



Atrofia de neurônios do plexo mientérico do íleo de ratos submetidos à intensa carência de proteínas

Neide Martins Moreira¹, Eliane Muniz², Catchia Hermes-Uliana³, Eduardo José de Almeida Araújo⁴ e Débora de Mello Goncalves Sant'Ana^{5*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. ²Universidade Paranaense, Guaíra, Paraná, Brasil. ³Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. ⁴Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. ⁵Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil *Autor para correspondência. E-mail: dmgsantana@gmail.com

RESUMO. Objetivou-se avaliar os efeitos da oferta de uma dieta contendo 4% de proteínas para ratos adultos, quanto aos aspectos morfométricos do plexo mientérico do íleo. Vinte animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: Controle (n = 10) que receberam ração comercial com 26% de proteína e Experimental (n = 10) alimentados com ração com teor proteico reduzido para 4%, durante 90 dias. Neurônios do plexo mientérico do íleo presentes em preparados totais foram evidenciados por intermédio da técnica de Giemsa e da NADH-diaforase. Tanto a população neuronal total, assim como a subpopulação NADH-diaforase positiva sofreram atrofia com redução da área do pericário, do núcleo e do citoplasma.

Palavras-chave: desnutrição proteica, sistema nervoso entérico, intestino delgado.

Atrophy of myenteric neurons in the ileum of rats submitted to severe protein deficiency

ABSTRACT. The effects of a 4%-protein diet in adult rats with respect to the morphometric aspects of the myenteric plexus in the ileum were assessed. Twenty animals were randomly divided into two groups: Control Group (n = 10), which received 26%-protein chow, and Experimental Group (n = 10), which received 4%-protein chow for 90 days. Neurons in the myenteric plexus in the ileum in whole mount were evidenced through Giemsa and NADH-diaphorase techniques. The overall neuronal population as well as the subpopulation positive for NADH diaphorase presented atrophy, with a reduction of the perikaryon, nucleus and cytoplasm.

Keywords: protein malnutrition, enteric nervous system, small intestine.

Introdução

A desnutrição, doença eminentemente social, é um dos maiores problemas de saúde pública, que abrange países subdesenvolvidos, em desenvolvimento e bolsões de miséria de países desenvolvidos (NÓBREGA, 1996). Definida como uma ausência do aporte total ou parcial de nutrientes essenciais para a dieta, sobretudo proteína e energia, ocorre frequentemente em crianças menores de cinco anos de idade (NÓBREGA, 1996). Dentro deste contexto, vale destacar que é comum em países em desenvolvimento ocorrer a substituição da dieta balanceada por uma alimentação rica em amido, já que os alimentos proteicos são normalmente mais caros e, por isso, menos acessíveis.

Sob carência de nutrientes, o organismo tende a poupar tecidos de baixa renovação como o nervoso (DEO, 1978). Este tecido compõe os elementos do sistema nervoso central e periférico. Considerando este último, na parede do tubo digestório encontra-

se o plexo mientérico entre os estratos circular e longitudinal da túnica muscular, o qual se organiza como uma rede de gânglios, dispostos regularmente e entremeados com fibras nervosas que se estendem do esôfago ao ânus. Este plexo é responsável pelo controle da motilidade intestinal (FURNESS; COSTA, 2006).

É sabido que a desnutrição compromete o funcionamento normal do sistema digestório, o que pode levar à má absorção e à alteração da motilidade intestinal (DOUGLAS, 2004). Como a maioria das reações biomoleculares requer a ação de enzimas (que geralmente são proteínas), é esperado que o metabolismo celular esteja alterado em animais submetidos à desnutrição proteica (DEO, 1978). Na busca de compreender o mecanismo das alterações causadas pela desnutrição, vários estudos experimentais têm sido realizados utilizando o rato, pelo seu tamanho reduzido, pelo seu comportamento reprodutivo e pela sua adaptabilidade a diversas dietas (NRC, 1995).

A literatura apresenta vários estudos que avaliam as consequências da carência de proteínas na dieta para a área do pericário de neurônios mientéricos de ratos, alguns demonstram aumento (HERMES et al., 2008; NATALI et al., 2005) e outros a redução (FIORINI et al., 1999; NATALI et al., 2003; TORREJAIS et al., 1995). A divergência de resultados exige que outros estudos sejam realizados, utilizando dietas notoriamente insuficientes para manter o balanço positivo de nitrogênio, e que considere não somente a área do pericário, como também seu núcleo e citoplasma. É importante também considerar um padrão de técnicas de evidencição neuronal que permita fazer comparações tanto para a população, como para subpopulação de neurônios mientéricos.

Neste sentido, neste estudo buscou-se avaliar as consequências de uma dieta com 4% de proteínas sobre a área do pericário, núcleo e citoplasma dos neurônios mientéricos do íleo de ratos evidenciados por diferentes técnicas histoquímicas.

Material e métodos

Tratamento dos Animais

O protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal da Universidade Paranaense (UNIPAR).

Utilizaram-se 20 ratos (*Rattus norvegicus* Wistar) machos, com 90 dias de idade (peso médio de $303,8 \pm 29,73$ g), os quais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: Controle (GC; $n = 10$) e Experimental (GE; $n = 10$), alojados em caixas de polipropileno tampadas com grade zincada com depressão central para deposição da ração e da garrafa de água. Permaneceram em biotério climatizado (temperatura entre 22 e 24°C) com ciclo claro/escuro de 12h com água (clorada) e ração (Nuvilab Cr-1 da Nuvital) disponíveis *ad libitum*. Durante 90 dias o GC recebeu ração comercial NUVILAB® (Paraná, Brasil) com 26% de proteínas e o GE recebeu ração manipulada com teor proteico de 4%, e manutenção do balanço vitamínico e mineral (ARAÚJO et al., 2005).

Após 90 dias, os animais foram pesados e anestesiados em jejum de 12h com o seguinte protocolo anestésico: Acepran $1,26 \text{ mL kg}^{-1}$, Ketamina (10%) $1,26 \text{ mL kg}^{-1}$, Xilasina (2%) $0,42 \text{ mL kg}^{-1}$ e Atropina (1%) $0,22 \text{ mL kg}^{-1}$ administrada intramuscularmente (PACHALY et al., 2003). Realizou-se laparotomia e o jejuno-íleo de cada animal foi retirado, pesado e mensurado com régua milimetrada.

Obtenção dos preparados de membrana:

O íleo terminal de cinco animais de cada grupo foi lavado com solução salina a 0,9%, preenchidos e imersos em solução fixadora de formol acético por 48h. Na sequência, os animais foram dissecados e corados com solução corante de Giemsa (à base de azul de metileno) em tampão fosfato de Sorensen (BARBOSA, 1978).

Os segmentos intestinais remanescentes de cada grupo foram submetidos à técnica histoquímica da NADH-diaforase. Para tanto, foram preenchidos com solução de Krebs (pH 7,3), lavados duas vezes nesta mesma solução (10 min. cada) e imersos por 5 min. em solução de Triton X-100 a 0,3% em Krebs. Foram também lavados duas vezes (10 min. cada) com solução de Krebs e imersos por 45 min. num meio de incubação que continha para cada 100 mL: 25 mL de solução de estoque de Nitro Blue Tetrazolium (Sigma, St. Louis, EUA); 25 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3; 50 mL de água destilada e 5 mL de β -NADH (Sigma, Steinheim, Germany) (GABELLA, 1969).

Os preparados totais elaborados com as diferentes técnicas foram dissecados sob esteriomicroscópio com transiluminação (Motic SMZ-140), por intermédio da remoção da túnica mucosa e da tela submucosa (permanecendo com a túnica muscular onde está inserido o plexo mientérico). A seguir foram desidratados, em série, ascendente de álcoois etílico, diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética de Permount® (Fischer Chemical, New Jersey, USA).

Análise morfométrica

A área do pericário e do núcleo de 300 neurônios do plexo mientérico do íleo, considerando toda a circunferência intestinal de cada rato, foi mensurada utilizando preparados de membrana submetidos à técnica de Giemsa e NADH-diaforase. Para tanto, imagens foram capturadas num microscópio (Motic B5), equipado com câmera de vídeo digital (Moticam 2000, 2.0 megapixels), associada a um microcomputador. Para completar esta avaliação, calculou-se em ambas as técnicas (1) a área do citoplasma por diferença entre a área do pericário e a área do núcleo e (2) a razão entre a área do núcleo e a área do pericário de cada neurônio mensurado (no intuito de avaliar a proporção ocupada por esta organela na região trófica do neurônio); (3) realizou-se uma análise de correlação entre as áreas mensuradas dos neurônios de cada grupo e (4) distribuíram-se os neurônios em classes quanto à área do pericário (intervalos de $50 \mu\text{m}^2$) e quanto à razão entre a área do

pericário e do núcleo (intervalos de 0,10), e elaborou-se a histograma de frequência.

Análise estatística

Todos os dados foram inicialmente submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação do tipo de distribuição. Dados com distribuição livre foram expressos como mediana e percentis (25 e 75), e os dados com distribuição normal expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Para comparar dados entre o GC e GE e a incidência dos neurônios de animais dos grupos controle e experimental distribuídos em classes foi comparada pelo teste de Mann Whitney (distribuição livre), e pelo teste t de Student para amostras independentes (distribuição normal). Em todos os testes, considerou-se 5% como nível de significância.

Resultados e discussão

No final do experimento, houve redução significativa do peso dos animais do grupo experimental ($215,34 \pm 56,31$ g) em relação ao grupo controle ($369,63 \pm 26,33$ g) ($p < 0,05$). O comprimento do íleo do grupo experimental ($86,6 \pm 13,94$ cm) apresentou redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle ($105,0 \pm 5,58$ cm).

Os resultados da análise morfométrica da área do pericário, do núcleo, do citoplasma, assim como, da razão entre a área do núcleo e do pericário de neurônios mientéricos, evidenciados pela técnica de Giemsa e pela da NADH-diaforase são apresentados na Tabela 1 e a correlação destes dados na Tabela 2.

A frequência dos neurônios corados por Giemsa distribuídos quanto à área do pericário e quanto à razão entre a área do núcleo e do pericário está apresentada nas Figuras 1 e 2, respectivamente. Já a distribuição de

neurônios NADH-diaforase positivos quanto aos mesmos critérios está apresentada nas Figuras 3 e 4.

O estudo com animais de laboratório possibilita compreender as alterações morfológicas e bioquímicas provocadas pela desnutrição, tornando possível estabelecer limites quanto a seus estágios pré-clínico, clínico moderado e severo. O rato é um dos modelos mais utilizados pelo seu tamanho, adaptabilidade a diversas dietas e facilidade de manuseio (NRC, 1995).

Os ratos do GC, ao receberem uma dieta com 26% de proteína durante 90 dias, apresentaram ganho de peso de 15,7%, enquanto que os do GE ao receber uma dieta com 4% de proteína perderam em média 29% do seu peso inicial ($p < 0,05$). A redução do peso corporal tem sido demonstrada em estudos com diferentes modelos experimentais de desnutrição em ratos (FIORINI et al., 1999; MEILLUS et al., 1998; NATALI; MIRANDA-NETO, 1996; TORREJAIS et al., 1995; ZANIN et al., 2003) e provavelmente reflitam a tentativa de manter a homeostasia do metabolismo, pela menor disponibilidade de nutrientes (ARAÚJO et al., 2006).

A redução do teor proteico além de acarretar danos para o desenvolvimento corporal atinge órgãos e sistemas (TORREJAIS et al., 1995). O tubo digestório, frequentemente, é comprometido pela deficiência da ingestão de aminoácidos (DEO, 1978). Neste experimento, o jejuno-íleo apresentou-se 17% menor no grupo experimental, demonstrando que a redução do teor proteico ocasionou um comprometimento no desenvolvimento do órgão ($p < 0,05$), achado comum também a outros estudos com diferentes modelos experimentais (MEILLUS et al., 1998; NATALI; MIRANDA-NETO, 1996; NATALI et al., 2005; TORREJAIS et al., 1995).

Tabela 1. Mediana e percentis (25 e 75) da área do pericário, área do núcleo, área do citoplasma e razão entre a área do núcleo e do pericário de neurônios mientéricos corados por Giemsa e NADH-diaforase do íleo de ratos normoalimentados (Grupo Controle) e submetidos à desnutrição proteica (Grupo Experimental).

Técnica		Área (μm^2)			Razão
		pericário	Núcleo	citoplasma	Núcleo/Pericário
Giemsa	GC	170,7 (120,2; 252,4)*	55,1 (38,1; 76,5)*	116,9 (75,8; 178,2)*	0,31 (0,24; 0,39)*
	GE	135,6 (96,5; 190,8)*	47,3 (32,2; 69,6)*	85,5 (57,4; 124,2)*	0,36 (0,27; 0,44)*
NADH-d	GC	117,4 (93,9; 157,7)*	68,1 (52,7; 87,7)*	44,9 (20,6; 81,9)*	0,60 (0,42; 0,79)
	GE	92,1 (72,1; 127,8)*	54,8 (42,2; 70,7)*	33,4 (16,2; 64,5)*	0,61 (0,44; 0,78)

Valores marcados numa mesma coluna com mesmo símbolo são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 2. Correlação entre área do pericário, do citoplasma e do núcleo de neurônios mientéricos do íleo de ratos normoalimentados (Grupo Controle) e desnutridos (Grupo Experimental).

Técnica	Grupo	Área do Pericário X Área do Núcleo	Área do Pericário X Área do Citoplasma	Área do Núcleo X Área do Citoplasma
Giemsa	GC	0,73	0,97	0,53
	GE	0,77	0,91	0,44
NADH-d	GC	0,28	0,78	0,27
	GE	0,36	0,78	0,18

Todos os valores são significativos considerando 5% como nível de significância.

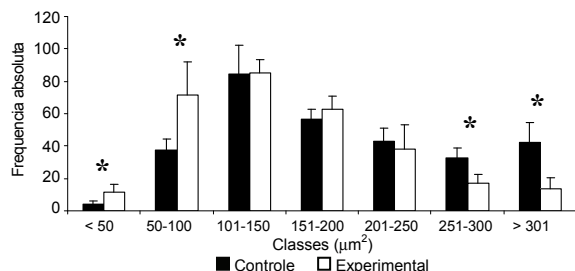


Figura 1. Histograma da incidência de neurônios mientéricos, segundo a área do pericário do íleo de ratos normoalimentados (Grupo Controle) e submetidos à desnutrição proteica (Grupo Experimental) corados por GIEMSA. Colunas da mesma classe marcadas com asterisco se diferem significativamente (* $p < 0,05$).

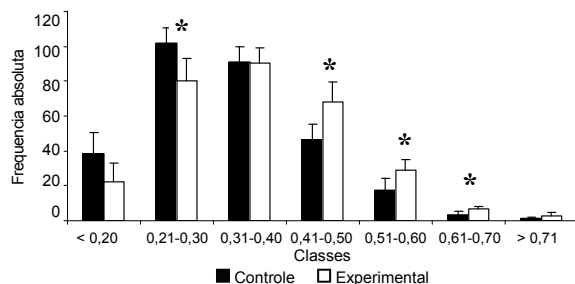


Figura 2. Histograma da razão entre a área do núcleo e a área do pericário de neurônios mientéricos do íleo de ratos normoalimentados (Grupo Controle) e submetidos à desnutrição proteica (Grupo Experimental) corados por GIEMSA. Colunas da mesma classe marcadas com asterisco se diferem significativamente (* $p < 0,05$).

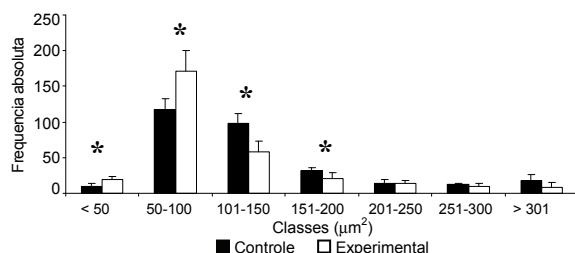


Figura 3. Histograma da incidência de neurônios mientéricos, segundo a área do pericário do íleo de ratos normoalimentados (Grupo Controle) e submetidos à desnutrição proteica (Grupo Experimental) corados pela NADH-diaforase. Colunas da mesma classe marcadas com asterisco se diferem significativamente (* $p < 0,05$).

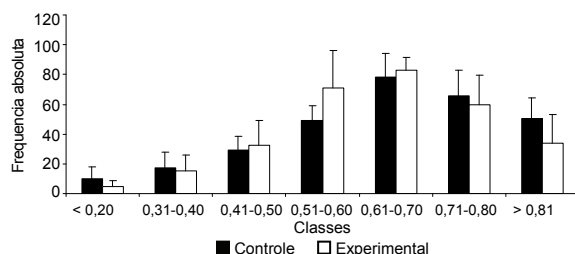


Figura 4. Histograma da razão entre a área do núcleo e a área do pericário de neurônios mientéricos do íleo de ratos normoalimentados (Grupo Controle) e submetidos à desnutrição proteica (Grupo Experimental) corados pela NADH-diaforase. Colunas da mesma classe marcadas com asterisco se diferem significativamente.

Carências nutricionais podem levar a alterações quantitativas nos neurônios mientéricos (ARAÚJO et al., 2003, 2006; FIORINI et al., 1999; HERMES et al., 2008; MEILLUS et al., 1998; MOREIRA et al., 2008; NATALI et al., 2003, 2005; SANT'ANA et al., 2006), no entanto, neste estudo realizou-se a mensuração dessas células, objetivando investigar se a desnutrição também afeta os aspectos morfométricos desses neurônios.

A análise morfométrica revelou redução significativa da área do núcleo, do citoplasma, com consequente redução do pericário. Porém, houve aumento significativo da razão entre a área do núcleo e do pericário dos neurônios mientéricos corados com a técnica de Giemsa ($p < 0,05$), dado não observado nos neurônios NADH-d positivos ($p > 0,05$).

Outros estudos de desnutrição experimental (utilizando 8% de proteína na dieta) demonstraram não haver alteração da área do pericário de neurônios entéricos no duodeno de ratos velhos (345 dias de idade) (NATALI et al., 2005) e no íleo de ratos jovens (60 dias de idade) (TORREJAIS et al., 1995). Contudo, Natali et al. (2003), ao estudarem os neurônios entéricos do duodeno de ratos adultos (120 dias de idade), encontraram dados morfométricos que se assemelham aos deste estudo, ou seja, observaram redução no tamanho da área do pericário e aumento na proporção dos neurônios pequenos nos animais alimentados com 8% de proteína. De acordo com Gabella (1971), este fato se explica pela ausência do crescimento do animal. A atrofia celular dos neurônios entéricos pode ser considerada como mecanismo básico de adaptação, no qual as células estão sob estresse, frente à diminuição da fonte de nutrientes ou de estímulos necessários para seu funcionamento.

Estudos quantitativos dos neurônios mientéricos do íleo demonstram que a população total não sofre alterações com a desnutrição (FIORINI et al., 1999; TORREJAIS et al., 1995), portanto a manutenção da densidade neuronal possivelmente seja pela adaptação que a escassez de aminoácidos induziu nestes neurônios. Em estudo anterior realizado com os mesmos animais deste experimento, Moreira et al. (2008) observaram que a desnutrição não provocou redução na população total de neurônios mientéricos corados por Giemsa, sendo assim a redução do tamanho observada neste estudo pode ser considerada indicativa de adaptação frente à desnutrição na tentativa de evitar a morte desses neurônios. Contudo, esses autores avaliaram que houve aumento do número de neurônios NADH-diaforase positivos evidenciados, demonstrando que com a desnutrição neurônios que não pertenciam a esta subpopulação passaram a fazê-la. Desta forma,

os resultados de atrofia dos neurônios NADH-diaforase positivos constatados neste estudo possivelmente seja uma tentativa de manter o metabolismo dos neurônios do plexo mientérico em equilíbrio, uma vez que essa técnica possibilita visualizar neurônios com metabolismo neuronal mais ativo (MIRANDA-NETO et al., 2001), já que a NADH-diaforase é uma enzima mitocondrial (GABELLA, 1969).

Azevedo et al. (2007), com o mesmo modelo experimental deste estudo, avaliaram a morfometria da parede intestinal do íleo e observaram redução da espessura da parede total, da túnica muscular e da túnica mucosa. Essa atrofia associada com o aumento da população marcada pela NADH-diaforase (MOREIRA et al., 2008) pode corroborar na compreensão da atrofia neuronal evidenciada pela mesma técnica verificada neste estudo, pois a redução da parede intestinal associada ao aumento da marcação neuronal, possivelmente fez com que esses neurônios ficassem menores, no intuito de se ajustarem às necessidades fisiológicas do animal.

Quanto à correlação entre as áreas do pericário, do citoplasma e do núcleo, observou-se que a proporcionalidade entre essas estruturas celulares estava sendo mantida, tanto nos neurônios corados com a técnica de Giemsa como aqueles corados com a técnica da NADH-diaforase. Dessa forma, podemos sugerir que os neurônios estavam modulando-se adequadamente, mesmo submetidos à indisponibilidade de aminoácidos para a síntese de novas proteínas.

Quando observado o número de neurônios, considerando as classes de acordo com a área do pericário, observou-se que tanto na técnica de Giemsa como na NADH-diaforase, houve aumento de neurônios pequenos nos animais desnutridos. Estas alterações são compreendidas como uma tentativa de modulação metabólica refletidos na morfologia celular. Fiorini et al. (1999) encontraram predomínio de neurônios médios e redução da população total de neurônios grandes no íleo de animais que sofreram restrição proteica a 8%, resultado semelhante ao encontrado neste estudo, em que se observa a redução em neurônios mientéricos com pericário entre $251\text{--}300\ \mu\text{m}^2$ e $>301\ \mu\text{m}^2$ (considerados grandes) marcados por Giemsa nos animais do grupo experimental.

Ao comparar o número de neurônios do presente estudo divididos em classes de acordo com a razão entre a área do núcleo e a área do pericário, observou-se que na técnica de Giemsa houve predomínio de neurônios em que o núcleo ocupava de 21 a 50%. Já na técnica de NADH-diaforase observou-se predomínio de neurônios em que o núcleo ocupava entre 51 a 80%

tanto no grupo controle quanto no experimental. Isto nos permite inferir que os núcleos de neurônios NADH-diaforase positivos tenderam a ocupar maior parte do pericário em ambos os grupos. A maior proporção do núcleo pode refletir maior anabolismo proteico nesta subpopulação neuronal (NATALI; MIRANDA-NETO, 1996).

Conclusão

A oferta de uma dieta com 4% de proteína a ratos adultos, durante 90 dias, causou diminuição do peso corporal, e do comprimento do jejuno-íleo. Quanto à área neuronal, observa-se que em ambas as técnicas empregadas houve atrofia dos neurônios entéricos do íleo.

Referências

- ARAÚJO, E. J. A.; SANT'ANA, D. M. G.; MOLINARI, S. L.; MIRANDA NETO, M. H. Effect of protein and vitamin B deficiency on the morphoquantitative aspects of the myenteric plexus of the descending colon of adults rats. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 61, n.2-A, p. 226-233, 2003.
- ARAÚJO, E. J. A.; SANT'ANA, D. M. G.; MOLINARI, S. L.; MIRANDA NETO, M. H. Biometric and food consumption parameters of rats subjected to hypoproteic and hipercaloric diet. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 8, n. 2, p. 131-138, 2005.
- ARAÚJO, A. E. J.; SANT'ANA, D. M. G.; MOLINARI, S. L.; MIRANDA-NETO, M. H. Quantitative study of the myenteric plexus of the descending colon of young rats subjected to sintese protein deficiency. **International Journal of Morphology**, v. 24, n.4, p. 591-597, 2006.
- AZEVEDO, J. F.; HERMES, C.; MANZANO, M. A.; ARAÚJO, E. J. A.; SANT'ANA, D. M. G. Análise morfométrica da parede intestinal do íleo de ratos submetidos a intensa carência de proteínas. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 10, n. 2, p. 85-89, 2007.
- BARBOSA, A. J. A. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 11, n. 2-3, p. 95-97, 1978.
- DEO, M. G. Cell biology of protein-calorie malnutrition. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 32, p. 49-95, 1978.
- DOUGLAS, C. R. **Fisiologia clínica do sistema digestório**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.
- FIORINI, A.; MOLINARI, S. L.; 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. Health Sciences**, v. 21, n. 2, p. 409-413, 1999.
- FURNESS, J. B.; COSTA, M. **The enteric nervous system**. New York: Churchill Livinstone, 2006.

- GABELLA, G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. **Experientia**, v. 23, n. 52, p. 218-219, 1969.
- GABELLA, G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. **Journal of Anatomy**, v. 109, n. 1, p. 81-95, 1971.
- HERMES, C.; ALMEIDA, E. C.; SOUZA, E. A.; ARAÚJO, E. J. A.; SANT'ANA, D. M. G. Efeitos da desnutrição protéica severa sobre aspectos morfológicos e quantitativos dos neurônios mientéricos do cólon ascendente de ratos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 11, n. 2, p. 13-16, 2008.
- MEILLUS, M.; NATALI, M. R. M.; MIRANDA NETO, M. H. Study of the myenteric plexus of the ileum of rats subjected to proteic undernutrition. **Revista Chilena Anatomía**, v. 16, n. 1, p. 9-14, 1998.
- MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L.; NATALI, M. R. M. Diferenças regionais no número e tipo de neurônios mientéricos do íleo de ratos: comparação entre técnicas de evidencição neuronal. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 59, n. 1, p. 5-69, 2001.
- MOREIRA, N. M.; HERMES, C.; ALMEIDA, C. S. L.; SANTANA, E. C.; SANT'ANA, D. M. G.; ARAÚJO, E. J. A. Quantitative analysis of the neurons from the myenteric plexus in the ileum of rats submitted to severe protein deficiency. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 66, n. 2-A, p. 242-245, 2008.
- NATALI, M. R. M.; MIRANDA-NETO, M. H. Effects of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of duodenum of rats. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 54, n. 2, p. 273-279, 1996.
- NATALI, M. R. M.; MIRANDA-NETO, M. H.; ORSI, A. M. Morphometry and quantification of the myenteric neurons of the duodenum of adult rats fed with hypoproteic chow. **International Journal of Morphology**, v. 21, n. 4, p. 273-277, 2003.
- NATALI, M. R. M.; MOLINARI, S. L.; 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.
- NÓBREGA, F. J. **Distúrbios da nutrição**. Rio de Janeiro: Revinter, 1996.
- NRC-National Research Council. **Nutrient requirements of laboratory animals**. Fourth Revised Edition. Washington, D.C.: National Academy Press, 1995.
- PACHALY, J. R.; SANT'ANA, D. M. G.; ARAÚJO, E. J. A.; CIFFONI, E. M. G.; ACCO, A. Anesthesia of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with allometrically scaled dose of Ketamine, Xylazine, Acepromazine and Atropine – preliminary report. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 6, n. 2, p. 195-195, 2003.
- SANT'ANA, D. M. G.; MOLINARI, S. L.; ARAÚJO, E. J. A.; MIRANDA-NETO, M. H. The effect of both protein and vitamin B complex deficiency on the morphoquantitative features of the myenteric plexus of the ascending colon of adult rats. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 9, n. 2, p. 135-140, 2006.
- TORREJAIS, M. M.; NATALI, M. R. M.; CONEGERO, C. I.; MIRANDA NETO, M. H. Effects of proteic malnutrition after breast-feeding on the morphology of the intestinal wall and myenteric neurons of the ileum of rats. **Revista Unimar**, v. 17, n. 2, p. 315-327, 1995.
- ZANIN, S. T. M.; MOLINARI, S. L.; SANT'ANA, D. M. G.; MIRANDA NETO, M. H. Neurônios NADH-diaforase positivo do jejuno de ratos adultos (*Rattus norvegicus*) desnutridos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 61, n. 3, p. 650-653, 2003.

Received on March 30, 2009.

Accepted on March 26, 2010.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.