1978)

The proximal colon was washed with 0.9% NaCl and filled with an acetic formaldehyde fixative solution. To maintain the filling, the ends of the proximal colon were

tied with suture thread. The proximal colon was then immersed in the same fixative solution for 24 hours and was subsequently loosened from the sutures and opened by longitudinal section along the length of the mesocolon insertion border.

Under the stereo-microscope (Olympus, Japan) with transillumination, the proximal colon was microdissected to remove and dispose of the mucosa and submucosa layers. The tunica serosa and muscular layer containing the myenteric plexus were preserved and together formed the whole mount preparation.

Each obtained whole mount preparation (one per animal) was immersed in a Giemsa dye solution in Sorensen phosphate buffer (pH 6.9) for at least 12 hours. Subsequently, they were dehydrated in increasing series of alcohols (90%, 95% and absolute), cleaned by three successive immersions in xylene (Synth[®], São Paulo, Brazil) and then placed between slide and coverslip glass with Permount (Fisher Chemical[®], USA) synthetic resin.

NADPH-d histochemistry technique (Scherer-Singler et al. 1983)

The proximal colon was washed and filled with phosphate buffer (PB, pH 7.4), and the ends were tied with suture thread to hold the filling. The segment was fixed in 4% paraformaldehyde (Merk, Darmstad, Germany) prepared in 0.1 M phosphate buffer (TF, pH 7.4) for 30 minutes. It was then immersed in 0.3% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, USA), dissolved in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) for 10 minutes and washed in PBS 10 x 10 minutes.

Sequentially, the proximal colon was incubated in a reactor medium containing 50 mg of Nitro Blue Tetrazolium (NBT, Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri, USA), 100 mg of β -NADPH (Sigma, Steinheim, Germany) and 0.3% Triton X-100 in Tris-HCl (0.1 M pH 7.6).

The development of the histochemical reaction was controlled visually with a

stereomicroscope (Olympus, Japan) and lasted 100 minutes. After the proximal colon was opened by cutting the sutures at the extremities, it was washed three times in PBS for 5 minutes each and then immersed in a solution of 4% paraformaldehyde for fixation and storage.

To obtain the whole mount preparation (one per animal), the same procedures of micro-dissection described for the Giemsa technique were used. The whole mount preparation obtained was dehydrated in increasing series of alcohols (90%, 95% and absolute), diaphanized by three consecutive immersions in xylene (Synth[®], São Paulo, Brazil) and then placed between a slide and a glass cover slip with Permount resin (Fisher Chemical[®], USA).

Quantification of neurons

To determine the neuronal density per unit area (mm^2), the whole mount preparation of proximal colon taken from each animal was visualized by light microscopy (Olympus BX40) with a 40x objective. The images observed under the microscope were captured by a high-resolution AxioCam digital camera (Zeiss, Jena, Germany), digitized with the Axio Vision 4.1[®] program and recorded onto a compact disc.

The neurons were counted from the images obtained from 120 microscopic fields per whole mount preparation, sampling equally all regions of the circumference of the proximal colon. Image-Pro Plus 3.0.1. (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA) was used to count the neurons in the recorded images.

The area provided by the previously measured 40x objective equaled 0.096 mm^2 , and the 120 fields represented a total area of 11.52 mm^2 of the colon, allowing the neuronal density per mm^2 of proximal colon to be determined.

Morphometry of neuronal cell body area

The cellular body area of the myenteric neurons was measured using Image-Pro Plus. For this, images of neurons taken by digital camera for neuronal quantification were used. The cellular body area (μm^2) of 100 neurons was measured per whole mount preparation of each animal, totaling 500 neurons per group. The neurons were classified according to the dimensions of the areas in class intervals of $100 \mu\text{m}^2$ to verify the frequency of neurons of different sizes.

Statistical analysis

The normality of data was tested using the Shapiro-Wilk test. The data that had a normal distribution were expressed as the mean \pm the standard deviation. The free-distribution data were expressed using the median and 25th and 75th (P25, P75) percentiles. Data from experimental and control groups were compared using Student's t test (data with normal distribution) or the Mann-Whitney test (data with free distribution). The significance level for all tests was $p < 0.05$.

RESULTS

The initial and final body weights of the animals did not differ ($p > 0.05$) between groups C and E. Weight gain was equal between the groups ($p > 0.05$) (Table 1).

The area (mm^2) of the proximal colon of group E and C animals was also not significantly different ($p > 0.05$) (Table 1).

Under light microscopy, in the colonic whole mount preparations, the myenteric neurons were seen within ganglia interconnected by bundles of nerve fibers, without a noticeable change in neuronal distribution between groups E and C (Fig. 1).

The numbers of neurons revealed by Giemsa staining (total neuronal population) and

the NADPH-d histochemical assay (NADPH-d+ neurons) did not differ ($p > 0.05$) between groups E and C (Table 2).

Among the total neuronal population, the cumulative cell body area in group E was greater ($p < 0.05$) than in group C (Table 2). The neurons were classified into intervals of $100 \mu\text{m}^2$ according to the dimensions of the cellular body. In group E, the frequency of neurons was lower in the $100\text{-}200 \mu\text{m}^2$ class and higher in the $300\text{-}400 \mu\text{m}^2$ class compared to controls (Fig. 2).

Among the NADPH-d⁺ neurons, the cellular body area was lower in group E than in controls ($p < 0.5$) (Table 2). The NADPH-d+ neurons of group E, when compared to controls, were more frequent in the $100\text{-}200 \mu\text{m}^2$ class and less frequent in classes equal to or greater than $300 \mu\text{m}^2$ (Fig. 3).

DISCUSSION

Considering the lack of reports on the effects of 2,4-D on the myenteric plexus, an initial dose of 2,4-D 5 mg/kg body weight was adopted in this initial exploratory study, which is five times greater than the NOAEL (1 mg/kg/day) established for the renal, hepatic and hematologic effects in rats (Garabrant & Philbert 2002).

The body weight of the animals in groups E and C did not differ ($P > 0.05$) at the beginning of the experiment. During the experimental period (15 days), the animals gained weight, but this weight did not result in differences ($p > 0.05$) in the final weight between the C and E groups, indicating that the dosage of 2,4-D used in this study did not interfere with the animals' body weight (Table 1). However, when 2,4-D is administered in higher doses (150 or 300 mg/kg/day), weight loss in Wistar rats is reported (Charles et al. 1996a, b), confirming that the effects of 2,4-D on weight are dose-dependent.

The area of the proximal colon in group E remained similar to controls ($p > 0.05$),

indicating that 2,4-D did not alter the size of the proximal colon and allowing the data obtained in quantitative assessments to be compared between groups E and C. Increased or decreased intestinal area promotes, respectively, greater dispersion or concentration in the distribution of neurons and, consequently, an apparent increase or decrease in the number of neurons can induce errors in the interpretation of results (Johnson et al. 1998, Phillips & Powley 2001).

In the colonic membrane preparations, the myenteric neurons were observed within ganglia interconnected by bundles of nerve fibers, as is well described in literature (Furness 2006). No visible changes were evident between the C and E rats, indicating that 2,4-D did not interfere with the spatial organization of the myenteric plexus.

To evaluate the total myenteric population, the Giemsa staining technique was used on whole mount preparations. This technique is based on the affinity of the dye to acid structures of cells and has been widely used (Romano et al. 1996, Furlan et al. 2002, Marese et al. 2007, Sugauara et al. 2009, Soares et al. 2009). Additionally, NADPH-d histochemistry was used to identify the subpopulation of neurons that expressed NOS and produced NO, a molecule that is inhibitory to the intestinal muscles.

To count each population of neurons, the captured images were displayed in a light microscope that equally sampled all the regions of the colon circumference, totaling 120 fields. Each field visualized by microscopy with a 40X objective had an area equivalent to 0.096 mm^2 , which permitted the expression of the neuronal density per square millimeter of colon. The neuronal density visualized by the Giemsa technique did not differ ($p > 0.05$) between animals receiving 2,4-D (E group) or vehicle (C group) and the sub-populations of NADPH-d+ neurons remained similar as well ($p > 0.05$) indicating that there was no myenteric neuron death induced by 2,4-D.

A decrease in the total number of neurons or in the myenteric neuronal sub-population

has been observed during the course of aging (Gagliardo et al. 2008, Mari et al. 2008) and some experimental conditions, such as diabetes (Fregonesi et al. 2001) and malnutrition (Natali & Miranda-Neto 1996, Mello et al. 1997, Sant'Ana et al. 1997), demonstrating the susceptibility of neurons to adverse health conditions. As the density of the total neuronal population and of the subpopulation of NADPH-d+ neurons was not changed, it would be reasonable to assume that 2,4-D has no toxic effect on colonic myenteric neurons, or at least that the utilized dose and the time of the experiment were not sufficient to induce severe toxicity that could cause neuronal apoptosis or necrosis.

Furthermore, the preservation of neuronal density in the myenteric plexus, although indicative of an absence of neuronal death, may not be indicative of the absence of neuronal injury. Therefore, the cell body area of the myenteric neurons was measured because during the steps preceding apoptosis or necrosis, the size of the neuron is modified. The cell body area of the myenteric neurons revealed by Giemsa staining (total population) differed ($p < 0.05$) between the E and C groups. The total cell body area of E-group neurons increased by ~13.5% compared to controls. This increase in area was confirmed when the neurons of both groups were classified into $100 \mu\text{m}^2$ intervals according to the dimensions of the cellular body. In the E group, there was a higher frequency of neurons in the upper classes ($300 \mu\text{m}^2$ or larger). In contrast, neurons with profile areas less than $300 \mu\text{m}^2$ were more common in controls.

The base of the Giemsa dye is methylene blue, which stains cellular acidic structures, especially free polyribosomes and the granular endoplasmic reticulum (Nissl corpuscles) of neurons. The increase in cell body area demonstrated by this staining technique indicates greater synthesis activity, similar to the activity that could occur in neurons to adapt to the toxic effects of 2,4-D. Hypertrophy in myenteric neurons evidenced by Giemsa staining in the ileum and distal colon of rats has been seen in induced toxoplasmosis (Sugauara et al. 2008,

2009, Soares et al. 2009)

Among the NADPH-d+ neurons, however, we found a significant decrease ($p < 0.05$) of ~7% in total cellular body profile area in the E group compared to controls, suggesting decreased expression of NOS and consequent decreased production of NO. In the frequency-distribution histogram of neurons in the cell body area class intervals, the NADPH-d⁺ neurons in the E group were more frequent in classes less than 300 μm^2 and less frequent in the larger classes compared to controls.

This neuronal atrophy with decreased expression of NO could result from the activation of inhibitory and excitatory enteric mechanisms to expedite the passage of the bolus and to reduce the storage time of feces in response to 2,4-D. In the muscular wall of the colon, NO is a principal inhibitor of muscle contraction, and acetylcholine is a major exciter (Furness 2006). The decreased activity of NADPH-d+ neurons is consistent with the consistency of feces eliminated by the animals in group E near the end of the trial period. Although diarrhea was not present, the stool became excessively pasty compared to the feces of group C, suggesting less retention time of stool in the proximal colon (data not shown).

Notably, hypertrophy in neurons of the total population occurred, which could also be an indication that one or more neuronal subpopulations were more activated to promote the synthesis and release of excitatory neurotransmitters. One method to compensate for neuronal damage due to initial harmful conditions is to increase polysomes and RNA and protein synthesis, which can lead to an increase in the dimensions of the cellular body (Jessel 1991). On the other hand, the increase in cell body area may be related to compensatory hypertrophy in regions of marked cell death (Phillips et al. 2003). However, neuronal density in the colon was not altered by 2,4-D, suggesting that the hypertrophy observed in myenteric neurons revealed by Giemsa staining resulted from adaptive responses to maintain functional homeostasis in the gastrointestinal tract.

The induction of hypertrophy in the general population of myenteric neurons and the atrophy of NADPH-d+ neurons by 2,4-D may be due to direct action of the herbicide on neurons or indirectly by way of intestinal irritation.

The mechanism of neurotoxicity of 2,4-D has not yet been fully determined. Changes in the brain's monoaminergic system (Ferri et al. 2000) and increased levels of serotonin in the cellular body of neurons from increased biosynthesis, reuptake inhibition or monoamine oxidase inhibition (Bortolozzi et al. 1998) are attributed to 2,4-D. However, it cannot be stated whether similar effects occurred in the myenteric plexus as a result of the herbicide.

In the ENS, serotonin (5-HT) is a potent stimulant of primary afferent intrinsic neurons, as well as an intermediary in enteric reflexes (Pan & Gershon 2000). The enteroendocrine cells release 5-HT in response to mechanical stimulation and a wide variety of chemical stimuli, including acids, nutrients, bile salts and bacterial toxins (Gershon et al. 1999, Lundgren 2002).

Irritants of the intestinal mucus activate the propulsive motor program, which suggests a defensive adaptation to rapidly eliminate the contents of the intestinal lumen (Grundy et al. 2006), given that a large portion of the signals to the inhibitory motor neurons originate from cholinergic interneurons (Li & Furness 2000).

The enteric reflex circuits may also be activated by various stimuli, including the chemical composition of luminal contents from, non-neuronal components, which trigger inflammatory responses that include the release of substances that directly or indirectly interact with the enteric neural network (Lomax et al. 2006). These substances facilitate enteric secretion of acetylcholine and increase the excitability of myenteric neurons and primary afferent enteric neurons (Mulholland & Smcone 1993, Ozaki & Gebhart 2001), which could also explain the hypertrophy in the total population of neurons and the atrophy of NADPH-d+ neurons. Excitatory motor neurons would be stimulated, and inhibitory motor

neurons would have decreased activity.

The proximal colon is important in regulating the amount of electrolytes and fluids absorbed by the intestine (Kaunitz et al. 1995), and the absorptive capacity of the colon is influenced by changes in motility, blood flow and neurocrine, endocrine and paracrine factors (Debongnie & Phillips 1978).

In summary, we observed that the dosage of 5 mg/kg/body weight for 15 days is not sufficient to promote neuronal death, but it leads directly or indirectly to adaptive responses expressed in the proximal colon: hypertrophy of the total population of neurons and atrophy of the NADPH-d+ neurons. These trophic changes would favor a shorter retention of fecal matter, interfering with stool consistency. However, further investigation should be conducted to assess the myenteric plexus under the effect of higher doses of 2,4-D and increased administration time to determine whether the hypertrophy and atrophy observed in this study represent stages of cellular change that, in the long term, culminate in cellular death.

CONCLUSION

It was concluded that in the proximal colon, the dose of 2,4-D given during the time period did not alter the myenteric neuronal density but rather induced hypertrophy and atrophy of the total population and the NADPH-d–reactive subpopulation of neurons, respectively

Acknowledgements

The authors thank the Universidade Paranaense (Unipar) for the funding of this research and for the provision of a fellowship for scientific initiation (Pibic/Unipar Programme)

REFERENCES

- Anderson G., Noorian A.R., Taylor G., Anitha M., Bernhar D., Srinivasan S. & Greene J.G: 2007. Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 207:4-12.
- Aydin H., Özdemir N. & Uzunören N. 2005. Investigation of the accumulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in rat kidneys. *Forensic Sci. Inter.* 153:53-57.
- Barbosa A.J.A. 1978. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.* 11:95-97.
- Bertrand P.P., Kunze W.A.A., Bornstein J.C., Furness J.B. & Smith M.L. 1997. Analyseis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical simulation of the mucosa. *Am. J. Physiol.* 36:6422-6435.
- Bjorling-Poulsen, M., Andersen H.R. & Grandjean P. 2008. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Eur. *Environ. Health* 7:1-50.
- Bongiovanni B., De L.P., Ferri A., Konjuh C., Rassetto M., Evangelista de Duffard A.M., Cardinali D.P. & Duffard R. 2007. Melatonin decreases the oxidative stress produced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rat cerebellar granule cells. *Neurotox Res.* 11:93-99.
- Bortolozzi A., Duffard R., Rubio M., Sturtz N. & Evangelista de Duffard A.M. 1998. Regionally specific changes in central brain monoamine levels by 2,4-diclorophenoxyacetic acid in acute treated rats. *Neurotoxicology.* 19(6):839-852.
- Boyer L., Ghoreishi M., Templeman V., Vallance B.A., Buchan A.M., Jevon G. Jacobson K. 2005. Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. *Auton. Neurosc. Basic Clin.* 117:41-53.

- Boyer L., Sidpra D., Jevon G., Buchan A.M. & Jacobson K. 2007. Differential responses of VIPergic and nitroergic neurons in paediatric patients with Crohn's disease. *Auton. Neurosc. Basic Clin.* 134:106-114.
- Bradbery S.M., Watt B.E., Proudfoot A.T. & Vale J.A. 2000. Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of acute chlorophenoxy herbicide poisoning: a review. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 38:111-122.
- Bukowska B., Rychlik B., Krokosz A. & Michalowicz J. 2008. Phenoxyherbicides induce production of free radicals in human erythrocytes: oxidation of dichlorohydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 by 2,4-D-Na and MCPA-Na. *Food and Chem. Toxicol.* 46(1):359-367.
- Charles J.M., Bond D.M., Jeffries T.K., Yano B.L., Stott W.T., Johnson K.A., Cunny H.C., Wilson R.D. & Bus J.S. 1996a. Chronic dietary toxicity/oncogenicity studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rodents. *Fund. Appl. Toxicol.* 33:166-172.
- Charles J.M., Dalgard D.W., Cunny H.C., Wilson R.D. & Bus J.A. 1996b. Comparative subchronic studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, amine and ester in rats. *Fund. Appl. Toxicol.* 33:161-165.
- Christensen J. 1989. Colonic motility, p.939-973 In: Schultz S.G., Wood J.D. & Rauner B.B. (Eds) *Handbook of physiology – the gastrointestinal system*. Maryland: American Physiological Society, 1906p.
- Costa M., Simon F.A.A. & Brooks J.H. 1994. The enteric nervous system. *Am. J. Gastroenterol.* 89(8):125-137.
- Cox C. 1999. Herbicide fact sheet 2,4 d: toxicology, part. 2. *J. Pesticide Reform.* 19(2):14-19.
- Debonnie J.C. & Phillips S.F. 1978. Capacity of the human colon to absorb fluid. *Gastroenterol.* 74:698-703.

- Di Paolo O., Evangelista de A.M. & Duffard R. 2001. In vivo and in vitro binding of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid to a rat liver mitochondrial protein. *Chem. Biol. Interac.* 137:229-241.
- Donald I.P., Smith R.G., Cruikshank J.G., Elton R.A. & Stoddart M.E. 1985. A study of constipation in the elderly living at home. *Gerontology.* 31:112-118.
- Ferri A., Bortolozzi A., Duffard R. & Evangelista de Duffard A.M. 2000. Monoamine levels in neonate rats lactationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Biogenic Amines* 16:73-100.
- Fregonesi C.E.P.T., Miranda-Neto, M.H., Molinari, S.L. & Zanoni, J.N. 2001. Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin induced diabetes. *Arq. Neuropsiquiatr.* 59:50-53.
- Furlan M.M.D.P, Molinari S.L. & Miranda-Neto M.H. 2002. Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 60:576-581.
- Furness J.B., Li Z.S., Young H.M. & Forstermann U. 1994. Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. *Cell. Tissue Res.* 277:139-149.
- Furness J.B. 2006. *The enteric nervous system.* Blackwell Publishing, Oxford. 274p.
- Gagliardo K.M., Clebis N.K., Stabile S.R., Mari R.B., Sousa J.M.A. & De Souza R.R. 2008. Exercise reduces inhibitory neuroactivity and protects myenteric neurons from age-related neurodegeneration. *Auton. Neurosc. Basic Clin.* 141:31-37.
- Garabrant D.H. & Philbert M.A. 2002. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology. *Crit. Rev. Toxicol.* 32:233-257.

- Gershon M.D. 1999. Review article; roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13(suppl 2):15-30.
- Grundy D., Al-Chaer E.D., Aziz Q., Collins S.M., Ke M., Tache Y. & Wood J.D. 2006. Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology.* 130:1391-1411.
- Hasler W.L., Kurosawa S. & Owyang C. 1990. Regional cholinergic differences between distal and proximal colonic myenteric plexus. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* 21: G404-G410.
- Jessel T.M. 1991. Reactions of neurons to injury, p.258-268. In: Kandell E.R. & Schwartz J. & Jessell T.M. (Eds). *Principles of neural science.* 3.ed. Norwalk, Appleton & Lange, 1135p.
- Johnson R.J.R., Schemann M., Santer R.M. & Cowen T. 1998. The effects of age on the overall population and on sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J. Anat.* 192:479-488.
- Konjuh C., Garcia G., López L., Evangelista de Duffard A.M., Brusco A. & Duffard R. 2008. Neonatal hypomyelination by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Chemical and ultrastructural studies in rats. *Toxicol. Sci.* 104(2):332-340.
- Li Z.S. & Furness J.B. 2001. Inputs from intrinsic sensory neurons to NOS immunoreactive neurons in the myenteric plexus of guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res.* 299:1-8.
- Lomax A.E., Fernandez E. & Sharkey K.A. 2005. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol. Motil.* 17:4-15.
- Lomax A.E., Linden D.R., Mawe G.M. & Sharkey K.A. 2006. Effects of gastrointestinal inflammation on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits. *Auton. Neurosc. Basic Clin.* 126:250-257.

- Lundgren O. 2002. Enteric nerves and diarrhoea. *Pharmacol. Toxicol.* 90:109-120.
- Marese A.C.M., Freitas P. & Natali M.R.M. 2007. Alterations of the number and profile of myenteric neurons of Wistar rats promoted by age. *Auton. Neurosc. Basic Clin.* 137:10-18.
- Mari R.B., Clebis N.K., Gagliardo K.M., Guimarães J.P., Stabile S.R., Germano R.M. & De Souza R.R. 2008. Effects of exercise on the morphology of the myenteric neurons of the duodenum of wistar rats during the ageing process. *Anat. Histol. Embryol.* 37:289-295.
- Mello E.V.S.L., Stabile S.R. & Miranda-Neto M. H. 1997. Effect of maternal protein deprivation on morphological and quantitative aspects of the myenteric plexus neurons of proximal colon in rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 55(1):106-113.
- Messenger J.P., Bornstein J.C. & Furness J.B. 1994. Electrophysiological and morphological classification of myenteric neurons in the proximal colon of guinea-pig. *Neuroscience* 60:227-244.
- Mulholland M.W. & Smcone D.M. 1993. Prostaglandin E2 stimulation of acetylcholine release from guinea pig myenteric plexus neurons. *Am J. Surg.* 166:552-556.
- Natali M.R.M. & Miranda-Neto M.H. 1996. Effect of maternal protein deprivation on morphological and quantitative aspects of the myenteric plexus neurons of proximal colon in rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 54:273-279.
- Ozaki N. & Gebhart G.F. 2001. Characterization of mechanosensitive splanchnic nerve afferent fibers innervating the rat stomach. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281:G1449-G1459.
- Pan H. & Gershon M.D. 2000. Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine. *J. Neurosci.* 20:3295-3309.

- Phillips R.J. & Powley T.L. 2001. As the gut ages: timetables for aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. *J. Comp. Neurol.* 434:358-377.
- Phillips R.J., Kieffer E.J. & Powley T.L. 2003. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. *Auton. Neurosc. Basic Clin.* 106:69-83.
- Phillips R.J. & Powley T.L. 2007. Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. *Auton. Neurosc. Basic Clin* 136:1-19.
- Romano E.B., Miranda-Neto M.H. & Cardoso R.C.S. 1996. Preliminary investigation about the effects of streptozotocin-induced chronic diabetes on the nerve cell number and size of myenteric ganglia in rat colon. *Rev. Chil. Anat.* 14:139-145.
- Rosso S.B., Cáceres A.O., Evangelista de Duffard A.M., Duffard R. & Quiroga S. 2000. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid disrupt the cytoskeleton and disorganizes the Golgi apparatus of cultured neurons. *Toxicol. Sci.* 56:133-140.
- Saffrey M.J. 2004. Ageing of the enteric nervous system. *Mech. Ageing Dev.* 125:899-906.
- Sant'Ana D.M.G., Miranda-Neto M.H., Molinari S.L. & Sant'Ana M.A. 1997. Morphological and quantitative study of myenteric plexus of ascending colon of rats subjected to proteic desnutrition. *Arq. Neuropsiquiatr.* 55:686-695.
- Sarna S.K. 1991. Physiology and pathophysiology of colonic motor activity. Part II. *Dig. Dis. Sci.* 36:998-1018.
- Silva E.A., Natali M.R.M. & Prado I.M.M. 2008. The number and profile of reactive NADH-d and NADPH-d neurons of myenteric plexus of six-month-old rats are different in the cecum portions. *Pesq. Vet. Bras.* 28(5):248-291.

- Silverio S.M., Mari R.B., Clebis N.K., Scoz J.R., Germano R.M., Agreste F., Bombonato P.P. & Stabille S.R. 2008. Assessment of naph-diphorase stained myenteric neurons of the jejunum of diabetic rats supplemented with ascorbic acid. *Pesq. Vet. Bras.* 28(2):95-102.
- Silverio S.M, Mari R.B., Clebis N.K., Scoz J.R., Germano R.M., Major J.A.A., Bombonato P.P. & Stabille S.R. 2009. Effects of ascorbic acid supplementation in ileum myenteric neurons of streptozotocin-induced diabetic. *Pesq. Vet. Bras.* 29(4):295-302.
- Soares J., Moreira M.N., Da Silva A.V., Sant'Ana D.M.G. & Araújo E.J.A. 2009. Infecção crônica por *Toxoplasma gondii* induzindo hipertrofia de neurônios do plexo mientérico do cólon descendente de *Rattus norvegicus*. *Rev. Brás. Parasitol. Vet.* 18(2):57-60.
- Sugauara E.Y.Y., Sant'Ana D.M.G., Almeida E.C., Reis A.B., Silva A.V. & Araújo E.J.A. 2008. Alterations on the myenteric plexus of the ileum and the descending colon caused by *Toxoplasma gondii* (genotype III). *Arq. Neuropsiquiatr.* 66(3-A):516-523.
- Sugauara E.Y.Y., Sant'Ana D.M.G., Silva A.V., Souza E.A. & Araújo E.J.A. 2009. Hypertrophy of the neurons in the ileum of rats infected with cysts of *Toxoplasma gondii* (genotype II). *Acta Scientiarum Biol. Sci.* 31(2):195-201.
- Scherer-Singler U., Vincent S.R., Kimura H. & McGeer E.G. 1983. Demonstration of unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J. Neurosci. Method.* UK. 9(3):229-234.
- Takahashi T. & Owyang C. 1998. Regional differences in the nitrergic innervation between the proximal and the distal colon in rats. *Gastroenterology.* 115:1504-1512.
- United States Environmental Protection Agency – EPA. 1987. The risk assessment guidelines of 1986. Office of health and environmental assessment. Washington, DC. EPA/600/8-87/045.

Table 1. Mean and standard deviation of the initial and final body weights (g) and proximal colon (PC) area (mm²) from control (C) and experimental (E) groups.

Groups	Initial weight (g)	Final weight (g)	PC Area (mm²)
C (n = 5)	266.80 ± 9.2	299.20 ± 9.3	2122.8 ± 123.96
E (n = 5)	254.40 ± 28.39	292.00 ± 4.06	2113.8 ± 175.79

Means did not show differences between groups (p>0.05)

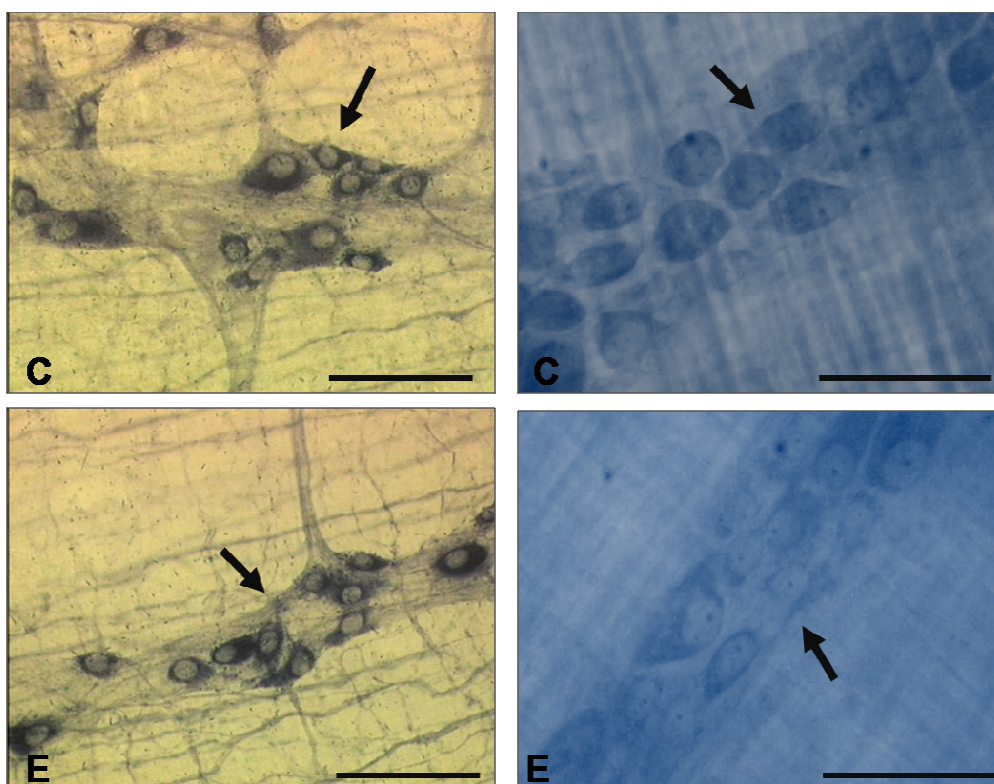


Fig. 1. Photomicrographs of proximal colon whole mount preparation of rats in the control (C) and experimental (E) groups showing: the left ganglion (arrow) containing myenteric NADPH-d⁺ neurons interconnected by bundles of nerve fibers; and on the right, ganglion containing myenteric neurons stained with Giemsa (arrow). (bar = 100 μ m).

Table 2. Mean and standard deviation of the neuronal density (neurons/11.52 mm² and neurons/mm² of the proximal colon) and median and percentiles (P25; P75) of myenteric neuron cellular body area (μm²) from the proximal colon (PC) of the control (C) and experimental (E) groups.

Groups	Neuronal density (11.52 mm² de PC)	Neuronal density (mm² de CP)	Cellular body area (μm²)
Giemsa Staining			
C (n = 5)	896.8 ± 86.9	77.84 ± 7.54	231.9 (176.3; 319.8)*
E (n = 5)	901.0 ± 144.9	78.21 ± 12.57	263.2 (196.3; 350.0)*
NADPH-d histochemistry			
C (n = 5)	473.2 ± 41,3	41,0 ± 3,58	338.5 (266.4; 438.3)*
E (n = 5)	466.0 ± 67.8	40.5 ± 5.88	314.2 (233.6; 411.1)*

The values marked with asterisk (*) in the same column show significant difference between groups (p<0.05)

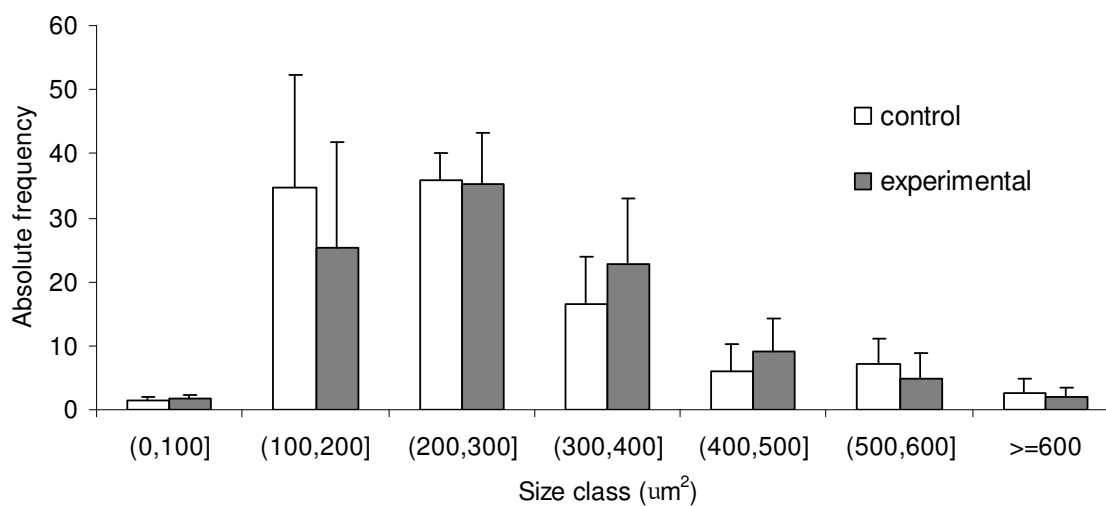


Fig. 2. Absolute-frequency histogram of the total population of myenteric neurons divided into classes of $100 \mu\text{m}^2$ according to the neuronal cellular body dimensions in the proximal colon of rats in the control (C) and experimental (E) groups.

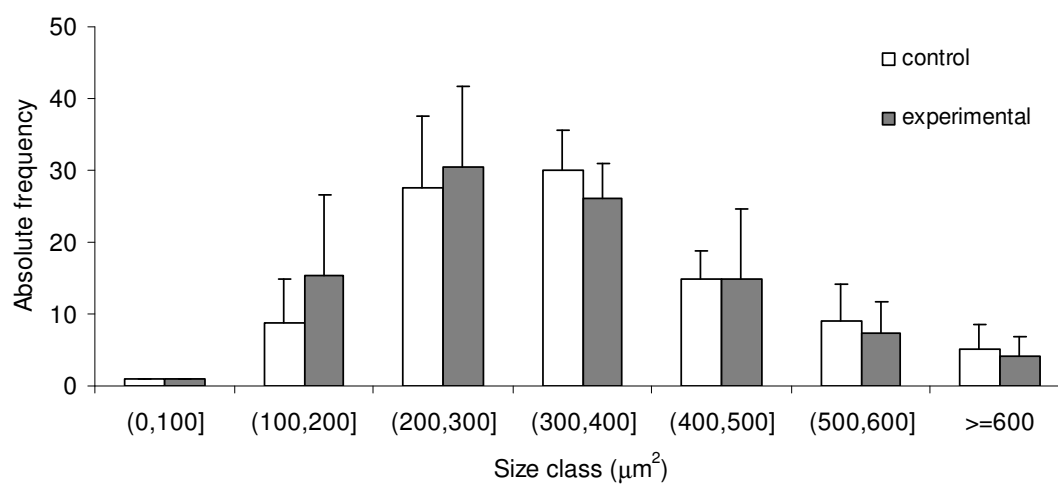


Fig. 3. Absolute-frequency histogram of myenteric NADPH-d+ neurons divided into classes of $100 \mu\text{m}^2$ according to the neuronal cellular body dimensions in the proximal colon of rats in the control (C) and experimental (E) groups.

**Avaliação morfoquantitativa de neurônios mientéricos do cólon proximal de ratos
tratados com o herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético**

Wagner Nanni^{4,2}, Renata de B. Mari⁵, Ricardo de M. Germano², Gisele da S. Porto^{2,6}, Juliana R. Scoz², Sandra R. Stabile^{1,2*}

RESUMO - Os sintomas decorrentes da neurotoxicidade do ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) incluem rigidez, letargia e anorexia, irritação gastrintestinal, náuseas, vômitos e diarreia e não se conhece seus efeitos no plexo mientérico. Considerando a utilização deste herbicida na agricultura, foram verificados os efeitos do 2,4-D sobre neurônios mientéricos do cólon proximal de ratos. Por 15 dias, foi fornecida dose de 2,4-D (5 mg/kg/dia) a ratos Wistar (n = 5) (grupo E). Um grupo controle (n = 5) de ratos permaneceu igual período sem receber 2,4-D. Após eutanásia com tiopental (40 mg/Kg), o cólon proximal foi retirado e submetido aos procedimentos para obtenção de preparados de membrana corados pela técnica de Giemsa e histoquímica da NADPH-diaforase (NADPH-d) para evidenciar neurônios. Os neurônios mientéricos foram quantificados e tiveram a área do pericário mensurada. A densidade neuronal no grupo E não diferiu ($p > 0,05$) do grupo C. Na população total de neurônios a área do pericário foi maior ($p < 0,05$) para o grupo E. Para neurônios NADPH-d reativos a área do pericário no grupo E diminuiu ($p > 0,05$) em relação ao grupo C. Concluiu-se que no cólon proximal o 2,4-D na dose e tempo utilizados não altera a densidade neuronal mientérica, mas induz hipertrofia e atrofia nos neurônios da população total e da subpopulação reativa a NADPH-d, respectivamente.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Herbicida, intestino, plexo mientérico, neurotoxicidade, 2,4-D.

ABSTRACT- [Morpho-quantitative evaluation of myenteric neurons of the proximal colon of rats treated with 2,4 dichlorophenoxyacetic acid herbicide] The symptoms caused by the neurotoxicity from 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) include stiffness, lethargy, anorexia, gastrointestinal irritation, nausea, vomiting and diarrhea, and its effects on the myenteric plexus are unknown. Because this herbicide is used in agriculture, the effects of 2,4-D on myenteric neurons in the proximal colon of rats were examined. For 15 days, a dose of 2,4-D (5 mg/kg/day) was given to Wistar rats (group E). A control group (C) received solvent (water) during the same period. After euthanasia, the proximal colon was removed, and whole mount preparations were subjected to Giemsa staining and histochemistry for NADPH-diaphorase (NADPH-d) to visualize neurons. The myenteric neurons were counted and measured for cell body profile area. The neuronal density in group E did not differ ($p > 0.05$) from controls. In the total neuronal population, cell body area was greater ($p < 0.05$)

⁴ Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Paranaense (Unipar), Umuarama, Paraná, Brasil

⁵ Laboratório de Pesquisa em Ciência Animal, Departamento de ciências Biológicas da Universidade Paranaense (Unipar), Paranavaí Campus, Paraná, Brasil.: Av. Huberto Bruning, 360, Jardim Santos Dumont, Paranavaí, Paraná, 87706-490 Brasil. *autor para correspondência: E-mail: srstabile@wnet.com.br

⁶ Bolsista de iniciação científica Pibic/Unipar

in group E. Among NADPH-d reactive neurons, the total cell body area in group E was lower ($p > 0.05$) than in controls. It was concluded that in the proximal colon, the dose of 2,4-D given during the time period did not alter the myenteric neuronal density but rather induced hypertrophy and atrophy of the total population and the NADPH-d-reactive subpopulation of neurons, respectively.

INDEX TERMS: Herbicide; intestine; myenteric plexus; neurotoxicity, 2,4-D.

INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de componentes químicos como os herbicidas é polêmico considerando os benefícios e os danos que ocasionam. A falta de conhecimento sobre os efeitos de exposições agudas ou crônicas, juntamente com manejo inadequado dos resíduos geram alto impacto ecotoxicológico (Cox 1999).

O ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) é o clorofenoxi herbicida mais usado no controle de pragas em plantações e por isso amplamente estudado (Bjørning-Oulsen et al. 2008). Exposição de seres humanos e outros animais ao 2,4-D, ou aos seus resíduos, ocorre através do ar, água, solo, alimentos contaminados ou durante a produção e aplicação do herbicida (Aydin et al. 2005).

Os efeitos de diferentes níveis de concentração do 2,4-D administrados em doses únicas ou continuadas sobre alguns sistemas orgânicos animais têm sido analisados. Para ratos, a dose experimentalmente determinada, com a qual não há estatística e nem indicações biológicas de efeitos tóxicos (NOAEL – no observed adverse effect level) foi estabelecida em 1 mg/Kg/dia para efeitos renais, hepáticos e hematológicos (Garabrant & Philbert 2002).

O 2,4-D é facilmente absorvido no tubo gastrointestinal, tem rápida distribuição nos tecidos corporais, não ocorre a bioacumulação e há excreção urinária na forma inalterada ou na forma conjugada com aminoácidos ou proteínas e como o metabólito 2,4-diclorofenol, sendo que apenas quantidades mínimas alcançam os tecidos corpóreos (Bradbery et al. 2000).

Contudo, a tendência de acumulação principalmente nos rins, fígado, tecido adiposo e sistema nervoso central é relatada (Aydin et al. 2005).

A intoxicação aguda pelo 2,4-D é caracterizada por complicações digestivas, cardíacas, respiratórias e por manifestações neuromusculares (Charles et al. 1996a,b). As pesquisas que verificam a neurotoxicidade do 2,4-D têm sido voltadas para análises do sistema nervoso central, porém, o mecanismo de ação deste herbicida ainda não está totalmente esclarecido (Bongiovanni et al. 2007, Bjorling-Poulsen et al. 2008, Konjuh et al. 2008).

Entre os mecanismos propostos para a neurotoxicidade do 2,4-D são relatadas: geração de alterações covalentes que afetam a estrutura da proteína e a atividade biológica (Di Paolo 2001); inibição da polimerização de microtúbulos (Rosso et al. 2000); produção de radicais livres (Bongiovanni et al. 2007, Bjorling-Poulsen et al. 2008, Bukowska et al. 2008); alterações na membrana celular do neurônio com desacoplamento da fosforilação oxidativa e interrupção do metabolismo da acetil coenzima A (Bradbery et al. 2000). Bortolozzi et al. (1998) ressaltam que ocorre aumento nos níveis de serotonina em função do aumento da biossíntese, ou por inibição da recaptção desse neurotransmissor ou inibição da enzima mono amina oxidase (MAO).

O sistema nervoso entérico (SNE) com seus plexos ganglionados mientérico e submucoso atua nos mecanismos da digestão e absorção de nutrientes controlando motricidade, o fluxo sanguíneo e secreções do tubo gastrointestinal (Phillips & Powley 2007). Por meio das conexões com os demais componentes do sistema nervoso autônomo, o SNE permite que a função do tubo digestório se integre harmoniosamente com as demais funções do organismo (Costa et al. 1994). Nos vários segmentos do tubo digestório, o plexo mientérico situado entre as camadas circular e longitudinal da túnica muscular está

relacionado principalmente com o controle da motilidade para o transporte do conteúdo luminal (Phillips & Powley 2007).

Alterações nos neurônios do plexo mientérico são responsabilizadas por manifestações como anorexia, constipação, diarreia, perda de peso, vômitos, náusea, entre outras, presentes em diferentes condições como diabetes (Silverio et al. 2008, 2009), desnutrição e restrição protéica (Natali & Miranda-Neto 1996, Sant'Ana et al. 1997), envelhecimento (Marese et al. 2007, Gagliardo et al. 2008, Mari et al. 2008, Silva et al. 2008), infecções (Sugauara et al. 2008, 2009), doença de Parkinson (Anderson et al. 2007), doença de Chron (Boyer et al. 2007), enterites e colites (Boyer et al. 2005, 2007, Lomax et al. 2006).

O SNE exhibe respostas adaptativas a diferentes tipos de estímulos e condições alterando sua estrutura funcional ou seu fenótipo químico para manter a homeostase das funções intestinais (Lomax et al. 2005). Os neurônios do plexo mientérico expressam diferentes tipos de neurotransmissores, podendo um mesmo neurônio liberar mais de um tipo de neurotransmissor (Furness 2006).

Técnicas que utilizam corantes à base de azul de metileno podem ser utilizadas para evidenciar a população total de neurônios, como é o caso da coloração de Giemsa (Barbosa 1978). O corante à base de azul de metileno tem afinidade por estruturas ácidas da célula e pode ser um indicador da atividade celular.

Entre a população geral de neurônios mientéricos encontram-se neurônios motores inibitórios que expressam o óxido nítrico (NO) e o peptídeo vasointestinal (VIP). O NO é produzido pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir da L-arginina, via mecanismo NADPH, Ca^{2+} ou calmodulina dependente (Wade 2002). Neurônios que expressam NO podem ser evidenciados por técnicas que utilizam anticorpos para a enzima NOS ou pela técnica histoquímica da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase diaforase

(NADPH-d) já que a enzima NOS co-existe com a NADPH-d (Furness et al. 1994, Saffrey 2004).

O intestino grosso constitui a última região do tubo gastrointestinal e desempenha importante função no controle hidroeletrolítico, além de controlar a velocidade de formação e eliminação das fezes (Christensen 1989). No rato, o intestino grosso é dividido em ceco, cólon proximal, cólon distal e reto, sendo o cólon proximal responsável pelo armazenamento do bolo fecal e o cólon distal por eliminar as fezes (Takahashi & Owyang 1998).

As diferenças funcionais entre as regiões do cólon se relacionam com o peristaltismo que inclui eventos coordenados de contração e relaxamento da túnica muscular (Hasler et al. 1990). No cólon proximal observa-se a retropropulsão, e no cólon distal a intensa contração peristáltica para propulsão das fezes (Messenger et al. 1994).

Diminuição na densidade neuronal do cólon pode gerar dificuldade de defecação em função da redução na frequência e na amplitude da contração colônica (Donald et al. 1985, Sarna 1991).

Uma vez que o 2,4-D tem ação sobre o sistema nervoso central é de se esperar que atue também sobre os neurônios do sistema nervoso entérico, já que entre as manifestações da intoxicação por 2,4-D são citadas anorexia, irritação gastrintestinal, náuseas, vômitos e diarreia (EPA 1987). Portanto, utilizando-se preparados de membrana corados pela técnica de Giemsa para evidenciar a população total de neurônios e pela histoquímica para evidenciar neurônios NADPH-d positivos (NADPH-d+), este trabalho objetivou verificar os efeitos da administração de 2,4-D sobre alguns aspectos morfométricos e quantitativos dos neurônios entéricos do cólon proximal de ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa desenvolvida de acordo com os princípios éticos na experimentação animal foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal da Unipar (CEPEEA/Unipar), protocolo nº 15620/2009.

Foram utilizados dez ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Wistar e de 60 dias de idade oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá.

Os animais foram mantidos em caixas plásticas individuais, em sala do biotério setorial com ciclo de iluminação artificial controlado para 12h claro/12h escuro, a temperatura ambiente de 22°C e permaneceram no biotério setorial pelo período de 22 dias, sendo sete dias para adaptação ao novo biotério e 15 dias para administração do 2,4-D. Os animais foram pesados diariamente durante o período experimental. Após o período de adaptação, os animais, então com 60 dias de idade, foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n = 5/grupo) como descrito a seguir.

Grupo E: grupo experimental formado por animais que receberam 5 mg/kg de peso corpóreo/dia de 2,4-D (Sigma, Steinheim, Germany) diluídos em 1 mL de água durante 15 dias, via gavagem oral;

Grupo C: grupo controle formado por animais que não receberam 2,4-D, mas que receberam durante 15 dias, via gavagem oral, a mesma quantidade de água destilada (1 mL).

Para todos os animais foram fornecidas ração comercial Nuvital® e água sem restrição.

Eutanásia dos animais, obtenção e mensuração do cólon proximal

Após o período experimental e jejum alimentar de 12 horas para controlar o grau de distensão do tubo gastrointestinal, os animais foram eutanasiados com injeção intravenosa de dose letal de tiopental sódico (40 mg/kg de peso).

Posteriormente, cada animal foi laparatomizado por incisão mediana ventral para a retirada do cólon proximal (limite cranial: junção ileocecólica; e limite caudal: visualização por transiluminação do desaparecimento das pregas oblíquas da mucosa).

O cólon proximal foi decalcado em papel branco milimetrado. O decalque, posteriormente, foi escaneado para determinação da área do segmento intestinal (mm²) por meio do analisador de imagem Image Pro-Plus 3.0.1[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

Imediatamente após ter sido decalcado, o cólon proximal foi subdividido em dois segmentos de igual comprimento. O segmento proximal (cranial) destinou-se à técnica de coloração de Giemsa e o segmento distal (caudal) à histoquímica da NADPH-d. Os preparados de membrana obtidos (um preparado/animal/técnica) após os procedimentos técnicos para evidenciar neurônios destinaram-se as avaliações quantitativas e morfométricas como descrito a seguir.

Técnica de Giemsa (Barbosa 1978)

O cólon proximal foi lavado com solução de NaCl 0,9% e preenchido com solução fixadora de formaldeído acético. Para manter o preenchimento, as extremidades do cólon proximal foram atadas com fio de sutura. O cólon proximal foi então imerso na mesma solução fixadora por 24 horas e, posteriormente, foi liberado das amarras e aberto por secção longitudinal ao longo da extensão da borda mesocólica.

Ao estereomicroscópio (Olympus[®], JAP) com transiluminação, o cólon proximal foi microdissecado para retirada e descarte da túnica mucosa e da tela submucosa. A túnica serosa e a túnica muscular contendo o plexo mientérico foram preservadas e juntas constituíram o preparado de membrana.

Cada preparado de membrana obtido (um por animal) foi imerso em solução corante de Giemsa em tampão fosfato de Sorensen (pH 6,9), por no mínimo 12 horas. Posteriormente, foi desidratado em série ascendente de alcoóis (90%, 95% e absoluto), diafanizado por três imersões consecutivas em xilol (Synth[®], São Paulo, Brasil) e, em seguida, colocado entre lâmina e lamínula de vidro com resina sintética Permout (Fisher Chemical[®], USA).

Técnica histoquímica da NADPH-d (Scherer-Singler et al. 1983)

O cólon proximal foi lavado e preenchido com tampão fosfato (PB pH 7,4) e, para manter o preenchimento, teve suas extremidades atadas com fio de sutura. O segmento foi fixado em paraformaldeído 4% (Merk, Darmstad, Germany) preparado em 0,1M de tampão fosfato (TF, pH 7,4) por 30 minutos. Então foi imerso em Triton X-100 a 0,3% (Sigma, St. Louis, USA) dissolvido em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) por 10 minutos e lavado em PBS por dez vezes (10 minutos cada lavagem).

Na sequência, o cólon proximal foi incubado em um meio de reação contendo 50 mg de Nitro Blue Tetrazolium (NBT, Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri, EUA), 100 mg de β -NADPH (Sigma, Steinheim, Germany) e 0,3% de Triton X-100 em tampão Tris-HCl (0,1M H 7,6).

O desenvolvimento da reação histoquímica foi controlado visualmente com o auxílio de estereomicroscópio (Olympus[®], JAP) e teve duração de 100 minutos. Após, o cólon proximal foi aberto cortando-se as amarras das extremidades, lavado três vezes em PBS por cinco minutos cada e, então, foi imerso em solução de paraformaldeído a 4% para a fixação e armazenagem.

Para a obtenção do preparado de membrana (um por animal), os mesmos procedimentos de microdissecção descritos para a técnica de Giemsa foram utilizados. O preparado de membrana obtido foi desidratado em série crescente de álcoois (90%, 95% e

absoluto) e diafanizado por três imersões consecutivas em xilol (Synth[®], São Paulo, Brasil) e, em seguida, colocado entre lâmina e lamínula de vidro com resina Permount (Fisher Chemical[®], USA).

Quantificação dos neurônios

Para a determinação da densidade neuronal por área (mm^2), o preparado de membrana do cólon proximal obtido de cada animal foi visualizado ao microscópio de luz (Olympus BX40), com objetiva de 40x. A imagem verificada ao microscópio foi capturada por câmera digital de alta resolução AxioCam (Zeiss, Jena, Germany), digitalizada em microcomputador pelo programa Axio Vision 4.1[®] e gravada em compact disc (CD).

Os neurônios foram quantificados nas imagens obtidas de 120 campos microscópicos por preparado de membrana, amostrando igualmente todas as regiões da circunferência do cólon proximal. O software de análise de imagens Image-Pro Plus 3.0.1. (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA) foi utilizado para a quantificação neuronal nas imagens gravadas.

A área fornecida pela objetiva de 40x previamente mensurada equivaleu a $0,096 \text{ mm}^2$, sendo que os 120 campos representaram a área total de $11,52 \text{ mm}^2$ de cólon, permitindo a determinação da densidade neuronal por mm^2 de cólon proximal.

Morfometria da área do pericário dos neurônios

A mensuração da área do pericário dos neurônios mientéricos foi realizada com auxílio do programa de análise de imagem computadorizado ImagePro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Para tanto, as imagens dos neurônios capturadas por câmara digital para a quantificação neuronal foram utilizadas.

Foi mensurada a área do pericário (μm^2) de 100 neurônios por preparado de membrana de cada animal, perfazendo o total de 500 neurônios por grupo.

Os neurônios foram classificados segundo as dimensões das áreas em intervalos de classe de $100 \mu\text{m}^2$ para verificação da frequência de neurônios de diferentes tamanhos.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi testada usando o teste de Shapiro-Wilk. Os dados que tiveram distribuição normal foram expressos em média \pm desvio-padrão. Os dados com distribuição livre foram expressos usando a mediana e os percentis de 25 e 75 (P25; P75). Os dados dos grupos controle e experimental foram comparados usando teste t de Student (dados com distribuição normal) ou teste de Mann-Whitney (dados com distribuição livre). O nível de significância adotado em todos os testes foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

O peso corporal inicial dos animais não diferiu ($p > 0,05$) entre os grupos C e E. O mesmo ocorreu em relação ao peso dos animais ao final do experimento que teve duração de 15 dias. Em ambos os grupos o ganho de peso dos animais se manteve equiparado sem diferença estatística ($p > 0,05$) (Tabela 1).

A área (mm^2) do cólon proximal nos animais dos grupos E e C se manteve equiparada sem diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Ao microscópio de luz, nos preparados de membrana do cólon, os neurônios mientéricos foram visualizados predominantemente no interior de gânglios interconectados por feixes de fibras nervosas sem alteração perceptível na distribuição neuronal entre os grupos C e E (Fig. 1).

A quantificação de neurônios evidenciados pela coloração de Giemsa (população total de neurônio) e pela histoquímica da NADPH-d (neurônios NADPH-d+) não diferiu ($p>0,05$) entre os grupos E e C (Tabela 2).

Para a população total de neurônios, a área do pericário no grupo E apresentou dimensões superiores ($p<0,05$) às do grupo C (Tabela 2). No grupo E a frequência de neurônios nas classes entre 100 e 200 μm^2 e entre 300 e 400 μm^2 diminuiu e aumentou, respectivamente, em comparação ao grupo C (Fig. 2).

Entre os neurônios NADPH-d+, a dimensão da área do pericário diferiu ($p<0,5$) entre os grupos E e C, sendo menor para o grupo E (Tabela 2).

Os neurônios NADPH-d+ do grupo E, quando comparados aos do grupo C, foram mais frequentes na classe entre 100 e 200 μm^2 e menos frequentes nas classes igual ou superiores a 300 μm^2 (Fig. 3).

DISCUSSÃO

Considerando a falta de relatos sobre os efeitos do 2,4-D no plexo gástrico, optamos por adotar neste estudo exploratório inicial a dose diária de 2,4-D de 5 mg/Kg de peso corporal que é cinco vezes maior do que a NOAEL (1 mg/Kg/dia) estabelecida para efeitos renais, hepáticos e hematológicos em ratos (Garabrant & Philbert 2002).

O peso corpóreo dos animais do grupo E e do grupo C não diferiu ($p> 0,05$) no início do experimento. Durante o período experimental (15 dias), os animais ganharam peso, mas este ganho não resultou em diferenças ($p>0,05$) no peso final entre os animais dos grupos C e E, indicando que na dosagem utilizada nesta pesquisa o 2,4-D não interferiu no peso corporal do animal (Tabela 1). Contudo, quando o 2,4-D é administrado em doses superiores (300 e 150 mg/Kg/dia) há relatos de perda de peso corporal em ratos Wistar (Charles et al. 1996a,b),

corroborando, portanto, que os efeitos do 2,4-D sobre o peso dos animais são dose dependentes.

A área do cólon proximal no grupo E se manteve equiparada à do grupo C sem diferença significativa ($p>0,05$), indicando que o 2,4-D também não alterou o tamanho do cólon proximal permitindo, assim, que os dados obtidos nas avaliações quantitativas pudessem ser comparados entre os grupos E e C. O aumento ou a diminuição na área intestinal promovem, respectivamente, maior dispersão ou concentração na distribuição dos neurônios e conseqüente aumento ou diminuição aparente na quantidade de neurônios que podem induzir a erros de interpretações dos resultados (Johnson et al. 1998, Phillips & Powley 2001).

Nos preparados de membrana do cólon, os neurônios mientéricos foram visualizados predominantemente no interior de gânglios, interconectados por feixes de fibras nervosas como bem descrito na literatura (Furness 2006), sem alteração visível entre os animais do grupo C e E, indicando que também o 2,4-D não interferiu na organização espacial do plexo mientérico.

Para avaliar a população mientérica total utilizamos a técnica de coloração de Giemsa em preparados de membrana. Esta técnica é baseada na afinidade do corante por estruturas ácidas das células e tem sido utilizada (Romano et al. 1996, Furlan et al. 2002, Marese et al. 2007, Sugauara et al. 2009, Soares et al. 2009).

Também a histoquímica da NADPH-d foi empregada para identificar a subpopulação de neurônios que expressam a enzima NOS e produzem NO que é inibitório para a musculatura intestinal.

Assim, para a quantificação de neurônios foram capturadas imagens visualizadas em microscopia de luz que amostraram igualmente todas as regiões da circunferência do cólon, perfazendo o total de 120 campos. Cada campo visualizado ao microscópio com a objetiva de

40X tinha área equivalente a $0,096 \text{ mm}^2$, o que nos permitiu expressar a densidade neuronal por mm^2 de cólon proximal.

A densidade dos neurônios visualizados pela técnica de Giemsa não diferiu entre os animais que receberam 2,4-D (grupo E) ou veículo (grupo C), assim como a densidade da sub-população de neurônios NADPH-d+ também permaneceu equiparada ($p>0,05$) entre os grupos E e C indicando que não ocorreu morte de neurônios mientéricos induzida pelo 2,4-D.

Diminuição na quantidade de neurônios na população total ou em sub-populações neuronais mientéricas é mencionada ao longo do envelhecimento (Gagliardo et al. 2008, Mari et al. 2008) e para algumas condições experimentais como diabetes (Fregonesi et al. 2001) e desnutrição (Natali & Miranda-Neto 1996, Mello et al. 1997, Sant'Ana et al. 1997), evidenciando a suscetibilidade desses neurônios às condições adversas à saúde. Como a densidade neuronal da população total de neurônios e sub-população de neurônios NADPH-d+ não foi alterada, seria plausível considerar que o 2,4-D não tem efeito tóxico para neurônios mientéricos do cólon ou, ainda, que a dose utilizada ou o tempo de experimento não foram suficientes para induzir toxicidade severa que pudesse promover apoptose ou necrose neuronal.

Por outro lado, a preservação da densidade neuronal no plexo mientérico, embora seja comprovante de que não ocorreu morte neuronal, não pode ser indicativo de ausência de lesão neuronal. Assim a área do pericário de neurônios mientéricos foi mensurada, uma vez que nas etapas que precedem a apoptose ou a necrose o tamanho do neurônio é modificado.

A área do pericário dos neurônios mientéricos evidenciados pela coloração de Giemsa (população total) diferiu ($p<0,05$) entre os grupos E e C. Neurônios do grupo E tiveram área do pericário aumentada em ~13,5% em relação ao grupo C. Este aumento na área é corroborado quando os neurônios de ambos os grupos foram classificados em intervalos de classe de $100 \mu\text{m}^2$ segundo as dimensões do pericário. No grupo E ocorreu maior frequência

de neurônios nas classes superiores a $300 \mu\text{m}^2$. Em contrapartida, no grupo C foram mais frequentes neurônios com dimensões do pericário incluídas nos intervalos de classe inferiores a $300 \mu\text{m}^2$.

O corante de Giemsa é à base de azul de metileno que cora estruturas ácidas da célula, principalmente polirribossomas livres e retículo endoplasmático granular (corpúsculos de Nilss) dos neurônios. O aumento na área de pericário evidenciado por esta técnica de coloração é indicativo de maior atividade de síntese, como a que poderia estar ocorrendo nos neurônios para se adequarem aos efeitos tóxicos do 2,4-D. Hipertrofia em neurônios evidenciados pela técnica de Giemsa no íleo e no cólon distal de ratos é mencionada na toxoplasmose induzida (Sugauara et al. 2008; 2009, Soares et al. 2009)

Entre os neurônios NADPH-d+, no entanto, foi constatada diminuição significativa ($p < 0,05$) de ~7% nas dimensões do pericário no grupo E quando comparado ao grupo C, sugerindo menor expressão da enzima NOS e conseqüente produção de NO diminuída. No histograma de distribuição de frequência de neurônios nos intervalos de classe referentes às dimensões da área do pericário, constatou-se que no grupo E os neurônios NADPH-d+ foram mais frequentes nas classes igual ou inferior a $300 \mu\text{m}^2$ e no grupo C a frequência foi maior para as classes superiores.

Esta atrofia neuronal com diminuição na expressão de NO poderia ser decorrente da ativação de mecanismos entéricos inibitórios e excitatórios para acelerar a passagem do bolo alimentar e reduzir o tempo de armazenamento de fezes em resposta ao 2,4-D. Na túnica muscular do cólon, o NO é um dos principais inibidores da contração muscular, assim como a acetilcolina é um dos principais excitatórios (Furness 2006). A atividade diminuída dos neurônios NADPH-d+ é condizente com a consistência das fezes eliminadas pelos animais do grupo E com a proximidade do final do período experimental. Embora não caracterizando diarreia, as fezes se tornaram excessivamente pastosa em comparação com as fezes do grupo

C (resultados não mostrados), sugerindo menor tempo de retenção do bolo fecal no cólon proximal.

Por outro lado, ressaltamos a ocorrência de hipertofia entre neurônios da população total, o que também poderia ser indicativo de que uma ou mais subpopulações neuronais estivessem mais ativadas para promover mais síntese e liberação de neurotransmissores excitatórios. Uma das formas de neurônios compensarem a lesão inicial decorrente de condições nocivas é aumentar seus polissomas, RNA e a síntese protéica o que pode levar ao aumento nas dimensões do pericário (Jessel 1991). Por outro lado, o aumento na área do pericário pode estar relacionado a uma hipertrofia compensatória em regiões onde há acentuada morte celular (Phillips et al. 2003). Contudo, a densidade neuronal no cólon não foi alterada pelo 2,4-D, sugerindo que a hipertrofia observada nos neurônios mientéricos evidenciados pela técnica de Giemsa seja decorrente de respostas adaptativas para manter a homeostase funcional do tubo gastrointestinal.

A indução de hipertrofia na população total de neurônios mientéricos e atrofia nos neurônios NADPH-d+ pelo 2,4-D pode ter ocorrido por ação direta do herbicida sobre os neurônios ou por ação indireta via irritação da mucosa intestinal.

O mecanismo da neurotoxicidade do 2,4-D ainda não está totalmente esclarecido. Alteração no sistema monoaminérgico cerebral (Ferri et al. 2000) e aumento do nível de serotonina por aumentar a biossíntese, inibir a receptação ou inibir a mono amina oxidase (Bortolozzi et al.1998) são atribuídos ao 2,4-D. Contudo, não podemos afirmar que efeitos semelhantes possam ter ocorrido no plexo mientérico por ação do herbicida.

No SNE, a serotonina (5-HT) é um potente estimulador dos neurônios primários aferentes intrínsecos e é um intermediário nos reflexos entéricos (Bertrand et al. 1997, Pan & Gershon 2000). As células enteroendócrinas liberam 5-HT em resposta a estimulação

mecânica, e a ampla variedade de estímulos químicos, incluindo ácidos, nutrientes, sais biliares e toxinas bacterianas (Gershon et al. 1999, Lundgren 2002).

Irritantes da mucosa intestinal ativam o programa motor propulsivo sugerindo uma adaptação defensiva para rápida eliminação do conteúdo do lúmen intestinal (Grundy et al. 2006), sendo que uma grande proporção de sinais para neurônios motores inibitórios vem de interneurônios colinérgicos (Li & Furness 2000).

Sabe-se que os circuitos reflexos entéricos também podem ser ativados por vários estímulos incluindo a composição química do conteúdo luminal a partir de componentes não neuronais desencadeantes de respostas inflamatórias que incluem liberação de substâncias que, direta ou indiretamente, interagem com a rede neuronal entérica (Lomax et al. 2006). Essas substâncias facilitam a secreção entérica de acetilcolina, além de aumentar a excitabilidade de neurônios mientéricos e neurônios entéricos primários aferentes (Mulholland & Smcone 1993, Ozaki & Gebhart 2001), o que poderia justificar também a hipertrofia na população total de neurônios e a atrofia de neurônios NADPH-d+. Neurônios motores excitatórios estariam estimulados e neurônios motores inibitórios estariam com atividade diminuída.

O cólon proximal é importante na regulação da quantidade de eletrólitos e fluídos absorvidos pelo intestino e a capacidade absorptiva do cólon é influenciada por alterações na motilidade, no fluxo sanguíneo e por fatores neurócrino, endócrino e parácrino (Debonnie & Phillips 1978).

Assim, constatamos que a dosagem de 5 mg/Kg/peso por 15 dias não é suficiente para promover morte neuronal, mas induz, direta ou indiretamente, respostas adaptativas manifestadas no cólon proximal como hipertrofia da população total de neurônios e atrofia de neurônios NADPH-d+. Estas alterações tróficas favoreceriam um menor tempo de retenção do bolo fecal interferindo na consistência das fezes. Contudo, mais investigações devem ser

conduzidas para avaliar o plexo mioentérico sob o efeito de doses mais elevadas de 2,4-D e maior tempo de administração, para averiguar se a hipertrofia e a atrofia constatada nesta pesquisa poderiam representar etapas de alteração celular que em longo prazo culminariam em morte celular.

CONCLUSÃO

A ingestão de 5 mg/Kg de peso corporal de 2,4-D por 15 dias: não interfere no tamanho do cólon proximal; não altera a densidade neuronal total e nem a subpopulação de neurônios NADPH-d+; induz hipertrofia do pericário de neurônios na população total e atrofia nos neurônios NADPH-d+ no cólon proximal de ratos Wistar.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Paranaense (Unipar) pelo financiamento do projeto e pela concessão de bolsa de iniciação científica (programa Pibic/Unipar)

REFERÊNCIAS

- Anderson G., Noorian A.R., Taylor G., Anitha M., Bernhar D., Srinivasan S. & Greene J.G: 2007. Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 207:4-12.
- Aydin H., Özdemir N. & Uzunören N. 2005. Investigation of the accumulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in rat kidneys. *Forensic Sci. Inter.* 153:53-57.
- Barbosa A.J.A. 1978. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.* 11:95-97.
- Bertrand P.P., Kunze W.A.A., Bornstein J.C., Furness J.B. & Smith M.L. 1997. Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am. J. Physiol.* 36:6422-6435.

- Bjorling-Poulsen, M., Andersen H.R. & Grandjean P. 2008. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Eur. Environ. Health 7:1-50.
- Bongiovanni B., De L.P., Ferri A., Konjuh C., Rassetto M., Evangelista de Duffard A.M., Cardinali D.P. & Duffard R. 2007. Melatonin decreases the oxidative stress produced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rat cerebellar granule cells. *Neurotox Res.* 11:93-99.
- Bortolozzi A., Duffard R., Rubio M., Sturtz N. & Evangelista de Duffard A.M. 1998. Regionally specific changes in central brain monoamine levels by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in acute treated rats. *Neurotoxicology.*19(6):839-852.
- Boyer L., Ghoreishi M., Templeman V., Vallance B.A., Buchan A.M., Jevon G. Jacobson K. 2005. Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. *Auton. Neurosc. Basic Clin.* 117:41-53.
- Boyer L., Sidpra D., Jevon G., Buchan A.M. & Jacobson K. 2007. Differential responses of VIPergic and nitrergic neurons in paediatric patients with Crohn's disease. *Auton. Neurosc. Basic Clin.* 134:106-114.
- Bradbery S.M., Watt B.E., Proudfoot A.T. & Vale J.A. 2000. Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of acute chlorophenoxy herbicide poisoning: a review. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 38:111-122.
- Bukowska B., Rychlik B., Krokosz A. & Michalowicz J. 2008. Phenoxyherbicides induce production of free radicals in human erythrocytes: oxidation of dichlorohydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 by 2,4-D-Na and MCPA-Na. *Food and Chem. Toxicol.* 46(1):359-367.
- Charles J.M., Bond D.M., Jeffries T.K., Yano B.L., Stott W.T., Johnson K.A., Cunny H.C., Wilson R.D. & Bus J.S. 1996a. Chronic dietary toxicity/oncogenicity studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rodents. *Fund. Appl. Toxicol.* 33:166-172.

- Charles J.M., Dalgard D.W, Cunny H.C., Wilson R.D. & Bus J.A. 1996b. Comparative subchronic studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, amine and ester in rats. *Fund. Appl. Toxicol.* 33:161-165.
- Christensen J. 1989. Colonic motility, p.939-973 In: Schultz S.G., Wood J.D. & Rauner B.B. (Eds) *Handbook of physiology – the gastrointestinal system*. Maryland: American Physiological Society, 1906p.
- Costa M., Simon F.A.A. & Brooks J.H.1994. The enteric nervous system. *Am. J. Gastroenterol.* 89(8):125-137.
- Cox C. 1999. Herbicide fact sheet 2,4 d: toxicology, part. 2. *J. Pesticide Reform.* 19(2);14-19.
- Debongnie J.C. & Phillips S.F. 1978. Capacity of the human colon to absorb fluid. *Gastroenterology.* 74:698-703.
- Di Paolo O., Evangelista de A.M. & Duffard R. 2001. In vivo and in vitro binding of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid to a rat liver mitochondrial protein. *Chem. Biol. Interac.* 137:229-241.
- Donald I.P., Smith R.G., Cruikshank J.G., Elton R.A. & Stoddart M.E. 1985. A study of constipation in the elderly living at home. *Gerontology.* 31:112-118.
- Ferri A., Bortolozzi A., Duffard R. & Evangelista de Duffard A.M. 2000. Monoamine levels in neonate rats lactationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Biogenic Amines* 16:73-100.
- Fregonesi C.E.P.T., Miranda-Neto, M.H., Molinari, S.L. & Zanoni, J.N. 2001. Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin induced diabetes. *Arq. Neuropsiquiatr.* 59:50-53.
- Furlan M.M.D.P, Molinari S.L. & Miranda-Neto M.H. 2002. Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 60:576-581.

- Furness J.B., Li Z.S., Young H.M. & Forstermann U. 1994. Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. *Cell. Tissue Res.* 277:139-149.
- Furness J.B. 2006. *The enteric nervous system*. Blackwell Publishing, Oxford. 274p.
- Gagliardo K.M., Clebis N.K., Stabile S.R., Mari R.B., Sousa J.M.A. & De Souza R.R. 2008. Exercise reduces inhibitory neuroactivity and protects myenteric neurons from age-related neurodegeneration. *Auton. Neurosc. Basic Clin.* 141:31-37.
- Garabrant D.H. & Philbert M.A. 2002. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology. *Crit. Rev. Toxicol.* 32:233-257.
- Gershon M.D. 1999. Review article; roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13(suppl 2):15-30.
- Grundy D., Al-Chaer E.D., Aziz Q., Collins S.M., Ke M., Tache Y. & Wood J.D. 2006. Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology.* 130:1391-1411.
- Hasler W.L., Kurosawa S. & Owyang C. 1990. Regional cholinergic differences between distal and proximal colonic myenteric plexus. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* 21: G404-G410.
- Jessel T.M. 1991. Reactions of neurons to injury, p.258-268. In: Kandell E.R. & Schwartz J. & Jessell T.M. (Eds). *Principles of neural science*. 3.ed. Norwalk, Appleton & Lange, 1135p.
- Johnson R.J.R., Schemann M., Santer R.M. & Cowen T. 1998. The effects of age on the overall population and on sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J. Anat.* 192:479-488.
- Konjuh C., Garcia G., López L., Evangelista de Duffard A.M., Brusco A. & Duffard R. 2008. Neonatal hypomyelination by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Chemical and ultrastructural studies in rats. *Toxicol. Sci.* 104(2):332-340.

- Li Z.S. & Furness J.B. 2001. Inputs from intrinsic sensory neurons to NOS immunoreactive neurons in the myenteric plexus of guinea-pig ileum. *Cell Tissue Res.* 299:1-8.
- Lomax A.E., Fernandez E. & Sharkey K.A. 2005. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol. Motil.* 17:4-15.
- Lomax A.E., Linden D.R., Mawe G.M. & Sharkey K.A. 2006. Effects of gastrointestinal inflammation on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits. *Auton. Neurosc. Basic Clin.* 126:250-257.
- Lundgren O. 2002. Enteric nerves and diarrhoea. *Pharmacol. Toxicol.* 90:109-120.
- Marese A.C.M., Freitas P. & Natali M.R.M. 2007. Alterations of the number and profile of myenteric neurons of Wistar rats promoted by age. *Auton. Neurosc. Basic Clin.* 137:10-18.
- Mari R.B., Clebis N.K., Gagliardo K.M., Guimarães J.P., Stabile S.R., Germano R.M. & De Souza R.R. 2008. Effects of exercise on the morphology of the myenteric neurons of the duodenum of wistar rats during the ageing process. *Anat. Histol. Embryol.* 37:289-295.
- Mello E.V.S.L., Stabile S.R. & Miranda-Neto M. H. 1997. Effect of maternal protein deprivation on morphological and quantitative aspects of the myenteric plexus neurons of proximal colon in rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 55(1):106-113.
- Messenger J.P., Bornstein J.C. & Furness J.B. 1994. Electrophysiological and morphological classification of myenteric neurons in the proximal colon of guinea-pig. *Neuroscience* 60:227-244.
- Mulholland M.W. & Smcone D.M. 1993. Prostaglandin E2 stimulation of acetylcholine release from guinea pig myenteric plexus neurons. *Am J. Surg.* 166:552-556.
- Natali M.R.M. & Miranda-Neto M.H. 1996. Effect of maternal protein deprivation on morphological and quantitative aspects of the myenteric plexus neurons of proximal colon in rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 54:273-279.

- Ozaki N. & Gebhart G.F. 2001. Characterization of mechanosensitive splanchnic nerve afferent fibers innervating the rat stomach. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281:G1449-G1459.
- Pan H. & Gershon M.D. 2000. Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine. *J. Neurosci.* 20:3295-3309.
- Phillips R.J. & Powley T.L. 2001. As the gut ages: timetables for aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. *J. Comp. Neurol.* 434:358-377.
- Phillips R.J., Kieffer E.J. & Powley T.L. 2003. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. *Auton. Neurosc. Basic Clin.* 106:69-83.
- Phillips R.J. & Powley T.L. 2007. Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. *Auton. Neurosc. Basic Clin* 136:1-19.
- Romano E.B., Miranda-Neto M.H. & Cardoso R.C.S. 1996. Preliminary investigation about the effects of streptozotocin-induced chronic diabetes on the nerve cell number and size of myenteric ganglia in rat colon. *Rev. Chil. Anat.* 14:139-145.
- Rosso S.B., Cáceres A.O., Evangelista de Duffard A.M., Duffard R. & Quiroga S. 2000. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid disrupt the cytoskeleton and disorganizes the Golgi apparatus of cultured neurons. *Toxicol. Sci.* 56:133-140.
- Saffrey M.J. 2004. Ageing of the enteric nervous system. *Mech. Ageing Dev.* 125:899-906.
- Sant'Ana D.M.G., Miranda-Neto M.H., Molinari S.L. & Sant'Ana M.A. 1997. Morphological and quantitative study of myenteric plexus of ascending colon of rats subjected to proteic desnutrition. *Arq. Neuropsiquiatr.* 55:686-695.
- Sarna S.K. 1991. Physiology and pathophysiology of colonic motor activity. Part II. *Dig. Dis. Sci.* 36:998-1018.

- Silva E.A., Natali M.R.M. & Prado I.M.M. 2008. The number and profile of reactive NADH-d and NADPH-d neurons of myenteric plexus of six-month-old rats are different in the cecum portions. *Pesq. Vet. Bras.* 28(5):248-291.
- Silverio S.M., Mari R.B., Clebis N.K., Scoz J.R., Germano R.M., Agreste F., Bombonato P.P. & Stabile S.R. 2008. Assessment of nadph-diaphorase stained myenteric neurons of the jejunum of diabetic rats supplemented with ascorbic acid. *Pesq. Vet. Bras.* 28(2):95-102.
- Silverio S.M., Mari R.B., Clebis N.K., Scoz J.R., Germano R.M., Major J.A.A., Bombonato P.P. & Stabile S.R. 2009. Effects of ascorbic acid supplementation in ileum myenteric neurons of streptozotocin-induced diabetic. *Pesq. Vet. Bras.* 29(4):295-302.
- Soares J., Moreira M.N., Da Silva A.V., Sant'Ana D.M.G. & Araújo E.J.A. 2009. Infecção crônica por *Toxoplasma gondii* induzindo hipertrofia de neurônios do plexo mientérico do cólon descendente de *Rattus norvegicus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18(2):57-60.
- Sugauara E.Y.Y., Sant'Ana D.M.G., Almeida E.C., Reis A.B., Silva A.V. & Araújo E.J.A. 2008. Alterations on the myenteric plexus of the ileum and the descending colon caused by *Toxoplasma gondii* (genotype III). *Arq. Neuropsiquiatr.* 66(3-A):516-523.
- Sugauara E.Y.Y., Sant'Ana D.M.G., Silva A.V., Souza E.A. & Araújo E.J.A. 2009. Hypertrophy of the neurons in the ileum of rats infected with cysts of *Toxoplasma gondii* (genotype II). *Acta Scientiarum Biol. Sci.* 31(2):195-201.
- Scherer-Singler U., Vincent S.R., Kimura H. & McGeer E.G. 1983. Demonstration of unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J. Neurosci. Method.* UK. 9(3):229-234.
- Takahashi T. & Owyang C. 1998. Regional differences in the nitrergic innervation between the proximal and the distal colon in rats. *Gastroenterology.* 115:1504-1512.

United States Environmental Protection Agency – EPA. 1987. The risk assessment guidelines of 1986. Office of health and environmental assessment. Washington, DC. EPA/600/8-87/045.

Tabela 1. Média e desvio padrão de pesos corporais (g) inicial e final e da área (mm²) do cólon proximal (CP) dos animais dos grupos controle (C) e experimental (E)

Grupos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Area do CP (mm²)
C (n = 5)	266,80 ± 9,2	299,20 ± 9,3	2122,8 ± 123,96
E (n = 5)	254,40 ± 28,39	292,00 ± 4,06	2113,8 ± 175,79

As médias não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (p>0,05)

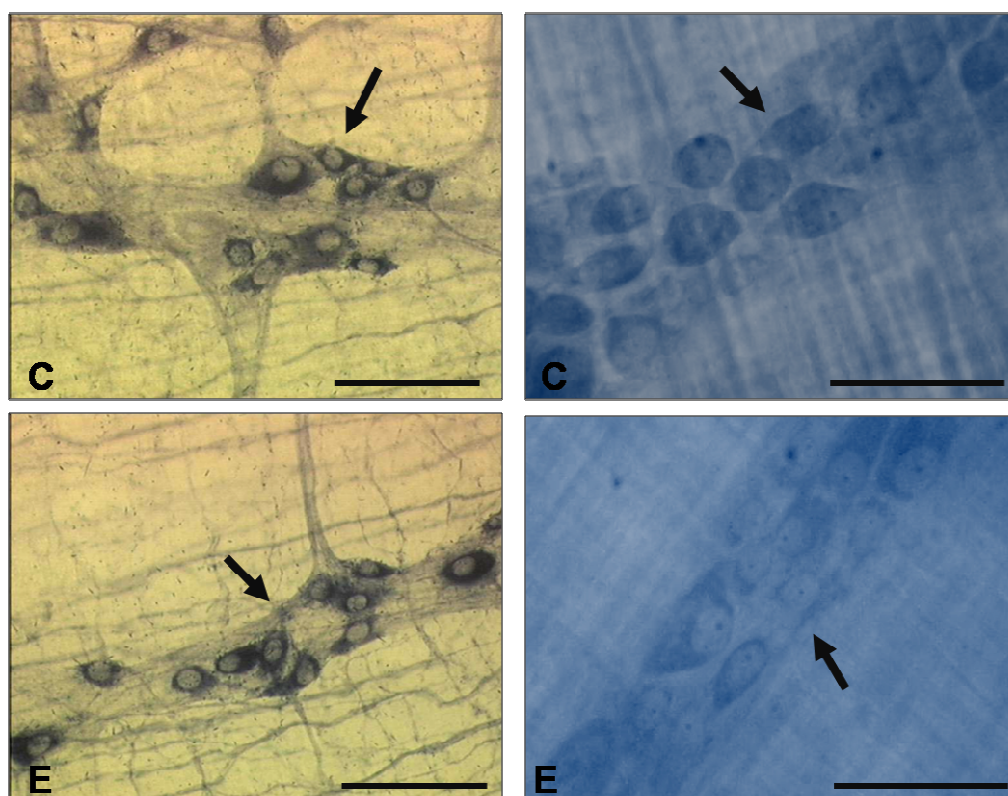


Fig. 1. Fotomicrografia de preparados de membrana do cólon proximal de ratos dos grupos controle (C) e experimental (E) evidenciando: à esquerda, gânglio (seta) contendo neurônios mientéricos NADPHd+ interconectado por feixes de fibras nervosas; e à direita, gânglio contendo neurônios mientéricos evidenciados pela técnica de Giemsa (seta). (barra = 100 μ m).

Tabela 2. Média e desvio padrão da densidade neuronal (neurônios/11,52 mm² de cólon proximal e neurônios/mm² de cólon proximal) e mediana e percentis (P 25; P 75) da área do pericário (µm²) de neurônios mientéricos do cólon proximal (CP) dos animais dos grupos controle (C) e experimental (E).

Grupos	Densidade neuronal (11,52 mm² de CP)	Densidade neuronal (mm² de CP)	Área do Pericário (µm²)
Técnica de coloração de Giemsa			
C (n = 5)	896,8 ± 86,9	77,84 ± 7,54	231,9 (176,3; 319,8)*
E (n = 5)	901,0 ± 144,9	78,21 ± 12,57	263,2 (196,3; 350,0)*
Histoquímica da NADPH-d			
C (n = 5)	473,2 ± 41,3	41,0 ± 3,58	338,5 (266,4; 438,3)*
E (n = 5)	466,0 ± 67,8	40,5 ± 5,88	314,2 (233,6; 411,1)*

Valores marcados por asterisco (*) na mesma coluna diferem (p <0,05) entre os grupos

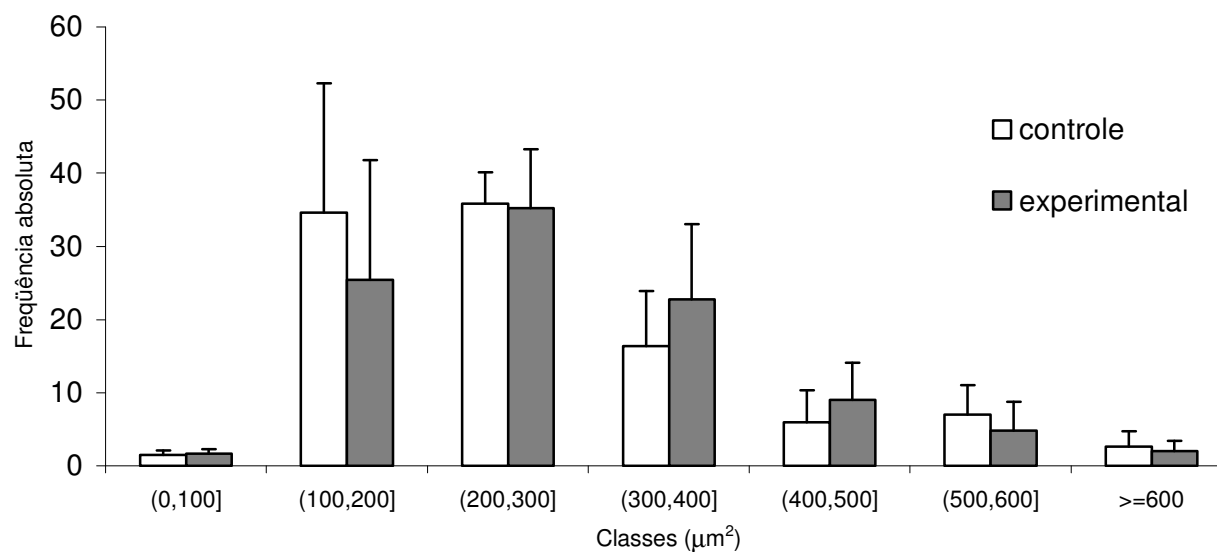


Fig. 2. Histograma de frequência absoluta da população total de neurônios mientéricos classificados em classes de $100 \mu\text{m}^2$ segundo as dimensões da área do pericário dos neurônios do cólon proximal de ratos dos grupos controle (grupo C) e experimental (E).

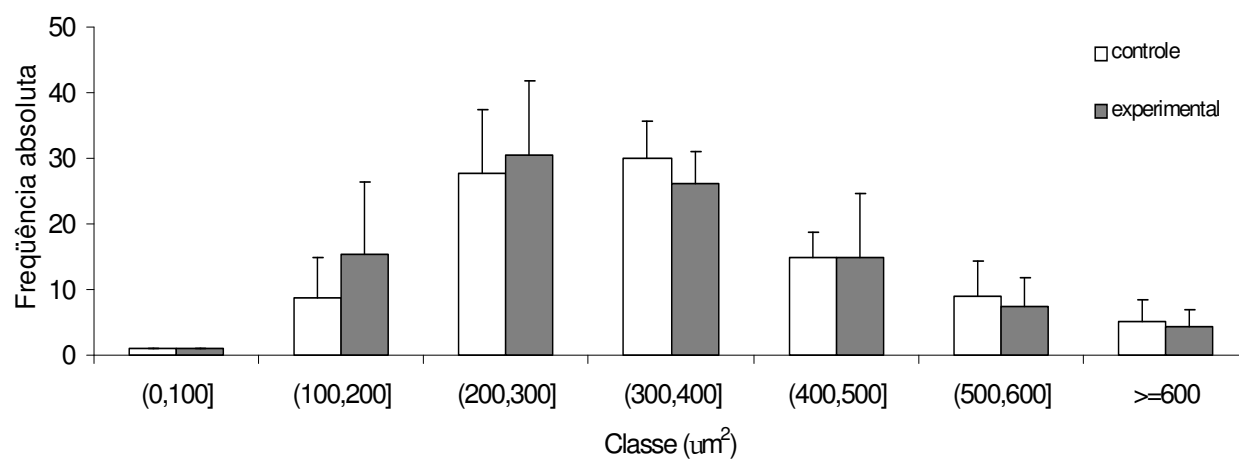


Fig. 3. Histograma de frequência absoluta de neurônios mientéricos NADPH-d+ classificados em classes de 100 μm² segundo as dimensões da área do pericário dos neurônios do cólon proximal de ratos dos grupos controle (grupo C) e experimental (E).



ISSN 0100-736X *print version*
ISSN 1678-5150 *online version*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Objective and editorial policy](#)
- [Presentation of manuscripts](#)

Objective and editorial policy

Pesquisa Veterinária Brasileira is aimed to publish the results of original research in order to contribute to the support of animal health, which most depends on the knowledge about veterinary prophylaxis and control.

Published monthly, **PVB** publishes original works and review articles in the field of veterinary pathology in its general sense, mainly relating to diseases of economic significance and of interest to public health.

Although the journal does not accept short communications in the form of scientific notes, there is no minimum limit of pages for a submitted work. However, it should present enough information about the experiments or the methodology used in the study.

Three copies of the work written in Portuguese or in English should be sent to the [editor](#) at the address below, together with a diskette (preferably prepared in MS-Word 7.0). All works should present the results of research which were not published and are not being considered for publication by other journal.

Although the concepts and opinions expressed in the works are responsibility of the authors, the [editor](#), with the assistance of the [Advisory board](#), reserves the right to suggest or request all necessary or recommendable changes.

Presentation of manuscripts

1. Works should be arranged, if possible, in the following order: Title, Abstracts (both in English and Portuguese), Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions (or combinations of these last three items), Acknowledgements, and References.

a) Article's **title** should be concise, and point the work's

content out;

b) **Abstracts** both in English and in Portuguese should be presented using active voice in the past. Abstracts should point out what was done and studied, as well as the most important results and conclusions. Indexing terms should be added at the final of each abstract. Authors should refer to the most recent issue of the journal to observe examples of abstracts.

c) The **introduction** should be brief, quote specific bibliographical citation (this should not assume the main importance of the item), and conclude with the work's objective.

d) **Material and Methods** should present all necessary data for other researchers to reproduce the work.

e) **Results** should concisely present all assembled data. Tables should only be prepared with relevant data, presenting averages of several repetitions, if appropriate. In some cases, it is suitable to express complex data through graphics, instead of presenting them in extensive tables.

f) In the **discussion**, the results should be discussed in relation to the literature. It is not recommended to mention works in progress or future plans, in order to avoid any author's and journal's obligation to publish them.

g) **Conclusions** should only be based on the results presented in the work.

h) **Acknowledgements** should be succinct, and should not appear in the text nor in footnotes.

i) The **reference** list, which should only include the bibliography cited in the work and the one that has served as secondary data sources, should be arranged in alphabetical order according to the surname of the first author. All author names and the title of each publication should be recorded. The title of the journal or work should also be cited in full or abbreviated, according to the rules of the Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT (Brazilian Association for Technical Standards), *Style Manual for Biological Journals* (American Institute for Biological Sciences) and / or *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (American Chemical Society, Washington, D.C.).

2. The preparation of the text should comply with the following rules:

a) all works should be typed double-spaced in only one side of the paper with margins of at least 2,5 centimetres; tables should be presented at the final of the work in separate sheets, using paper A4, if necessary; all pages should be

consecutively numbered and ordered in text, captions, tables and figures;

b) the text should be the most concise possible, preferably using an impersonal language and the past tense; footnotes should be numbered consecutively in superscript Arabic numerals; footnotes should appear at the bottom of their respective pages; all tables and figures should be mentioned in the text, preferably by their identification number and following this numerical order; the abstracts should appear in a single paragraph, and should not quote bibliographical references;

c) author's professional address should appear as a footnote in the first page of the work;

d) all acronyms and abbreviations should appear within parentheses following their full names the first time they are mentioned in the text;

e) bibliographical citations should follow the form "author and year"; for works with two authors, both author names should be cited; for works with three or more authors, only the first name should be cited and followed by "et al." and the year; for works with same authors and year, a lower-case letter should be added to the year in order to differentiate them; all cited works should appear in full in the reference list, including those which have served as secondary data sources; however, secondary sources should not be cited in the text; this should be stated at the final of the reference list in the following form: "(Cited by Author 19..)"; the secondary sources should be cited only once in the reference list; personal communications and other unpublished data should be preferably cited within parentheses in the text, citing their titles and authors; the comma should not be used between author and year; the semicolon should not be used after the year; examples: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) reference list should be prepared with a minimum of punctuation, and without using capital letters; scientific names should be underlined, following the journal's style (please see the most recent issue), including the citation order of the bibliographical elements.

3. **Figures** (graphics, drawings, maps or photographs) should be presented in a bigger size (about 150%) to allow reductions. Use lettering or signals of sufficient size to be legible after reduction, when appropriate. No part should be typed. Magnification should be preferably indicated in the figure area; a title at the top of the figure should be avoided. Drawings should be made in black ink on white paper; do not use squared paper. Using a soft pencil, each figure should be identified at the margin or on the back with the author's name, the figure number and an arrow pointing to the top. Photographs should be presented in black and white glossy

prints, and should not be mounted. Coloured slides should also be presented. Only in the case colour is essential for the complete understanding of the figures, their printing will be in colour. Do not use paper clips or staples; send figures in an envelope instead.

4. Figure's descriptive captions should contain sufficient information to make them understandable. Captions should be presented in separate sheets, beginning with the title of the work.

5. **Tables** should be understandable without reference to the text. Each table should have a complete title. Vertical rules should not be used in tables; instead, two long lines should be used, one above and the other below the column headings; between these two lines, other shorter lines can be used to group columns. Footnotes should be indicated in alphabetical letters, restarting from *a* each new table. Footnotes should appear just below the respective table, separated by a short line at the left.

[\[Home\]](#) [\[About the journal\]](#) [\[Editorial board\]](#) [\[Subscription\]](#)

© 2009 *Colégio Brasileiro de Patologia Animal*

Embrapa-CNPAB/PSA
Km 47 - Seropédica
23851-970 Rio de Janeiro RJ Brasil
Tel.: +55 21 2682-2940
Tel./Fax: +55 21 2682-1081

e-Mail

colegio@cbpa.org.br



WebQualis

CONSULTAR ▾ DOCUMENTOS DE ÁREA ▾ E-MAIL DOS COORDENADORES LISTA COMPLETA

Selecione o tipo de detalhamento da pesquisa:

Por ISSN do Periódico Por Título do Periódico Por Classificação / Área de Avaliação

CONSULTAR

Área de Avaliação Estrato

* Ano-Base 2007

Área de Avaliação: MEDICINA VETERINÁRIA



ISSN	Título	Estrato	Área de Avaliação
0100-204X	Pesquisa Agropecuária Brasileira (1977. Impressa)	B1	MEDICINA VETERINÁRIA
1678-3921	Pesquisa Agropecuária Brasileira (Online)	B1	MEDICINA VETERINÁRIA
0100-736X	Pesquisa Veterinária Brasileira (Impresso)	B1	MEDICINA VETERINÁRIA
0936-6768	Reproduction in Domestic Animals (1990)	B1	MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR

Reconhecida pela Portaria - MEC Nº 1580, DE 09/11/93 - D.O.U. 10/11/93

Mantenedora: Associação Paranaense de Ensino e Cultura - APEC

DIRETORIA EXECUTIVA DE GESTÃO DA PESQUISA E DA PÓS GRADUAÇÃO

COORDENADORIA DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA - COPIC

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEPEEA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "AVALIAÇÃO MORFOQUANTITATIVA DOS NEURÔNIOS MIENTÉRICOS DO CÓLON PROXIMAL DE RATOS (RATTUS NORVEGICUS) TRATADOS COM ÁCIDO 2,4 DICLOROFENOXIACÉTICO", protocolo 15620/2009, sob a responsabilidade de SANDRA REGINA STABILLE, está de acordo com os Princípios éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) em reunião realizada em 29/08/2008. Este certificado expira em 29/08/2009.

We certify that the project "AVALIAÇÃO MORFOQUANTITATIVA DOS NEURÔNIOS MIENTÉRICOS DO CÓLON PROXIMAL DE RATOS (RATTUS NORVEGICUS) TRATADOS COM ÁCIDO 2,4 DICLOROFENOXIACÉTICO", protocol 15620/2009, in the responsibility of SANDRA REGINA STABILLE, is in agreement with the Ethical Principles in Animal adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH OF UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) in 08/29/2008. Expiration date: 08/29/2009.

UMUARAMA - PR, 01/11/2008.



Prof. Msc. Juliana Silveira do Valle
Presidente CEPEEA/UNIPAR.

Registro Nº:15620



Dayane Aparecida Fagiolo
Secretária CEPEEA/UNIPAR.

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](#)