

INFLUÊNCIA DO ENVELHECIMENTO SOBRE A DENSIDADE DE NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS NADPH-DIAFORE POSITIVO DO DUODENO DE RATOS

Eliane Sagrado¹
Clebiane Loli¹
Joice Naiara Bertaglia Pereira²
Juliana Plácido Guimarães²
Renata de Britto Mari^{4*}

SAGRADO, E.; LOLI, C.; PEREIRA, J. N. B.; GUIMARÃES, J. P.; MARI, R. B. de. Influência do envelhecimento sobre a densidade de neurônios mioentéricos naph-diafore positivo do duodeno de ratos. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, Umuarama, v. 16, n. 1, p. 27-31, jan./abr. 2012.

RESUMO: O século XX foi caracterizado pelo aumento na longevidade do ser humano, sendo que a expectativa de vida equivale a quase o dobro da idade alcançada no início do século. O envelhecimento é um processo progressivo e inevitável que ocorre com o avanço da idade, independentemente de doença, estilo de vida ou fatores ambientais. Está acompanhado de modificações morfofisiológicas que determinam à perda gradual da capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente. No trato gastrointestinal (TGI), o processo de envelhecimento pode provocar alterações morfofuncionais significativas nos plexos entéricos, ocasionando maior incidência de processos patológicos. A regulação da motilidade do TGI é controlada principalmente pelos neurônios mioentéricos e alterações na densidade destes neurônios podem resultar em modificações na frequência e amplitude da contração intestinal. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a densidade dos neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos do duodeno de ratos Wistar durante o processo de envelhecimento. Para tanto, foram utilizados 15 ratos machos da linhagem Wistar, divididos em três grupos (n=5/grupo): C6 (animais com seis meses de idade); C12 (animais com doze meses de idade); C18 (animais de dezoito meses). Os animais dos grupos C12 e C18 aos seis meses de idade foram transferidos para o biotério setorial, onde permaneceram até aos 12 e 18 meses respectivamente, sob condições ambientais controladas de temperatura e de iluminação e água *ad libitum*. Após o período experimental todos os animais foram submetidos a eutanásia e os duodenos foram coletados e processados pela técnica histoquímica da NADPH-diaforase. Ao compararmos os grupos C6, C12 e C18 verificou-se uma diminuição na densidade neuronal (número de neurônios/mm²) com o envelhecimento, entretanto esta diferença só foi significativa (p<0,05) nos animais com 18 meses de idade. Essa redução na densidade de neurônio nitrérgicos também foi relatada na literatura no duodeno e em outros segmentos intestinais, em diferentes espécies animais com o avanço da idade. Tendo em vista tais alterações, se faz necessário o desenvolvimento de intervenções terapêuticas, que visem minimizar os efeitos do envelhecimento, melhorando desta forma a qualidade de vida da população idosa.

PALAVRA-CHAVE: Plexo mioentérico. Envelhecimento. NADPH-diaforase.

INFLUENCE OF AGING ON THE DENSITY OF MYENTERIC NEURONS NADPH- DIAFORE POSITIVE

ABSTRACT: The twentieth century was characterized by increasing in human longevity, being life expectancy equivalent to practically twice of the age reached at the beginning of the century. The aging is a progressive and inevitable process that occurs with age and does not depend of diseases, lifestyle or environmental factors; it is accompanied by morph physiological changes that determine the progressive loss of individual's ability to adapt to the environment. In the Gastrointestinal Tract (GIT), the aging process can provoke significant morpho functional changes in the enteric plexuses causing higher incidence of pathological processes. The GIT motility is primarily controlled by myenteric neurons, thus, changes in the density of these neurons may result in changes in the frequency and amplitude of intestinal contraction. Therefore, the aim of this work to evaluate the density of myenteric neurons NADPH-diaforase positive in the duodenum of Wistar rats during aging process. Fifteen male wistar rats were used in the experiment. The animals were divided in three groups of five animals (n=5) as following: C6 (animals aged six months); C12 (animals aged twelve months); C18 (animals aged eighteen months). The animals from the groups C12 and C18 were previously transferred to vivarium, under environmental conditions of controlled temperature and light and water *ad libitum*, since have reached six months to twelve and eighteen months respectively. After experimental period, all animals were euthanized and the duodenum were collected and processed for standard histochemical NADPH-diaforase technique. As a result, a decrease in the neuronal density (mm²) at the time with aging was observed in the three groups, C6, C12 and C18, however, this difference was remarkable (p>0,05) from twelve months old. This reduction in the density of nitrergic neurons was previously reported in the duodenum and other intestinal segments of different animals under aging process. Based in such alterations, were believed that there is a need of the development of therapies that minimize the effects of aging, thus, improving the quality of elderly life.

KEYWORDS: Myenteric plexuses. Aging. NADPH-diaforase.

Introdução

A população brasileira vem envelhecendo de forma rápida desde o início da década de 60, quando a queda das taxas de fecundidade começou a alterar sua estrutura etária (CHAIMOWICZ, 1997). Segundo o IBGE (2010) o alargamento do topo da pirâmide etária pode ser observado pelo crescimento da participação relativa da população com 65

anos ou mais, que era de 4,8% em 1991, passando a 5,9% em 2000 e chegando a 7,4% em 2010.

Este crescimento da população idosa no Brasil acontece em um cenário marcado pela pobreza e pela falta de recursos socioeconômicos (FERREIRA 2006). O atendimento da população brasileira com 60 anos ou mais, corresponde 23% dos gastos públicos com internações hospitalares, variando pouco entre regiões do país (LIMA; COSTA et al.,

¹Universidade Paranaense, Campus Paranavaí - Curso de Enfermagem.

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

³Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus Experimental do Litoral Paulista.

2003).

O envelhecimento é um processo progressivo e inevitável que ocorre com o avanço da idade, independentemente de doença, estilo de vida ou fatores ambientais (HOLLOSZY; FONTANA, 2007). Está acompanhado de modificações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e psicológicas, que determinam a perda gradual da capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente, ocasionando maior vulnerabilidade e conseqüentemente maior incidência de processos patológicos (PAPALÉO-NETO, 2006).

No trato gastrointestinal (TGI), o processo de envelhecimento manifesta-se, clinicamente, como retardo na motilidade esofágica (WADE, 2002) e no esvaziamento gástrico (CLARKSTON et al., 1996), aceleração do trânsito intestinal (WADE, 2002), assim como, diminuição da função absorptiva (SANTER; BAKER, 1993). Esses fenômenos estão relacionados à alterações no funcionamento do plexo mioentérico, o principal componente do sistema nervoso entérico responsável pelo controle da motilidade do tubo digestório (GUYTON; HALL, 2002).

Embora neurônios sejam relativamente resistentes, durante o processo de envelhecimento é natural que parte do número dessas células seja perdida (FURLAN, 2000). Pesquisas têm sido realizadas para compreender os efeitos do envelhecimento sobre os neurônios entéricos, e observou-se que há alterações no número de diferentes populações de neurônios mioentéricos tanto em ratos (GABELLA, 1979; SANTER; BAKER, 1988), como também em humanos (MECIANO, et al., 1995; SOUZA et al., 1993), cobaias (GABELLA, 1989) e camundongos (EL-SALHY et al., 1999). Estudos com envelhecimento têm utilizado principalmente ratos por possuem vida média de 24 meses, sendo que aos seis anos de idade já são considerados adultos, com 12 meses são denominados meia-vida e a partir de 18 meses são considerados idosos (PHILLIPS et al., 2003; SAFFREY, 2004).

O comprometimento da população neuronal mioentérica pode acarretar disfunções gastrointestinais que comprometem a qualidade de vida dos idosos. Assim, se faz necessário compreender as alterações morfofuncionais ocorridas nas diferentes populações neuronais entéricas, a fim de que se possa contribuir para o desenvolvimento de novas terapias, que visem contribuir para a promoção da saúde durante o processo de envelhecimento. Neste sentido, destacam-se os neurônios mioentéricos nitrérgicos, pois são responsáveis pela inibição da musculatura lisa do tubo digestório e, portanto, estão diretamente relacionados à velocidade de trânsito do alimento no estômago e intestinos (FURNESS, 2000). Desta forma, o presente estudo teve por objetivo analisar a densidade de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivo (nitrérgicos) do duodeno de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) durante o processo de envelhecimento.

Material e Método

Foram utilizados 15 ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, distribuídos aleatoriamente em três grupos (n=5/grupo):

- C6: animais de 06 meses;
- C12: animais de 12 meses;
- C18: animais de 18 meses.

Os animais dos grupos C12 e C18, aos seis meses

de idade foram transferidos para o Biotério Setorial, onde permaneceram até os 12 e 18 meses, respectivamente. Todos foram alojados em caixas de polipropileno providas de bebedouro e comedouro, mantidas em condições ambientais controladas de temperatura (24±2°C) e de iluminação (ciclo de 12 horas claro/ 12 horas escuro) e água *ad libitum*. No início do experimento e mensalmente os animais foram pesados.

Eutanásia dos animais

Ao final do período experimental (12 e 18 meses) os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e submetidos à eutanásia com dose letal de anestésico (Tiopental® 40mg/kg de peso corpóreo) pela veia peniana. Posteriormente, foram submetidos à laparotomia, por meio de incisão mediana na parede abdominal, para retirada do duodeno (limite cranial: a porção caudal da região pilórica do estômago e limite caudal: a flexura duodeno-jejunal). O segmento obtido, ainda fechado, foi inicialmente mensurado e decalcado em papel para determinação da sua área (mm²), em seguida os desenhos foram escaneados, juntamente com uma régua, e a área do segmento foi determinada por meio do analisador de imagem Image Pro-Plus 3.0.1®. Posteriormente, os duodenos foram submetidos à técnica histoquímica, para evidenciação de neurônios NADPH-diaforase positivos.

Deteção dos neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos (SCHERER-SINGLER et al., 1983)

Os segmentos foram lavados e preenchidos com solução de Krebs pH 7,3 (1,3 g de NaHCO₃, 0,24 g de MgCl₂·6H₂O, 0,44 g de KCl, 0,165 g de NaH₂PO₄, 7,05 g de NaCl e 0,27 g de CaCl₂ em um litro de água destilada). Para o preenchimento, as extremidades foram fechadas com fio de sutura. A seguir, os segmentos foram submetidos a duas lavagens em solução de Krebs (10 minutos cada), seguidas de permeabilização em Krebs contendo Triton X-100 a 0,3% dissolvido em tampão fosfato de sódio (pH 7,3) durante 10 minutos. Depois, mais duas lavagens em PBS durante dez minutos cada foram necessárias para posterior incubação em meio de reação constituído por 50mg de NBT, 100 mg de β-NADPH e 0,3% de Triton X-100 em tampão Tris-HCl (0,1M pH 7,6) por duas horas, para evidenciar os neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos. Posteriormente, os duodenos tiveram suas extremidades liberadas e foram imersos em solução de paraformaldeído a 4% para a fixação e armazenagem.

Obtenção dos preparados de membrana

Após período de 48 horas de fixação, foram elaborados preparados de membrana por meio de secções ao longo do eixo longitudinal na margem mesentérica dos duodenos. Em seguida, foram microdissecados sob estereomicroscópio, para retirada das tûnicas mucosa e submucosa e preservação das tûnicas muscular e serosa. Estes preparados de membrana obtidos foram montados entre lâmina e lamínula com Permount (Synth®).

Quantificação neuronal (mm²)

A quantificação neuronal por área (mm²) foi realizada por meio dos preparados de membrana obtidos de cada duodeno. Para tanto, em cada preparado de membrana foi adaptado um sistema teste constituído por 60 campos equidistantes, distribuídos em dez colunas com seis linhas cada, amostrando todas as regiões (mesentérica, intermediária e antimesentérica) do duodeno.

Os campos visualizados ao microscópio, com aumento de 400X, foram capturados por meio de uma câmera digital de alta resolução acoplada ao microscópio. As imagens capturadas foram transferidas para o computador, a partir do qual foram delimitadas por um sistema teste constituído por linhas de inclusão (margem superior e margem direita) e de exclusão (margem inferior e margem esquerda). Desta maneira, os neurônios contidos dentro dos limites da área teste e os que tocaram as margens superior e direita foram contados e os neurônios que tocaram as margens inferior e esquerda do campo foram excluídos.

A área calculada de cada campo foi de 0,056mm²,

sendo que a área total analisada por preparado de membrana foi de 3,36 mm².

Análise estatística

A análise estatística foi feita pelo programa Sisvar. Os dados referentes à quantificação dos neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos foram analisadas pelo teste Scott Knott e os resultados descritos como média ± desvio padrão. O nível de significância adotado foi de P<0,05.

Resultados

Durante todo o período experimental (12 e 18 meses) não foram observadas alterações no comportamento dos animais dos grupos estudados (consumo de água e ração, urina e fezes). Os dados referentes ao peso corpóreo dos animais durante todo o período experimental estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Média de peso (gramas) dos animais dos grupos C6, C12 e C18 durante o período experimental

	Jul	Ago	Set	Out	Nov	De	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
C6	398	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	397	493	483	484	490	490	497	-	-	-	-	-	-
C18	496	482	463	471	483	486	506	510	512	514	512	514	512

Ao analisarmos os preparados de membrana, não foram verificadas diferenças morfológicas com o envelhecimento. Em todos os grupos estudados (C6, C12 e C18), os neurônios mioentéricos, foram localizados na túnica muscular, reunidos em gânglios, com número variado de neurônios por gânglio e normalmente os neurônios apresentaram corpo celular alongado e núcleo oval. Neurônios isolados, especialmente no trajeto das fibras nervosas, foram também encontrados (Figura 1).

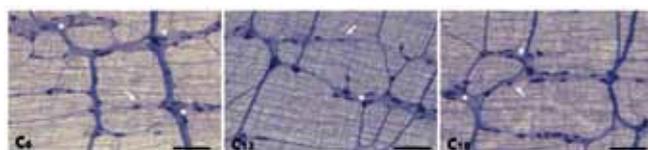


Figura 1: Fotomicrografia do plexo mioentérico do duodeno de ratos dos grupos C6, C12 e C18, evidenciando neurônios NADPH-diaforase agrupados em gânglios (*) com presença de neurônios isolados no trajeto das fibras nervosas (seta) (barra:100µm).

Não foram observadas diferenças significativas (p>0,05) na área do duodeno (mm²) com o envelhecimento, ao compararmos os três grupos estudados (C6, C12 e C18) (tabela 2).

Tabela 2: Média da área do duodeno (mm²) dos animais dos grupos C6, C12 e C18

Grupos	Área do duodeno (mm ²)
C6	136,56 ± 2,56a
C12	137,55 ± 4,55a
C18	138,2 ± 2,91a

* letras iguais na mesma coluna não diferem pelo teste de Scott Knott

A densidade neuronal foi obtida por meio da média de neurônios por mm² do duodeno dos grupos estudados. Os animais do grupo C6 apresentaram média neuronal de 78,78 ± 0,98, no grupo C12 a média foi de 74,36 ± 2,95, enquanto que no grupo C18 foi de 56,67 ± 5,86 (tabela 3).

Tabela 3: Média±desvio padrão do número de neurônios (mm²) NADPH-diaforase positivos do duodeno de ratos do grupo C6, C12 e C18

Grupos	Densidade de Neurônios (mm ²)
C6	78,78 ± 0,98a
C12	74,36 ± 2,95a
C18	56,67 ± 5,86b

*letras diferentes na mesma coluna diferem pelo Teste de Scott Knott

Ao compararmos os grupos C6, C12 e C18 verificou-se uma diminuição na densidade neuronal (mm²) com envelhecimento, entretanto esta diferença só foi significativa (p>0,05) entre os seis e dezoito meses (grupos C6 e C18), onde a diminuição na densidade neuronal foi de 28 % e entre os doze e dezoito meses (C12 e C18), com diminuição de 24%.

Discussão

A análise quantitativa realizada neste trabalho se deu mediante preparados de membrana do duodeno. Segundo Saffrey (2004), a utilização de preparados de membrana é uma maneira eficiente para estudo da densidade neuronal, assim como, torna possível uma rápida amostragem do grande número de gânglios em apenas um único preparado de tecido.

Alterações na área dos segmentos do trato gastrointestinal são verificadas durante as etapas de desenvolvimento do animal. Desta forma, se tais alterações não forem mensuradas podem levar a análises equivocadas da densidade neuronal, provocada por uma redução ou aumento aparente da densidade de neurônios por área (GABELLA, 1971, 1989).

É descrito na literatura a utilização de fator de correção para evitar erros na interpretação de dados referentes à densidade neuronal, em que este fator é derivado da razão entre a área do intestino de um animal jovem pela área de um animal senil (GABELLA, 1971, 1989; PHILLIPS et al., 2003).

Assim como observado em nosso trabalho, Gagliardo et al. (2008) e Mari et al. (2008) também não verificaram alterações nas dimensões do colo e duodeno, respectivamente, com o envelhecimento. Desta forma, neste estudo não se fez necessário a utilização do fator de correção, uma vez que não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na área do duodeno entre os grupos estudados.

A técnica histoquímica NADPH-diaforase que evidencia uma subpopulação de neurônios que sintetizam óxido nítrico (NO), um neurotransmissor inibitório da musculatura intestinal (FURNESS, 2000; FURNESS et al, 1992; SANDERS; WARD, 1992).

Foi possível observar com o envelhecimento uma perda de 28% de neurônios mioentérico NADPH-diaforase, ao compararmos os animais dos grupos C6 e C18, inferindo uma redução significativa na densidade neuronal. O NO apresenta capacidade inibitória sob a musculatura do TGI, o NO contribui de maneira secundária no processo de absorção, uma vez que aumenta o tempo de contato para digestão e absorção da ingesta (MARTINEZ-CUESTA et al., 1997). Desta forma, esta diminuição na população nitrérgica poderia acarretar disfunções intestinais, com diminuição na taxa absorptiva e consequentemente na condição nutricional do idoso. Entre os mecanismos neurais, que envolvem alterações na produção de neurotransmissores, são relatados casos de constipação idiopática crônica, doença comumente relatada em pacientes idosos (FIRTH; PRATHER, 2002).

Entretanto, entre os animais adultos e de meia idade (grupos C6 para C12, respectivamente) a redução na densidade neuronal não se mostrou significativa, sendo de apenas 6%, sugerindo que a diminuição na população neuronal nitrérgica se inicia a partir da meia idade.

A perda no número total de neurônios mioentéricos com o envelhecimento tardio foi verificada no intestino delgado de ratos (SANTER; BAKER, 1988) e cobaias (GABELLA, 1989) e no colo de ratos (PHILLIPS et al., 2003). No íleo e colo de ratos, Johnson et al. (1998) e Takahashi et al. (2000), respectivamente, verificaram diminuição significativa no número de neurônios nitrérgicos com o envelhecimento. Souza et al. (1993) relatam a diminuição de 34% no número de neurônios mioentérico do intestino delgado de humanos, sendo que no duodeno a redução na densidade mostrou-se maior que nos demais segmentos intestinais.

Phillips et al. (2003) não verificaram diminuição na densidade da subpopulação nitrérgica neuronal no intestino grosso (colo e reto) quando comparado ratos jovens (3 meses) com ratos velhos (24 meses). Por outro lado, Takahashi et al. (2000), verificaram uma diminuição significativa no número de neurônios nitrérgico do colo por gânglio quando

comparados ratos jovens, com idade entre 4 e 8 meses com ratos senis com idade variando entre 22 e 28.

Dados na literatura a respeito da população nitrérgica são bastante conflitantes. A perda neuronal verificada ao longo da vida promove um rearranjo entre os neurônios remanescentes que assumem as funções dos neurônios perdidos, refletindo em aumento compensatório de subpopulações neuronais. Cserni et al. (2007) e Beck et al. (2009) evidenciaram colocalização da atividade nitrérgica e colinérgica em neurônios entéricos, que podem apresentar alterações em seu código químico com o avanço da idade ou em diferentes condições experimentais, o que poderia justificar as diferentes observações na densidade de neurônios nitrérgicos nos segmentos do TGI.

Alterações no código químico para expressão de neurotransmissores foram observadas em casos de colite ulcerativa (NEUNLIST et al., 2003) e colocalização nitrérgica e colinérgica foi descrita no reto de sujeitos portadores de doença de Crohn assintomática, indicando uma resposta regenerativa do plexo mioentérico nesses casos (SCHNEIDER et al., 2001).

Neste trabalho foram observadas redução na densidade dos neurônios nitrérgicos com o envelhecimento, sendo esta significativa em idade mais avançada. Tendo em vista o aumento expressivo da população idosa no Brasil, se faz necessário melhor compreender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de envelhecimento destes neurônios, assim como o desenvolvimento de intervenções terapêuticas, que visem minimizar os efeitos do envelhecimento, melhorando desta forma a qualidade de vida da população idosa.

Referências

- BECK, M. et al. Chat and nos in human myenteric neurons: co-existence and co-absence. **Cell Tissue Research**, v. 338, n.1, p. 37-51, 2009.
- CHAIMOWICZ, F. A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. **Rev. Saúde Pública**, vol. 31, n. 2, 184-200, 1997.
- CLARKSTON, W. K. et al. Evidence for anorexia of aging. Gastrointestinal transit and hunger in healthy elderly vs. young adults. **Am. j. Physiol.** v. 272, p. 243-248, 1996.
- CSERNI, T. et al. The effect of age on colocalization of acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase staining in enteric neurons in an experimental model. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 42, n. 2, p. 300-304.
- EL-SALHY, M.; SANDSTRÖM, O.; HOLMLUND, F. Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. **Mech. Ageing and Dev.** v. 107, p. 93-103, 1999.
- JACOB FILHO, W. Atividade física e envelhecimento saudável. **Rev. Bras. Educ. Fis. Esp.** v. 20, n.5, p. 73-77, 2006.

- FIRTH, M.; PRATHER, C. M. Gastrointestinal motility problems in the elderly patient. **Gastroenterology**, v.122, p.1688-1700, 2002.
- FURLAN, M. M. D. P. Ontogenia e filogenia do sistema nervoso entérico. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 4, n. 2, p. 149-157, 2000.
- FURNESS, J. B. Types of neurons in the myenteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 81, p. 87-96, 2000.
- FURNESS, J. B. et al. Roles of peptides in transmission in the enteric nervous system. **TINS**, v. 15, p. 66-71, 1992.
- GABELLA, G. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea-pigs. **Gastroenterol.** v. 96, p.1487-1493,1989.
- GABELLA, G. Innervation of the gastrointestinal tract. **Intern. Rev. Cytol.** New York, v. 59, p.129-193,1979.
- GABELLA, G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. **J. Anat.** v. 191, p. 81-95, 1971.
- GAGLIARDO, K. M. et al. Exercise reduces inhibitory neuroactivity and protects myenteric neurons from age-related neurodegeneration. **Auton. Neurosc. Basic Clin.** v. 141, p. 31-37, 2008.
- GUYTON, A. C. HALL, J. E. Princípios gerais da função gastrointestinal - motilidade, controle nervoso e circulação sanguínea. In:_____.**Tratado de fisiologia médica.** 10. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2002. p. 668-676.
- HOLLOSZY, J. O.; FONTANA, L. Caloric restriction in humans. **Experimental Gerontology**, v. 42, p. 709-712, 2007.
- IBGE -Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. **Censo demográfico:** Brasil, 2007. Rio de Janeiro: IBGE 2003.
- JOHNSON, R. J. R. et al. The effects of age on the overall population and sub-population of myenteric neurons in the rat small intestine. **J. Anat.** v. 192, p. 479-488, 1998.
- LIMA-COSTA, M. F.; BARRETOS, S. M.; GIATTI, L. Condições de saúde, capacidade funcional, uso de medicações da população idosa brasileira: um estudo descritivo baseado na pesquisa nacional por amostra de domicílios. **Caderno de Saúde Pública**, v.19, n. 3, p.735-743, 2003.
- MARI, R. B. et al. Effects of exercise on the morphology of the myenteric neurons of the duodenum of wistar rats during the ageing process. **Anat. Histol. Embryol.** v. 37, p. 289-295, 2008.
- MARTNEZ CUESTA, M. A. et al. Nitric oxide modulates the acute increase of gastrointestinal transit induced by endotoxin in rats: a possible role for tachykinins. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 49, p. 988-990, 1997.
- MECIANO FILHO, J.; CARVALHO, V. C.; DE SOUZA, R. R. Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age: a preliminary investigation. **Gerontology**, v. 41, p.18-21,1995.
- NEUNLIST, M. et al. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. **Gut.** v. 52, p. 84-90, 2003.
- PAPALÉO NETTO. M. **Tratado de gerontologia.** 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2006.
- PHILLIPS, R. J. et al. Aging of the myenteric plexus:neuronal loss is specific to cholinergic neurons. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 106, p. 69-83, 2003.
- SAFFREY, M. J. Ageing of the enteric nervous system. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, p. 899-906, 2004.
- SANDERS, K. M.; WARD, S. M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. **Am. J. Physiol.** v. 262, p. 379-392, 1992.
- 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.** v. 25, p. 59-67, 1988.
- SANTER, R. M.; BACKER, D. M. Enteric system In: AMENTA, F. Aging of the autonomic nervous system. **CRC Press**, p. 214-221,1993.
- SCHNEIDER, J. et al. Neurotransmitter coding of enteric neurons in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. **Neurogastroenterology and Motility**, v.13, p. 255-264, 2001.
- SOUZA, R. R. et al. Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. **International Journal of Experimental Clinical of Gerontology.** v. 39, p. 183-188, 1993.
- TAKAHASHI, T. et al. Decreased expression of nitric oxide synthase in the colonic myenteric plexus of aged rats. **Brain Research**, v. 883, p. 15-21, 2000.
- WADE, P. R. Aging and neural control of the GI tract: i age-related changes in the enteric nervous System. **Am. J. Physiol. Gastrointestinal An Liver Physiology**, v. 283, p. 489-495, 2002.