

# ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS NEURÔNIOS NADH-DIAFORASE POSITIVOS DO JEJUNO DE RATOS WISTAR EM DIFERENTES IDADES

## Evânildo Buzzo Romano

Doutora em Anatomia Funcional: estruturas e ultra-estrutura pela Universidade de São Paulo - USP; Docente em Anatomia Humana na Universidade Estadual de Maringá - UEM. E-mail: ebromano@hotmail.com

## Maria Raquel Marçal Natali

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP. Docente em Histologia na Universidade Estadual de Maringá - UEM. E-mail: mrmnatali@uem.br

## Joici de Carvalho Leite

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá - UEM. E-mail: joici-carvalho@hotmail.com

## Lilian Brites Campos

Mestranda em Biologia Celular pela Universidade Estadual de Maringá - UEM. E-mail: lilianbrites@hotmail.com

## Evandro José Beraldi

Mestrando em Biologia Celular pela Universidade Estadual de Maringá - UEM. E-mail: evandro-vahn@hotmail.com

**RESUMO:** O sistema nervoso entérico é uma divisão do sistema nervoso autônomo, constituído pelos plexos ganglionados mioentérico e submucoso. Ele atua regulando as funções do trato gastrointestinal e, a partir da idade adulta, sofre um processo contínuo de neurodegeneração. O envelhecimento envolve mudanças em certos aspectos da estrutura e das funções gastrointestinais, resultando em uma redução na frequência e amplitude dos movimentos peristálticos, assim como complicações na digestão e absorção de nutrientes. Portanto nos propusemos a estudar a densidade dos neurônios NADH-diaforase positivos, do plexo neuronal de jejuno, em ratos de diferentes idades (21, 60, 90, 210 dias), empregando-se o método histoquímico NADH-diaforase, em preparados de membrana do jejuno em ratos Wistar. Por meio da morfometria da subpopulação de neurônios nitrérgicos do jejuno de ratos envelhecidos, positivos para a técnica NADH-diaforase, os resultados desse estudo demonstram que ocorre um aumento natural da área dos neurônios nas primeiras semanas de vida. A partir da idade adulta, o tamanho médio da área dos neurônios sofre uma diminuição, associada ao início da perda neuronal, e permanece sem alterações significativas durante o restante da vida do animal.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ratos *Wistar*; Neurônios Mioentéricos; Jejuno; Morfometria; Envelhecimento.

## MORPHOMETRIC ANALYSIS OF NADH-DIAPHORASE POSITIVE NEURONS OF THE JEJUNUM OF WISTAR RATS AT DIFFERENT AGES

**ABSTRACT:** The enteric nervous system is a division of the independent nervous system, consisting of the ganglionated myenteric and submucous plexuses. It acts by regulating the functions of the gastrointestinal tract, and from adulthood, suffers a continual process of neurodegeneration. Aging involves changes in certain aspects of gastrointestinal structure and function, resulting in a reduction in the peristalsis frequency and amplitude, as well as complications in nutrients digestion and absorption. So it was decided to study the NADH density -diaphorase positive neuronal plexus of jejunum in rats of different ages (21, 60, 90, 210 days), using the NADH-diaphorase histochemical method in membrane preparations of jejunum in rats Wistar. By morphometry nitrergic neurons subpopulation of the old mice jejunum, positive for NADH-diaphorase technique, the results of this study demonstrate that there is a natural increase in the area of neurons in the first weeks of life. Upon adulthood, the mean area of neurons is diminished, associated with the onset of neuronal loss and remains without significant changes during the rest of the animal's life.

**KEYWORDS:** Wistar Rats; Myenteric Neurons; Jejunum; Morphometry;

Aging.

## INTRODUÇÃO

O sistema nervoso entérico (SNE) é uma divisão do sistema nervoso autônomo, constituído pelos plexos ganglionados mioentérico e submucoso. Embora o SNE comunique-se por uma grande extensão com o sistema nervoso central, ele é capaz de funcionar autonomamente. Esta relativa independência permite ao SNE o controle de funções complexas do trato gastrointestinal, atuando na regulação da absorção, secreção e motilidade (WADE; COWEN, 2004).

O plexo mioentérico é uma complexa rede de neurônios e seus processos dendríticos e axonais, localizado entre as camadas longitudinal e circular do músculo liso na parede do trato gastrointestinal. É de natureza parassimpática e é constituído por fibras e neurônios (gânglios intramurais) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Os gânglios possuem importante papel no controle da motilidade produzindo os movimentos peristálticos, os quais têm a tarefa de impulsionar o conteúdo existente na luz do intestino coordenando as contrações e relaxamento dos músculos circulares e longitudinais além de controlarem a ação das glândulas intestinais (COOKE, 1986).

O envelhecimento é um processo vital nos seres vivos em que ocorre uma série de alterações, levando à regressão de praticamente todo o sistema orgânico (RIBAS, 1968). Como consequência, ocorre uma queda gradativa do rendimento corporal, afetando os sentidos, a capacidade de movimentação, a reação emocional e intelectual.

O acúmulo de perdas celulares, ou seja, havendo mais morte celular do que proliferação é característica dos tecidos em envelhecimento, ocorrendo em idades mais avançadas ou em doenças degenerativas (RIBAS, 1968). No caso do tecido nervoso a perda celular é bastante significativa comparada aos outros tecidos, pois suas células não são capazes de se multiplicar.

O envelhecimento envolve mudanças em certos aspectos da estrutura e das funções gastrointestinais. Há uma redução na frequência e amplitude dos movimentos peristálticos, assim como complicações na digestão e absorção de nutrientes (JOHNSON et al., 1998). Alterações na função neuromuscular gastrointestinal estão relacionadas à incidência de problemas gastrointestinais, tais como disfagia, distúrbios no refluxo gastro-esofágico, dores abdominais, diarreia, constipação e incontinência fecal (WADE; COWEN, 2004).

No processo de envelhecimento há uma redução excessiva das células nervosas. Ocorre um decréscimo de mais ou menos 40% dos neurônios intramurais em ratos com 24 meses de idade (SANTER; BAKER, 1988), que é acompanhado pelo aparente crescimento dos componentes fibrosos que fazem parte do plexo (GOMES; SOUZA; LIBERTI, 1997).

Estas variações relacionadas ao envelhecimento já fo-

ram observadas em várias espécies, incluindo humanos (MECIANO-FILHO; CARVALHO; DE SOUZA, 1995; GOMES; SOUZA; LIBERTI, 1997), ratos, cobaias e camundongos (SANTER; BAKER, 1988; GABELLA, 1989; SANTER, 1994; JOHNSON et al., 1998; WADE, 2002; PHILLIPS; POWLEY, 2001).

Santer e Baker (1988) estudaram os efeitos da idade sobre os neurônios do plexo mioentérico em intestino delgado de ratos, verificando que em animais idosos ocorreu perda neuronal de 40% no jejuno, 43% no íleo, 64% no colo e 42% no reto, acompanhada de um aumento da área dos neurônios, quando comparado a ratos jovens. Os autores ressaltam que a perda afetaria toda população neuronal, sendo acompanhada de uma concomitante reorganização dos elementos ganglionares restantes e um aumento na sua eficiência.

Considerações semelhantes foram observadas por Gabella (1989) no tubo digestório. Durante o envelhecimento, o tubo digestório das cobaias sofreu um aumento de comprimento e diminuição de 50% na densidade neuronal intestinal, também acompanhada por mudanças estruturais e reorganização dos neurônios.

A relação entre o predomínio de uma população neuronal, o tamanho do corpo celular e o período do desenvolvimento do animal foi analisada por Gabella (1971), no plexo mioentérico de ratos adultos e recém-nascidos. O autor concluiu que durante o crescimento existe um aumento no tamanho neuronal, e que a população predominante nos animais recém-nascidos é a de neurônios pequenos. Contudo em animais adultos, embora os neurônios pequenos estivessem presentes, os neurônios maiores constituíam o principal componente da população ganglionar.

Vários métodos têm sido utilizados para estimar o número de neurônios entéricos. Estes incluem coloração não-histoquímica (azul de toluidina, azul de metileno, azul cuprolínico e corante de Giemsa), coloração pela prata, técnicas histoquímicas (NADH-diaforase, NADPH-diaforase, acetilcolinesterase), técnicas imunohistoquímicas, como Miosina V (BUTTOW et al., 2006), (VIP, PGP 9.5, Subst. P, neurotensina, neuropeptídeo Y, etc.) (BOR-SENG-SHU et al., 1994; LIBERTI et al., 1994; NATALI; MIRANDA-NETO, 1996; SCHÄFER; HÄNSGEN; MESTRES, 1999; NATALI; MIRANDA-NETO; ORSI, 2003).

A técnica histoquímica NADH-diaforase é utilizada para evidenciar a subpopulação de neurônios nitrérgicos, que juntamente com os neurônios colinérgicos, constituem a população mioentérica. Neurônios nitrérgicos são aqueles que utilizam NO sintetizado pela enzima óxido nítrico sintetase, que por sua vez requer nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) para sua atividade (PHILLIPS; KIEFFER; POWLEY, 2003).

O objetivo deste trabalho foi analisar a morfometria dos neurônios mioentéricos do jejuno de ratos Wistar, com idades de 21, 60, 90, 210 dias, empregando-se os métodos de microscopia de luz em preparados de membrana obtidos pela dissecação das túnicas intestinais do jejuno, com exposição do plexo mioentérico. A evidenciação neuronal foi feita pela análise da subpopulação neuronal nitrérgica

através da técnica histoquímica NADH-diaforase.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 OBTENÇÃO DOS GRUPOS

Foram utilizados segmentos do jejuno de 20 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e mantidos com temperatura constante de  $22 \pm 2$  °C e alternância de ciclos de iluminação de claro e escuro de 12 horas, durante o período de vida correspondente, sendo mortos com as idades de 21, 60, 90, 210 dias. Com exceção do grupo de 21 dias (desmame), os animais receberam ração padronizada para roedores NUVILAB-NUVITAL® (recomendada pelo National Research Council & National Health Institute - USA), com teor protéico de 22 %, e água "ad libitum".

Ao sacrifício, cinco animais de cada faixa etária foram pesados e após inalação de éter etílico, foram submetidos a laparotomia. O segmento jejuno de cada animal foi retirado, e preparado para a realização da técnica histoquímica do NADH-diaforase.

Todos os procedimentos deste estudo estão de acordo com princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram submetidos à análise do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá. (Protocolo 024/2004).

#### 2.2.1 Evidenciação Neuronal - Método Histoquímico Do NADH-Diaforase (GABELLA, 1969)

Os segmentos intestinais (jejuno) foram lavados e dissecados por injeção de solução de Krebs, pH 7.3, com uma agulha introduzida em sua extremidade proximal, seguida de ligadura de suas extremidades com linha fina. Os segmentos foram imersos em solução de Krebs, pH 7.3, durante 10 a 20 minutos para manter as condições celulares. Em seguida foram imersos em solução triton X100 (0,3%) em solução de Krebs durante 10 minutos. Após este procedimento os segmentos intestinais foram submetidos a três lavagens em solução de Krebs, três minutos cada. A seguir foram incubados durante aproximadamente 45 minutos em solução contendo Nitro Blue Tetrazolium (NBT), tampão fosfato de sódio,  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida) e água destilada. Transcorrido o tempo de incubação, interrompe-se a reação utilizando-se formol a 10% tamponado.

Após fixação, os segmentos intestinais foram abertos e dissecados em microscópio estereoscópico, visando à retirada das túnicas mucosa e submucosa. A seguir foi realizada a desidratação das membranas, em três álcoois absoluto por 3 a 5 minutos a cada passagem, diafanização em três xilóis consecutivos, permanecendo 5 minutos a cada passagem, e posteriormente foi feita a montagem das lâminas com os segmentos jejunais, entre lâmina e lamínula com resina sintética Permoumt® (Fisher Chemical, New Jersey, USA).

### 2.2 ANÁLISE DO PERFIL NEURONAL

Para o estudo da área dos neurônios nos diferentes grupos, foram capturadas imagens dos gânglios da região intermediária para realizar as medidas. Considerou-se como região intermediária as partes da circunferência intestinal localizadas entre 60° e 120°, e entre 240° e 300° em relação à inserção do mesentério (Figura 1) (MIRANDA-NETO et al., 2001).

As imagens foram capturadas com o auxílio do programa de análise de imagem Image-Pro® Plus 4.5 (Media Cybernetics, Inc.). Foram medidas as áreas de 100 neurônios de cada animal, num total de 500 neurônios, utilizando-se o mesmo programa. A área será expressa em micrômetros quadrados.

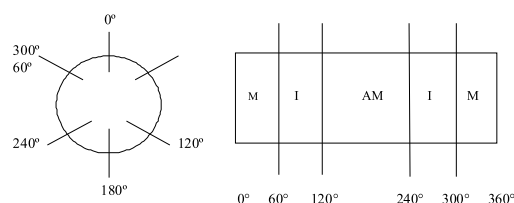


Figura 1 Esquema do preparado de membrana

### 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

## 3 RESULTADOS

Podemos observar na Tabela 1 e na Figura 2, os valores médios, em micrômetros quadrados, da área dos neurônios positivos para a técnica NADH-diaforase, no caso, a subpopulação nitrérgica. Os resultados mostraram que houve um aumento na área dos neurônios do jejuno relacionado à idade do animal.

Os três grupos mais velhos, E60, E90 e E210, apresentaram um aumento estatisticamente significativo na média da área de seus neurônios, quando comparados ao grupo mais jovem, E21. O grupo de 60 dias apresentou ainda um aumento significativo da área neuronal quando comparado ao grupo de 90 dias. As demais alterações na área dos neurônios não apresentaram significância (Tabela 1).

Tabela 1 Tamanho dos neurônios NADHd-positivos ( $\mu\text{m}^2$ ) no jejuno de ratos envelhecidos

Grupos	Média $\pm$ desvio padrão (SD)*
E21	151.7 $\pm$ 60,25
E60	208.2 $\pm$ 83,07
E90	195.4 $\pm$ 73,74
E210	199.7 $\pm$ 68,10

\*a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey

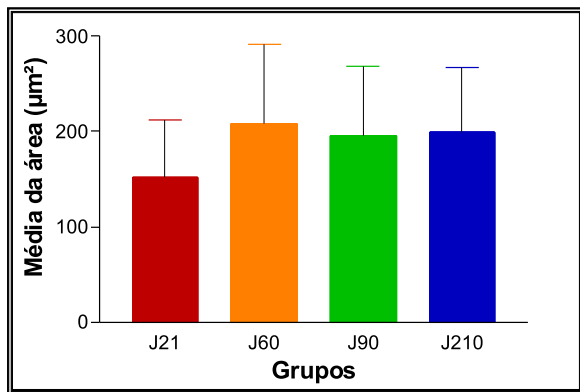


Figura 2 Tamanho médio dos neurônios NADHd-positivos no jejuno de ratos de diferentes idades

Os grupos de 21, 90 e 210 dias apresentaram uma distribuição homogênea semelhante quanto à média de neurônios. Já o grupo de 60 dias, que apresentou os maiores valores para a área dos neurônios, apresenta uma distribuição mais heterogênea, com pico variando entre 100 e 250  $\mu\text{m}^2$  (Figura 2).

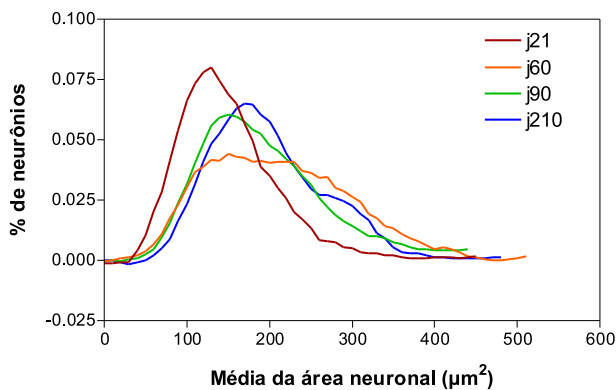


Figura 3 Mudanças na média da área dos neurônios do jejuno em diferentes idades

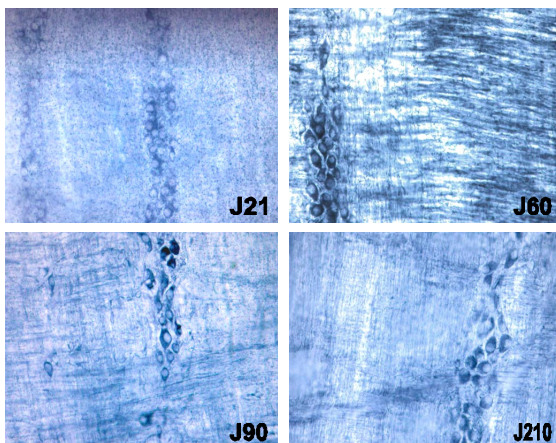


Figura 4 Fotomicrografias dos preparados de membrana evidenciando os neurônios do plexo mioentérico do jejuno de ratos Wistar em diferentes idades.(40X) Coloração NADH-diaforase.

#### 4 DISCUSSÃO

No presente estudo, a média da área dos neurônios NADH-diaforase positivos no jejuno variou um pouco quanto aos trabalhos já publicados. Utilizando a técnica histoquímica para detectar a atividade da DPNH-tetrazólio redutase, Gabella (1971) observou que, em ratos com 90 dias de idade, o pico do tamanho dos neurônios no intestino delgado ficava entre 100 e 175  $\mu\text{m}^2$ . Já Phillips, Kieffer e Powley (2003) encontrou um pico entre 90 e 180  $\mu\text{m}^2$  para animais de 90 dias. Nos resultados obtidos, observamos que o pico de neurônios está situado entre 120 e 200  $\mu\text{m}^2$  (figura 3).

Os animais de 60 dias apresentaram o maior valor médio para a área neuronal dentre os grupos estudados. Provavelmente, é nesse período do crescimento do animal que as células nervosas se desenvolvem por completo, atingindo seu tamanho ideal. Em seguida, o grupo de 90 dias apresentou uma diminuição no tamanho de seus neurônios, enquanto o de 210 não apresentou diferenças significativas em relação aos animais de 90 dias. Somado aos resultados obtidos por Phillips, Kieffer e Powley (2003) e Santer e Baker (1988), já citados anteriormente, podemos supor que em idades avançadas do animal, como 720 dias, por exemplo, o tamanho médio dos neurônios do jejuno não apresenta alterações significativas quando comparado ao grupo de 210 dias.

Sabemos que no processo de envelhecimento há uma redução excessiva das células nervosas, já observadas por vários autores em diferentes espécies, incluindo humanos (SANTER; BAKER, 1988; GABELLA, 1989; GOMES; SOUZA; LIBERTI, 1997; SANTER, 1994; JOHNSON et al., 1998; MECIANO-FILHO; CARVALHO; DE SOUZA, 1995; WADE, 2002; PHILLIPS; POWLEY, 2001). Associando essa perda neuronal com a diminuição dos neurônios no grupo de 90 dias em relação ao de 60 dias, podemos supor que nesse período inicia-se o declínio do número de células nervosas, ocorrendo a morte de alguns dos neurônios maiores.

A partir dos 90 dias, a tendência é de que o tamanho dos neurônios no jejuno permaneça constante até o fim da vida do animal. Ressaltamos que esse aumento é significativo apenas no intestino grosso, onde as perdas neuronais são mais acentuadas e os neurônios sobreviventes sofrem hipertrofia causada por um aumento na demanda funcional (PHILLIPS; KIEFFER, POWLEY, 2003) abaixo do esperado, o motivo para tal baixa, pode ter sido o tempo que o material ficou estocado antes de ser trabalhado.

Segundo Santer e Baker (1988), não ocorrem diferenças significativas na média da área dos neurônios NADHd-positivos no jejuno dos ratos envelhecidos, quando comparados animais de 180 e 720 dias, assim como também não há diferença nas outras regiões do intestino delgado e grosso.

Já Phillips, Kieffer e Powley (2003) utilizando a técnica histoquímica NADPH-diaforase, que também evidencia os neurônios nitrérgicos, observou um aumento na área dos neurônios na região do intestino grosso, onde as perdas neuronais são mais acentuadas, embora as diferenças na

média das áreas dos neurônios do intestino delgado não sejam significativas.

Analisando os resultados obtidos, podemos observar que ocorreu um aumento na área dos neurônios mioentéricos no primeiro mês de vida do animal, e esse aumento provavelmente é inerente ao desenvolvimento do organismo. Essa mudança no tamanho pode ser observada mesmo sem a mensuração da área dos neurônios (Figura 3).

## 5 CONCLUSÃO

O aumento da área dos neurônios NADH-diaforase positivos no jejuno de ratos em envelhecimento ocorre naturalmente durante as primeiras semanas de vida, processo inerente ao desenvolvimento do organismo. A partir da idade de 60 dias, quando os neurônios se desenvolvem por completo e atinge seu tamanho ideal, a perda neuronal que se inicia, leva a uma diminuição na média da área desses neurônios que, permanecem sem alterações significativas até o fim da vida do animal.

## REFERÊNCIAS

- BOR-SENG-SHU, E. et al. Myenteric neurons of the mouse small intestine. Morphometry and acetylcholinesterase activity. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 101-108, 1994.
- BUTTOW, N. C. et al. Immunolocalization of myosin-V in the peribronchial, intrapulmonary peritracheal plexuses of the Wistar rat. **J. Neurosc. Meth.**, v. 152, n. 1/2, p. 274-277, 2006.
- COOKE, H. J. Neurobiology of the intestinal Mucosa. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 90, p. 1057-1081, 1986.
- GABELLA, G. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 96, p. 1487-1493, 1989.
- \_\_\_\_\_. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. **J. Anat.**, v. 109, p. 81-94, 1971.
- \_\_\_\_\_. Detection of nerve cells by a histochemical technique. **Experientia**, v. 25, p. 218-219, 1969.
- GOMES, O. A.; SOUZA, R. R.; LIBERTI, E. A. A preliminary investigation of the effects aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. **Gerontology**, v. 43, p. 210-217, 1997.
- JOHNSON, R. J. R. et al. The effects of age on the overall population and on sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine. **J. Anat.**, v. 192, p. 479-488, 1998.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2004.
- LIBERTI, E. A. et al. A quantitative and comparative study of the ganglionic neurons in the myenteric and submucous plexuses of the small intestine and the intramural plexus of the gall bladder the guinea-pig. **Rev. Bras. Cienc. Morfol.**, v. 11, p. 106-114, 1994.
- MECIANO-FILHO, J.; CARVALHO, V. C.; DE SOUZA, R. R. Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age.: A preliminary investigations. **Gerontology**, v. 41, p. 18-21, 1995.
- MIRANDA-NETO, M. H. et al. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of the neuronal evidential. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 59, p. 54-59, 2001.
- NATALI, M. R. M.; MIRANDA-NETO, M. H. Effect of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of the duodenum of rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 54, p. 273-279, 1996.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; ORSI, A. M. Morphometry and quantifications of the myenteric neurons of the duodenum of adult rats fed with hypoproteic chow. **Int. J. Morphol.**, v. 21, p. 273-277, 2003.
- PHILLIPS, R. J.; KIEFFER, E. J.; POWLEY, T. L. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 106, p. 69-83, 2003.
- \_\_\_\_\_.; POWLEY, T. L. As the gut ages: timetables of aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 434, p. 358-377, 2001.
- RIBAS, J. C. **Medicina e Saúde**. São Paulo, SP: Abril cultural, 1968. v. 5.
- SANTER, R. M. Survival of population of NADH-diaforase stained myenteric neurons in small intestine of aged rats. **J. Auton Nerv Syst.**, v. 49, p. 115-121, 1994.
- \_\_\_\_\_.; BAKER, D. M. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and intestine of adult and aged rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 25, p. 59-67, 1988.
- SCHÄFER, K. H.; HÄNSGEN, A.; MESTRES, P. Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. **The Anatomical Record.**, v. 256, p. 20-28, 1999.
- WADE, P. R.; COWEN, T. Neurodegeneration: a key fac-

tor in the ageing gut. **Neurogast. Motil.**, v. 16, p. 19-23, 2004.

\_\_\_\_\_. Aging and neural control of the GI tract. I Age-related changes in the in the enteric nervous system. **Am. J. Physiol.**, v. 283, p. 489-95, 2002.

*Recebido em: 14 Setembro 2009*

*Aceito em: 31 Março 2010*