

NEURÔNIOS NADH-DIAFORASE POSITIVOS DO JEJUNO DE RATOS ADULTOS (*RATTUS NORVEGICUS*) DESNUTRIDOS

Aspectos quantitativos

Sônia Trannin de Mello Zanin¹, Sonia Lucy Molinari²,
Débora de Mello Gonçalves Sant'Ana¹, Marcílio Hubner de Miranda Neto²

RESUMO - Temos por objetivo contribuir com informações sobre os aspectos quantitativos dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos do jejuno de ratos submetidos a desnutrição protéica. Foram utilizados 10 ratos (90 dias de idade), divididos em grupos: controle (n=5, ± 278 g) e desnutrido (n=5, ± 280 g). Nos 120 dias seguintes, os ratos do grupo controle receberam ração com teor protéico de 22%, os do grupo desnutrido, 8%. Ao final deste período, os ratos do grupo controle pesaram $\pm 394,4$ g e os desnutrido $\pm 273,5$ g. O jejuno foi submetido à técnica histoquímica da NADH-diaforase para evidenciar células nervosas em preparado de membranas. Foram contados os neurônios presentes em 80 campos microscópicos em ambos os grupos. Verificaram-se no controle $\pm 674,6$ neurônios e no desnutrido $\pm 1326,8$ neurônios; A dieta não alterou a organização dos neurônios entretanto, levou a um menor desenvolvimento corporal nos animais desnutridos, contribuindo para que os neurônios destes sofressem menor dispersão e apresentassem maior densidade por mm².

PALAVRAS-CHAVE: desnutrição, jejuno, neurônios mioentéricos, rato.

NADH-diaforase positive neurons of the jejunum of disnurtured adult rats (*Rattus norvegicus*): quantitative aspects

ABSTRACT - We aim at contributing with information on the quantitative aspects of the NADH-diaforase positive myenteric neurons of the jejunum of adult rats subjected to protein desnutrition. Ten rats aging 90 days were divided into two groups: control (n=5, ± 278 g) and disnurtured (n=5, ± 280 g). In the following 120 days, the rats from the control group had chow with 22% protein level, and those from the disnurtured group, with 8% protein level. After this period, the control rats weighted ± 394.4 g and the disnurtured ± 273.5 g. The jejunum was subjected to the histochemical technique of the NADH-diaforase to stain nerve cells in whole-mounts. The neurons found in 80 microscopic fields of both groups were counted. In the control ± 674.6 neurons were observed, and ± 1326.8 neurons were counted in the disnurtured group. The low-protein diet did not alter the organization of the neurons, but led to a smaller body growth in the disnurtured animals, preventing neuronal dispersal and leading to a greater density per mm².

KEY WORDS: desnutrition, jejunum, myenteric neurons, rat.

O estado nutricional é determinado pelo suprimento de nutrientes e pela utilização destes pelo organismo. A desnutrição está relacionada com o desequilíbrio do estado nutricional e ocorre sob diversas formas, podendo ter conseqüências reversíveis ou irreversíveis¹. Estudos específicos sobre os

efeitos da desnutrição dos neurônios do plexo mioentérico evidenciaram redução de 27% no número de neurônios no intestino delgado de ratos cujas mães sofreram restrição protéica durante as duas últimas semanas de gestação². Em estudos realizados com o jejuno de ratos desnutridos nos perí-

Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá PR, Brasil: ¹Professor da Universidade Paranaence-Umuarama, PR, Brasil; ²Professor da Universidade Estadual de Maringá PR - Brasil.

Recebido 20 Julho 2002, recebido na forma final 19 Fevereiro 2003. Aceito 17 Março 2003.

Dr. Marcílio Hubner de Miranda Neto - Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Universidade Estadual de Maringá - Avenida Colombo 5790/H79 - 87020-900 Maringá PR - Brasil.

odos de gestação e lactação e submetidos a dieta com teor protéico normal, no período de desmame, não foi verificada a redução da população de neurônios³. Verificou-se também que em ratos renutridos aos 21 dias de vida extra-uterina, cujas mães sofreram restrição protéica durante a gestação, não foram observadas, no intestino como um todo, diferenças estatisticamente significativas com relação à densidade neuronal, o que sugere que com a renutrição foi possível recuperar-se o número estimado de neurônios⁴. Efeitos da desnutrição pré e pós-natal em ratos também demonstraram, no intestino delgado, diminuição do comprimento das vilosidades, o que sugere que poderia ter havido importante mecanismo de adaptação em resposta à desnutrição. Tal adaptação talvez represente uma condição em que o plexo mioentérico atue em um limite necessário à manutenção da homeostase visceral⁵.

O sistema nervoso mioentérico exibe grande complexidade anatômica, bioquímica e funcional, abrangendo redes neurais intrínsecas formadas por neurônios sensitivos, interneurônios e neurônios motores. Essa complexa organização neural desempenha importante função na homeostase, por controlar a tonicidade dos vasos sanguíneos do tubo digestório, sua motilidade, o transporte de líquidos e a secreção das células endócrinas intrínsecas⁶.

Com o objetivo de colaborar com os conhecimentos sobre os neurônios mioentéricos, o presente estudo foi realizado com ratos adultos, com 210 dias de idade, submetidos a dieta hipoprotéica (8%), para verificar possíveis alterações quantitativas ocorridas no plexo em função da dieta imposta através de comparação com os dados obtidos em animais de grupo que recebeu dieta com teor protéico de 22%.

MÉTODOS

Este estudo foi realizado utilizando-se o jejuno de 10 animais de laboratório, *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, divididos em dois grupos: controle e desnutrido.

Os animais, a partir dos 90 dias (280g) de idade, foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura constante e alternância de ciclos claro-escuro de 12 horas. Os animais pertencentes ao grupo controle, nos 120 dias que se seguiram, continuaram recebendo, *ad libitum*, ração com teor protéico de 22%. Os animais do grupo desnutrido receberam, durante 120 dias, *ad libitum*, ração com teor protéico de 8%. Esta dieta foi obtida a partir da ração NUVILAB (recomendada pelo National Research Council & National Institute of Health – USA-teor protéico de 22%), com uma mistura de amido de milho e suplementação vitamínica e de sais minerais. A ração foi sub-

metida à análise dos níveis de proteínas pelo método de Semimicro Kjeldahl⁷ e foi peletizada. Esta dieta hipoprotéica foi formulada de acordo com o descrito na literatura⁸⁻¹¹. Os ratos foram sacrificados de acordo com as normas de conduta ética em experimentação animal* [*BRASIL, Lei nº. 6.638, de 8 de maio de 1979. Normas para a prática didático-científica da viviseção de animais e determinação de outras providências. Lex1979;43:416].

O jejuno foi retirado e submetido à técnica histoquímica de evidênciação de células nervosas, através da atividade da enzima NADH-diaforase, utilizando-se como acceptor artificial de elétrons o nitro blue tetrazólium (NBT)¹². Em seguida, os segmentos foram microdissecados ao estereomicroscópio com transluminação, retirando-se a túnica mucosa e a tela submucosa, desidratados, diafanizados e distendidos entre lâmina e lamínula com resina sintética Permunt.

Para a quantificação dos neurônios mioentéricos, foram contados 80 campos de microscópio, com objetiva de 40 X (13,28 mm²), sendo 40 campos da região mesentérica e 40 da região antimesentérica, nos dois grupos.

A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação do número de neurônios encontrados em cada grupo de animais foram calculados. O teste t de Student foi aplicado para comparar as diferenças entre as médias obtidas entre os dois grupos. O nível de significância utilizado foi 5%.

RESULTADOS

Os ratos do grupo controle, aos 90 dias, pesaram em média 278g e, aos 210 dias, 394,4g. Os animais do grupo desnutrido, aos 90 dias, pesaram em média 280g e, aos 210 dias, 273,5g.

Nos dois grupos, em ambas as regiões, os neurônios NADH-diaforase positivos raramente apresentaram-se isolados, predominando o agrupamento com formação de gânglios. Os gânglios eram, na maioria, paralelos entre si e orientados transversalmente em relação ao maior eixo do intestino.

A densidade dos neurônios era heterogênea, variando conforme o local da circunferência intestinal considerada: próximo à inserção do mesentério observou-se maior densidade neuronal (Figs 1-A e B) em relação à região antimesentérica (Figs 1-C e D).

Considerando os 80 campos de microscópio encontrou-se, em média, no grupo controle, 674,6 neurônios, enquanto no grupo desnutrido, 1326,8 neurônios (Tabela 1). Aplicando o teste t de Student verificaram-se diferenças significativas no número de neurônios entre os dois grupos estudados ($t = 5,9$; valor crítico = 2,306).

DISCUSSÃO

O desenvolvimento dos ratos dos 90 aos 210 dias recebendo dieta com teor de proteínas de 22% possibilitou um ganho de peso de 41,9%, enquanto os

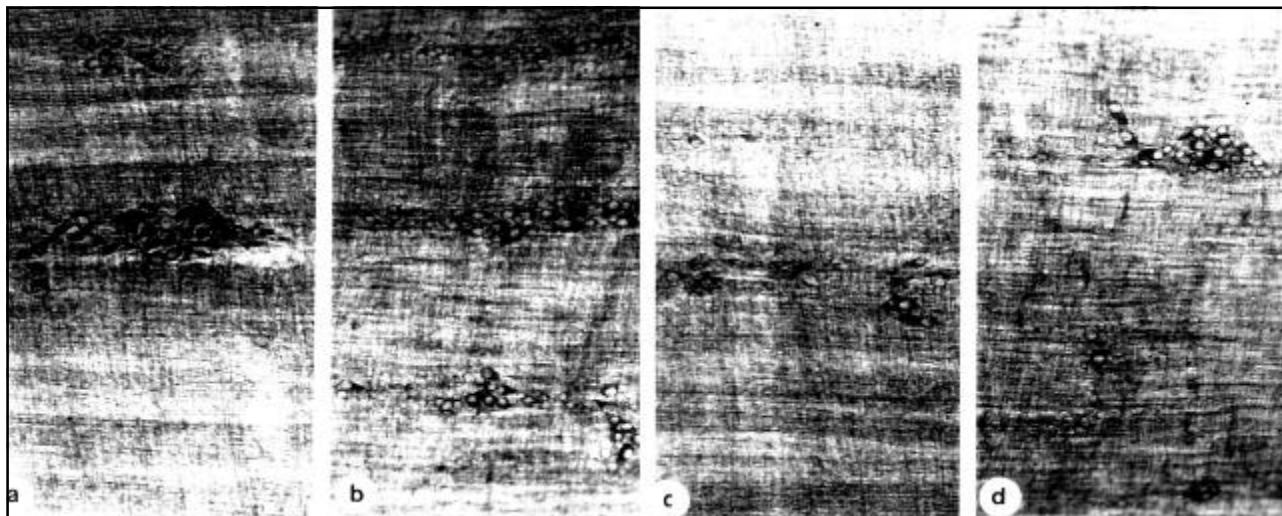


Fig 1. Preparado de membrana do jejuno mostrando a morfologia e a disposição dos neurônios do plexo mioentérico. (a) região mesentérica (rato controle); (b) região mesentérica (rato desnutrido); (c) região antimesentérica (rato controle) e (d) região antimesentérica (rato desnutrido). NADH, 151x.

Tabela 1. Média do número de neurônios evidenciados no jejuno de ratos dos grupos controle e desnutrido, em 13,28 mm².

| Ratos | Grupo controle | Grupo desnutrido |
|-------|----------------|------------------|
| 1 | 627 | 1218 |
| 2 | 553 | 1301 |
| 3 | 714 | 1645 |
| 4 | 606 | 1072 |
| 5 | 873 | 1398 |
| X | 674,6 | 1326,8 |
| S | 125,17 | 214,32 |
| C.V. | 18,55% | 16,15% |

t = 5,9; c.v. = 2.306.

ratos que receberam ração com teor de proteínas de 8% perderam 2,32% de seu peso corporal. Verificou-se que o peso corporal dos ratos desnutridos foi 44,2% menor do que os do grupo controle. Dados semelhantes foram constatados em outros experimentos em que os grupos de ratos desnutridos apresentaram peso corporal inferior aos dos grupos controles, na ordem de 35,1%¹³ e 37,9%¹⁴.

Ao se realizar estudos quantitativos de neurônios do plexo mioentérico, tem sido recomendada observância das possíveis diferenças existentes entre os diferentes segmentos do sistema digestório¹⁵⁻¹⁷ ou, até mesmo, diferenças regionais em um mesmo segmento^{13,15-18}. Miranda-Neto et al.¹⁵ argumentam que, quando utilizados grupos controle e experimental,

a inobservância deste aspecto pode comprometer os resultados da pesquisa. Propõem uma 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 privilegiasse, no grupo controle, quantificações na região mesentérica e, no grupo experimental, na região antimesentérica, possivelmente concluiria erroneamente que a condição imposta levou a redução significativa no número de neurônios. Para evitar este tipo de erro, em todos os animais, foram quantificados os neurônios NADH-diaforase positivos, em igual número de campos, das regiões mesentérica e antimesentérica, o que permite uma comparação mais segura entre os dois grupos.

Os neurônios variaram em seu formato e apresentaram núcleo esférico, geralmente excêntrico, conforme verificado na literatura para neurônios mioentéricos do jejuno, bem como de outros segmentos intestinais e em diferentes espécies de animais^{13-15,17-20}. A descrição do núcleo excêntrico, verificada pelos diversos autores, constitui achado normal para a posição do núcleo no corpo do neurônio mioentérico, que não deve ser confundido com sinais de degeneração neuronal, conforme é constatado para os núcleos dos neurônios do sistema nervoso central que se encontram em processo degenerativo²¹.

Embora tenha ocorrido perda de peso corporal, não se observaram alterações na organização dos neurônios mioentéricos. Nos dois grupos os neurônios formavam gânglios na região mesentérica e anti-

mesentérica, semelhantes aos observados por Zanin et al.¹⁹ no jejuno de ratos (*Rattus norvegicus*) com 210 dias de idade, bem como as descrições feitas para outros segmentos do intestino de ratos que foram submetidos a dieta hipoprotéica^{3,13}, confirmando que a imposição de restrições protéicas para o teor de 8% em ratos adultos jovens, até os 210 dias, não provoca alterações morfológicas significativas na disposição dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos.

A densidade de neurônios nos animais desnutridos foi 96,7% maior que nos animais do grupo controle. Entretanto, não podemos interpretar este dado como um aumento da população neuronal total, pois se considerarmos que o surgimento de novos neurônios na vida adulta é um processo pouco expressivo e que, carece de fatores de estimulação e que, por outro lado, a desnutrição atua levando a redução do número de neurônios, quer seja no sistema nervoso central ou no sistema nervoso entérico^{2,13}, podemos atribuir esta diferença à menor dispersão dos neurônios nos animais desnutridos, uma vez que, estes cresceram menos e, conseqüentemente, seus neurônios sofreram menor dispersão, o que também foi constatado em outros experimentos realizados com ratos desnutridos^{3,13,14,22}.

CONCLUSÃO

A dieta hipoprotéica não alterou a organização dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos. Entretanto, levou a menor desenvolvimento corporal nos animais desnutridos, contribuindo para que os neurônios destes sofressem menor dispersão e apresentassem maior densidade por mm².

REFERÊNCIAS

1. Marcondes, E. Desnutrição. São Paulo: Sarvier, 1976:178.
2. Santer RM, Conboy B. Prenatal undernutrition permanently decreases enteric neuron number and sympathetic innervation of Auerbach's plexus in the rat. *J. Anat* 1990;168:57-62.
3. Miranda-Neto MH, Molinari SL, Stabile SR, Sant'Ana DMG, Natali MRM. Morphological and quantitative study of the myenteric neurons of the jejunum of malnourished rats (*Rattus norvegicus*). *Arq Neuropsiquiatr* 1999;57:387-391.
4. Gomes OA. Repercussões morfológicas da desnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal. Tese, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1999.
5. Firmansyah A, Suwandito L, Penn D, Lebenthal E. Biochemical and morphological changes in the digestive tract of rats after prenatal and postnatal malnutrition. *Am J Clin Nutr* 1989;50:761-768.
6. Brandão MCS. Influência da desnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição sobre o plexo mioentérico do estômago de ratos. Tese, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.
7. Silva DJ. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Minas Gerais: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1981:33-46.
8. Moura AS. Modelos experimentais para o estudo lactotrófico e suas influências nos lactentes em ratas albinas. *Ciência e Cultura*. 1986;38:980.
9. Torrejais MM, Natali MRM, Conegero CI, Miranda-Neto MH. Effects of proteic desnutrition after breast-feeding on the morphology of the intestinal wall and enteric neurons of the ileum of rats. *Revista UNIMAR* 1995;17:315-327.
10. Natali MRM, Miranda-Neto MH. Effects of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of duodenum of rats. *Arq Neuropsiquiatr* 1996;54:273-279.
11. Mello EVSL, Stabile SR, Miranda-Neto MH. Effect of maternal protein deprivation on morphological and quantitative aspects of the myenteric plexus neurons of proximal colon in rats. *Arq Neuropsiquiatr* 1997;55:106-113.
12. Gabella G. Detection of nerve cells by histochemical technique. *Experientia* 1969; 25:218-219.
13. Sant'Ana DMG, Miranda-Neto MH, Souza R.R, Molinari SL. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon rats subjected to proteic desnutrition. *Arq Neuropsiquiatr* 1997;55:687-695.
14. Fiorini A, Molinari SL, Natali M.R.M, Miranda-Neto M.H. Quantitative morphological analysis of the myenteric neurons of the ileum in rats under experimental desnutrition. *Acta Scientiarum* 1999;21:409-413.
15. Miranda-Neto MH, Molinari SL, Natali, MRM, Sant'Ana DMG. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59:54-59.
16. Molinari SL, Pereira MS, Souza RR, Miranda-Neto MH. Estudo morfológico do plexo mioentérico do estômago glandular do rato (*Anas* sp). *Revista UNIMAR* 1994;16:419-426.
17. Irwin D A. The anatomy of Auerbach's plexus. *Am J Anat* 1931;49:141-166.
18. Fregonesi CEPT, Miranda-Neto MH, Molinari SL. Estudo morfológico e quantitativo dos neurônios do plexo mioentérico do corpo do estômago de *Rattus norvegicus*. *Acta Scientiarum* 1998;20:221-224.
19. Zanin STM, Molinari SL, Sant'Ana DMG, Miranda-Neto MH. Densidade dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos do jejuno de ratos (*Rattus norvegicus*). *Arq Ciênc Saúde Unipar* 2001;5:03-07.
20. Gabella G. Innervation of the gastrointestinal tract. *Internat Rev Cytol*. 1979;59:129-191.
21. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 9.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999:152.
22. Molinari SL, Fernandes CA, Sant'Ana DMG, Miranda-Neto MH. NADH-diaforase positive myenteric neurons of the glandular region of the stomach of rats (*Rattus norvegicus*) subjected to desnutrition. *Rev Chil Anat* 2002;19-23.