

ANÁLISE MORFOMÉTRICA E QUANTITATIVA DOS NEURÔNIOS DO PLEXO MIENTÉRICO DO CECO DE RATOS SUBMETIDOS A INTENSA CARÊNCIA DE PROTEÍNA

Eliane Muniz¹

Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana²

Eduardo José de Almeida Araújo³

MUNIZ¹, E; SANT'ANA², D. M. G; ARAÚJO³, E. J. A. Análise morfológica e quantitativa dos neurônios do plexo mientérico do ceco de ratos submetidos a intensa carência de proteína. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar*, Umuarama, v. 10, n. 2, p. 77-84, jul./dez. 2007

RESUMO: Avaliaram-se os efeitos crônicos de uma dieta severamente hipoprotéica, sobre aspectos quantitativos e morfológicos de neurônios mientéricos, NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos jovens. Oito ratos foram divididos em dois grupos, sendo que para um dos grupos foi oferecida ração com teor protéico de 26% (controle) e, para o outro, ração com o teor protéico de 4%, mantendo-se o balanço vitamínico e mineral durante 12 semanas. Após eutanásia, o ceco de cada animal foi coletado e dissecado para confecção de preparados de membrana, os quais foram submetidos à técnica da NADPH-diaforase. Para contagem e mensuração destes neurônios, o ceco foi dividido em quatro regiões: apical mesentérica; apical antimesentérica; basal antimesentérica; próxima à ampola cecal. Não se observou alteração significativa para o peso dos animais, área do ceco e densidade populacional dos neurônios mientéricos no final do experimento. Por outro lado, em algumas regiões do ceco, os neurônios tiveram redução da área nuclear, com conseqüente redução da área do pericário.

PALAVRAS-CHAVE: Sistema Nervoso Entérico. Má-Nutrição Protéico-Energética (MPE). Neurônios Nitrérgicos. Plasticidade Neuronal.

QUANTITATIVE AND MORPHOMETRIC ANALYSIS OF MYENTERIC NEURON FROM THE CECUM OF RATS SUBMITTED TO INTENSIVE PROTEIN DEFICIENCY

ABSTRACT: The chronic effects of a severe hypoproteic diet on quantitative and morphometric aspects of NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons from the cecum of young rats were assessed. Eight rats were divided into two groups. One group (control) was fed with 26%-protein chow and the other with 4%-protein chow during 12 weeks. The vitamin and mineral balance was kept. After euthanasia, the cecum of each animal was collected and dissected for the whole-mount preparation, which were submitted to NAPDH-diaphorase. The cecum was divided into four regions for counting and measurement of neurons: apical mesenteric, antimesenteric apical, basal antimesenteric, and next to the cecal ampulla. Significant alterations were not noted with respect to the weight of the animals, cecum area, and population density of myenteric neurons at the end of the experiment. On the other hand, in some regions of the cecum, the neurons presented a reduction of the nuclear area with resulting reduction of the soma area.

KEYWORDS: Enteric Nervous System. Energetic-Protein Malnutrition. Nitregic Neurons. Neuronal Plasticity.

ANÁLISIS MORFOMÉTRICA Y CUANTITATIVA DE LAS NEURONAS DEL PLEXO MIENTÉRICO DEL CECO DE RATAS SOMETIDOS A UNA INTENSA CARENCIA DE PROTEÍNA

RESUMEN: Se evaluaron los efectos crónicos de una dieta severamente hipoprotéica, sobre aspectos cuantitativos y morfológicos de neuronas mientéricas, NADPH-diaforase positivos del ceco de ratas jóvenes. Ocho ratas fueron divididas en dos grupos, siendo que para uno de los grupos fue ofrecida ración con tenor proteico de 26% (control) y, para el otro, ración con el tenor proteico de 4%, manteniéndose el balance vitamínico y mineral durante 12 semanas. Tras eutanásia, el ceco de cada animal fue recolectado y disecado para confección de preparados de membrana, los cuales fueron sometidos a la técnica de la NADPH-diaforase. Para recuento y mensuración de estas neuronas, el ceco fue dividido en cuatro regiones: apical mesentérica, apical antimesentérica, basal antimesentérica y próxima a la ampolla cecal. No se observó alteración significativa en el peso de los animales, área del ceco y densidad poblacional de las neuronas mientéricas al final del experimento. Por otro lado, en algunas regiones del ceco las neuronas tuvieron reducción del área nuclear, con conseqüente reducción del área del pericario.

PALABRAS CLAVE: Sistema Nervioso Entérico. Mala Nutrición Proteico-Energética (MPE). Neuronas Nitrérgicas. Plasticidad Neuronal.

¹ Formanda do Curso de Enfermagem – UNIPAR – Umuarama - PR.

² Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana. Laboratório de Neurogastroenterologia Experimental. Universidade Paranaense (UNIPAR). Praça Mascarenhas de Moraes, s/n. Umuarama-PR. 87520-210. E-mail: debora@unipar.br

³ Eduardo José de Almeida Araújo. Laboratório de Neurogastroenterologia Experimental. Universidade Paranaense (UNIPAR). Praça Mascarenhas de Moraes, s/n. Umuarama-PR. 87520-210. E-mail: eduardoaraujo@unipar.br

Introdução

O intestino grosso é a porção terminal do canal alimentar. Inicia-se na papila ileal e termina no ânus, sendo dividido em: ceco, cólons, reto e ânus. O ceco é a primeira parte do intestino grosso e fica situada posteriormente à papila ileal, que faz profusão na luz intestinal (BANKS, 1992; VASCONCELLOS, 1998; SEYFERT, 2003).

A morfologia do ceco varia nas diferentes espécies, principalmente entre herbívoros e carnívoros. O ceco de herbívoros apresenta-se sacciforme, semelhante a uma vírgula, de parede delgada, possuindo uma curvatura maior livre e uma menor presa à parede pelo mesocolo. No meio do órgão há uma leve constrição, sendo dividido em duas porções, uma apical e outra basal. Na porção apical encontra-se uma massa distinta de tecido linfóide em sua parede lateral, sendo este tecido ausente na porção basal (VASCONCELLOS, 1998; ZANONI et al., 1998; SEYFERT, 2003; GUYTON; HALL, 2006).

Na cavidade abdominal do rato o ceco está situado à esquerda do intestino delgado e possui duas curvaturas: a menor localizada na borda mesentérica e a maior na borda antimesentérica. Divide-se em três regiões distintas: corpo, ápice cranial e base caudal e não apresenta tênias (SMELTZER; BARE, 2002; SEYFERT, 2003; GUYTON; HALL, 2006). Nos animais herbívoros o ceco tem como funções a absorção de água e dos eletrólitos do quimo para formação das fezes, além de síntese de vitaminas do complexo B (TAYLOR et al., 1942; KOLB, 1987; SEYFERT, 2003; GUYTON; HALL, 2006). No rato o ceco é responsável pela digestão da celulose, e absorção dos carboidratos, proteínas, água e outros produtos da digestão.

Histologicamente, na parede do ceco identifica-se a túnica mucosa, tela submucosa, túnica muscular e túnica serosa (ZANONI et al., 1998; SEYFERT, 2003; GUYTON; HALL, 2006). Entre os estratos da túnica muscular, encontra-se o plexo mientérico, formado por gânglios de formatos triangulares, poligonais e alongados e feixes de fibras nervosas que os interconectam (ZANONI et al., 1997; 1998; SEYFERT, 2003). Os neurônios do plexo mientérico estão distribuídos de forma heterogênea no ceco, sendo que a região próxima à ampola cecal apresenta maior quantidade de gânglios e neurônios quando comparada às demais regiões. Assim, os neurônios desta região tendem a ser mais volumosos e com diversos formatos (ZANONI et al., 1997; SEYFERT, 2003).

A desnutrição protéica é uma das situações clínicas que freqüentemente levam a alterações intestinais, podendo causar constipação ou diarreia (WATERLOW, 1996). Diversos estudos vêm sendo realizados através de modelos experimentais de desnutrição protéica, para avaliar sua repercussão nos diferentes segmentos do tubo digestório.

Neste sentido, a maioria se concentra em avaliar o intestino delgado (SANTER; BAKER, 1988; NATALI; MIRANDA-NETO, 1996; NATALI et al., 2003; BRANDÃO et al., 2003; MELLO et al., 2004; TORREJAIS et al., 1995; MEILUS et al., 1998; MIRANDA-NETO et al., 1999). Em menor número existem trabalhos que avaliam o intestino grosso (MELLO et al., 1995; SANT'ANA et al., 1997; SANT'ANA et al., 2001; CASTELUCCI et al., 2002; RECINOS, 1996; ARAÚJO et al., 2003a). Portanto, ainda

há uma real lacuna na literatura, em relação a estudos do plexo mientérico do ceco de ratos desnutridos. Em função disso, o experimento foi realizado submetendo ratos a dieta intensamente pobre em proteínas, avaliando-se quantitativa e morfometricamente os neurônios NADPH-diaforase positivos do plexo mientérico do ceco destes animais.

Material e Métodos

O protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal da Universidade Paranaense (UNIPAR) em reunião realizada em 22/03/2007.

Foram utilizados oito ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos, com 90 dias de idade (peso corporal 283,9±38,7g), os quais foram separados aleatoriamente e mantidos em gaiolas individuais num biotério setorial, com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram divididos em dois grupos: o grupo controle (GC; n=4) e o grupo experimental (GE; n=4). O GC recebeu ração comercial NUVILAB com 26% de proteína, e o GE recebeu ração preparada com 4%, pela adição de amido de milho como descrito por Araújo et al. (2005). Ambos receberam ração e água *ad libitum* por um período de 90 dias, avaliando-se o peso corporal mensalmente. Ao final deste período, os ratos dos dois grupos foram anestesiados por intermédio da seguinte associação: Acepromazina 1% (1,26 mL/Kg), Ketamina-10% (1,26 mL/Kg), Xilazina-2% (0,42 mL/Kg) e Atropina-1% (0,22 mL/Kg), por injeção intramuscular (PACHALY et al., 2003). Depois de constatada ausência de reflexos a estímulos dolorosos e miorelaxamento, realizou-se a laparotomia pela linha média e removeu-se o ceco de cada rato com auxílio de pinça e tesoura e a eutanásia por aprofundamento anestésico. Realizou-se o decalque do ceco de cada animal sobre papel branco, o qual foi escaneado para que a área fosse determinada utilizando o software Motic Image Plus versão 2.0.

Os cecos dos animais de ambos os grupos foram submetidos à técnica histoquímica da NADPH-diaforase, segundo Scherer-Singler et al. (1983). Para tanto, os órgãos foram lavados e preenchidos com tampão fosfato (PBS; pH 7,4) formando bexigas, imersos e fixados em paraformaldeído a 4%, preparado em tampão fosfato 0,1M (PBS; pH 7,4) por 30 min, imersos em solução Triton X-100® 0,3%, dissolvido em tampão fosfato salinado (PBS, pH 7,4) por 10 minutos, e posteriormente lavados dez vezes (dez minutos cada) em PBS 0,01M pH 7,4. Em seguida, foram imersos no meio de incubação, para a evidenciação neuronal contendo β-NADPH e NBT (solução de 200 mL contém: 200 mL de tampão Tris-HCl; 0,05 g de NBT; 0,1 g de β-NADPH e 0,6 mL de Triton X-100), durante 60 minutos. A reação foi monitorada sob estereomicroscópio. Os segmentos foram lavados em solução tampão PBS 0,01M pH 7,4 (três vezes de cinco minutos), e a interrupção da reação ocorreu com paraformaldeído 4% em solução tampão PBS 0,01M pH 7,4.

Realizou-se a microdissecção sob estereomicroscópio com transluminação, retirando-se a túnica mucosa e a tela submucosa. Em seguida, os preparados totais foram desidratados em série ascendente de álcoois, diafanizadas em xilol e montadas entre lâmina e lamínula.

A análise do laminário foi realizada em quatro regiões do ceco: apical mesentérica (AM), apical antimesentérica (AA), próximo à ampola cecal (PA) e região basal antimesentérica (BA) conforme demonstrados na Figura 1.

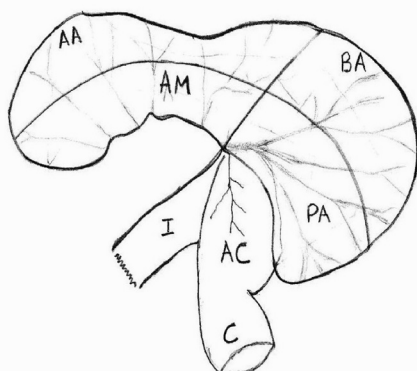


Figura 1 – Desenho esquemático do ceco do rato, observado por sua face ventral. Regiões: apical antimesentérica (AA), basal antimesentérica (BA), apical mesentérica (AM) e próximo à ampola cecal (PA). Íleo (I) e colo (C) e ampola cecal (AC).

A quantificação dos neurônios mientéricos foi realizada por amostragem em 40 campos microscópios de cada uma das regiões supracitadas, utilizando-se microscópio fotônico¹, com objetiva de 40X. Todos os neurônios de cada campo foram contados, considerando-se os meio-neurônios de campos alternados. A área de cada campo microscópico era de 0,21 mm².

Para a análise morfométrica, realizou-se a mensuração da área do pericário e do núcleo de 100 neurônios de cada região supracitada de todos os animais de ambos os grupos, por intermédio de um software de análise de imagem². As imagens utilizadas foram capturadas por uma câmera de vídeo digital³, acoplada a um microcomputador e a um microscópio fotônico trinocular⁴, utilizando a objetiva de 40X. Para complementar esta avaliação, calculou-se (1) a área do citoplasma por diferença entre a área do pericário e a área do núcleo e (2) a razão entre área do núcleo e a área do pericário de cada neurônio mensurado; (3) realizou-se uma análise de correlação entre as áreas mensuradas dos neurônios de cada grupo e (4) classificaram-se os neurônios quanto à área do pericário, quanto à razão entre a área do pericário e do núcleo, e realizou-se um histograma de frequência.

A normalidade dos dados foi avaliada por intermédio do método de Kolmogorov e Smirnov. Assim, dados considerados normais foram apresentados como média e desvio padrão e comparados pelo teste Análise de Variância (ANOVA). Os dados não considerados com distribuição normal foram apresentados como mediana e percentis 25 e 75 (P25 e P75) e foram comparados por testes não paramétricos. Na inferência estatística, delimitou 5%

como nível de significância.

Resultados

Durante o período experimental, os animais de ambos os grupos desenvolveram alteração visível, mantendo-se saudáveis até a eutanásia. No final do experimento, o grupo controle teve peso corporal de 347,63g ± 35,75g e o grupo experimental de 277,5g ± 40,15g ($p > 0,05$). A área do ceco do grupo controle foi 2,25 ± 0,13 cm² e do grupo experimental 1,21 ± 0,27 cm² ($p > 0,05$).

A densidade populacional de neurônios encontrada em cada região do ceco dos animais de ambos os grupos está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Número dos neurônios mientéricos NADPH-d positivos em 8,4 mm² nas diferentes regiões do ceco de ratos adultos normoalimentados (grupo controle) e submetidos à desnutrição protéica (grupo experimental).

Regiões	Grupo Controle (n= 4)	Grupo Experimental (n=4)
AA	196,5 (179,5; 206,0)	226,8 (215,8; 283,5)
BA	179,5 (152,5; 183,5)	205,5 (193,0; 241,0)
AM	274,0 (218,0; 325,0)	292,0 (273,0; 307,0)
PA	275,0 (220,5; 378,0)	405,0 (332,5; 443,5)
Mediana geral	204,0 (183,5; 274,0)	260,5 (220,8; 307,0)

Valores expressos como mediana (P25; P75). AA – Região Apical Antimesentérica. AM – região Apical mesentérica. BA – Região Basal Antimesentérica. PA- Próximo à ampola cecal. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Os resultados quanto à análise morfométrica da área do pericário, do núcleo, do citoplasma, assim como da razão entre a área do núcleo e do pericário, estão apresentados, respectivamente, nas Tabelas 2, 3, 4 e 5.

Tabela 2 – Área do pericário (μm²) de neurônios mientéricos NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos normoalimentados (Grupo Controle) e submetidos à desnutrição protéica (Grupo Experimental).

Regiões	Grupo Controle	Grupo Experimental
AA	107,55 (68,1; 149,7)	100,1 (72,85; 144,45)
BA	103,6 (72,4; 137,7)	96,1 (70,8; 138,5)
AM	94,9 (64,7; 137,3)*	79,35 (61,4; 109,85)*
PA	89,1 (63,9; 126,4)	83,6 (67,15; 110,25)
Mediana geral	97,8 (66,9; 137,7)*	89,0 (67,3; 126,6)*

Valores expressos como mediana (P25; P75). AA – Região Apical Antimesentérica. AM – região Apical mesentérica. BA – Região Basal Antimesentérica. PA- Próximo à ampola cecal. Valores marcados numa mesma linha com asterisco (*) são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

¹ Motic B1.

² Motic Imagem Plus 2.0.

³ Moticam 2000.

⁴ Motic B5.

Tabela 3 – Área do núcleo (μm^2) de neurônios mientéricos NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos normoalimentados (Grupo Controle) e submetidos à desnutrição protéica (Grupo Experimental).

Regiões	Grupo Controle	Grupo Experimental
AA	29,6 (21,6; 37,4)*	25,3 (20,0; 32,9)*
BA	29,4 (22,4; 39,5)	27,5 (21,7; 35,5)
AM	29,7 (21,0; 37,5)*	24,7 (19,0; 31,5)*
PA	29,1 (22,5; 37,9)*	27,8 (19,8; 31,5)*
Mediana geral	31,5 (21,8; 38,0)*	27,0 (20,0; 32,6)*

Valores expressos como mediana (P25; P75). AA – Região Apical Antimesentérica. AM – região Apical mesentérica. BA – Região Basal Antimesentérica. PA- Próximo à ampola cecal. Valores marcados numa mesma linha com asterisco (*) são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Área do citoplasma (μm^2) de neurônios mientéricos NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos normoalimentados (Grupo Controle) e submetidos à desnutrição protéica (Grupo Experimental).

Regiões	Grupo Controle	Grupo Experimental
AA	72,85 (42,0; 115,1)	74,45 (48,35; 113,6)
BA	73,5 (44,6; 104,4)	68,5 (45,3; 103,5)
AM	61,8 (41,5; 98,2)	56,6 (37,5; 79,1)
PA	57,1 (37,8; 90,8)	59,2 (42,3; 81,4)
Mediana geral	66,2 (40,4; 101,75)	62,5 (42,7; 95,6)

Valores expressos como mediana (P25; P75). AA – Região Apical Antimesentérica. AM – região Apical mesentérica. BA – Região Basal Antimesentérica. PA- Próximo à ampola cecal. A comparação das médias não apresenta diferenças significativa com 0,005% de significância.

Tabela 5 – Razão entre a área do núcleo e a área do pericário de neurônios mientéricos NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos normoalimentados (Grupo Controle) e submetidos à desnutrição protéica (Grupo Experimental).

Regiões	Grupo Controle	Grupo Experimental
AA	0,26 (0,21; 0,37)*	0,25 (0,19; 0,33)*
BA	0,29 (0,23; 0,39)	0,28 (0,21; 0,36)
AM	0,32 (0,24; 0,39)	0,30 (0,23; 0,38)
PA	0,34 (0,25; 0,42)*	0,29 (0,23; 0,37)*
Total	0,30 (0,23; 0,39)*	0,28 (0,22; 0,36)*

Valores expressos como mediana (P25; P75). Valores marcados numa mesma linha com asterisco (*) são significativamente diferentes ($p < 0,05$). AA – Região Apical Antimesentérica. AM – região Apical mesentérica. BA – Região Basal Antimesentérica. PA- Próximo à ampola cecal.

O resultado da análise de correlação, entre as áreas mensuradas dos neurônios do grupo controle e do grupo experimental, encontra-se apresentado nos gráficos de dispersão das figuras 2 e 3, respectivamente.

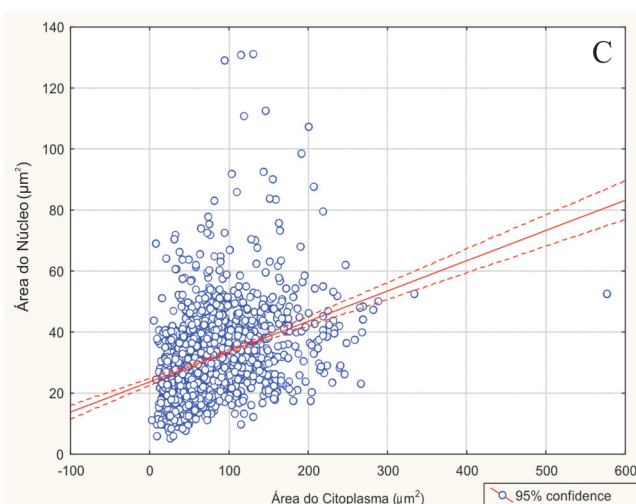
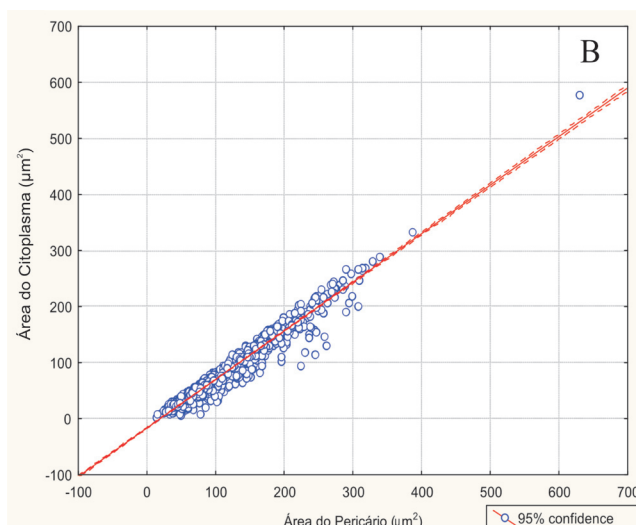
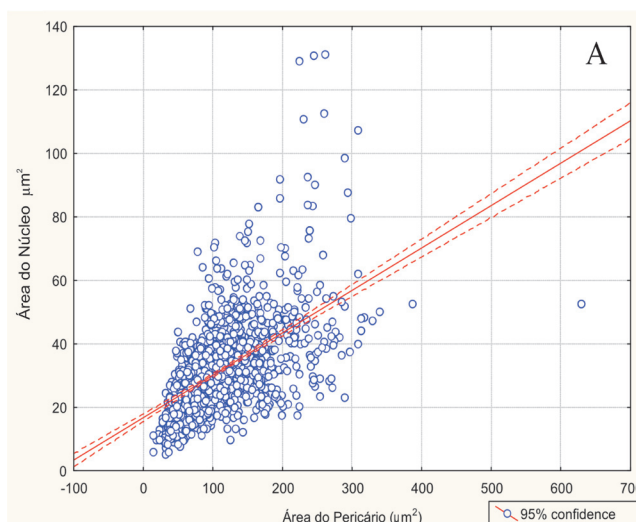


Figura 2 – Gráfico de dispersão entre a área do pericário e a área do núcleo (A, $r = 0,57$, $p < 0,05$), área do pericário e do citoplasma (B, $r = 0,98$, $p < 0,05$) e área do citoplasma e do núcleo (C, $r = 0,37$, $p < 0,05$) de neurônios mientéricos NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos normoalimentados (Grupo Controle).

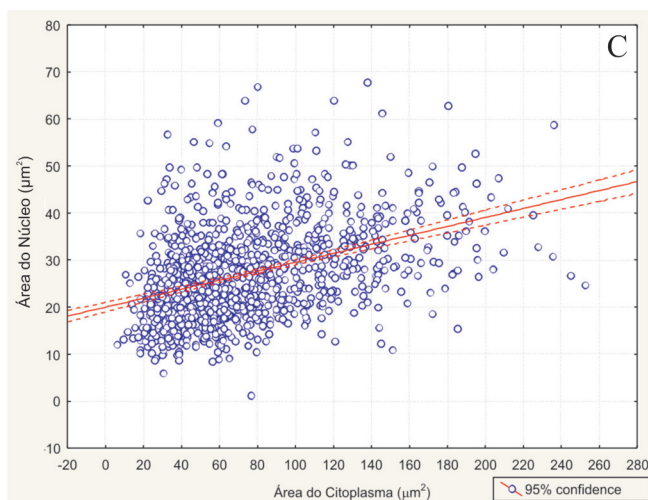
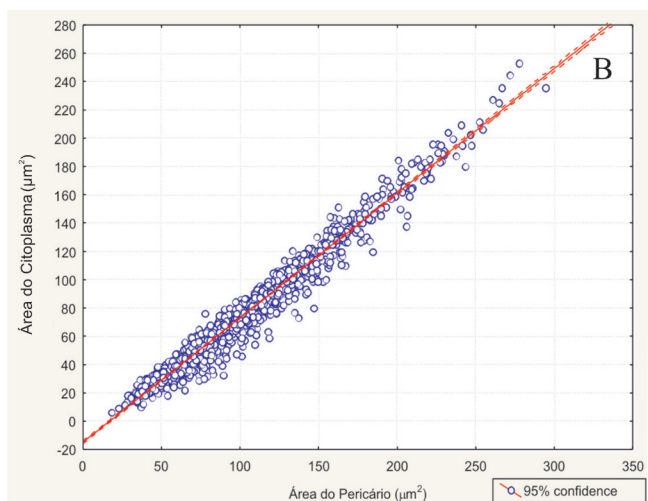
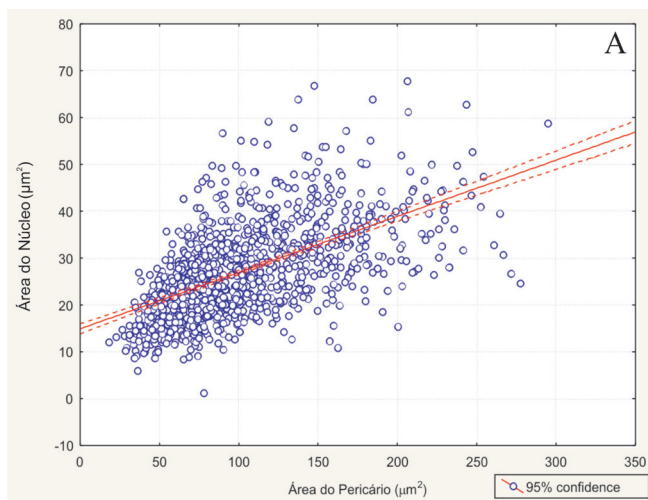


Figura 3 – Gráfico de dispersão entre a área do pericário e a área do núcleo (A, $r = 0,58$, $p < 0,05$), área do pericário e do citoplasma (B, $r = 0,98$, $p < 0,05$) e área do citoplasma e do núcleo (C, $r = 0,41$, $p < 0,05$) de neurônios mientéricos NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos desnutridos (GC).

O histograma de frequência com dados relacionados à área do pericário, razão da área do núcleo e do pericário, está apresentado, respectivamente, nas Figuras 4 e 5.

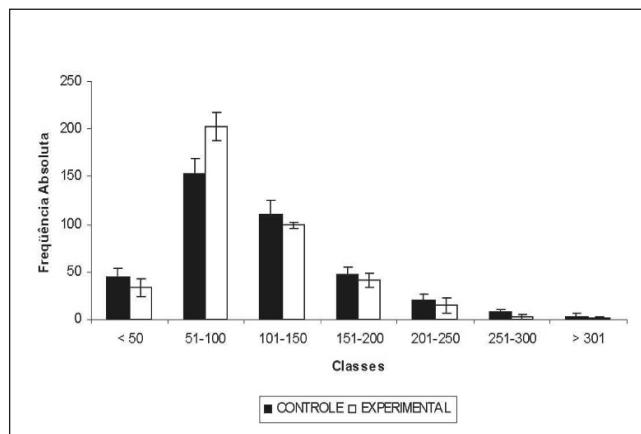


Figura 4 – Histograma da área do pericário de neurônios mientéricos NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos normoalimentados (Grupo Controle) e submetidos à desnutrição protéica (Grupo Experimental). Colunas da mesma classe marcadas com asterisco se diferem significativamente ($*p < 0,05$).

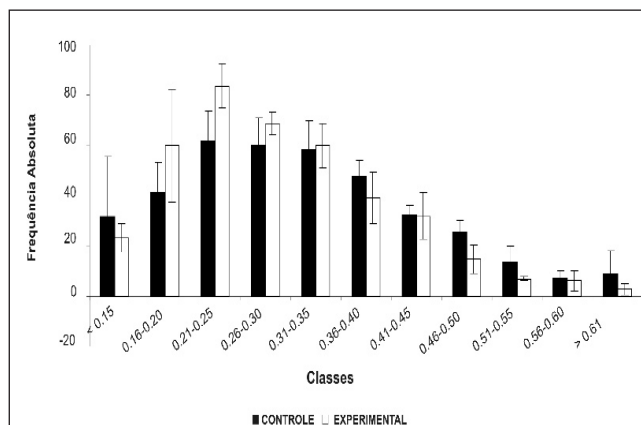


Figura 5 – Histograma da razão entre a área do núcleo e a área do pericário de neurônios mientéricos NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos normoalimentados (Grupo Controle) e submetidos à desnutrição protéica (Grupo Experimental). Colunas da mesma classe marcadas com asterisco se diferem significativamente ($*p < 0,05$).

Discussão

Estudos relacionados à má-nutrição protéica são importantes e atuais, e visam a elucidar seus efeitos sobre a estrutura e funcionamento das diversas partes do sistema digestório. Portanto, a realização de estudos sobre este tema, em diferentes espécies de animais, contribui para o aumento do conhecimento a respeito da má nutrição humana.

A redução no aporte e síntese de proteínas provoca alterações estruturais dos diversos órgãos que compõem o sistema digestório, podendo resultar em alterações do trânsito intestinal, constipação, inflamações e diarreia (WATERLOW, 1996; SOUZA; ARAÚJO, 2004).

Uma das alterações clínicas mais frequentes entre animais desnutridos é o menor ganho ou a perda de peso corporal. Araújo et al. (2005), estudando animais submetidos a desnutrição severa (4% proteína), pelo mesmo modelo experimental deste estudo, verificaram que os animais experimentais apresentaram peso corporal 54,23% menor do que os do grupo controle, desenvolvendo menor quantidade

de massa gorda e massa magra. Sant'Ana et al. (2006) relataram que ratos adultos alimentados com teor de 8% de proteínas, apresentaram peso corporal 14,8% menor que os controle. Neste estudo, no entanto, não houve diferença estatística significativa entre os animais do grupo controle e experimental, apesar de o grupo experimental apresentar peso corporal médio 20,17% menor que o controle.

Possivelmente, nestes animais o menor aporte de proteínas tenha sido suficiente para manter a taxas metabólicas dos mesmos, não acarretando perda de peso, semelhante ao verificado por Schoffen et al. (2005), estudando ratos velhos com desnutrição protéica de 8%.

Estudos com restrição protéica, realizados com ratos *germfree*, demonstraram que estes animais têm retardo na degradação e reabsorção protéica no ceco, reduzindo inclusive a renovação de células intestinais deste órgão (LOESCHE, 1968). Estudos experimentais no intestino grosso demonstraram que a desnutrição protéica (8% de teor de proteínas na dieta), levou a uma alteração no número de neurônios mientéricos do colo ascendente de rato, independentemente da região da circunferência intestinal analisada e das subpopulações quantificadas (SANT'ANA et al., 2001; SANT'ANA et al., 2006). Já em estudos com redução do teor protéico a 4% não houve alteração no número de neurônios mientéricos do colón descendente (ARAÚJO et al., 2005).

No ceco, os neurônios mientéricos estão distribuídos de forma distinta nas diferentes regiões, sendo mais concentrados na região próxima à ampola cecal, possivelmente por ser uma região de transição, tendo a necessidade de maior concentração de fibras nervosas e neurônios, diferença esta especialmente verificada entre os neurônios da via colinérgica (SEYFERT, 2003). Este mesmo autor, ao analisar as subpopulações de neurônios NADH-diaforase e NADPH-diaforase positivos, não encontrou diferença significativa entre as regiões. Igualmente, neste estudo, não foi observada diferença no número de neurônios mientéricos NADPH-d positivos entre as regiões do ceco, possivelmente por se tratar de uma subpopulação neuronal, que desempenha papel semelhante em todas as áreas do órgão.

Zanoni et al. (1997) demonstraram que o número de neurônios no ceco de animais controle foi em média de 4784/cm², quando evidenciados com azul de metileno, semelhante ao número encontrado por Seyfert (2003), com a técnica da ACHE (4673/cm²). Este autor sugeriu que a maioria da população neuronal deste órgão está envolvida com a via colinérgica e demonstrou que a subpopulação de neurônios NADPH-diaforase representou apenas 16,22% da população total de neurônios. A NADPH-diaforase é uma enzima colocalizada com a NO-sintase e os neurônios demonstrados pela histoquímica de evidênciação desta enzima representam a subpopulação neuronal envolvida com a via nitrérgica, que possuem potencial inibitório para a contração muscular (SCHERER-SINGLER et al., 1983).

Neste estudo não foi observada diferença numérica entre os neurônios dos animais do grupo controle e desnutrido, demonstrando que a restrição protéica a 4%, por 90 dias, não foi suficiente para levar à morte de neurônios nesta subpopulação, em nenhuma das regiões do ceco. Sant'Ana et al. (2001, 2006) demonstraram que os neurônios NADPH-

diaforase positivos foram os que apresentaram menor perda, no colo ascendente, de animais submetidos a uma dieta contendo 8% de proteínas. Já no colo descendente, com esta mesma dieta, Araújo et al. (2003a) demonstraram haver uma redução de 24,2% desta subpopulação de neurônios. Assim, este resultado é acentuado quando ratos são submetidos a uma dieta com um nível ainda menor de proteínas (o mesmo nível utilizado no presente estudo: 4%), visto que 37,8% dos neurônios NADPH-diaforase positivos de colo descendente são perdidos (ARAÚJO et al., 2006).

Segundo Cowen et al. (2000), a restrição dietética parece atingir especialmente neurônios colinérgicos, que demonstram ser a subpopulação neuronal mais vulnerável aos efeitos da dieta, o que contribui para a explicação das alterações de motilidade intestinal. Estes autores encontraram aumento na proporção de neurônios NOS positivos, enfatizando que os mesmos caracterizam uma subpopulação, menos vulnerável à morte celular, possivelmente por terem aprimorado os mecanismos de defesa contra os danos dos radicais livres.

A partir da análise morfológica, revelou-se que as áreas do pericário e do núcleo, de uma maneira geral, tendem a decrescer em função da dieta hipoprotéica. Este fato fica explícito quando observado o aumento significativo do número de neurônios que tinham pericário com área entre 51 a 100 μm^2 , a despeito do número de neurônios com pericário de maiores áreas nos animais do grupo experimental. Considerando que não houve perda neuronal, estas alterações são indicativas de modulações celulares bioquímicas, que refletiram na morfologia celular, sinais que demonstram a busca da sobrevivência dos neurônios, durante o momento de hostilidade. Isto é corroborado pelo fato de que a manutenção das correlações entre as áreas do pericário, do citoplasma e do núcleo, demonstra que a proporcionalidade entre essas estruturas celulares estava sendo mantida. Assim, nos permite sugerir que os neurônios estavam modulando-se adequadamente, mesmo frente à menor disponibilidade de aminoácidos para síntese de novas proteínas. É possível também considerar que o fluxo deste monômero estava sendo direcionado para tecidos mais nobres, ou seja, com menor capacidade de regeneração, como é o caso das células objeto deste estudo.

É curioso também perceber que o número de neurônios com núcleo ocupando uma menor parte do pericário (21 a 25%), aumentou, em detrimento do número de neurônios em que o núcleo ocupava entre 46 a 55% do pericário. Este fato foi observado em praticamente toda extensão do órgão, com exceção na região basal antimesentérica. Considerando que o experimento não alterou a área do citoplasma dos neurônios deste estudo, sugere-se que essa redução da área nuclear seja a principal responsável pela redução da área do pericário, observada na região apical mesentérica do ceco nos animais do grupo experimental. Considerando, ainda, que o tamanho do núcleo está diretamente relacionado ao metabolismo celular (ANDRADE; JORDÃO, 2005), sobretudo à síntese protéica, pode-se inferir que os neurônios, os quais tinham núcleos que ocupavam 46 a 55% do pericário, pertenciam a uma subpopulação de neurônios metabolicamente ativa, e que o organismo dos animais do grupo experimental compreendeu que poderia ser inibida num momento de privação de aminoácidos de fonte exógena. Possivelmente,

este grupo também deve representar o aumento do número de neurônios com pericário entre 51 e 100 μm^2 .

Não foram encontrados, na literatura, outros estudos que verificassem os efeitos da desnutrição sobre a área do corpo e do núcleo celular de neurônios do ceco. Por outro lado, considerando outros segmentos intestinais, Natali et al. (2005) demonstram que não houve alteração da área do pericário de neurônios mientéricos do duodeno de ratos alimentados com ração contendo 8% de proteínas. Quando ratos são submetidos a restrição proteica ainda maior (4%), observou-se aumento do pericário de neurônios NADH-diaforase positivos do colo ascendente (HERMES et al., 2006). Estudos avaliando neurônios mientéricos do ceco, sob outras condições experimentais, têm demonstrado que a idade não interfere no fato de que o pericário de neurônios NADPH-diaforase positivos da região apical, tendam a ser maior do que os da região basal, exceto quando os animais são submetidos à atividade física (SILVA, 2006). Além disso, em ratos diabéticos, o número de neurônios NADH-diaforase positivos, com pericário de valores intermediários, tendem a aumentar (ZANONI et al., 1997).

Conclusão

A dieta intensamente pobre em proteínas, fornecida a ratos jovens, durante 90 dias, não provoca alteração no número de neurônios NADPH-diaforase positivos do ceco. Por outro lado, esta condição experimental induz redução do pericário e do núcleo desses neurônios em algumas regiões do ceco.

Referências

ANDRADE, C. G. T. J.; JORDÃO, B. Q. O núcleo da célula. In: JUNQUEIRA, L. C.; ARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

ARAÚJO, E. J. A. et al. Effect of protein and vitamin B deficiency on the morpho-quantitative aspects of the myenteric plexus of the descending colon of adult rats. **Arq. Neuropsiquiatr.** v. 61, p. 226-233, 2003a.

_____. Regional differences in the number and type of myenteric neurons in the descending colon of rats. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** v. 61, n. 2-a, p. 220-225, 2003b.

_____. Parâmetros biométricos e de consumo alimentar de ratos submetidos à dieta hipoprotéica e hipercalórica. **Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR**, v. 8, n. 2, p.131-138, 2005.

_____. Quantitative study of the myenteric plexus of the descending colon of young rats subjected to intense protein deficiency. **Int. J. Morphol.** v. 24, n. 4, p. 591-597, 2006.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1992.

BRANDÃO, M. C. S.; ANGELES, R. C.; SOUZA, R. R. Effects of pre and postnatal protein energy deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric

study in weanling rats. **Nutr. Res.** v. 23, p. 215-223, 2003.

CASTELUCCI, P. et al. Effects of pre and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. **Cell Tissue Res.** v. 310, p.1-7, 2002.

COWEN, T. et al. Restricted diet rescues rat enteric motor neurons from age related cell death. **Gut.** v. 47, p. 653-660, 2000.

KOLB, E. **Fisiologia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HERMES, C. et al. Efeitos da desnutrição proteica sobre a área dos neurônios do plexo mientérico do colo ascendente de ratos. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA FÓRUM DE PESQUISA, 5., 2006, Umuarama. **Anais...** Umuarama: UNIPAR, 2006. p. 83.

LOESCHE, W. J. Accumulation of endogenous protein in the caecum of the germfree rat. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.129, p. 380-384, 1968.

MEILUS, M.; NATALI, M. R. M.; MIRANDA-NETO, M. H. Study of the myenteric plexus of the ileum of rats subjected to protein undernutrition. **Rev. Chil. Anat.** v.16, p. 9-14, 1998.

MELLO, E. V. S. L.; STABILLE, S. R.; MIRANDA-NETO, M. H. Effects of maternal protein deprivation on morphological and quantitative aspects of the myenteric plexus neurons of proximal colon in rats. **Arq. Neuropsiquiatr.** v. 55, n.1, p.106-113,1995.

MELLO, S. T. S. et al. Estudo morfoquantitativo do plexo mioentérico do duodeno de ratos submetidos a carência de proteínas e de vitaminas do complexo B. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 2, p. 251-256, 2004.

MIRANDA-NETO, M. H. et al. Morphologic and quantitative study of the myenteric neurons of the jejunum of malnourished rats (*Rattus norvegicus*). **Arq. Neuropsiquiatr.** v. 57, n. 2, p. 387-391, 1999.

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

NATALI, R. M. R.; MIRANDA-NETO, M. H.; ORSI, A. M. Morphometry and quantification of the myenteric neurons of the duodenum of adult rats fed with hypoproteic chow. **Int. J. Morphol.** v. 21, n. 4, p. 273-277, 2003.

NATALI, M. R. M.; VALENTINI, L. C.; MIRANDA-NETO, M. H. Morphoquantitative evaluation of the duodenal myenteric neuronal population in rats fed with hypoproteic

ration. **Biocell**. v. 29, n.1, p. 39-46, 2005.

PACHALY, J. R. et al. A. Anesthesia of wistar rats (*Rattus norvegicus*) with allometrically scaled doses of ketamine, xylazine, acepromazine and atropine - preliminary report. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 6, n. 2, p.195, 2003.

RECINOS, J. G. **Estudos quantitativos do plexo mioentérico do cólon descendente de ratos submetidos à desnutrição protéica**. 1996. Trabalho de Conclusão de Curso. (Especialização) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1996.

SANT'ANA, D. M. G. et al. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon of rats subjected to proteic desnutrition. **Arq Neuropsiquiatr**. v. 55, p. 687-695, 1997.

SANT'ANA, D. M. G.; MOLINARI, S. L.; MIRANDA-NETO, M. H. Effects of protein and vitamin B deficiency on blood parameters and myenteric neurons of the colon of rats. **Arq. Neuropsiquiatr**. v. 59, n. 3-a, p. 493-498, 2001.

SANT'ANA, D. M. G. et al. Effect of protein and complex b vitamins deficiency on the morphoquantitative features of the myenteric plexus of the ascending colon of adult rats. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 9, n. 2, p. 135-140, 2006.

SANTER, R. M.; BAKER, D. M. Enteric neurons numbers and size in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. **J. Auton. Nerv. Syst**. v. 28, p. 59-67, 1988.

SCHERER-SINGLER, U. et al. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. **J. Neurosci Methods**. n. 9, p. 229-234, 1983.

SCHOFFEN, J. P. F. et al. Effects of a hypoproteic diet on myosin-V immunostained myenteric neurons and the proximal colon wall of aging rats. **Autonomic neuroscience: basic and Clinical**. v.122, p.77-83, 2005.

SEYFERT, C. E. **Densidade e área do perfil celular dos neurônios mioentéricos reativos a acetilcolinesterase, NADH e NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos**. 2003. 69 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo: São Paulo, 2003.

SILVA, E. A. **Avaliação morfológica e quantitativa dos neurônios do plexo mioentérico nas diferentes porções do ceco de ratos com seis e doze meses de idade, sedentários, e ratos submetidos à atividade física regular, com doze meses**. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo: São Paulo, 2006.

SMELTZER, S.; BARE, B. G. **Brunner**: tratado de enfermagem médico-cirúrgica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SOUZA, A. P. O.; ARAÚJO, E. J. A. Alterações morfológicas do duodeno causadas pela desnutrição protéico-energética. **Arq. Ciên. Saúde da Unipar**, v. 8, Suplemento 1, 2004.

TAYLOR, A.; PERNNINGTON, D.; THACKER, J. The vitamin requirements of caeectomized rats. **Univ. Texas Pub**. v. 4, n. 2, p. 30-37, 1942.

TORREJAIS, M. M. et al. Effects of protein malnutrition after breast-feeding on the morphology of the intestinal wall and myenteric neurons of the ileum rats. **Rev. Unimar**. v.17, n. 2, p. 315-327, 1995.

VASCONCELLOS, D. **Gastroenterologia prática**. 5. ed. São Paulo: Sarvier, 1998.

WATERLOW, J. C. **Malnutrición proteico-energética**. OPS. Washington. p. 510, 1996.

ZANONI, J. A. et al. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the caecum of streptozotocin-induced diabetic rats. **Arq. Neuropsiquiatr**. v. 55, n. 4, p. 696-702, 1997.

ZANONI, J. A.; MIRANDA-NETO, M. H.; ROMANO, E. B. Estudo morfológico da parede do ceco de ratos wistar. **Arq. Cienc. Saúde UNIPAR**, v. 2, n. 1, p. 95-99, 1998.

Recebido em: 14/09/2007

Aceito em: 09/04/2008