

DENSIDADE DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS NADH-DIAFORASE POSITIVOS DO JEJUNO DE RATOS (*Rattus norvegicus*)

Sônia M. Tranin Zanin*, **

Sonia Lucy Molinari**

Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana*, **

Marcílio Hubner de Miranda Neto**

ZANIN, Sônia M. Tranin; MOLINARI, Sonia Lucy; SANT'ANA, Débora de Mello Gonçalves; MIRANDA-NETO, Marcílio Hubner. Densidade dos Neurônios Mioentéricos Nadh-Diaforase Positivos do Jejunum de Ratos (*Rattus norvegicus*). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 5(1): 03-08., 2001.

RESUMO: Considerando a importância do conhecimento de particularidades do plexo mioentérico em cada segmento intestinal para subsidiar estudos anatômicos, fisiológicos e condições experimentais, realizamos a presente pesquisa como o objetivo de estudar a densidade de neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos nas regiões mesentérica e antimesentérica do jejuno de ratos. Cinco ratos adultos com 120 dias de idade ($\pm 394,4$ g) foram sacrificados através de inalação de éter etílico. Segmentos do jejuno foram submetidos a técnica histoquímica de evidênciação de células nervosas através da atividade da enzima NADH-diaforase (GABELLA, 1969), para verificar a disposição, formato dos gânglios e contagem dos neurônios. Para a quantificação dos neurônios mioentéricos, os preparados de membrana foram divididos em 2 regiões: mesentérica e antimesentérica. Em cada região considerada, contou-se os neurônios presentes em 40 campos ($6,64\text{mm}^2$), através de microscópio com objetiva de 40 X. Amostras do jejuno de 5 animais foram fixadas em formol a 10% e submetidas à rotina histológica e corados com hematoxilina-eosina. Os gânglios são, na maioria, paralelos entre si e orientados transversalmente em relação ao maior eixo do intestino em ambas regiões estudadas, porém na região mesentérica os gânglios são mais numerosos. Verificou-se em média 265,8 e 408,8 neurônios/ $6,64\text{mm}^2$ nas regiões antimesentérica e mesentérica, respectivamente. Constatou-se que a densidade dos neurônios é heterogênea, variando conforme o local da circunferência intestinal considerada, próximo à inserção do mesentério observa-se maior densidade neuronal em relação à região antimesentérica.

PALAVRAS-CHAVE: jejuno; neurônios mioentéricos; ratos.

DENSITY OF NADH-DIAPHORASE POSITIVE MYENTERIC NEURONS IN THE RAT JEJUNUM

ZANIN, Sônia M. Tranin; MOLINARI, Sonia Lucy; SANT'ANA, Débora de Mello Gonçalves; MIRANDA-NETO, Marcílio Hubner. Density of NADH-Diaphorase Positive Myenteric Neurons in the Rat Jejunum. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 5(1): 03-08, 2001.

ABSTRACT: Given the importance of knowing the features of the myenteric plexus in each intestinal portion to give support to anatomical, physiological and experimental investigations, the present research was carried out with the purpose of studying the density of NADH-diaphorase positive myenteric neurons in the mesenteric and antimesenteric regions of the rat jejunum. Five adult rats, aging 120 days ($\pm 394,4$ g) were killed through inhalation of ethylic ether. Jejunal segments were subjected to the histochemical technique for evidention of nerve cells showing activity of the NADH-diaphorase enzyme (GABELLA, 1969) to verify arrangement and shape of the ganglia and to allow neuronal countings. For this last procedure the whole-mounts were divided into two regions, mesenteric and antimesenteric. In each region, all the neurons of 40 fields (6.64mm^2) were counted under microscope using 40X objective. Samples of jejunum of five animals were fixed in 10% formol solution, subjected to histological routine and stained with hematoxylin-eosin. In both regions, most of the ganglia were parallel to

*Professor de Anatomia da Universidade Paranaense

** Professor de Anatomia da Universidade Estadual de Maringá

Endereço: Sonia Lucy Molinari. Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790. DCM/UEM, bloco H-79, sala 3. Maringá - PR. 87020-900

each other and oriented transversally relative to the intestinal length, but in the mesenteric region the ganglia were more numerous. Means of 265.8 and 408.8 neurons/6.64 mm² were observed in the antimesenteric and mesenteric regions, respectively. It was verified that the density of neurons is heterogeneous, varying according to the site in the intestinal circumference; near the mesenteric attachment the neuronal density is greater than that in the antimesenteric region.

KEY WORDS: jejunum; myenteric neurons; rats.

Introdução

O jejuno constitui-se em segmento intestinal onde a digestão ainda encontra-se em curso, sendo que também a absorção de nutrientes é intensa. Para que estas funções sejam executadas de maneira ideal, a velocidade do trânsito do bolo alimentar deve compatibilizar-se com a realização de ambas.

A condução do bolo alimentar é realizada pelos movimentos peristálticos, movimentos estes que são controlados principalmente pelos elementos que provêm a inervação intestinal.

O tubo digestivo é innervado por fibras nervosas e neurônios agrupados em plexos com localização intramural. Estes plexos constituem o sistema nervoso entérico que apresenta um funcionamento relativamente independente do sistema nervoso central, realizando funções complexas como: controle da motilidade gastrointestinal, da secreção de glândulas exócrinas e endócrinas e do fluxo sanguíneo local (GABELLA, 1979; WOOD, 1981; STERNINI, 1988).

Em uma mesma espécie, diferentes densidades neuronais podem ser encontradas no mesmo segmento do trato digestivo de animais de diferentes idades (ALI & McLELLAND, 1979; SANTER & BAKER, 1988; SANTER, 1994) ou submetidos a diferentes condições experimentais (TORREJAIS *et al.*, 1995; NATALI & MIRANDA-NETO, 1996; ROMANO *et al.*, 1996; MELLO *et al.* 1997; SANT'ANA *et al.*, 1997; ZANONI *et al.*, 1997). Vários autores chamam atenção que a densidade neuronal pode variar em um mesmo segmento do intestino quando diferentes regiões da circunferência intestinal são comparadas (IRWIN, 1931; ALI & McLELLAND, 1979; SANTER, 1994; SANT'ANA *et al.*, 1997).

Considerando a importância do conhecimento de particularidades do plexo mioentérico em cada segmento intestinal para subsidiar estudos anatômicos, fisiológicos e

condições experimentais, realizamos a presente pesquisa como o objetivo de estudar a densidade de neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos nas regiões mesentérica e antimesentérica do jejuno de ratos.

Material e Métodos

Utilizou-se o jejuno de 05 animais de laboratório, *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá.

Cinco ratos adultos com 120 dias de idade, pesando em média \pm 394,4 g, foram sacrificados através de inalação de éter etílico. O jejuno foi retirado e submetido a técnica histoquímica de evidênciação de células nervosas através da atividade da enzima NADH-diaforase utilizando como aceptor artificial de elétrons o Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (GABELLA, 1969), para verificar a disposição dos gânglios do plexo mioentérico, bem como para realizar a contagem dos neurônios NADH-diaforase positivos. Em seguida, segmentos do jejuno foram microdissecados ao estereomicroscópio com transiluminação, retirando-se a túnica mucosa e a tela submucosa, para obtenção dos preparados de membranas, que posteriormente foram desidratados, diafanizados e distendidos entre lâmina e lamínula com resina sintética Permout.

Para a quantificação dos neurônios mioentéricos, os preparados de membrana do jejuno foram divididos em 2 regiões: mesentérica e antimesentérica. Foram contados os neurônios de 40 campos microscópicos (6,64mm²) em cada região considerada. Para a contagem foi utilizado microscópio com objetiva de 40 X.

A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação do número de neurônios encontrados foram calculados. O teste "T de Student" foi aplicado para comparar as diferenças entre as médias obtidas nas regiões mesentérica e antimesentérica. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados

Os neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos, no jejuno, raramente apresentam-se isolados, predominando o agrupamento com formação de gânglios. Os gânglios são, na maioria, paralelos entre si e orientados transversalmente em relação ao maior eixo do intestino, em ambas regiões estudadas, porém na região mesentérica os gânglios são mais volumosos e numerosos (Figura 1- a e b).

A densidade dos neurônios é heterogênea, variando conforme o local da circunferência intestinal considerada, próximo à inserção do mesentério observa-se maior densidade neuronal (Figura 1- a) em relação à região antimesentérica (Figura 1- b).

Verificou-se em média 265,8 e 408,8 neurônios/6,64mm² nas regiões antimesentérica e mesentérica, respectivamente, conforme TABELA 1.

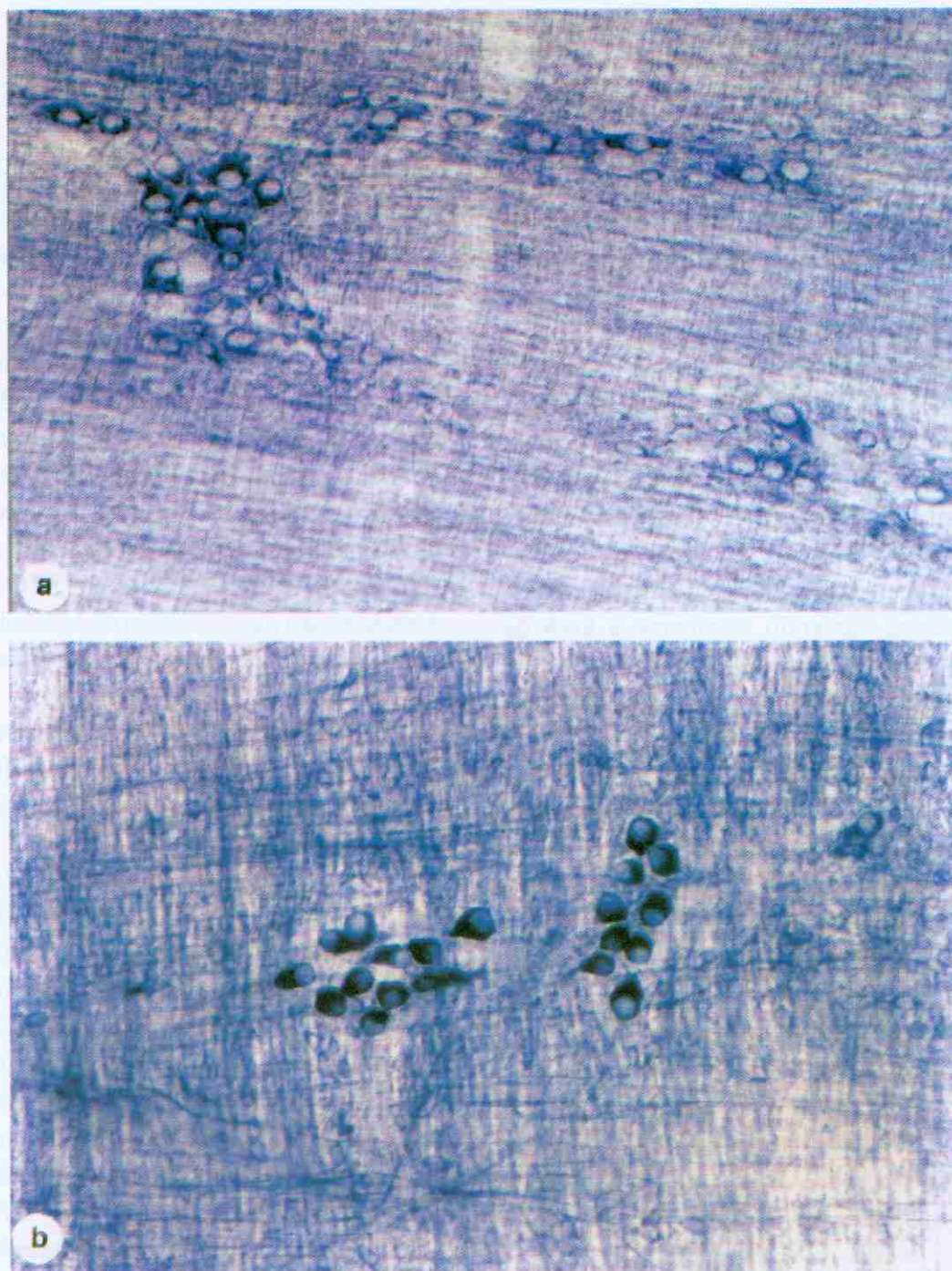


Figura 1 - Preparado de membrana mostrando a morfologia e disposição do plexo mioentérico nas regiões mesentérica (a) e antimesentérica, (b). NADH, 60x.

TABELA 1 – Densidade de neurônios NADH-diaforase positivos encontrados em uma área de 6,64mm², nas regiões mesentérica e antimesentérica do jejuno de ratos.

Ratos	Nº de neurônios nas regiões	
	Mesentérica	Antimesentérica
1	420	
2	324	229
3	427	287
4	346	260
5	527	346
X	408,8 ± 79,94 ^a	265,8 ± 54,15 ^b

Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente pelo teste t de Student (p < 0,05).

Discussão

A organização dos neurônios formando gânglios, por nós observada no jejuno de rato, assemelha-se às descrições feitas para mamíferos, roedores e aves (GABELLA, 1971; MOLINARI *et al.*, 1994; NATALI & MIRANDA-NETO, 1996; SANT'ANA *et al.*, 1997), porém a presença de neurônios isolados faz lembrar a disposição do sistema nervoso entérico difuso encontrado em peixe como a truta (BURNSTOCK, 1959) e no mandi (SOUZA *et al.*, 1982).

Verificamos que a densidade dos neurônios é heterogênea variando conforme a área da circunferência intestinal analisada. Apresenta um maior número de neurônios na região próxima à inserção do mesentério do que na região antimesentérica. A distribuição heterogênea dos neurônios na parede do intestino, conforme a região considerada, foi anteriormente verificada em estudos realizados nas regiões mesentérica e antimesentérica do jejuno de gato (LEAMING & CAUNA, 1961), corroborando os resultados por nós obtidos. Diferenças regionais em outros segmentos intestinais foram também relatadas em estudos realizados no colo ascendente de ratos, onde constatou-se uma maior densidade de neurônios NADH-diaforase positivos na região antimesocólica do que na intermediária (SANT'ANA *et al.*, 1997), no colo de cobaia (IRWIN, 1931; GABELLA, 1979), no rato, cachorro, gato e coelho (IRWIN, 1931). Em estudos realizados com estômago de ratos (FREGONESI *et al.*, 1997) e cobaias (GABELLA,

1979) encontraram-se diferenças regionais semelhantes as ocorridas no intestino, evidenciando maior densidade neuronal próximo à curvatura gástrica menor quando comparado a região próxima à curvatura gástrica maior.

É interessante notar que tanto no intestino, quanto no estômago, as menores densidades neuronais foram verificadas nos locais em que o componente muscular era menos significativo. Segundo dados da literatura, a diferença na densidade neuronal pode estar relacionada à espessura da túnica muscular. Nesse sentido, SAFFREY & BURNSTOCK (1994) mencionaram que o número de neurônios do plexo mioentérico é maior onde as camadas de músculo liso são mais espessas.

A média do número de neurônios em uma área de 6,64 mm² na região mesentérica foi de 408,8 neurônios, enquanto que na região antimesentérica 265,8 neurônios. Aplicando o teste T de Student verificamos diferenças significativas entre as regiões estudadas do grupo controle (t = 3,33, valor crítico = 1,86). MIRANDA-NETO *et al.* (2001) também encontraram diferenças significativas ao comparar a densidade de neurônios NADH, NADPH e acetilcolinesterase positivos nas regiões mesentérica, intermediária e antimesentérica do íleo de ratos.

Argumentam que a variação na densidade verificada ao redor da circunferência intestinal independe da técnica usada para evidenciar os neurônios, deixando claro a necessidade de estar alerta para o local onde as quantificações são realizadas. Complementam que, quando se realiza um estudo com grupos controle e experimental, a inobservância destes

aspectos pode comprometer os resultados da pesquisa. Numa situação hipotética, em que um grupo de animais recebeu um tratamento que poderia alterar o número de neurônios mas não o fez, se o pesquisador, durante a obtenção das amostras ou contagens, por desconhecimento privilegiasse, no grupo controle, quantificações na região mesentérica e no grupo experimental, na antimesentérica, possivelmente concluiria erroneamente que a condição imposta levou a uma redução significativa no número de neurônios.

Outro problema que poderia surgir seria a análise do material de alguns animais do mesmo grupo na região mesentérica e de outros na região antimesentérica, o que daria uma falsa idéia de que os dados sofreram grande dispersão comprometendo a significância do tratamento estatístico.

Conclusão

Este estudo demonstrou que o plexo mioentérico do jejuno de ratos, conforme a região analisada, apresenta diferenças na distribuição dos neurônios, verificando-se na região próxima ao mesentério maior densidade de neurônios NADH diaforase positivos.

Referências

- ALI, H.A.; McLELLAND, J. Neuron number in the intestinal myenteric plexus of the domestic fowl (*Gallus gallus*). *Zbl. Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryol.*, 8:277-283, 1979.
- BURNSTOCK, G. The innervation of the gut of the brown trout (*Salmo trutta*). *Q. J. Microscopic Sci.*, 100:109-120, 1959.
- FREGONESI, C.E.P.T.; MIRANDA-NETO, M.H.; MOLINARI, S.L. Estudo morfológico e quantitativo dos neurônios do plexo mioentérico do corpo do estômago de *Rattus norvegicus*. *Acta Scientiarum*, 20(2): 221-224, 1998.
- GABELLA, G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. *Experientia*, 23(52):218-219, 1969.
- GABELLA, G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J. Anat.*, 109(1):81-95, 1971.
- GABELLA, G. Innervation of the gastrointestinal tract. *International Review Cytology*, 59:129-191, 1979.
- IRWIN, D.A. The anatomy of Auerbach's plexus. *Am. J. Anat.*, 49(1):141-166, 1931.
- LEAMING, D.; CAUNA, N. A qualitative and quantitative study of the myenteric plexus of the small intestine of the cat. *J. Anat.*, 95:160-169, 1961.
- MELLO, E.V.S.L.; STABILLE, S.R.; MIRANDA-NETO, M.H.. 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, 1997.
- MIRANDA-NETO, M.H.; MOLINARI, S.L.; NATALI, M.R.M.; SANT'ANA, D.M.G. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of neuronal evidentiatio. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 59(1):54-59, 2001.
- MOLINARI, S.L.; PEREIRA, M.S.; SOUZA, R.R. de; MIRANDA-NETO, M.H. *et al.*. Estudo morfológico do plexo mioentérico do estômago glandular do pato (*Anas sp.*). *Revista UNIMAR*, 16(2):419-426, 1994.
- NATALI, M.R.M.; MIRANDA-NETO, M.H.. Effects of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of duodenum of rats. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 54(2):273-279, 1996.
- ROMANO, E.B.; MIRANDA-NETO, M.H.; CARDOSO, R.C.S.. Preliminary investigation about the effects of streptozotocin-induced chronic diabets on the nerve cell number and size of myenteric ganglia in rat colon. *Rev. Chil. Anat.*, 14:139-145, 1996.
- SAFFREY, M.J.; BURNSTOCK, G.. Growthfactors and the developments and plasticity of the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 49:183-196, 1994.
- SANT'ANA, D.M.G. MIRANDA-NETO, M.H.; SOUZA, R.R. de; MOLINARI, S.L. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon rats subjected to proteic desnutrition. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 55(4):687-695, 1997.
- SANTER, R.M. ; BAKER, D.M. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 25:59-67, 1988.
- SANTER, R.M. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 49:115-121, 1994.
- SOUZA, R. R. de ; FERRI, S.; FERRAZ-DE-CARVALHO, C.A. ; PARANHOS, G.S. Myenteric plexus in a fresh water teleost intestine. I – Quantitative study of nerve cells. *Anat. Anz.*, 152:359-362, 1982.
- STERNINI, C. Structural and chemical organization of the myenteric plexus. *Ann. Rev. Physiol.*, 50:81-93, 1988.
- TORREJAIS, M.M. ; NATALI, M.R.M.; CONEGERO, C.I.; MIRANDA-NETO, M.H.. Effects of proteic desnutrition after breast-feeding on the morphology of the intestinal wall and enteric neurons of the ileum of rats. *Revista UNIMAR*, 17(2):315-327, 1995.
- WOOD, J.D. Intrinsic neural control of intestinal motility. *Ann. Rev. Physiol.*, 43:33-51, 1981.
- ZANONI, J.N.; MIRANDA-NETO, M.H.; BAZOTTE, R.B.; SOUZA, R.R. de. Morphological and quantitative analysis of the neurons of myenteric plexus of the cecum of streptozotocin-induced diabetics rats. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 55(4):696-702, 1997.

Recebido em: 18/12/00

Aceito em: 14/08/01