FLÁVIO SILVA TAMPELINI

**Aspectos morfoquantitativos e ultraestruturais dos componentes do plexo
mioentérico do intestino grosso de ratos submetidos à subnutrição (dieta
padrão de Moçambique) e renutrição nos períodos pré e pós-natal**

São Paulo
2016

FLÁVIO SILVA TAMPELINI

Aspectos morfoquantitativos e ultraestruturais dos componentes do plexo mioentérico do intestino grosso de ratos submetidos à subnutrição (dieta padrão de Moçambique) e renutrição nos períodos pré e pós-natal

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3400
FMVZ

Tampelini, Flávio Silva

Aspectos morfoquantitativos e ultraestruturais dos componentes do plexo mioentérico do intestino grosso de ratos submetidos à subnutrição (dieta padrão de Moçambique) e renutrição nos períodos pré e pós-natal / Flávio Silva Tampelini. -- 2016.
128 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti.

1. Proteína vegetal. 2. Proteína animal. 3. Subnutrição. 4. Plexo mioentérico. 5. Intestino grosso.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "ASPECTOS MORFOQUANTITATIVOS E ULTRA-ESTRUTURAIS DOS COMPONENTES DO PLEXO MIOENTÉRICO DO INTESTINO GROSSO DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO E RENUTRIÇÃO PROTEICA NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-NATAL", protocolado sob o CEUA nº 2121040214, sob a responsabilidade de **Edson Aparecido Liberti e equipe; Flávio Silva Tampelini** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 26/10/2015.

We certify that the proposal "título em inglês", utilizing 91 Isogenic rats (91 females), protocol number CEUA 2121040214, under the responsibility of **Edson Aparecido Liberti and team; Flávio Silva Tampelini** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMZV) in the meeting of 10/26/2015.

Vigência da Proposta: de 03022014 a 12122014
Silvestres

Área: Cirurgia/ Anatomia Dos Animais Domésticos E

Procedência: Biotério Central do ICB I

Espécie: Rato isogênico

Gênero: Fêmeas

idade: 3-6 semanas N: 91

Linhagem: Norvergicus

Peso: 280-320
gramas

São Paulo, 24 de novembro de 2015

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 14 de abril de 2016

CEUA N 2121040214

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Edson Aparecido Liberti

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti (orientador)

Título da proposta: "ASPECTOS MORFOQUANTITATIVOS E ULTRAESTRUTURAIS DOS COMPONENTES DO PLEXO MIOENTÉRICO DO INTESTINO GROSSO DE RATOS SUBMETIDOS À SUBNUTRIÇÃO (DIETA PADRÃO DE MOÇAMBIQUE) E RENUTRIÇÃO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-NATAL".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 21/março/2016) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O termo subnutrição é mais adequado para se referir a carência de um nutriente específico - no caso da dieta utilizada em nossa pesquisa (Dieta padrão de Moçambique) a carência proteica. Já o termo desnutrição é mais genérico e tem uma abordagem mais complexa, se referindo a carência de dois ou mais nutrientes ao mesmo tempo. Portanto, com a alteração do título de nosso trabalho, nos adequamos mais à proposição do trabalho".

Comentário da CEUA: "Alteração de título aceita.".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: TAMPELINI, Flávio Silva

Título: Aspectos morfoquantitativos e ultraestruturais dos componentes do plexo mioentérico do intestino grosso de ratos submetidos à subnutrição (dieta padrão de moçambique) e renutrição nos períodos pré e pós-natal

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Ao meu pai (in memoriam); as três mulheres da minha vida (Maria Elena, Oneida e Vanessa) e aos meus alunos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, Florivaldo Ricieri Tampelini (*in memorian*) e Maria Elena da Silva Tampelini, pela educação e por me mostrarem o caminho correto.

À Vanessa, minha melhor amiga, confidente e namorada. Obrigado por estar ao meu lado em todas as situações, me apoiar e fazer meus dias mais felizes. Amo você!

Aos meus tios José Roberto Crevelaro da Silva e Norma Sueli Tampelini pelo apoio, incentivo e suporte financeiro com meus estudos desde o ensino médio.

À amiga Maria Lúcia de Campos Motta (Malú), pela amizade, carinho, atenção e respeito. Foram tantos momentos de conversas, risos, angústias, alegrias, lanches (rs) e gentilezas que não caberiam nessas palavras. A sua presença tornou minha passagem por São Paulo mais alegre. Muito obrigado!

Ao Sr. Nelson Camillo de Almeida e Sra. Rosângela Bonini de Almeida, por toda ajuda, apoio, carinho e incentivo durante essa caminhada.

Ao meu orientador e AMIGO, Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti. Já tive a oportunidade de demonstrar com palavras e atos o quanto o senhor é importante em minha vida. Poderia ficar horas escrevendo, mas serei breve. O senhor é exemplo de caráter, dedicação, comprometimento e amor incondicional pelo trabalho e por nossa amada Anatomia. Exerce com louvor sua nobre missão, o sacerdócio da docência – o “ser professor”, na sua verdadeira concepção. Meu respeito, admiração, carinho e gratidão. Muito obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Ciências Básicas em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso, pela anuência com meu afastamento e realização do doutorado.

À Professora Laura Beatriz Mesiano Maifrino, pela gentileza em fornecer o kit de imunohistoquímica (VIP e substância P) utilizado em nossa pesquisa.

Ao amigo Hélio Borba Moratelli, por incentivar e assegurar institucionalmente a conclusão desse doutorado.

À minha amiga e “chefe” Bianca Borsatto Galera, pelo incentivo na realização dessa pesquisa e por todo o carinho e respeito durante os anos de convivência em Cuiabá.

À Professora Silvia de Campos Boldrini (*in memorian*). O combinado era fazermos a homenagem para o Professor Edson juntos. O combinado era eu fazer doutorado com o Professor Edson e lhe acompanhar na Odonto – como sempre fiz. Mas a vida não segue os “nossos planos”, ela tem seu próprio seguimento. Sua partida deixou uma lacuna em vários corações – e no meu. Concluí “os nossos dois combinados”, mas sem sua doce presença. Você fez/faz falta!

À Sra. Rosana Duarte Prisco, pela paciência, dedicação e profissionalismo na execução da estatística desse trabalho.

Aos técnicos do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Marta Righetti, Sônia Yokomizo e Sebastião Boleta pelo inestimável auxílio nas técnicas de histologia, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente.

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Fábio França e Renivaldo de Souza, pelo auxílio na eutanásia dos animais.

À Sra. Rose Elic pela atenção, profissionalismo e auxílio nas fotografias de microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, em especial, a senhora Jaqueline Martins Santana (Departamento de Anatomia), e a senhora Elza (bibliotecária).

À Aline Rosa Marosti, pela valiosa ajuda durante o período de biotério e com as coletas dos materiais quando eu ainda não estava oficialmente em São Paulo. Muito obrigado!

À Liliana Ribeiro, pelas conversas, amizade, carinho e valiosa ajuda durante o período de biotério.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada a Clínica e a Cirurgia - LAFACC, em especial, Any Kelly Gomes de Lima, Cristina de Sousa Bolina, Josy Cal, Lídia dos Santos Cruz, Lígia Pelosi Mendonça, Marcelo Arthur Cavalli, Paulo Henrique de Matos Alves.

Aos verdadeiros catedráticos do LAFACC, Josemberg Baptista e Ricardo Bragança de Vasconcellos Fontes, que durante um momento de dificuldade em meu doutoramento, se solidarizaram e até sugeriram uma “saída para o problema”.

Aos amigos Luciano César Pereira Campos Leonel, Vinícius de Jesus Correia e Rafael Oliveira, companheiros de moradia durante os dois anos que permaneci em São Paulo. Obrigado pelas incontáveis conversas e risadas.

Ao amigo Luciano César Pereira Campos Leonel. Você sempre disse que aprendeu muita coisa comigo, mas nem imagina o quanto aprendi com você. A convivência, conversas, alegrias e angústias compartilhadas e o respeito mútuo, formaram o alicerce de nossa amizade.

À equipe da limpeza do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por proporcionarem um ambiente de trabalho limpo, organizado e digno para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À equipe de guardas do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela segurança e cumplicidade para que eu pudesse desenvolver essa pesquisa em dias e horários incomuns.

Às Casas André Luiz e ao Projeto Entrega por SP, por contribuírem com meu crescimento e aprendizado, tornando-se fundamentais em minha vida durante os dois anos que permaneci em São Paulo. Obrigado por me fazerem uma pessoa melhor!

“É fundamental diminuir a distância entre o que se diz e o que se faz, de tal forma que, num dado momento, a tua fala seja a tua prática. ”

Paulo Freire

RESUMO

TAMPELINI, F. S. **Aspectos morfoquantitativos e ultraestruturais dos componentes do plexo mioentérico do intestino grosso de ratos submetidos à subnutrição (dieta padrão de Moçambique) e renutrição nos períodos pré e pós-natal.** [Morphoquantitative aspects and ultrastructural components of the myenteric plexus of the large intestine of rats submitted to malnutrition (standard diet of Mozambique) and refeeding pre- and postnatal]. 2016. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A fome e a subnutrição estão entre os mais devastadores problemas sociais e de saúde pública nos países em desenvolvimento, estando relacionadas a problemas socioeconômicos como pobreza, miséria, baixo nível educacional, ausência de programas de saúde, déficit no saneamento básico e tabus alimentares. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da dieta básica da população de Moçambique (DM) e da renutrição proteica, nos componentes do plexo mioentérico dos segmentos proximal e distal do intestino grosso de ratos Wistar de 21 e 42 dias. Para tanto, os animais foram divididos em sete grupos: o controle, dieta AIN-93G com adição de 20% de caseína (NN21 e NN42); Dieta de Moçambique (DM21 e DM42); Dieta Moçambique suplementada, acrescida de 20% de caseína (NM21 e NM42) e o grupo renutrindo (RM42), animais do grupo DM21 que, a partir do 22º dia, receberam a dieta NM até atingirem 42 dias de vida. As amostras dos segmentos proximal e distal do intestino grosso, foram coletadas e submetidas às técnicas histoquímicas da NADH-diaforase e NADPH-diaforase e imunohistoquímica (ChAT, Substância P e VIP), para avaliação qualitativa e quantitativa dos neurônios do plexo mioentérico. A estrutura, ultraestrutura e morfometria dos componentes ganglionares e da parede e mucosa intestinal, foram avaliadas com o uso de técnicas rotineiras de histologia (HE, Picro-sírius e Weigert) e de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, dependendo do parâmetro a ser avaliado, utilizados dois ou três fatores (grupo, idade e segmento do intestino). Quando necessário, comparações múltiplas pelos métodos de Bonferroni ou Tukey foram aplicadas, com nível de significância $p < 0,05$. A análise qualitativa mostrou que todos os grupos experimentais, independentemente da idade (21 e 42 dias) e segmento intestinal (proximal e distal), apresentaram as camadas histológicas e seus constituintes preservados. Os animais do grupo DM apresentaram os menores valores para: peso e comprimento; dados metabólicos; área da parede e mucosa intestinal; comprimento e

área do intestino. A renutrição não foi capaz de recuperar esses parâmetros. As fibras colágenas do tipo I predominaram no grupo DM e as do tipo III no grupo RM. As fibras elásticas não foram detectadas na cápsula dos gânglios mioentéricos do grupo DM aos 21 e 42 dias. A imunorreatividade dos neurônios mioentéricos à ChAT, SP e VIP, mostrou-se fraca no grupo DM. Sob o aspecto ultraestrutural, o grupo DM exibiu um atraso no desenvolvimento celular. A densidade de neurônios reativos à NADH-d e NADPH-d foi maior em todos os grupos de 21 em comparação aos grupos de 42 dias, independente do segmento. O grupo DM apresentou uma densidade numérica neuronal maior em relação aos outros grupos, independente do segmento e idade. Por outro lado, quando se avaliou a área do perfil neuronal, os grupos de 42 dias exibiram uma área maior em relação aos animais de 21 dias, independente do segmento. Entre os grupos da mesma faixa etária, independente do segmento, a área neuronal dos animais foi maior no grupo NN, e menor no grupo DM. O grupo RM não recuperou esse parâmetro. A estimativa do número total de neurônios da NADH-d aumentou com a idade em todos os grupos. Considerando a mesma faixa etária, não foram detectadas diferenças entre os grupos. Já a estimativa neuronal para a NADPH-d foi maior no grupo DM, independentemente da idade.

Palavras-chave: Proteína vegetal. Proteína animal. Subnutrição. Plexo mientérico. Intestino grosso.

ABSTRACT

TAMPELINI, F. S. Morphoquantitative aspects and ultrastructural components of the myenteric plexus of the large intestine of rats submitted to malnutrition (standard diet of Mozambique) and refeeding pre- and postnatal. [Aspectos morfoquantitativos e ultraestruturais dos componentes do plexo mioentérico do intestino grosso de ratos submetidos à subnutrição (dieta padrão de Moçambique) e renutrição nos períodos pré e pós-natal]. 2016.128 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Hunger and malnutrition are among the most devastating social and public health problems in developing countries, being related to socioeconomic problems such as poverty, misery, poor education, absence of health programs, deficit in basics sanitation and food taboos. The aim of the present study was to evaluate the effects of Mozambique population's regular diet (DM) and the protein refeeding in the components of the myenteric plexus of proximal and distal segments of the large intestine of Wistar rats 21 and 42 days old. Animals were divided into seven groups: control, AIN-93G diet with 20% casein addition (NN21 and NN42); Diet Mozambique (DM21 and DM42) and Diet Mozambique supplemented with 20% casein (NM21 and NM42) and re-nourished group (RM42), animals from DM21 group, 22 days old, that received the NM diet until they reach 42 days old. Proximal and distal segments samples of the large intestine were collected and submitted to NADH-diaforase and NADPH-diaforase histochemical techniques and to immunohistochemistry (ChAT, Substance P and VIP), in order to demonstrate myenteric neurons. The structure and ultra-structure of ganglion components and intestinal wall were assessed using routine histology techniques (HE, Picrosirius and Weigert) and scanning and transmission electron microscopy. Data was analyzed by the analysis of variance (ANOVA) and, depending on the parameter to be assessed, two or three factors were used (group, age and bowel segment). When necessary, multiple comparisons by Bonferroni or Tukey methods were applied, considering $p < 0.05$ as significance level. Qualitative analysis showed that all groups, regardless of age (21 and 42 days), and intestinal segments (proximal and distal) showed histological layers and their constituents preserved. RM group did not recovered this parameter. DM group animals showed the smallest values for the following parameters: weight and length; metabolic data; intestinal mucosa and wall area; intestine length and area. Refeeding did not recovered these parameters. Type I collagen fibers were most frequent in DM group, whereas type III prevailed in RM group. Elastic fibers were

not detected in the capsule of myenteric ganglion of DM group at 21 and 42 days. DM group showed low immune reactivity of myenteric neurons to ChAT, SP and VIP. As regards to ultrastructural aspects, DM group showed slow cellular development. Besides, NADH-d and NADPH-d analysis exhibited increased numeric neuronal density in 21 days old animals compared to 42 days old animals, despite segments. DM group showed higher neuronal numeric density than other groups, regardless of segment and age. On the other hand, when evaluating the neuronal profile area, 42 days groups showed greater area than 21 days animals, with both techniques and regardless of segment. Furthermore, DM group showed significantly lower neuronal area compared to the other groups, regardless of intestinal segment. RM group did not recovered this parameter. Total number of neurons directly increased according to age in all groups. No difference was found between groups of same age. NADPH-d neuronal estimative was higher in DM group, regardless of age.

Keywords: Vegetable protein. Animal protein. Malnutrition. Myenteric plexus. Intestine, large.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa da mudança na distribuição da fome no mundo nos anos de 1990-1992 e 2014-2016.....	32
Figura 2 -	Mapa da fome em 2015	33
Figura 3 -	Representação da organização do sistema nervoso entérico (SNE).....	37
Figura 4 -	Representação dos diferentes tipos de neurônios encontrados no SNE de cobaia	39
Figura 5 -	Sexagem dos filhotes pela distância anogenital	46
Figura 6 -	Fluxograma do período experimental	47
Figura 7 -	Gaiolas metabólicas.....	48
Figura 8 -	Esquema das diferenças entre os segmentos proximal e distal do intestino grosso de ratos	49
Figura 9 -	Procedimentos prévios às técnicas de histoquímica (NADH-d e NADPH-d).....	50
Figura 10 -	Quantificação da densidade numérica neuronal (DNN)	56
Figura 11 -	Mensuração da área do perfil do corpo neuronal (APN)	57
Figura 12 -	Mensuração da mucosa intestinal.....	58
Figura 13 -	Mensuração da área da parede, área interna e área externa do intestino grosso	59
Figura 14 -	Aspecto geral da morfologia do intestino grosso nos diferentes grupos experimentais	63
Figura 15 -	Características estruturais do segmento proximal do intestino grosso.....	66
Figura 16 -	Características estruturais do segmento distal do intestino grosso	67
Figura 17 -	Avaliação do componente elástico evidenciado pela técnica de resorcina-fucsina (WEIGERT, 1898).....	68
Figura 18 -	Avaliação do componente colágeno evidenciado pela técnica do Picro-sírius (JUNQUEIRA et al., 1979)	69
Figura 19 -	Componentes do plexo mioentérico no segmento proximal do intestino grosso evidenciados pela reação da NADH-d.....	71
Figura 20 -	Componentes do plexo mioentérico no segmento distal do intestino grosso evidenciados pela reação da NADH-d	72
Figura 21 -	Componentes do plexo mioentérico no segmento proximal do intestino grosso evidenciados pela reação da NADPH-d.....	74

Figura 22 - Componentes do plexo mioentérico no segmento distal do intestino grosso evidenciados pela reação da NADPH-d	75
Figura 23 - Fotomicrografias exibindo a imunorreatividade do plexo mioentérico do intestino grosso ao ChAT	76
Figura 24 - Fotomicrografias exibindo a imunorreatividade do plexo mioentérico do intestino grosso à Substância P e ao VIP	77
Figura 25 - Micrografia eletrônica de transmissão (MET) do segmento distal do intestino grosso de ratos	79
Figura 26 - Eletromicrografia de varredura da superfície do segmento proximal do intestino grosso de ratos	80
Figura 27 - Representação gráfica da média e desvio padrão do comprimento do intestino (cm) nos diferentes grupos experimentais	83
Figura 28 - Representação gráfica da média e desvio padrão da área total do intestino (cm ²) nos diferentes grupos experimentais	83
Figura 29 - Representação gráfica da média e desvio padrão da massa corporal (g), ingestão alimentar (g), ingestão de água (g), excreção de urina (g) e excreção de fezes dos animais dos grupos NN, NM, RM e DM, submetidos às gaiolas metabólicas nas semanas S1 e S3	85
Figura 30 - Representação gráfica da média e desvio padrão das áreas externa, interna, da parede e da mucosa do intestino grosso (mm ²)	88
Figura 31 - Representação gráfica da média e desvio padrão da densidade neuronal pela técnica de NADH-d, nas regiões P e D do intestino grosso (mm ²).....	89
Figura 32 - Representação gráfica da média e desvio padrão do NTN pela técnica de NADH-d, nas regiões P e D do intestino grosso	91
Figura 33 - Representação gráfica da média e desvio padrão da área do perfil neuronal pela técnica de NADH-d, nas regiões P e D do intestino grosso (µm ²).....	92
Figura 34 - Representação gráfica da frequência (%) dos neurônios NADH-d positivos nas regiões P e D, em 21 dias e 42 dias, encontrados nos intervalos de área do perfil do corpo neuronal	93
Figura 35 - Representação gráfica da média e desvio padrão da densidade neuronal pela técnica de NADPH-d, nas regiões P e D do intestino grosso (mm ²)	94
Figura 36 - Representação gráfica da média e desvio padrão do NTN pela técnica de NADPH-d, nas regiões P e D do intestino grosso.....	95

Figura 37 - Representação gráfica da média e desvio padrão da da área do perfil neuronal pela técnica de NADPH-d, nas regiões P e D do intestino grosso (μm^2)	96
Figura 38 - Representação gráfica da área média da frequência (%) dos neurônios NADPH-d positivos nas regiões P e D, em 21d e 42d	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das Rações utilizadas na presente pesquisa.....	45
Tabela 2 -	Aspectos gerais: peso, comprimento do rato, comprimento do intestino, área do intestino nos diferentes grupos experimentais.....	82
Tabela 3 -	Avaliações Metabólicas nas semanas S1 e S3 dos animais dos grupos NN, DM, NM e RM.....	84
Tabela 4 -	Área externa e área interna da parede intestinal (mm ²).....	86
Tabela 5 -	Área da parede e área da mucosa intestinal (mm ²).....	87
Tabela 6 -	Densidade numérica neuronal (nº de neurônios/mm ²) evidenciados pela técnica de NADH-d nos segmentos P e D do intestino grosso (mm ²)	90
Tabela 7 -	Área do perfil dos corpos neuronais evidenciados pela técnica de NADH-d nos segmentos P e D do intestino grosso (µm ²)	92
Tabela 8 -	Densidade numérica neuronal (nº de neurônios/mm ²) evidenciados pela técnica de NADPH-d nos segmentos P e D do intestino grosso (mm ²)	94
Tabela 9 -	Área do perfil dos corpos neuronais evidenciados pela técnica de NADPH- d nos segmentos P e D do intestino grosso (µm ²)	96

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Área externa
AI	Área interna
AM	Área da mucosa do intestino grosso
AP	Área da parede do intestino grosso
APN	Área do perfil do corpo neuronal
AS	Área superficial do intestino grosso
ATI	Área total do intestino
CI	Comprimento do intestino
D	Segmento distal do intestino grosso
DM	Dieta de Moçambique
DM21	Grupo subnutrido Moçambique de 21 dias
DM42	Grupo subnutrido Moçambique de 42 dias
DNN	Densidade numérica neuronal
DP	Desvio padrão
FAO	Food and Agriculture Organization
HE	Hematoxilina-eosina
HIV/AIDS	Vírus da imunodeficiência humana/ síndrome da imunodeficiência humana
ICB/USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
ICBIII-USP	Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo
IPANs	Neurônios aferentes primários intrínsecos
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NADH-d	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - diaforase
NADPH-d	Nicotinamida adenina fosfato - diaforase
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NM	Dieta Moçambique suplementada
NM21	Grupo nutrido Moçambique de 21 dias
NM42	Grupo nutrido Moçambique de 42 dias
NN	Dieta controle ou nutrida
NN21	Grupo nutrido normal (controle) de 21 dias
NN42	Grupo nutrido normal (controle) de 42 dias

NO	Óxido nítrico
NTN	Estimativa do número total de neurônios
OsO ₄	Tetróxido de ósmio
P	Segmento proximal do intestino grosso
PBS	Tampão salina fosfato
PM	Plexo mioentérico
RM	Dieta moçambique renutrida
RM42	Grupo renutrido Moçambique de 42 dias
S1	Primeira semana de avaliação em gaiola metabólica
S3	Terceira semana de avaliação em gaiola metabólica
SA	Subnutrição aguda
SC	Subnutrição crônica
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
SP	Substância P
TGI	Trato gastrointestinal
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
WFP	World food programme
WHO	World health organization
HCL	Ácido clorídrico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
VCI/FMVZ-USP	Departamento de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
±	Mais ou menos
Σ	Somatória
μm	Micrômetros
μm^2	Micrômetros quadrados
cm	Centímetros
cm^2	Centímetros quadrados
M	Molar
m	Milímetros
mm^2	Milímetros quadrados
ΣQ	Soma dos neurônios contados
ΣA	Soma das áreas de todos os marcos
Σp	Somatória do número de pontos que incidem sobre a estrutura
a/p	Área por ponto.
g	Gramas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1	SUBNUTRIÇÃO.....	29
2.1.1	Considerações gerais	29
2.1.2	Subnutrição ao redor do mundo	31
2.1.3	Subnutrição e a dieta padrão de Moçambique	33
2.1.4	Proteína animal x proteína vegetal	34
2.2	SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO (SNE).....	36
3	OBJETIVOS	42
3.1	GERAIS.....	42
3.2	ESPECÍFICOS	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	44
4.2	AVALIAÇÃO METABÓLICA	48
4.3	COLETA E OBTENÇÃO DOS SEGMENTOS DO INTESTINO GROSSO	48
4.4	MÉTODOS HISTOQUÍMICOS PARA A EVIDENCIAÇÃO DE NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS	49
4.4.1	Técnica da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - diaforase (NADH-d)	50
4.4.2	Técnica da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato-diaforase (NADPH-d).....	51
4.5	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA A EVIDENCIAÇÃO DE NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS	51
4.6	MÉTODOS ROTINEIROS DE MICROSCOPIA DE LUZ	52
4.7	MÉTODOS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA	53

4.7.1	De Transmissão.....	53
4.7.2	De Varredura	54
4.8	MÉTODOS QUANTITATIVOS	55
4.8.1	Área superficial do intestino grosso (AS)	55
4.8.2	Densidade Numérica Neuronal (DNN)	55
4.8.3	Estimativa do Número Total de Neurônios (NTN)	56
4.8.4	Área do Perfil do Corpo Neuronal (APN).....	56
4.8.5	Determinação da Área da Mucosa intestinal (AM).....	57
4.8.6	Determinação da área interna (AI), área externa (AE) e área da parede intestinal (AP)	58
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
5	RESULTADOS.....	62
5.1	ANÁLISE QUALITATIVA.....	62
5.1.1	Microscopia de luz.....	62
5.1.1.1	Morfologia da parede e mucosa intestinal.....	62
5.1.1.2	Avaliação do componente elástico	68
5.1.1.3	Avaliação do componente colágeno.....	69
5.1.1.4	Morfologia dos gânglios do plexo mioentérico reativos à NADH-d e NADPH-d.....	70
5.1.1.5	Morfologia dos gânglios do plexo mioentérico: imunohistoquímica para ChAT, SP e VIP	76
5.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	78
5.2.1	De Transmissão.....	78
5.2.2	De Varredura	80
5.2	ANÁLISE QUANTITATIVA	81
5.2.1	Aspectos Gerais.....	81
5.2.2	Dados Metabólicos.....	84

5.2.3	Características morfométricas do intestino grosso	86
5.2.4	Densidade numérica dos neurônios evidenciados pela técnica da NADH-d.....	89
5.2.5	Número total estimado de neurônios evidenciados pela técnica da NADH-d.....	90
5.2.6	Área do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica NADH-d.....	91
5.2.7	Densidade numérica dos neurônios evidenciados pela técnica da NADPH-d.....	93
5.2.8	Número total estimado de neurônios evidenciados pela técnica da NADPH-d	95
5.2.9	Área do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica NADPH-d.....	95
6	DISCUSSÃO	99
6.1	ASPECTOS GERAIS E AVALIAÇÃO METABÓLICA.....	99
6.2	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, MORFOMÉTRICAS E ULTRAESTRUTURAIS DA MUCOSA E DA PAREDE DO INTESTINO GROSSO	102
6.3	AVALIAÇÃO MORFOQUANTITATIVA DOS NEURÔNIOS DO PLEXO MIOENTÉRICO REATIVOS À NADH-D E NADPH-D.....	106
7	CONCLUSÕES	112
	REFERÊNCIAS	115

1 INTRODUÇÃO

A subnutrição pode ser definida como um estado de deficiência de energia, proteína e/ou outro nutriente específico, acarretando alterações na função corporal, podendo ser revertida com suporte nutricional adequado (ALLISON, 2000). Apresenta uma alta prevalência em países subdesenvolvidos, estando relacionada a problemas socioeconômicos, educacionais, de saúde e de saneamento básico (MULLER; KRAWINKEL, 2005). Subnutrição é o maior problema de saúde pública em países em desenvolvimento no mundo, sendo responsável por mais de 2 milhões de mortes em crianças com menos de 5 anos de idade (MULLER; KRAWINKEL, 2005; COLLINS et al., 2006; BLACK et al., 2008; FAO, 2012). Estima-se que 13-19 milhões de crianças são afetadas pela subnutrição aguda em todo o mundo. Essas crianças têm aproximadamente 9x mais chances de morte quando comparadas àquelas sem esse fator de risco. A combinação de pobreza, falta de saneamento básico, acesso a comida, falha no sistema de saúde, desmame precoce e regiões de conflito, associada a doenças como HIV/AIDS, diarreias e infecções respiratórias são os fatores responsáveis por esse alto índice de mortalidade (ONIS et al., 1993; BHUTTA, 2009). Ainda, Levitsky e Strupp (1995) e Monte (2000) afirmam que a subnutrição, além de ser um problema de saúde pública, é um grave problema social, uma vez que sua natureza multifatorial e ocorrência em períodos críticos de desenvolvimento, podem levar a alterações morfológicas, comportamentais e cognitivas.

Está claro que uma deficiência no estado nutricional, é o principal fator para diminuição das funções fisiológicas, aumento no risco de complicações e morte. Com isso, uma significativa relação entre nutrição e alterações nas mais diversas funções e sistemas corporais, têm sido observadas (WANDEN-BERGHE et al., 2009), principalmente no controle intrínseco do TGI (CONBOY; SANTER; SWIFT, 1987; SANTER; CONBOY, 1990; MIRANDA-NETO, 1999; CASTELUCCI et al., 2002; BRANDÃO, 2003; SCHOFFEN et al., 2005; GOMES et al., 2006; LIBERTI et al., 2007; GREGGIO et al., 2010; CIRINO et al., 2013; SCHOFFEN et al., 2014a; SCHOFFEN et al., 2014b).

Os componentes do trato gastrintestinal (TGI), do esôfago ao ânus, apresentam certas características estruturais em comum. Trata-se de um tubo oco, composto por uma luz, cujo diâmetro é variável, circundado por uma parede formada por quatro camadas distintas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (adventícia), cada qual com suas respectivas constituições, funções e adaptações para cada órgão (GARTNER; HIATT, 2007; ROSS; PAWLINA, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A inervação dos órgãos do TGI é extremamente complexa, e difere de outros órgãos periféricos por apresentar um extenso sistema nervoso intrínseco, que controla suas funções mesmo quando está completamente separado do controle central (FURNESS, 2012). De fato, para que desempenhe suas funções de digestão, absorção e excreção, o TGI recebe uma inervação intrínseca, conferida por uma ampla rede nervosa organizada em plexos ganglionares dispostos entre suas túnicas – o sistema nervoso entérico (SNE), e também uma inervação extrínseca, conferida por fibras nervosas colinérgicas parassimpáticas que estimulam a musculatura lisa do intestino, fibras nervosas adrenérgicas simpáticas que deprimem a atividade da musculatura lisa intestinal e por neurônios viscerais aferentes (FURNESS, 2006; PHILLIPS; POWLEY, 2007).

O grau de participação entre o controle intrínseco e o controle extrínseco na coordenação da função muscular, varia de acordo com a região do TGI e também com circunstâncias fisiológicas. Em termos gerais, o movimento do esôfago é amplamente determinado por um padrão neural gerado no sistema nervoso central (SNC), ao passo que uma extensa parte do SNE tem um papel secundário. Os movimentos de propulsão gástrica são miogênicos, mas o SNC através do tronco cerebral e de reflexos esofagogástricos, apresenta um papel importante no controle do volume, força de contração e secreção ácida. Por outro lado, o SNE domina o controle da motilidade do intestino delgado e grosso (FURNESS, 2006), com exceção da defecação, onde o SNC exerce controle por meio dos centros de defecação na medula espinal lombar e sacral (FURNESS, 2012).

De maneira geral, o SNE consiste em numerosos tipos de neurônios e células gliais agrupadas em gânglios e distribuídos em dois plexos maiores: o plexo mioentérico (ou de Auerbach), responsável pelo controle da motilidade intestinal, e localizado entre as camadas longitudinal e circular da túnica muscular do esôfago o ânus, e o plexo submucoso (ou de Meissner), localizado na camada submucosa dos intestinos delgado e grosso, ficando encarregado de controlar as atividades das túnicas submucosa e mucosa, e regular o tônus vascular e a absorção/secreção de substâncias (SCHEMANN; NEULIST, 2004; FURNESS, 2006).

Considerando que muitos estudos têm sido realizados com a finalidade de entender os efeitos da subnutrição em diversos órgãos, as repercussões sobre o intestino grosso - um importante órgão responsável pela absorção de água e de alguns eletrólitos, necessários à manutenção da homeostase do organismo, ainda é tema a ser explorado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SUBNUTRIÇÃO

2.1.1 Considerações gerais

A subnutrição é uma interação de diversas deficiências, caracterizando uma síndrome complexa (CHANDRA, 1992). Corresponde a um estado de deficiência de energia, proteína ou outro nutriente específico e um inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos, levando ao enfraquecimento do sistema imunológico e diminuição das atividades físicas, mentais e cognitivas, tornando as pessoas mais vulneráveis à doenças e infecções, podendo ser revertida com suporte nutricional adequado. (MONTEIRO, 1995; MORGANE et al., 2002; KONDRUP et al., 2003; STRATTON, 2005; MARTINS et al., 2011; FAO, 2015).

Atualmente, estudos sobre os efeitos adversos da subnutrição materna no crescimento fetal e neonatal e suas repercussões na vida adulta, têm sido realizados. De acordo com Desai et al. (1996), uma deficiência nutricional durante o período de desenvolvimento, causa efeitos prolongados e persistentes ao longo da vida de um indivíduo, causando um déficit de crescimento generalizado e redução permanente do tamanho dos órgãos e tecidos.

A subnutrição deflagra efeitos deletérios à estrutura e crescimento ósseo (YANAGUIZAWA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2010), e a cartilagem do processo condilar da mandíbula e da sincondrose basioccipital (BOLDRINI, 2003; OLIVEIRA et al., 2010; CAVALLI et al., 2015). Além disso, uma diminuição na síntese da matriz de colágeno das articulações (SPANHEIMER et al., 1991), modificações estruturais e ultraestruturais da cartilagem articular da articulação do joelho (BOLINA, 2014), alterações morfológicas na musculatura esquelética (DE OLIVEIRA, 2006; PARADA-SIMÃO et al., 2011), no coração (SARAIVA, 1992) e no timo (BAPTISTA, 2013) de animais subnutridos, foram relatadas. No sistema nervoso - em especial o SNE, diversos trabalhos (SANTER; CONBOY, 1990; NATALI; MIRANDA-NETO, 1996; LEITE-MELLO et al., 1997; TORREJAIS et al., 1997; CASTELUCCI et al., 2002, GOMES et al., 2006; GREGGIO et al., 2010; MAROSTI, 2016), relataram alterações no PM de animais subnutridos.

A subnutrição pode ser subdividida em crônica (SC), definida como a baixa estatura em relação à idade e subnutrição aguda (SA), entendida como baixo peso em relação à altura. A SA pode manifestar-se em qualquer época da vida e é passível de recuperação. Por outro lado, a SC, ocasionada pela SA não tratada no período entre a concepção e os dois anos de idade, deixa alterações irreversíveis (LI et al., 2003).

A nutrição adequada é essencial para o bem-estar de qualquer sociedade ou indivíduo dentro dela. O estado nutricional é o processo em que os diversos órgãos reconhecem os alimentos e os líquidos essenciais para garantir o crescimento, a maturação e a duplicação celular, refletindo o equilíbrio entre a ingestão e a demanda (necessidade) de nutrientes de um indivíduo (ALVES et al., 2008; WHO, 2015). Além disso, o estado nutricional em condições normais, ou seja, uma dieta diversificada, que inclua alimentos básicos, legumes, frutas, alimentos de origem animal e, quando necessário, fortificados, é fundamental para a saúde e para o desenvolvimento físico e cognitivo. Diversos fatores, entre eles: a disponibilidade e acesso aos alimentos, o saneamento básico – tais como acesso à água potável, questões culturais e de educação, podem afetar os níveis nutricionais (FAO, 2015).

A origem da subnutrição está basicamente relacionada com a pobreza, incluindo o baixo nível socioeconômico e cultural, saneamento básico, condições climáticas, costumes culturais e religiosos, hábitos do aleitamento materno e a disponibilidade e qualidade dos serviços de saúde (MULLER; KRAWINKEL, 2005; FAO, 2015). Além disso, fatores ligados à produção, industrialização, distribuição e custo dos alimentos interferem no acesso à alimentação adequada (FAO, 2015).

O mundo produz alimento suficiente para suprir os 7 bilhões de habitantes. No entanto, uma em cada oito pessoas vai para a cama com fome todas as noites (FAO, 2015). Em alguns países, uma em cada três criança está abaixo do peso. Há muitas razões para a fome no mundo, entre elas podemos destacar: 1) a pobreza, que impossibilita as pessoas de terem acesso a alimentos nutritivos; 2) a falta de investimento na agricultura, resultando em precária infraestrutura agrícola, tais como estradas, armazéns e irrigação; 3) intempéries do clima por meio dos desastres naturais, como inundações, tempestades tropicais e longos períodos de seca – principal causa de escassez de alimentos no mundo; 4) as guerras e os deslocamentos causados pelos conflitos; 5) a crise financeira mundial, que causa uma oscilação nos preços dos alimentos e 6) o desperdício dos alimentos. Aproximadamente um terço de tudo que é produzido no mundo, não é consumido (FAO, 2015).

No entanto, nos dias atuais, observamos um declínio da subnutrição no mundo devido ao crescimento econômico - que tem papel chave para o sucesso desta diminuição, e a queda

nos preços internacionais dos alimentos (FAO, 2015). Além disso, a interação entre a mobilização da comunidade, com o desenvolvimento e distribuição de comidas terapêuticas têm sido usadas como estratégia para melhorar o problema da falta de comida (BHUTTA, 2009).

2.1.2 Subnutrição ao redor do mundo

Dados recentes da FAO (2015), sinalizam um declínio no número de pessoas subnutridas no mundo nas últimas décadas – apesar desse número ainda ser alarmante. Entre 1990-1992, havia mais de 1 bilhão de pessoas subnutridas no mundo (18,6% da população mundial); entre 2000-2002 este número diminuiu para ~929 milhões de pessoas (14,9% da população mundial). Seguindo o padrão de diminuição, 14,3% da população mundial se encontrava em estado de subnutrição entre 2005-2007 (~942 milhões de pessoas) e 11,8% no período de 2010-2012. O progresso continua na luta contra a fome, mas, ainda, ~795 milhões de pessoas - uma em cada nove – não tem comida para uma vida ativa e saudável nos dias atuais. Estes números correspondem a 10,9% da população mundial.

Embora em números absolutos esses valores pareçam estratosféricos – e o são, a prevalência da subnutrição diminuiu bastante nas últimas décadas, mesmo com o aumento de 1,9 bilhões de habitantes na população mundial. Desde os anos de 1990-1992, o número de pessoas subnutridas diminuiu ~216 milhões, ou seja, uma redução de 21,4%. (FAO, 2015; WHO, 2015).

A maioria dos países monitorados pela Food and Agriculture Organization (FAO) -72 de 129 – atingiram a meta em reduzir pela metade a incidência de subnutrição até 2015. Além disso, 29 países, entre eles o Brasil, cumpriram o objetivo mais ambicioso proposto pela cúpula mundial da alimentação em 1996 - reduzir pela metade o número absoluto de pessoas subnutridas em 2015, ou trazê-lo abaixo do limiar de 5% (FAO, 2015). Em números totais, os continentes asiático e africano dominam este triste índice. O continente asiático, é o que apresenta o maior número de indivíduos subnutridos (~512 milhões). Por outro lado, o continente africano, mesmo apresentando menos da metade do número de subnutridos (~232 milhões), mostrou uma prevalência de 20% do total da população, contra 12,1% do continente asiático (FAO, 2015). Ao observarmos a Figura 1, constatamos a manutenção das regiões que apresentavam os maiores índices de subnutrição em 1990-1992 quando comparadas aos dias

REVISÃO DA LITERATURA

atuais. Por outro lado, fica claro a diminuição no número absoluto de subnutridos nos últimos 25 anos – só aumentou na África subsaariana e Ásia ocidental, e o aumento na porcentagem do total da população que apresenta o quadro de subnutrição em algumas regiões (FAO, 2015).

Figura 1 - Mapa da mudança na distribuição da fome no mundo nos anos de 1990-1992 e 2014-2016

Fonte: (FAO, 2015).

Legenda: Números absolutos (milhões) e porcentagem (%) da distribuição da fome em diferentes regiões.

Segundo o Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome, a pobreza no Brasil foi reduzida de 24,7% em 2002 para 8,5% em 2012, e a extrema pobreza caiu de 9,8% para 3,6% no mesmo período. Esse resultado fez com que o país cumprisse a meta de reduzir pela metade o número de pessoas que passam fome estabelecida pela cúpula mundial de alimentação (FAO, 2015). No Brasil, cuja população é de ~197 milhões de pessoas, cerca de 13 milhões apresentavam algum tipo de subnutrição, prevalência de 7% (FAO, 2012). Os índices em 2011 eram de apenas 5-9%, valor considerado baixo; já em 2012, este índice passou para 5-14%, moderadamente baixo (FAO, 2012; FAO, 2014). Atualmente, menos de 5% da população brasileira se encontra em estado de subnutrição (Figura 2). Estes dados correspondem a menor taxa já registrada pelo país e o melhor índice possível na classificação da World Food Programme (WFP) (WFP, 2015).

Figura 2 - Mapa da fome em 2015

Fonte: (WFP, 2015).

Legenda: Observar os índices de subnutrição no Brasil e em países do leste africano, em particular, Moçambique.

2.1.3 Subnutrição e a dieta padrão de Moçambique

Países africanos, entre eles Moçambique, um país situado no sudoeste africano com cerca de 25 milhões e meio de habitantes, mostram um alto índice de subnutrição em sua população. Estima-se que cerca de 24-35% da população de Moçambique esteja subnutrida (Figura 2) (FAO, 2015).

Dados mostram que cerca de 50% da população de Moçambique vive abaixo da linha de pobreza absoluta (FAO, 2004). A SC, é responsável pela fraca capacidade produtiva, ausências ao local de trabalho, susceptibilidade às doenças, diminuição da aptidão física e baixo nível intelectual, resultando num menor rendimento escolar e maiores riscos de doenças degenerativas (FINKEL et al., 2004; BLACK et al., 2008; MARTINS, 2008). Dados oficiais¹, indicam que a DC na República de Moçambique, ocorre devido uma falha no crescimento nos

¹ República de Moçambique. 2010. Plano de ação multisetorial para a redução da desnutrição crônica em Moçambique 2011-2014 (2020). 111 páginas

primeiros anos de vida, sendo responsável por um terço das mortes em crianças menores de cinco anos. A persistência destas vítimas, principalmente nas regiões rurais e suburbanas de Moçambique, onde os meios de saneamento básico são escassos, faz com que a meta em reduzir a mortalidade infantil e a subnutrição seja um desafio constante. (MARTINS, 2008).

Diferentemente do que ocorre em outros continentes, o africano mostra uma tendência na manutenção da oferta energética basicamente vegetal (FAO, 2012). A dieta básica oferecida à população de Moçambique, tem como principal fonte de proteínas o amendoim, além de outros componentes como farinha de milho e couve liofilizada.

2.1.4 Proteína animal x proteína vegetal

Proteínas são moléculas orgânicas formadas a partir da ligação peptídica entre dois aminoácidos, sendo sua estrutura constituída de diferentes combinações entre apenas vinte aminoácidos (COZZOLINO, 2009). Nove aminoácidos, incluindo lisina, metionina, treonina, triptofano, histidina, leucina, isoleucina, valina e fenilalanina, são considerados aminoácidos essenciais para a nutrição humana (HAN et al., 2015).

As proteínas estão sempre presentes quando o corpo está crescendo, reparando ou trocando os tecidos. Elas auxiliam no crescimento e no reparo dos tecidos do corpo; facilitam as reações químicas; regulam os processos no organismo; ajudam a manter o volume, a composição e o equilíbrio ácido-base dos fluidos corporais; transportam lipídeos, vitaminas, minerais e oxigênio pelo corpo; inativam invasores estranhos e fornecem energia quando necessário (WHITNEY; ROLFES, 2008).

A capacidade em fornecer nitrogênio e aminoácidos essenciais nas quantidades adequadas às necessidades de cada organismo, determina a qualidade nutricional das proteínas. Isto posto, as proteínas podem ser classificadas em completas, parcialmente incompletas e totalmente incompletas (HOFFMAN; FALVO, 2005; COZZOLINO, 2009). As proteínas completas seriam aquelas derivadas de alimentos como carne, leite, ovos, peixes e aves, os quais apresentam todos os aminoácidos essenciais em quantidades adequadas ao crescimento e manutenção. Já as proteínas parcialmente incompletas seriam as que oferecem aminoácidos em quantidade suficiente apenas para a manutenção do organismo, como algumas proteínas provenientes de leguminosas, oleaginosas e cereais. Por fim, as proteínas totalmente incompletas, como a gelatina, são as que não fornecem aminoácidos essenciais em quantidade

REVISÃO DA LITERATURA

suficiente nem mesmo para a manutenção do organismo. Dois fatores influenciam a qualidade da proteína: a digestibilidade, que vai depender da fonte de proteína e outros alimentos ingeridos com ele, e a composição de aminoácidos. A digestibilidade da maioria das proteínas animais é alta; proteínas de origem vegetal são menos digestíveis (HOFFMAN; FALVO, 2005; WHITNEY; ROLFES, 2008; COZZOLINO, 2009).

Proteínas de origem animal são consideradas completas e utilizadas como referência no que se refere a composição de aminoácidos essenciais para o organismo humano. Alimentos de origem vegetal também são fontes significativas de proteínas, sendo classificados, como parcial ou totalmente incompletos. Não obstante, apesar dessa deficiência em aminoácidos essenciais específicos, as proteínas vegetais contribuem consideravelmente para a ingestão proteica total da população, uma vez que representam as fontes proteicas de menor custo e, portanto, de maior consumo, sobretudo nos países de menor nível socioeconômico. Muito embora as proteínas vegetais apresentem limitações nutricionais, na dieta normal de um indivíduo, vários tipos de alimentos são consumidos simultaneamente, ocorrendo um complemento em termos de aminoácidos essenciais (HOFFMAN; FALVO, 2005; COZZOLINO, 2009).

De acordo com Hiane et al. (2006), a digestibilidade, a qual é fator determinante na qualidade proteica da dieta, afere a porcentagem das proteínas hidrolisadas pelas enzimas digestivas e absorvidas pelo organismo na forma de aminoácidos, ou de qualquer outro composto nitrogenado. Maga, Lorenz e Onauemi (1973); Sgarbieri (1987) e Macedo e Damico (2000) relatam que proteínas cujas ligações peptídicas não são hidrolisadas pelo processo digestivo, sofrem transformações no intestino grosso ou são excretadas nas fezes.

Isto posto, boa parte das proteínas de origem animal fornecem uma boa absorção de aminoácidos pelo organismo - como a caseína, com teor proteico de 81,57% (PIRES et al., 2006) e digestibilidade da ordem de 96% (SGARBIERI, 1987). Por outro lado, quando se avalia as proteínas de origem vegetal, observa-se que a digestibilidade é prejudicada por serem mais resistentes à ação de enzimas (MAGA et al., 1973; CARIAS et al., 1995). Com relação à dieta de Moçambique, o conteúdo proteico do amendoim, seu principal constituinte, pode variar de 21,0 a 36,4% (WOODROOF, 1983).

2.2 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO (SNE)

Em seu trabalho que estabeleceu a base do sistema nervoso autônomo (SNA), Langley (1921), o dividiu em três partes: simpático, parassimpático e entérico. Entretanto, diversos fatores corroboram para o estudo separado da parte entérica, entre eles a independência do controle do SNC sob muitos aspectos funcionais e a presença de vias de reflexo, com neurônios sensoriais, interneurônios e neurônios motores (excitatórios e inibitórios), formando vias de reflexo intrínsecos no intestino e a extensa quantidade e variedade de neurônios (FURNESS; COSTA, 1980). Isto posto, se caracterizou uma terceira divisão do sistema nervoso: o SNE.

O SNE é a mais complexa parte do sistema nervoso periférico, constituído por um vasto número de neurônios, células gliais organizadas em gânglios interconectados, fibras nervosas que suprem tecidos efetores, incluindo a musculatura da parede do intestino, epitélio de revestimento, vasos sanguíneos intrínsecos e células endócrinas, gástricas e pancreáticas (GERSHON, 1998; FURNESS, 2006). Está presente no TGI, do esôfago ao esfíncter anal interno, na bexiga urinária, vesícula biliar, vias biliares extra-hepáticas, pâncreas, traqueia e brônquios. Apesar de apresentar um padrão similar ao longo do TGI, pequenas diferenças, no que se referem a forma e tamanho dos gânglios entéricos, são encontradas (FURNESS; COSTA, 1980).

O SNE além de determinar o padrão de motilidade do TGI, controla a secreção de ácido gástrico, regula o movimento do fluído através do revestimento epitelial, altera o fluxo sanguíneo local, altera o manejo de nutrientes e interage com o sistema endócrino e imune do intestino (FURNESS, 2006). Além disso, contribui ao longo das células gliais, para a manutenção e integridade da barreira epitelial entre a luz e células do intestino (FURNESS, 2012).

Existem no SNE cerca de 400-600 milhões de neurônios, este número é maior que o total de todos os gânglios simpáticos e parassimpáticos combinados, e igual ao número de neurônios da medula espinal (FURNESS, 2006). A complexidade dessa quantidade, diversidade funcional e química neuronal, associada à sua capacidade de controle intrínseco de diversos órgãos, independentemente do SNC, levaram alguns autores (GERSHON, 1998; LEBOUVIER et al., 2009), a chamarem o SNE de “segundo cérebro”.

Gânglios e fibras nervosas ao longo do TGI, formam uma malha organizada entre suas túnicas, formando plexos ganglionares. De maneira geral, da camada serosa para a camada mucosa, aparecem o plexo subseroso, nervos na musculatura longitudinal, plexo mioentérico,

REVISÃO DA LITERATURA

nervos na musculatura circular, plexo muscular profundo, plexo submucoso, nervos na musculatura mucosa, plexo mucoso e inervação vascular (FURNESS; COSTA, 1980). Entretanto, destacam-se o plexo mioentérico (Auerbach) e o plexo submucoso, onde a quase totalidade das células nervosas residem (FURNESS, 2006) (Figura 3).

Figura 3 - Representação da organização do sistema nervoso entérico (SNE)

Fonte: (Adaptado de FURNESS, J. B., 2012).

Legenda: Esquema da estratigrafia do TGI e localização dos plexos mioentérico e submucoso entre suas camadas.

O plexo submucoso, localizado na túnica submucosa, é encontrado preferencialmente nos intestinos delgado e grosso, aparecendo apenas como gânglios isolados no esôfago e estômago (FURNESS, 2000; PHILLIPS; POWLEY, 2007). Dependendo da localização de seus neurônios e fibras nervosas, pode ser subdividido em três partes: plexo submucoso interno (Meissner), adjacente à camada muscular da mucosa; plexo submucoso externo (Schabadasch ou Henle), adjacente à camada circular da túnica muscular externa e o plexo submucoso intermediário, situado entre os dois anteriormente citados (SCHEMANN; NEUNLIST, 2004; FURNESS, 2006). O plexo submucoso coordena reflexos de secreção e absorção, bem como o controle motor do músculo liso da mucosa (PHILLIPS; POWLEY, 2007).

REVISÃO DA LITERATURA

Por outro lado, o plexo mioentérico (PM), localizado entre as camadas longitudinal e circular da túnica muscular externa, se estende por todo o TGI, do esôfago ao esfíncter interno do ânus (GABELLA, 1987; FURNESS, 2000; PACHNIS; LARANJEIRA, 2009), e é primariamente envolvido no início e controle do padrão motor do músculo liso (peristaltismo), ou seja, na motilidade do TGI (SCHEMANN; NEUNLIST, 2004; PHILLIPS; POWLEY, 2007). Evidentemente, essa separação entre os plexos submucoso e mioentérico é didática, uma vez que eles estão interconectados, com neurônios do plexo submucoso externo innervando a camada circular da muscular e neurônios dos gânglios mioentéricos emitindo prolongamentos para gânglios submucosos, além de suprirem a maioria das túnicas do TGI (FURNESS et al., 1990; SCHEMANN; NEUNLIST, 2004).

O plexo mioentérico pode ser subdividido em três plexos: primário, formado por gânglios e densas fibras nervosas - as fibras interganglionares (chamadas de fibras intermodais), que interconectam os gânglios transversalmente e longitudinalmente; secundário, formado por fibras nervosas mais delgadas, que conectam as fibras interganglionares entre si ou a gânglios, e com frequência, encontram-se dispostas perpendicularmente às fibras interganglionares e terciário, formado por fibras extremamente delgadas, dispersas nos espaços entre as fibras interganglionares e secundárias (WILSON et al., 1987; SANTER; BAKER, 1993; FURNESS, 2004 et al.; FURNESS, 2006; FURNESS, 2008).

Métodos funcionais, farmacológicos, neuroquímicos e morfológicos identificaram dezessete tipos de neurônios intrínsecos no SNE, catorze destes, no intestino delgado de cobaia, sendo dez presentes no plexo mioentérico e quatro no plexo submucoso (Figura 4) (FURNESS, 2000). Funcionalmente, esses neurônios podem ser agrupados em neurônios motores, interneurônios, neurônios aferentes primários intrínsecos (intrinsic primary afferent neurons – IPANs) e neurônios intestino-fugais (víscero-fugais). Entretanto, há inúmeras subdivisões para os neurônios acima citados (COSTA et al., 1992; FURNESS, 2000; FURNESS et al., 2000).

Em termos funcionais, existem cinco tipos de neurônios motores: neurônios excitatórios da musculatura intestinal, neurônios inibitórios da musculatura intestinal, neurônios secretomotores/vasodilatadores, neurônios secretomotores que não são vasodilatadores e neurônios que innervam células enteroendócrinas, como aquelas que innervam as células endócrinas que secretam gastrina no estômago (FURNESS et al., 2000). No que diz respeito aos neurotransmissores motores excitatórios mais frequentes, destacam-se a acetilcolina e as taquicininas – sendo a substância P a mais importante. Por outro lado, o óxido nítrico (NO) e o peptídeo vasoativo intestinal (VIP), são os neurotransmissores motores inibitórios principais (FURNESS, 2000; SCHEMANN; NEUNLIST, 2004).

Figura 4 - Representação dos diferentes tipos de neurônios encontrados no SNE de cobaia

Fonte: (Adaptado de FURNESS, J. B., 2006).

Legenda: Esquema dos quatorze tipos de neurônios encontrados no SNE de cobaia. ML: Músculo longitudinal; PM: Plexo mioentérico; MC: Músculo circular; PS: Plexo submucoso; MM: Muscular da mucosa; MUC: Mucosa. 1) Interneurônios ascendentes; 2) Neurônios mioentéricos aferentes primários; 3) Neurônio intestino-fugal; 4) Neurônio motor excitatório da musculatura longitudinal; 5) Neurônio motor inibitório da musculatura longitudinal; 6) Neurônio motor excitatório da musculatura circular; 7) Neurônio motor inibitório da musculatura circular; 8) Interneurônio descendente (reflexo local); 9) Interneurônio descendente (reflexo secretomotor); 10) Interneurônio descendente (complexo migratório mioelétrico); 11) Neurônio aferente primário intrínseco submucoso; 12) Neurônio secretomotor/vasodilatador não-colinérgico; 13) Neurônio secretomotor/vasodilatador colinérgico; 14) Neurônio secretomotor (não-vasodilatador) colinérgico.

O SNE está envolvido em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos do TGI. É essencial para uma vida saudável, como indicado pela alta taxa de morbidade e mortalidade associada com suas anormalidades (DE GIORGIO et al., 2000). Um amplo quadro de distúrbios entéricos causados por falha em uma ou mais das funções do SNE têm sido descritos. Esses distúrbios podem ser classificados em neuropatias congênitas ou do desenvolvimento, neuropatias adquiridas, neuropatias associadas a outras doenças e neuropatias iatrogênicas (FURNESS, 2012).

As alterações do TGI presentes em indivíduos e ratos subnutridos, somada à falta de um consenso e conhecimento de suas causas, ressaltam a necessidade de estudos voltados nessa área. Além disso, o fato da subnutrição causar alterações nos neurônios entéricos, e por

REVISÃO DA LITERATURA

consequência nas funções do TGI e a ausência de trabalhos que relacionem os aspectos morfoquantitativos e ultraestruturais do PM do intestino grosso de animais subnutridos (dieta padrão de Moçambique) e renutrição nos períodos pré e pós-natal, justificam o presente estudo. Desta forma, a atual pesquisa visa contribuir para esse importante assunto, que continua sendo um problema de saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Esta seção mostra os objetivos gerais e específicos do trabalho

3.1 GERAIS

Investigar, no plexo mioentérico dos segmentos proximal e distal do intestino grosso de ratos Wistar de 21 e 42 dias, as possíveis repercussões morfoquantitativas e ultraestruturais da dieta padrão de Moçambique (hipoproteica).

3.2 ESPECÍFICOS

Analisar, com o uso de técnicas de histoquímica, imunohistoquímica, microscopia de luz, microscopia eletrônica transmissão e varredura:

- a) A estrutura e a ultraestrutura dos neurônios do plexo mioentérico;
- b) A reatividade dos neurônios e dos gânglios à NADPH, NADH, ChAT, VIP e Substância P;
- c) A estrutura de fibras colágenas e do sistema elástico dos componentes ganglionares e da parede intestinal;
- d) A densidade e morfometria dos neurônios reativos à NADPH e NADH;
- e) O número total estimado de neurônios do plexo mioentérico;
- f) A morfologia do intestino grosso.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção compreende a descrição detalhada da metodologia empregada no estudo. A presente pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo (ICBIII-USP).

4.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas, com aproximadamente 60 dias de vida e peso entre 280 e 320 gramas, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os animais, foram acondicionados em gaiolas de polipropileno dispostas em estante vertical mantidas em sala climatizada, com temperatura controlada entre 23 e 25°C, e em ciclo de claro/escuro de 12 horas. Depois de ambientados no biotério, os animais foram acasalados durante 10 dias por um sistema poligâmico (1 macho para 2 fêmeas em uma mesma gaiola), período em que passaram a receber as respectivas rações descritas a seguir.

Como controle, utilizou-se a dieta AIN-93G com adição de 20% de caseína (NN), estabelecida de acordo com o protocolo preconizado pelo American Institute of Nutrition (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). A composição da Dieta de Moçambique (DM) foi baseada nos alimentos mais consumidos pela população daquele País, constituída de farinha de milho, farinha de amendoim torrado, couve liofilizada, suplementada com mix mineral AIN-93G e mix vitamínico AIN-93. A DM acrescida de 20% de caseína constituiu a dieta de Moçambique suplementada (NM). Todas as dietas foram preparadas por um laboratório bioquímico especializado² e suas respectivas composições nutricionais estão expressas na Tabela 1.

¹ Rhoster Indústria e Comércio Ltda, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1 - Composição das Rações utilizadas na presente pesquisa

Composição Nutricional	Ração AIN-93G	Ração Moçambique	
	Nutrida (%)	Padrão (%)	Suplementada (%)
Umidade	8,4	4,7	5,6
Proteína Bruta	20 (caseína)	16,2 (vegetal)	24,2
Extrato Etéreo	7,2	24,1	20,7
Fibra Bruta	4,1	0,9	1,3
Matéria Mineral	2,8	3,3	3,3
Carboidrato	58,9	50,5	44,9
Kcal/g Dieta	3,8	4,8	4,6

Fonte: Rhostr Indústria e Comércio Ltda, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil.

Legenda: Quantidade presente por Kg de ração

Decorrido o período de acasalamento, as fêmeas foram separadas em gaiolas individuais de acordo com as respectivas dietas (NN, DM, NM) durante a gestação e após o nascimento dos filhotes. Embora o número de filhotes variou de 5 a 12 animais por ninhada, estabeleceu-se como número padrão, 6 filhotes, para que todos tivessem o mesmo acesso à lactação. Para tanto, após o terceiro dia de vida extrauterina, realizou-se a sexagem considerando-se além da distância anogenital (maior nos machos), a visualização do escroto (Figura 5A e 5B). Ademais, tomou-se o cuidado para que fosse mantido o maior número de machos possível na formação dos grupos experimentais (Figura 5C).

As ninhadas cujas mães se alimentaram de seus filhotes, foram sumariamente descartadas. Dadas as dificuldades para a obtenção dos filhotes e as técnicas empregadas na presente pesquisa, determinou-se como suficiente para que a mesma fosse realizada, um número de 30 fêmeas e 15 machos.

Figura 5 - Sexagem dos filhotes pela distância anogenital

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Distância anogenital: (A) em filhotes fêmeas. (B) em filhotes machos. (C). Representação de ninhada com 11 filhotes, com padronização de 6 filhotes por fêmea, permanecendo o maior número de machos possíveis na formação dos grupos experimentais

Após 21 dias, época determinada para o desmame, os filhotes formaram, de acordo com as dietas, os grupos experimentais NN21, DM21 e NM21. A partir do 22º dia de vida, filhotes dos grupos NN, DM e NM foram mantidos com as respectivas dietas até o 42º dia de vida, quando constituíram, respectivamente os grupos NN42, DM42 e NM42. Animais do grupo DM que do 22º ao 42º dia de vida passaram a receber a ração NM, constituíram o grupo renutrido Moçambique (RM42).

O fluxograma da Figura 6 ilustra os procedimentos para a obtenção dos animais de todos os grupos experimentais.

Figura 6 - Fluxograma do período experimental

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2015 adaptado de MENDONÇA, L. P., 2015).

Legenda: Fluxograma correlacionando os eventos realizados para a formação dos grupos experimentais nos diferentes períodos.

4.2 AVALIAÇÃO METABÓLICA

A avaliação dos dados metabólicos ocorreu no período compreendido entre os dias 22 e 42, durante 5 dias logo após o desmame (período S1), e 5 dias antes da eutanásia (período S3), onde os animais dos grupos NN42, DM42, NM42 e RM42 foram colocados em gaiolas metabólicas³, para controle e mensuração diária da *massa corporal*, *ingestão alimentar*, *ingestão de água*, *excreção de urina* e *excreção de fezes* (Figura 7). Quando os animais não estavam nas gaiolas metabólicas, eram alocados individualmente em gaiolas de polipropileno.

Figura 7 - Gaiolas metabólicas

Fonte: (Adaptado BAPTISTA, J. S., 2008).

Legenda: Monitoramento dos animais. (A) Gaiola metabólica. Bebedouro (seta verde), Gavetas de alimentação (seta laranja), Tubo coletor para desperdício de água (seta azul), Tubo coletor de urina (seta vermelha), Tubo coletor de fezes (seta amarela). (B) Estante vertical com 12 gaiolas metabólicas. (C) Caixas de polipropileno.

4.3 COLETA E OBTENÇÃO DOS SEGMENTOS DO INTESTINO GROSSO

Os animais de todos os grupos (NN21, DM21, NM21, NN42, DM42, NM42, RM42) foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico Xilasina (40mg/kg) e Ketamina (120mg/kg) e, em seguida, tiveram aberta a cavidade abdominal através de uma secção

³ Tecniplast, Buguggite, VA., Itália

MATERIAIS E MÉTODOS

mediana, a fim de se retirar todo o intestino grosso. Após a lavagem com PBS (0,1 M), os espécimes foram fotografados, e a sua área determinada (em cm²), utilizando-se o programa Image Pro-Plus 3.0 (Zeiss, Germany). Com o propósito de serem submetidos às diferentes técnicas, o intestino grosso foi dividido em segmentos (regiões) com aproximadamente 2cm de comprimento assim denominados: proximal (P) logo após o ceco (colo proximal) e distal (D) correspondendo ao colo descendente (Figura 8).

Figura 8 - Esquema das diferenças entre os segmentos proximal e distal do intestino grosso de ratos

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: (A) Figura ilustrativa dos diferentes segmentos do intestino grosso de ratos utilizados em nosso trabalho.

(B). Característica de mucosa pregueada (*) do segmento proximal do intestino grosso de ratos. (C)

Característica de mucosa lisa (*) do segmento distal do intestino grosso de ratos.

4.4 MÉTODOS HISTOQUÍMICOS PARA A EVIDENCIAÇÃO DE NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS

O seguinte procedimento padrão descrito a seguir, foi utilizado para todos os métodos histoquímicos do presente trabalho. Desta forma, os segmentos P e D foram lavados com PBS (Tampão Salina Fosfato, 0.1M, pH 7,4) e tiveram a extremidade distal ligada com fio

MATERIAIS E MÉTODOS

apropriado. Com auxílio de uma seringa, através da extremidade proximal, a solução apropriada para cada método foi injetada na luz da víscera, em quantidade suficiente para distender levemente as paredes de cada segmento. Ao fim deste procedimento, procedeu-se à ligadura da extremidade oral com fio apropriado (Figura 9).

Figura 9 - Procedimentos prévios às técnicas de histoquímica (NADH-d e NADPH-d)

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Métodos histoquímicos de evidênciação de neurônios totais e nitrérgicos do intestino grosso: (A) Ligadura das extremidades intestinais com fio. (B). Corte da amostra pela borda mesentérica. (C) Obtenção do preparado de membrana: separação das camadas mucosa e submucosa (seta verde) das camadas musculares circular e longitudinal (seta amarela). (D) Preparado de membrana pronto.

4.4.1 Técnica da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - diaforase (NADH-d)

Preconizada por Gabella (1987), e utilizada como um marcador pan-neuronal, essa metodologia foi empregada nos segmentos P e D de 5 animais de cada grupo.

Após preenchidos com solução de Krebs⁴, os espécimes foram imersos durante 20 minutos na mesma solução, e em seguida transferidos para uma solução permeabilizante (Krebs contendo Triton X-100 a 0,3%) onde permaneceram por 5 minutos. Em seguida, os segmentos foram lavados novamente em solução de Krebs por 10 minutos e imersos por 90 minutos (a 37°C) em um meio de incubação, que consiste em: 0,5mg/ml de Nitro Blue Tetrazolium (NBT)⁴ em água destilada; 25 partes de PBS (0,1M pH 7,4) e 50 partes de água; 0,5mg/ml de β -NADH na forma reduzida. A reação foi interrompida com a transferência dos espécimes para uma solução fixadora de paraformaldeído a 4% em PBS (pH 7,4), onde permaneceram por um período de 48 horas.

⁴ 1,3 g NaHCO₃, 0,24g de MgCl₂·6H₂O, 0,44g de KCl, 0,165g de NaH₂PO₂, 7,05g de NaCl e 0,27 de CaCl₂ em 1 litro de água destilada.

Os segmentos P e D foram então abertos em sua margem mesentérica e, sob lupa estereoscópica, foram dissecados com pinças oftalmológicas, retirando-se as camadas mucosa e submucosa, e mantendo-se a camada muscular (Figura 9). Os espécimes foram montados como preparados totais de membrana entre lâmina e lamínula, em solução de glicerina tamponada.

4.4.2 Técnica da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato-diaforase (NADPH-d)

A técnica de evidenciação da enzima β -NADPH-d para neurônios nitrérgicos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Santer (1994), em 5 animais de cada grupo. Inicialmente, foi injetada no interior dos segmentos, quantidade suficiente de PBS (0.1M, pH 7,4). Após imersos por 30 minutos em solução fixadora de paraformaldeído a 4% em PBS, os espécimes foram lavados em PBS por 10 minutos e imersos por 90 minutos (a 37°C) no meio de incubação contendo solução de 25mg de NBT, 50mg de β -NADPH na forma reduzida e 0,3% de Triton X-100 em tampão Tris-HCL (0,1M pH6,0), (para cada 100ml. Os procedimentos para a interrupção da reação, a obtenção e montagem dos preparados totais de membrana foram os mesmos utilizados no item anterior (4.4.1).

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA A EVIDENCIAÇÃO DE NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS

Os procedimentos para a evidenciação da imunorreatividade dos elementos do plexo mioentérico do intestino grosso à Substância P (SP), Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) descritos inicialmente por Costa et al. (1983), e ChAT foram realizados em fragmentos das regiões P e D de 3 animais de cada grupo. Os espécimes foram lavados e preenchidos com o fixador Zamboni e mergulhados na mesma solução por um período de 18 a 24 horas a uma temperatura de 4°C. Após a fixação, os segmentos foram abertos pela margem mesentérica, lavados em álcool 80% até a remoção do fixador, e desidratados em álcool 95%, 100%(I) e 100% (II) por 30 minutos, diafanizados em xilol e reidratados em sequência decrescente de

MATERIAIS E MÉTODOS

álcool (100%, 80% e 50%) por 30 minutos. Os segmentos foram então mantidos em PBS 0,1M, pH 7,3 a 4°C contendo azida sódica (0,4%)⁵.

Os preparados de membrana obtidos (item 4.4) foram lavados em Triton X-100 a 0,3% diluído em PBS (0,1M; pH 7,3) por 10 minutos sob agitação. Decorrido esse tempo, os espécimes foram incubados em soro de cabra 10% por 2 horas sob agitação, e em seguida incubados por 22 horas a temperatura ambiente em anticorpo primário de coelho anti-SP⁶ ou anti-VIP⁷ na diluição 1:200 (Kit de imunofluorescência S-3026 e S-3049) e ChAT na diluição 1:200, por um período de 2 horas a 37°C. Após a lavagem em PBS (0,1M; pH 7,3) 3 vezes consecutivas por 5 minutos, os espécimes foram incubados no escuro por 2 horas em anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugado com o fluorocromo (FITC)⁸. Em seguida, os espécimes foram lavados em PBS (0,1M; pH 7,3) por 3 vezes (10 minutos cada), e montados com glicerol entre lâmina e lamínula.

4.6 MÉTODOS ROTINEIROS DE MICROSCOPIA DE LUZ

Fragmentos de cerca de 2 cm das regiões P e D do intestino grosso de 5 animais de cada grupo foram lavados em PBS, e mantidos em solução fixadora de formol a 10% a 4 °C, por um período de 24 horas. Posteriormente, os espécimes foram desidratados em série crescente de alcoóis (do 70° ao absoluto), diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast (Sigma).

Cortes transversais de 5 µm de espessura foram submetidos à coloração do Picro-Sirius e avaliados sob luz polarizada (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979) para a tipificação das fibras colágenas (tipo I: vermelho, laranja, amarelo; tipo III: verde). A análise das fibras elásticas foi realizada em cortes corados pelo método da resorcina-fucsina (WEIGERT, 1898). As características gerais do intestino grosso foram avaliadas através dos cortes corados pela técnica de HE (BEHMER; TOLOSA; FREITAS-NETO, 1976), permitindo evidenciar o aspecto das diferentes camadas constituintes do intestino grosso (mucosa, muscular da mucosa e muscular). Com esta coloração, também foram obtidas as medidas de

⁵ Synth®, Diadema, Brasil

⁶ Bachem – Peninsula Laboratories, USA.

⁷ Bachem – Peninsula Laboratories, USA.

⁸ Bachem – Peninsula Laboratories, USA.

área interna e externa da parede intestinal, bem como espessura da parede e mucosa intestinal. Todos os espécimes foram montados entre lâmina e lamínula com Entellan⁹.

4.7 MÉTODOS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA

4.7.1 De Transmissão

Para esse procedimento, três animais de cada grupo foram anestesiados com solução anestésica contendo cetamina (50mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e, após abertura mediana da caixa torácica a fim de expor o coração, foram submetidos a uma perfusão através do ventrículo esquerdo, com solução de Karnowsky modificada (2% de paraformaldeído, 25% de glutaraldeído e solução tampão cacodilato a 1M, pH 7,4). Após a perfusão, retirou-se dos segmentos P e D, fragmentos de aproximadamente 1cm, que foram imediatamente transferidos para uma solução fixadora (glutaraldeído a 2,5%, por 2 horas a 4°C), lavados em tampão, e pós-fixados por imersão em solução de tetróxido de ósmio (OsO₄ a 2%) durante 2 horas a 4°C.

Em seguida, os fragmentos foram lavados em solução salina e imersos, por um período de 12 a 48 horas à temperatura ambiente e local escuro, em solução aquosa de acetato de uranila a 0,5%. Para que ocorresse a substituição da água do material por um fluido miscível tanto na água quanto em óxido de propileno (resina), os fragmentos foram desidratados em série crescente de álcoois (70%, 80%, 90%, 95% e absoluto), e três passagens em óxido de propileno, por 10 minutos cada banho.

Após desidratados, sob agitação e a temperatura ambiente, os fragmentos permaneceram em uma solução de resina⁹ e óxido de propileno na proporção de 1:1 por 1 hora, e na proporção de 3:1 por 1 hora e 30 minutos para gradativa infiltração do material. Em seguida, também sob agitação em temperatura ambiente, os fragmentos foram imersos em uma solução de resina pura onde permaneceram por um período de 12 a 18 horas. Findo esse período, os espécimes foram mantidos por 1 hora em estufa a 37°C em nova resina, com o frasco aberto para total evaporação da fase líquida do material.

⁹ Low Viscosity Media Spurr's Kit, Electron Microscopy Sciences. USA.

MATERIAIS E MÉTODOS

A inclusão dos fragmentos foi realizada em moldes retangulares preenchidos por resina e mantidos por 5 dias em estufa a 60°C, para a polimerização dos blocos. Em seguida, os blocos foram trimados sob ultramicrotomo¹⁰, onde se obteve cortes semifinos de 300nm corados com azul de toluidina a 1%, para posterior observação sob microscopia de luz.

Selecionada a área de interesse do fragmento, foram realizados cortes ultrafinos de 50nm em ultramicrotomo, que foram coletados em telas de cobre de 200 “mesh”¹¹, contrastados com solução aquosa de acetato de uranila a 4% por 3 minutos, lavados com água destilada, contrastados com solução aquosa de citrato de chumbo a 0,4% por 3 minutos e novamente lavados com água destilada. As telas foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão¹² do Departamento de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.7.2 De Varredura

Três animais de cada grupo foram anestesiados e perfundidos como descrito no item anterior (4.7.1). Após a perfusão e retirada do intestino grosso, foram obtidos fragmentos de aproximadamente 1 cm dos segmentos P e D, submetidos à criofratura com nitrogênio líquido. Os fragmentos assim obtidos, foram imersos em solução fixadora por 48 horas a 4°C e, após lavagem em PBS, foram pós-fixados por imersão em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 1%, por 2 horas, seguida de desidratação por uma série crescente de alcoóis (70%, 80%, 90%, 95% e absoluto), secos ao ponto crítico¹³, e fixados em bases metálicas apropriadas, onde foram metalizados com íons de ouro¹⁴. A análise foi feita em um microscópio eletrônico de varredura¹⁵ do Departamento de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

¹⁰ Leica Ultracut UCT. Germany

¹¹ Sigma-Aldrich.USA.

¹² FEI Morgani 268 (D). USA.

¹³ BAL-TEC, modelo CPD-030, Schalksmühle, Alemanha. Departamento de Anatomia ICB/USP.

¹⁴ BALZERS, modelo SCD-040, Reinraumtechnik Lanz, Alemanha. Departamento de Anatomia ICB/USP.

¹⁵ LEO, modelo 435 VP, Departamento de Anatomia dos animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária.

4.8 MÉTODOS QUANTITATIVOS

Nesta seção, utilizando as técnicas histoquímicas de NADH-d e NADPH-d foram determinadas a **área superficial do intestino grosso (AS)**, a **densidade numérica neuronal (DNN)**, o **número total estimado de neurônios (NTN)** e a **área do perfil do corpo neuronal (APN)** dos segmentos P e D em cada grupo.

4.8.1 Área superficial do intestino grosso (AS)

Com o uso do software Image Pro-plus 3.0, a AS dos animais de todos os grupos foi determinada (em cm²) nas imagens obtidas do intestino grosso colocado sobre uma folha de sulfite, ao lado de uma escala milimetrada.

4.8.2 Densidade Numérica Neuronal (DNN)

A avaliação da DNN foi realizada utilizando um microscópio de luz (Zeiss, Inc., Axioskop 40) equipado com câmera de vídeo (AxioCam HRC) e software quantitativo (AxioVision 4.6.3). Projetadas no monitor do computador, as imagens de cada campo, obtidas com objetiva de 40x de preparados totais de membrana, foram avaliadas a fim de quantificar, de acordo com Gundersen (1977), os neurônios que ficaram dentro de quatro marcos de quantificação sem viés com duas linhas de inclusão (pontilhadas) e duas linhas de exclusão (contínuas) (Figura 10). Desta forma, tanto os neurônios que ficavam no interior de cada marco quanto aqueles que tocavam as linhas pontilhadas, independente da intensidade da coloração, foram quantificados. A DNN dos neurônios reativos à NADH-d e NADPH-d. foram determinadas em 20 campos aleatórios de cada segmento P e D.

Para calcular a DNN, a seguinte equação foi utilizada (GUNDERSEN et al., 1988):

$$QA = \sum Q / \sum A(m)$$

Onde, $\sum Q$ é a soma dos neurônios contados e $\sum A(m)$ é a soma das áreas de todos os marcos.

Como a área de cada marco foi de $691,57\mu\text{m}^2$, e cada campo era constituído por 4 marcos, a somatória dos 20 campos foi de $55325,6\mu\text{m}^2$ (ou $0,0553256\text{mm}^2$).

Figura 10 - Quantificação da densidade numérica neuronal (DNN)

Fonte: (TAMPELINI, F.S., 2016).

Legenda: Esquema da metodologia de quantificação da DNN utilizando os quatro marcos com linhas de inclusão (pontilhadas) e exclusão (contínuas) utilizando o programa Axiovision projetado na tela do computador.

4.8.3 Estimativa do Número Total de Neurônios (NTN)

A NTN reativos à NADH-d e NADPH-d do intestino grosso foi calculada multiplicando-se a DNN média dos dois segmentos P e D pela AS.

4.8.4 Área do Perfil do Corpo Neuronal (APN)

Em imagens dos preparados totais de membrana reativos à NADH-d e NADPH-d obtidas como descrito no item 4.8.2, foram mensuradas (em μm^2) a APN de 30 neurônios escolhidos de forma aleatória em cada segmento P e D, perfazendo um total de 60 neurônios por animal (Figura 11).

Figura 11 - Mensuração da área do perfil do corpo neuronal (APN)

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Esquema da metodologia de mensuração da APN em NADH-d utilizando o programa Axiovision projetado na tela do computador.

4.8.5 Determinação da Área da Mucosa intestinal (AM)

Para a determinação desse parâmetro (AM), foi sobreposto um sistema teste de pontos sobre as imagens de 10 cortes de cada segmento (P e D) corados com HE, projetadas na tela do computador, obtidas de cada animal de todos os grupos (100 cortes/grupo) (Figura 12).

Após a contagem dos pontos incidentes na mucosa, determinou-se a AM por meio da seguinte equação (REED; HOWARD, 1998):

$$AM = \sum p. a/p$$

onde,

$\sum p$ = somatória do número de pontos que incidem sobre a estrutura;

a/p = área por ponto.

Figura 12 - Mensuração da mucosa intestinal

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Esquema da metodologia de mensuração da AM, utilizando o programa Axiovision projetado na tela do computador.

4.8.6 Determinação da área interna (AI), área externa (AE) e área da parede intestinal (AP)

Em 10 cortes de cada segmento (P e D) corados com HE, a AI e a AE da parede do intestino grosso foram determinadas em imagens obtidas com o uso do sistema previamente descrito (item 4.8.2), projetadas na tela do computador obtidas de cada animal de todos os grupos (100 cortes/grupo). A AP foi obtida subtraindo-se a AE da AI (Figura 13).

Figura 13 - Mensuração da área da parede, área interna e área externa do intestino grosso

↔ Área da parede (AP)

— Área interna (AI)

— Área externa (AE)

□ Mucosa

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Esquema da metodologia de mensuração da AP, AI e AE, utilizando o programa Axiovision projetado na tela do computador.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média $\pm$ DP. Os **dados metabólicos** foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com dois fatores: grupo (NN, DM, NM e RM) e semanas (S1 e S2), sendo medidas repetidas em semanas, seguida por comparações múltiplas pelo método de

MATERIAIS E MÉTODOS

Bonferroni. Dados referentes à **AS** e **NTN** foram submetidos à ANOVA com dois fatores: grupo (NN, DM e NM) e idade (21d e 42d), e à análise de variância com um fator: grupo (NN42, DM42, NM42 e RM42), ambos seguidos por comparações múltiplas pelo método de Tukey quando necessário. Em relação aos demais parâmetros do estudo, **DNN**, **APN**, **AM**, **AI** e **AE** e **AP** a análise estatística foi realizada empregando-se ANOVA com três fatores: grupos (NN, DM e NM), idade (21d e 42d) e região do intestino grosso (proximal e distal) como fator de medida repetida. Empregou-se também ANOVA dois fatores: grupo (NN42, DM42, NM42 e RM42) e região do intestino grosso (proximal e distal) como fator de medida repetida. Em ambos os casos, quando necessário, prosseguiu-se com comparações múltiplas pelo método de Bonferroni. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$ (ZAR, 1984).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE QUALITATIVA

A seguir, foram avaliados os aspectos morfológicos, estruturais e ultraestruturais dos segmentos proximal e distal do intestino grosso nos diferentes grupos experimentais de 21 dias (NN, DM e NM) e 42 dias (NN, DM, NM e RM)

5.1.1 Microscopia de luz

5.1.1.1 Morfologia da parede e mucosa intestinal

Ao se avaliar as secções transversais coradas pelo método de hematoxilina-eosina verificou-se, de modo geral, que todos os grupos experimentais apresentaram as camadas musculares (longitudinal e circular), submucosa e mucosa características. Com relação à mucosa, em todos os grupos, foi possível observar a ausência de vilosidades e a presença de dobras. As dobras encontradas no intestino grosso não são permanentes, e são formadas pela contração local da camada muscular, com consequente penetração da submucosa. Ademais, observou-se a presença de grande quantidade de glândulas intestinais tubulares retas ou criptas intestinais (criptas de Lieberkühn) com grande quantidade de células caliciformes, que se estenderam através da espessura completa da mucosa. (Figura 14).

Nos animais de 42 dias (Figuras 14A-D), ocorreu um aumento aparente da espessura das camadas muscular e mucosa quando comparados aos seus respectivos grupos de 21 dias (Figuras 14E-G). Entre os animais de 42 dias, a camada muscular mais espessa foi observada nos grupos NN e NM (Figuras 14A e 14C), comparativamente aos demais grupos (Figuras 14B e 14D). Entre os animais de 21 dias, somente no grupo DM evidenciou-se diminuição das camadas musculares e mucosa quando comparado aos grupos NN e NM (Figuras 14E e 14G).

RESULTADOS

Figura 14 - Aspecto geral da morfologia do intestino grosso nos diferentes grupos experimentais

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Morfologia da parede, mucosa e luz do segmento distal do intestino grosso nos grupos de 21 dias (NN, DM e NM) e 42 dias (NN, DM, NM e RM). (HE. Barra de calibração: 200 μ m).

RESULTADOS

Nas figuras 15 e 16 evidenciam-se os aspectos das camadas musculares, submucosa e mucosa, bem como a conformação e distribuição dos gânglios do plexo mioentérico nos segmentos P e D do intestino grosso. Em todos os grupos, independente do segmento (P e D) e idade (21 dias e 42 dias), observou-se bem preservadas, as características das camadas musculares, submucosa e mucosa.

Ao se analisar a camada muscular longitudinal, notou-se o padrão circular de suas células com núcleos em disposição central (Figuras 15A-C e 16A-C). Já a camada muscular circular, caracterizou-se por apresentar fibras musculares lisas e núcleos com aspecto alongado característico (Figuras 15A-C e 16A-C).

De forma mais detalhada, foi possível identificar entre as camadas musculares (longitudinal e circular) o plexo mioentérico (de Auerbach), responsável pela sua inervação, caracteristicamente constituído por corpos neuronais com núcleos grandes e arredondados, cercados por células com núcleo de menor tamanho, as células satélites (ou gliais). O plexo submucoso (de Meissner), responsável pela inervação da mucosa, foi também identificado na forma de pequenos gânglios, ora na transição entre as camadas muscular circular e submucosa, ora na musculatura circular (Figuras 16C). Vale ressaltar que as mesmas características encontradas no segmento proximal, aplicam-se ao segmento distal.

A camada submucosa se mostrou de maneira regular em todos os grupos, apresentando tecido conectivo, alguns agregados de adipócitos e vasos sanguíneos (Figuras 15A, 15B e 16A-C). Como característica, a mesma projetava-se em direção à mucosa, formando um eixo central de tecido conectivo no interior das dobras temporárias da mucosa do intestino grosso (Figuras 15A, 15D e 16D).

Relativamente à mucosa notou-se, em todos os grupos experimentais, a ausência de pregas e vilos em sua superfície. Entretanto, dobras temporárias foram detectadas, formadas pela contração local da camada muscular (Figuras 15D e 16D). O padrão característico, foi evidenciado em todos os grupos, isto é, a presença de um revestimento de epitélio simples cilíndrico (Figuras 15D-F e 16D), uma lâmina própria com tecido conjuntivo frouxo, células musculares lisas e células livres do tecido conjuntivo (Figuras 15B, 15E, 15F e 16B, 16D, 16E), e uma muscular da mucosa, de difícil visualização nos espécimes aqui avaliados.

Numerosas glândulas intestinais tubulares retas, ou criptas intestinais (criptas de Lieberkühn) com elevada quantidade de células caliciformes, uma luz central, e células enteroendócrinas em sua base foram observadas, estendendo-se através da espessura da mucosa. (Figuras 15A, 15B, 15D-F e 16B, 16D-F).

RESULTADOS

Também puderam ser observadas, em todos os grupos, as placas de Peyer, um agregado de nódulos linfóides que participam do sistema imunológico intestinal e ocupam boa parte da lâmina própria da mucosa e da submucosa (Figuras 15F e 16F).

Figura 15 - Características estruturais do segmento proximal do intestino grosso

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Camada muscular longitudinal (ML), camada muscular circular (MC), submucosa (SM), mucosa (MUC), plexo mioentérico (➡), núcleos das células musculares lisas (*), criptas intestinais com perfil transversal circular (CIC), lâmina própria (LP), células caliciformes (*), luz das criptas intestinais (*), células livres do tecido conectivo na lâmina própria(*), luz intestinal (L), plexo submucoso (↪), dobra da mucosa (retângulo pontilhado), onde é possível observar as criptas intestinais em corte longitudinal (CIL) e a superfície da mucosa, recoberta pelo epitélio simples cilíndrico (↗), células enteroendócrinas do sistema neuroendócrino difuso (➡), lâmina própria (LP), células musculares lisas (→). Notar a placa de Peyer (PP), agregados de folículos linfóides que participam do sistema imunológico intestinal. (HE. Barra de calibração: A,B: 20 µm; C,E: 10 µm; D,F: 50 µm

Figura 16 - Características estruturais do segmento distal do intestino grosso

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Camada muscular longitudinal (ML), camada muscular circular (MC), submucosa (SM), mucosa (MUC), plexo mioentérico (➡), núcleos das células musculares lisas (*), criptas intestinais com perfil transversal circular (CIC), lâmina própria (LP), células caliciformes (*), luz das criptas intestinais (*), células livres do tecido conectivo na lâmina própria (*), luz intestinal (L), plexo submucoso (➡), dobra da mucosa (retângulo pontilhado), onde é possível observar as criptas intestinais em corte longitudinal (CIL) e a superfície da mucosa, recoberta pelo epitélio simples cilindrico (), células enteroendócrinas do sistema neuroendócrino difuso () e as células musculares lisas (→). Notar a placa de Peyer (PP), agregados de folículos linfóides que participam do sistema imunológico intestinal. (HE. Barra de calibração: A,B: 20 µm; C,E: 10 µm; D,F: 50 µm.

5.1.1.2 Avaliação do componente elástico

Em ambos os segmentos, exceto no grupo DM (21, 42), as fibras do sistema elástico foram evidenciadas como componente da cápsula dos gânglios mioentéricos. (Figura 17).

Figura 17 - Avaliação do componente elástico evidenciados pela técnica de resorcina-fucsina (WEIGERT, 1898)

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Aspecto geral dos gânglios do plexo mioentérico dos segmentos proximal do intestino grosso, evidenciados pela técnica de resorcina-fucsina (Weigert, 1898). Sistema elástico envolvendo grupos de neurônios (➡). Região dos gânglios do plexo mioentérico (*). Camada muscular longitudinal (ML). Camada muscular circular (MC). (Barra de calibração: 20 µm).

5.1.1.3 Avaliação do componente colágeno

Relativamente às fibras colágenas, observou-se que as mesmas faziam parte da estrutura da cápsula ganglionar, de onde partiam septos delgados em direção ao interior do gânglio, separando os neurônios entre si. Essa conformação só foi devidamente detectada nos animais com 42 dias (NN, DM, NM, RM), onde as fibras do tipo I distinguiram-se nas cores vermelha, laranja, amarela, e as do tipo III, na cor verde.

Ao se comparar os grupos entre si, as fibras do tipo I predominaram nos grupos NN, DM e NM, sendo a maior densidade das fibras do tipo III verificada no grupo RM (Figura 18).

Figura 18 - Avaliação do componente colágeno evidenciado pela técnica do Picro-sírius (JUNQUEIRA et al., 1979)

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Fotomicrografia do plexo mioentérico do segmento proximal do intestino grosso nos grupos de 42 dias. Observar os grupos NN42 (A), DM42 (B) e NM42 (C), onde predominaram as fibras colágenas do tipo I (vermelha, laranja e amarela) e o grupo RM42 (D), com predomínio das fibras colágenas do tipo III (verdes). Notar a região dos gânglios do plexo mioentérico (*). (Barra de calibração: 20 μm).

5.1.1.4 Morfologia dos gânglios do plexo mioentérico reativos à NADH-d e NADPH-d

No que se refere ao aspecto geral da conformação e distribuição dos gânglios do plexo mioentérico reativos à NADH-d, independente do segmento e da idade dos animais, todos os grupos experimentais apresentaram características em comum, ou seja, gânglios de diferentes tamanhos e formas contendo quantidade variável de neurônios, paralelos entre si, alinhados perpendicularmente ao longo do eixo do intestino, e algumas vezes interconectando-se através de suas extremidades (Figuras 19A, 19C, 19E, 19H e 20C). Quanto à forma, todos os grupos exibiram gânglios triangulares (Figuras 19F e 20F), trapezoidais, semilunares ou circulares (Figuras 19G, 20D, 20H).

Ao se avaliar os neurônios mioentéricos, independente da região e grupo estudado, idade dos animais, os mesmos apresentaram-se com formatos alongados, ovalados e arredondados, e de tamanhos grandes, médios e pequenos. Os neurônios grandes destacaram-se por exibir reatividade citoplasmática intensa e homogênea, contornos regulares e núcleo excêntrico, poucas dessas células exibiram citoplasma irregular e zonas translúcidas, sugestivas de vacuolização (Figuras 19 e 20). Sob esse aspecto, os neurônios médios, com contornos e formatos irregulares, exibiram reatividade citoplasmática moderada ou fraca. Esta última característica predominou nos neurônios pequenos, independente da região e grupo (Figuras 19 e 20). Gânglios com poucos espaços em seu interior, sugestivo da ausência de neurônios foram também observados em todos os grupos estudados (Figuras 19 e 20).

Figura 19 - Componentes do plexo mioentérico no segmento proximal do intestino grosso evidenciados pela reação da NADH-d

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Aspecto geral dos gânglios do plexo mioentérico do segmento proximal do intestino grosso, evidenciados pela reação da NADH-d. (A) Gânglios com aspecto alongado e paralelo entre si contendo quantidade variável de neurônios. (B) Neurônios com citoplasma fortemente marcados, contornos regulares e núcleos excêntricos (). Notar espaços no interior do gânglio, não sendo possível detectar nitidamente a presença de neurônios (*). (C) Gânglios com aspecto alongado e paralelos entre si. Notar espaços no interior do gânglio, não sendo possível detectar nitidamente a presença de neurônios (*), neurônios fracamente marcados () e pequenos neurônios ou células gliais (). (D) Gânglio com neurônios de citoplasma fortemente marcado, contorno regular e núcleo excêntrico (), com formatos alongados, arredondados e ovalados. (E) Gânglios com aspecto alongado e paralelo entre si contendo quantidade variável de neurônios. Notar a fusão de dois neurônios (seta branca) e a união de dois gânglios em uma de suas extremidades por meio de uma alça (→). Ainda, a presença de neurônios grandes, médios e pequenos () e células gliais (), foram observados. (F) Gânglio com aspecto triangular. Observar a presença de espaços no gânglio (*) e neurônios fracamente marcados (). (G) Gânglio com aspecto de semilua. (H) Gânglios com aspecto alongado e paralelo entre si contendo quantidade variável de neurônios, unidos por meio de uma alça (→). (Barra de calibração: A,C,E,H: 50 µm, B: 10 µm; D,F,G: 20 µm).

Figura 20 - Componentes do plexo mioentérico no segmento distal do intestino grosso evidenciados pela reação da NADH-d

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Aspecto geral dos gânglios do plexo mioentérico do segmento distal do intestino grosso, evidenciados pela reação da NADH-d. **(A)** Gânglio de contorno irregular contendo espaços em seu interior (*) e neurônios pequenos ou células gliais (Σ). **(B)** Neurônios grandes, médios e pequenos (➤). Notar a presença de neurônios pequenos ou células gliais (Σ). **(C)** Gânglios com aspecto alongado e paralelos entre si. **(D)** Gânglio com aspecto trapezoidal. Notar os espaços entre os neurônios (*) e a presença de um espaço circular na região central do gânglio (asterisco branco). **(E)** Gânglio apresentando neurônios com citoplasma fortemente marcados, contorno regular e núcleo excêntrico (➡), grande quantidade de neurônios fracamente marcados. Ainda, a fusão de quatro neurônios (seta branca) e a presença de pequenos neurônios ou células gliais (Σ), são observados. **(F)** Gânglio com aspecto triangular. Observar a presença de espaços no gânglio (*), neurônios fracamente marcados (◊) e neurônios pequenos ou células gliais (Σ). **(G)** Gânglio apresentando neurônios com citoplasma fortemente marcados, contorno regular e núcleo excêntrico (◊) e neurônios pequenos ou células gliais (Σ). **(H)** Gânglio com aspecto circular mostrando um espaço circular em seu interior. Notar a presença de neurônios fracamente marcados (◊) e espaços entre os neurônios (*). (Barra de calibração: A,C,E,H: 50 µm; B: 10 µm; D,F,G: 20 µm).

RESULTADOS

De maneira geral, nos dois segmentos e em todos os grupos, quando se avalia a reatividade à NADPH-d, gânglios de tamanhos, formatos e número variado de neurônios nitrérgicos foram observados, contendo espaços pequenos e grandes, indicativo da presença de neurônios não nitrérgicos. Neurônios forte e fracamente reativos, com contorno típico de células multidendríticas, citoplasma volumoso e núcleos redondos ou ovalados também foram detectados em todos os grupos, não se evidenciando aspectos que pudessem diferenciar os grupos quanto a essas características. Nos dois segmentos e em todos os grupos experimentais, foram detectadas as malhas primária (algumas vezes com corpos neuronais em seu interior), secundária e terciária do plexo mioentérico. Também quanto a esse aspecto, não se evidenciou diferenças significativas entre os grupos (Figuras 21 e 22).

Figura 21 - Componentes do plexo mioentérico no segmento proximal do intestino grosso evidenciados pela reação da NADPH-d

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Componentes do plexo mioentérico do segmento proximal do intestino grosso, evidenciados pela reação da NADPH-d. (A) Gânglios com aspecto alongado e paralelos entre si, contendo espaços em seu interior e com neurônios forte e fracamente marcados. Notar a presença de malhas primária e secundária. (B) Neurônios nitrérgicos com contorno típico de células multidendríticas, citoplasma volumoso e núcleos redondos ou ovalados (). Neurônios fracamente marcados (seta branca). Notar o espaço no interior do gânglio, correspondente a neurônios não nitrérgicos circundados por prolongamentos com varicosidades (*). (C) Gânglio com neurônios fracamente marcados (seta branca). É possível observar ainda, as malhas primária, secundária e terciária. (D) Neurônio fracamente marcado (seta branca) e prolongamento terminal (). (E) Neurônio com seu prolongamento terminal (). (F) Corpos neuronais isolados nas malhas do plexo mioentérico (). (G) Neurônios nitrérgicos com contorno típico de células multidendríticas, citoplasma volumoso e núcleos redondos ou ovalados (). Neurônio com seu prolongamento terminal (). (H). As malhas primária (I), secundária (II) e terciária (III), foram detectadas em todos os grupos estudados. Corpos neuronais isolados nas malhas do plexo mioentérico (). (Barra de calibração: A,H: 50 µm; B: 10 µm; C,D,E,F,G: 20 µm).

Figura 22 - Componentes do plexo mioentérico no segmento distal do intestino grosso evidenciados pela reação da NADPH-d

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Componentes do plexo mioentérico do segmento distal do intestino grosso, evidenciados pela reação da NADPH-d. (A) Neurônios fusionados (asterisco branco). Corpo neuronal isolado nas malhas do plexo mioentérico (↗). (B) Neurônios nitrérgicos com contorno típico de células multidendríticas, citoplasma volumoso e núcleos redondos ou ovalados (➡). Notar o espaço no interior do gânglio, correspondente a neurônios não nitrérgicos circundados por prolongamentos com varicosidades (*). (C) Gânglio em formato circular com espaços em seu interior, correspondente a neurônios não nitrérgicos e corpos neuronais isolados. (D) Gânglio com espaços em seu interior, correspondente a neurônios não nitrérgicos. Notar neurônio com seu prolongamento terminal (↗). (E) Corpo neuronal isolado nas malhas do plexo mioentérico (↗). (F) Corpo neuronal isolado nas malhas do plexo mioentérico (↗). Neurônio fracamente marcado (seta branca). Espaço no interior do gânglio (*). (G) Neurônios nitrérgicos com contorno típico de células multidendríticas (↗). Neurônio fracamente marcado (seta branca). (H). Observar as malhas primária (I), secundária (II) e terciária (III). Neurônio fracamente marcado (seta branca). (Barra de calibração: 20 µm).

5.1.1.5 Morfologia dos gânglios do plexo mioentérico: imunohistoquímica para ChAT, SP e VIP

Nas figuras 23, e 24 estão representadas, respectivamente, a imunorreatividade dos neurônios mioentéricos à ChAT, à SP e ao VIP. Tanto no segmento proximal, como distal, foram observadas diferenças significativas principalmente entre os animais dos grupos NN e DM.

Relativamente à ChAT, foram detectados neurônios imunorreativos nos animais do grupo DM, porém, estes concentravam-se preferencialmente em gânglios pequenos. A característica para os gânglios grandes desse grupo, foi a de pouca quantidade de neurônios com imunorreatividade positiva, ao contrário do observado nos gânglios do grupo NN, onde, pelo menos a metade do gânglio era ocupada por neurônios imunorreativos (Figura 23).

Figura 23 - Fotomicrografias exibindo a imunorreatividade do plexo mioentérico do intestino grosso ao ChAT

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Neurônios mientéricos imunorreativos à ChAT nos grupos NN (A,B) e DM (C1, C2, D). Notar a quantidade maior de neurônios imunorreativos nos gânglios grandes dos animais nutridos (setas longas). No grupo DM, predominou a pequena quantidade de neurônios imunorreativos (C1, D), cuja maior concentração foi observada preferencialmente nos gânglios pequenos (C2). Ambos os grupos exibiram espaços, característicos de neurônios sem reatividade (setas curtas), e elevada quantidade de varicosidades (setas duplas). (Barra de calibração: 40 μ m).

RESULTADOS

Também para a SP e o VIP, muito embora em determinados trechos do grupo DM tenham sido detectados gânglios com elevada quantidade de neurônios imunorreativos para esses mediadores, aparentemente a maior proporção dessas células foi observada nos animais do grupo NN (Figura 24).

Figura 24 - Fotomicrografias exibindo a imunorreatividade do plexo mioentérico do intestino grosso à Substância P e ao VIP

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Neurônios mientéricos imunorreativos à SP e ao VIP (setas longas), nos grupos NN (A, C) e DM (B, D). Notar a quantidade maior de neurônios imunorreativos no grupo NN, comparativamente ao grupo DM. Em ambos os grupos, foram detectados espaços contendo neurônios não reativos (seta curta), e varicosidades (seta dupla). (Barra de calibração: 40 μ m).

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

5.2.1 De Transmissão

A análise dos aspectos ultraestruturais de algumas organelas dos neurônios mioentéricos permitiu destacar diferenças nos grupos estudados, mormente aos 42 dias.

Assim, nos nucléolos, quanto aos materiais que o constituem, a eletrondensidade evidente do material fibrilar no grupo nutrido (NN42), foi pouco destacada nos grupos DM42 e NM42, e parcialmente recuperada no grupo RM42. O material granular predominou no grupo NM42, e foi decrescendo proporcionalmente nos grupos DM42, RM42, e NN42.

Nos grupos NN42 e DM42 a membrana nuclear exibiu contornos regulares, e a cromatina nuclear, com alguns pontos eletrondensos. Comparativamente, nos grupos NM42 e RM42, destacou-se o contorno irregular da membrana nuclear, e a distribuição homogênea da cromatina nuclear.

Embora aparentemente reduzidas em número no grupo RM42, não se pode afirmar que existam diferenças significativas entre os grupos, quanto às vesículas granulares e agranulares das terminações nervosas (Figura 25).

RESULTADOS

Figura 25 - Micrografia eletrônica de transmissão (MET) do segmento distal do intestino grosso de ratos

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: (A, D, G, J) Aspecto geral do núcleo de um neurônio. A membrana nuclear (seta preta) e a cromatina nuclear (*) podem ser observadas. (B, E, H, K) Aspecto geral do nucléolo dos núcleos dos neurônios. O material granular (g) e fibrilar (f) estão presentes em todos os grupos. (C, F, I, L) Aspecto geral das terminações nervosas, onde são observadas as vesículas granulares (seta branca) e agranulares (cabeça de seta) (Barra de calibração: A,B,D,E,H,I,K,: 0,5 μ m; F,L: 1 μ m; C,G,J:2 μ m)

5.2.2 De Varredura

O aspecto tridimensional da mucosa no segmento proximal dos grupos NN (21 e 42) e DM (21 e 42) são exibidos na figura 26.

Comparativamente, aos 21 dias, nota-se que a superfície da mucosa dos animais nutridos (NN) é plana e que as aberturas das criptas intestinais são de fácil identificação. Aos 42 dias, o aspecto característico de “giros” é bem evidente nos animais nutridos (NN). Além disso, as aberturas das criptas intestinais no grupo NN são maiores, em menor número e mais organizadas.

Figura 26 - Eletromicrografia de varredura da superfície do segmento proximal do intestino grosso de ratos

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Notar no grupo DM42, a produção de muco pelas células caliciformes. (Barra de calibração: A, B, C, D:30 μ m).

5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA

Neste item, avaliou-se em todos os grupos experimentais de 21 dias (NN, DM e NM) e 42 dias (NN, DM, NM e RM), os parâmetros relativos ao **peso e comprimento do animal; comprimento e áreas total do intestino, da mucosa, e interna e externa da parede intestinal**). Também foram comparados os **dados metabólicos (massa corporal, ingestão alimentar, ingestão de água, excreção de urina e excreção de fezes)**, e a **densidade numérica neuronal, área do perfil do corpo neuronal e o número total estimado de neurônios** reativos à NADH-d e NADPH-d.

5.2.1 Aspectos Gerais

Na Tabela 2 e Figura 27 estão expressos os parâmetros relativos ao peso e comprimento do animal, e comprimento (CI) e área total do intestino (ATI).

Considerando o fator **peso**, notou-se em todos os grupos, um aumento nos animais de 42 dias em relação aos de 21 dias; também foram detectadas diferenças significativas entre os grupos na mesma faixa etária. Assim, nos animais de 21 dias, ao se analisar o grupo NN, observou-se que a média de peso desses animais foi 67,2% maior que a do grupo DM, e 18,3% maior que a do grupo NM; aos 42 dias, o peso do grupo NN exibiu um aumento de 138%, 31,2% e 47,9%, em relação aos grupos DM, NM e RM, respectivamente.

Diferenças estatísticas foram verificadas entre os animais de 21 e de 42 dias, referentes ao **comprimento dos animais**. Considerando os animais de 21 dias, o grupo NN apresentou um comprimento 15,3% e 3,4% maior que os grupos DM e NM, respectivamente; aos 42 dias, ocorreu uma diminuição significativa deste parâmetro no grupo DM em relação aos grupos NN (14,1%), NM (16,5%) e RM (12,5%).

RESULTADOS

Tabela 2 - Aspectos gerais: peso, comprimento do rato, comprimento do intestino, área do intestino nos diferentes grupos experimentais

Grupo	Peso (g)	Comprimento rato (cm)	Comprimento Intestino (cm)	Área intestino (cm ²)
NN21	56,2 ± 5,5	12,0 ± 0,6	6,86 ± 0,66	4,98 ± 0,79 ^b
DM21	33,6 ± 2,8 ^{a, b}	10,4 ± 0,4 ^{a, b}	5,49 ± 0,40 ^a	3,12 ± 0,49 ^a
NM21	47,5 ± 4,7 ^a	11,6 ± 0,4 ^a	6,11 ± 0,63	3,43 ± 0,77
NN42	186,6 ± 5,1 ^α	17,0 ± 0,4 ^α	10,43 ± 1,11 ^β	10,04 ± 0,68 ^{β, b}
DM42	78,4 ± 7,2 ^{α, a, b}	14,6 ± 0,4 ^{α, c}	9,32 ± 0,58 ^{β, a}	8,45 ± 0,92 ^{β, a}
NM42	142,2 ± 15,2 ^{α, a}	17,5 ± 0,5 ^α	9,96 ± 0,85 ^β	9,40 ± 0,53 ^β
RM42	126,1 ± 14,9 ^c	16,7 ± 0,5 ^b	9,75 ± 1,16	9,09 ± 0,75

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Dados expressos em média ± desvio padrão. = ^α 42≠21, p<0,05; ^β= 42≠21, p<0,001. Em 21d: ^a p<0,05 comparado ao NN; ^b p<0,05 comparado ao NM. Em 42d: ^a p<0,05 comparado ao NN; ^b p<0,05 comparado ao NM; ^c p<0,05 comparado a todos os grupos.

Em relação ao **CI**, verifica-se na figura 27 que houve diferença significativa quando se comparou os animais de 21 dias com os de 42 dias, p<0,001. Em ambas as faixas etárias, o grupo nutrido (NN) apresentou um comprimento intestinal maior quando comparado, respectivamente aos grupos DM21 (24,9%) e DM42 (11,8%), p<0,05 (Figura 27).

RESULTADOS

Figura 27 Representação gráfica da média e desvio padrão do comprimento do intestino (cm) nos diferentes grupos experimentais

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Independentemente da idade, o grupo NN apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos DM e NM, $p < 0,05$. Os grupos NN, DM e NM apresentaram diferenças significativas entre 21d e 42d, $p < 0,05$.

Ao se considerar a **ATI**, esse parâmetro foi significativamente maior nos grupos de 42 dias, comparativamente aos de 21 dias, $p < 0,001$. Entre os animais de 21 dias, a ATI do grupo NN foi maior 59,4% do que o grupo DM, e 45,1% do que o grupo NM. Da mesma forma, aos 42 dias, o grupo NN mostrou um aumento de 18,7% e 6,8% em relação aos grupos DM e NM (Figura 28)

Figura 28 - Representação gráfica da média e desvio padrão da área total do intestino (cm^2) nos diferentes grupos experimentais

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Independentemente da idade, o grupo NN apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo DM, $p < 0,05$. Os grupos NN, DM e NM apresentaram diferenças significativas entre 21d e 42d, $p < 0,001$.

5.2.2 Dados Metabólicos

Na tabela 4 estão expressos os valores relativos a esses parâmetros, na primeira (S1) e terceira (S3) semanas de avaliação.

Tabela 3 - Avaliações Metabólicas nas semanas S1 e S3 dos animais dos grupos NN, DM, NM e RM

		NN	DM	NM	RM
Massa Corporal (g)	S1	77,09±3,31 ^{a,b,c}	36,87±1,90 ^d	61,46±4,05 ^f	35,47±0,67
	S3	154,04±4,03 ^{§, a, b, c}	61,99±7,19 ^{§, d, e}	122,78±7,07 ^{§, f}	91,50±3,30 [§]
Ingestão Alimentar (g)	S1	9,90±0,61 ^{a, b, c}	5,96±1,20 ^d	6,93±1,26	5,82±1,44
	S3	154,04±4,03 ^{*, a, b, c}	61,99±7,19 ^{*, d}	12,37±1,27 [*]	10,69±1,00 [*]
Ingestão de Água (g)	S1	12,39±2,21	8,64±1,78 ^d	12,49±2,42	9,04±1,15
	S3	21,81±2,57 [*]	21,55±9,19 ^{*, d}	31,15±7,09 [*]	26,25±7,75 [*]
Excreção de Urina (g)	S1	4,43±1,83	2,79±0,87 ^d	5,92±1,80	2,79±0,78
	S3	10,71±1,34 [§]	8,81±6,77 ^{§, d}	17,88±5,99 [§]	13,77±6,35 [§]
Excreção de Fezes (g)	S1	1,04±0,12 ^{b, c}	0,71±0,15	0,53±0,18	0,58±0,16
	S3	1,72±0,29 ^{§, a, c}	1,26±0,24 [§]	1,47±0,37 ^{§, f}	1,06±0,17 [§]

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Dados expressos em média ± desvio padrão. ^a = S3≠S1, p<0,05; ^{*} = S3≠S1, p<0,001; ^aNN≠DM, p<0,05;

^bNN≠NM, p<0,05; ^cNN≠RM, p<0,05; ^dDM≠NM, p<0,05; ^eDM≠RM, p<0,05 e ^fNM≠RM, p<0,05.

Ao avaliar a **massa corporal**, houve um aumento significativo de S1 para S3 em todos os grupos experimentais. Em S1, o grupo NN apresentou uma massa corporal 109%, 25,4% e 117,3% maior quando comparado aos grupos DM, NM e RM, respectivamente. Da mesma forma, em S3, o ganho de massa corporal no grupo NN foi maior quando comparado aos grupos DM (148,5%), NM (25,5%), e RM (68,3%), (p<0,05) (Figura 29A; Tabela 3).

Com relação à **ingestão alimentar**, em todos os grupos, houve um aumento do consumo de ração entre S1 e S3 (p<0,001) onde, em S1, o grupo NN apresentou uma ingestão alimentar 66%, 42,8% e 70% maior quando comparado aos grupos DM, NM e RM, respectivamente. Em S3, a ingestão do grupo NN foi 52,8%, 16,8% e 35,1% maior que a dos grupos DM, NM e RM respectivamente (Figura 29B; Tabela 3).

De S1 para S3, a **ingestão de água** aumentou significativamente em todos os grupos, p<0,001, existindo, portanto, efeito de interação entre grupo e semana. Assim, grupo que mais

RESULTADOS

consumiu água foi o RM (190,2%), seguido pelos grupos NM (149,4%); DM (149,2%), e NN (75,9%) (Figura 29C; Tabela 3).

Figura 29 - Representação gráfica da média e desvio padrão da massa corporal (g), ingestão alimentar (g), ingestão de água (g), excreção de urina (g) e excreção de fezes dos animais dos grupos NN, NM, RM e DM, submetidos às gaiolas metabólicas nas semanas S1 e S3

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: **(A)** Em todos os grupos, $S3 \neq S1$, $p < 0,05$. Em S1, apenas os grupos DM e RM não apresentaram diferença significativa entre si, $p > 0,05$. Em S3, foi detectada diferença significativa entre todos os grupos, $p < 0,05$. **(B)** Independente do grupo, $S3 \neq S1$, $p < 0,001$. Independente da semana, os grupos NM, RM e DM apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo NN, $p < 0,05$. O grupo DM apresentou diferença significativa em relação ao grupo NM, $p < 0,05$. **(C)** Independente do grupo, $S3 \neq S1$, $p < 0,001$. Independente da semana, o grupo DM apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo NM, $p < 0,05$. **(D)** Independente do grupo, $S3 \neq S1$, $p = 0,030$. Independente da semana, o grupo DM apresentou diferença significativa em relação ao grupo NM, $p < 0,05$. **(E)** Em todos os grupos, $S3 \neq S1$, $p < 0,05$. Em S1, os grupos NM e RM apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo NN, $p < 0,05$. Em S3, o grupo RM apresentou diferença significativa em relação aos grupos NN e NM, e o grupo DM apresentou diferença significativa em relação ao grupo NN, $p < 0,05$.

RESULTADOS

Ao se avaliar o volume de **excreção de urina**, observou-se de S1 para S3, um grande aumento neste parâmetro em todos os grupos experimentais, $p=0,030$. Todavia, entre os grupos, a única diferença estatística observada foi a maior excreção de urina do grupo NM quando comparado ao grupo DM, ou seja, 111,9% em S1 e 103% em S3 (Figura 29D; Tabela 3).

A **excreção de fezes** aumentou de maneira significativa em todos os grupos experimentais entre S1 e seus correspondentes de S3. Em S1, esse parâmetro para o grupo NN foi 94,4% e 78,8%, comparativamente aos grupos NM e RM. Em S3, o grupo NN excretou, respectivamente, 35,9% e 61,7% mais fezes do que os grupos DM e RM (Figura 29E; Tabela 3).

5.2.3 Características morfométricas do intestino grosso

Os dados relativos à área externa da parede (AE); área interna da parede (AI); área da parede (AP) e área da mucosa (AM) dos segmentos P e D do intestino grosso de todos os grupos de 21 e de 42 dias estão expressos nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Área externa e área interna da parede intestinal (mm^2)

Grupos	Área Externa (mm^2)		Área Interna (mm^2)	
	Proximal	Distal	Proximal	Distal
NN21	5,410 $\pm$ 1,339 ^{a, b}	4,828 $\pm$ 0,708 ^{a, b}	4,011 $\pm$ 1,290 ^{a, b}	3,785 $\pm$ 0,888 ^{a, b}
DM21	2,090 $\pm$ 0,174 ^d	2,388 $\pm$ 0,187 ^d	1,570 $\pm$ 0,130 ^d	1,891 $\pm$ 0,081 ^d
NM21	3,397 $\pm$ 0,565	3,830 $\pm$ 1,085	2,491 $\pm$ 0,457	2,820 $\pm$ 0,907
NN42	11,362 $\pm$ 1,401 ^{§, a1}	11,145 $\pm$ 1,548 ^{§, a1}	8,143 $\pm$ 1,369 ^{§, a1}	7,582 $\pm$ 1,563 ^{§, a1}
DM42	8,861 $\pm$ 1,088 [§]	8,407 $\pm$ 1,126 [§]	6,749 $\pm$ 0,756 [§]	6,610 $\pm$ 1,152 [§]
NM42	9,196 $\pm$ 1,729 ^{§, b1}	8,772 $\pm$ 1,545 ^{§, b1}	6,314 $\pm$ 1,664 ^{§, b1}	6,152 $\pm$ 1,229 ^{§, b1}
RM42	8,891 $\pm$ 1,418 ^c	10,190 $\pm$ 1,388 ^c	6,238 $\pm$ 1,398 ^c	7,849 $\pm$ 1,770 ^c

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. [§] = 42 dias $\neq$ 21 dias, $p<0,05$. Em 21 dias: ^aNN $\neq$ DM, $p<0,05$; ^bNN $\neq$ NM, $p<0,05$; ^dDM $\neq$ NM, $p<0,05$. Em 42 dias: ^{a1}NN $\neq$ DM, $p<0,05$; ^{b1}NN $\neq$ NM, $p<0,05$; ^cNN $\neq$ RM, $p<0,05$.

RESULTADOSTabela 5 - Área da parede e área da mucosa intestinal (mm²)

Grupos	Área da Parede (mm ²)		Área da Mucosa (mm ²)	
	Proximal	Distal	Proximal	Distal
NN21	1,400±0,095 ^a	1,043±0,194	3,566±0,059	3,497±0,296
DM21	0,519±0,078	0,497±0,172	1,175±0,150	1,220±0,099
NM21	0,906±0,118	1,011±0,192	2,358±0,301	2,475±0,340
NN42	3,219±0,077 ^{§,a1,b1}	3,564±0,148 ^{§, a1,b1}	6,781±0,474	6,462±0,366
DM42	2,111±0,564 ^{§,d,e}	1,797±0,288 ^{§,d,e}	3,049±0,176	3,480±0,229
NM42	2,882±0,138 [§]	2,620±0,326 [§]	4,954±0,350	4,946±0,260
RM42	2,653±0,283 ^c	2,341±0,455 ^c	4,065±0,540	4,088±0,336

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Dados expressos em média ± desvio padrão. [§] = 42 dias ≠ 21 dias, p<0,05. Em 21 dias: ^aNN≠DM, p<0,05; ^bNN≠NM, p<0,05; ^dDM≠NM, p<0,05. Em 42 dias: ^{a1}NN≠DM, p<0,05; ^{b1}NN≠NM, p<0,05; ^cNN≠RM, p<0,05; ^dDM≠NM, p<0,05; ^eDM≠RM.

Em todos os grupos, a **AE** dos animais de 42 dias foi significativamente maior em relação aos seus correspondentes de 21 dias, independente do segmento (P e D). Aos 21 dias, o grupo NN destacou-se por apresentar uma área maior do que a verificada para os grupos DM e NM, também independente do segmento. Também nos animais de 42 dias, esse parâmetro foi maior nos segmentos P e D do grupo NN, em relação aos demais grupos experimentais (DM, NM e RM) (Figura 30A; Tabela 4).

Em todos os grupos experimentais, relativamente aos dados de **AI**, os animais de 42 dias exibiram um aumento quando comparados aos animais de 21 dias, independente dos segmentos (P e D). Na faixa etária de 21 dias, a maior área foi verificada no grupo NN, independente do segmento. Aos 42 dias, a AI do grupo NN foi maior somente quando comparada ao grupo NM (29% no segmento P, e 23,2% no segmento D) (Figura 30B; Tabela 4).

Obtida pela diferença entre a AE e a AI, a **AP** dos diferentes grupos de 42 dias foi maior do que os correspondentes de 21 dias, independente do segmento. Entre os animais de 21 dias, a área do grupo NN foi 169,5% maior do que a do grupo DM, somente no segmento P. Já nos animais de 42 dias, independente do segmento, a maior área foi observada no grupo NN (Figura 30C; Tabela 5).

A análise dos dados da **AM** permitiu verificar, mais uma vez, que esse parâmetro foi significativamente maior nos grupos de 42 dias em relação aos seus correspondentes de 21 dias,

RESULTADOS

independente dos segmentos P e D. Tanto em 21 dias quanto em 42 dias, os animais nutridos (NN) exibiram uma área maior quando comparados aos demais grupos de suas respectivas faixas etárias (Figura 30D; Tabela 5).

Figura 30 - Representação gráfica da média e desvio padrão das áreas externa, interna, da parede e da mucosa do intestino grosso (mm²)

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: (A). Nos grupos DM, NM e NN, 42 dias $\neq$ 21 dias, independentemente das regiões P e D, $p < 0,05$. Em 21 dias, os grupos DM, NM e NN apresentaram diferenças significantes entre si, independentes das regiões P e D, $p < 0,05$. Em 42 dias, os grupos DM, NM e RM apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo NN, independente das regiões P e D, $p < 0,05$. (B). Nos grupos DM, NM e NN, 42 dias $\neq$ 21 dias, independente das regiões P e D, $p < 0,05$. Em 21 dias, os grupos DM, NM e NN apresentaram diferenças significantes entre si, independentes das regiões P e D, $p < 0,05$. Em 42 dias, o grupo NM apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo NN, independente das regiões P e D, $p < 0,05$. (C). Nos grupos DM, NM e NN, 42 dias $\neq$ 21 dias, nas regiões P e D, $p < 0,05$. Em 21 dias, o grupo DM apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo NN, na região proximal, $p < 0,05$. Em 42 dias, apenas os grupos RM e NM não apresentaram diferença significativa entre si, independente das regiões P e D, $p < 0,05$. (D). Nos grupos DM, NM e NN, 42 dias $\neq$ 21 dias, nas regiões P e D, $p < 0,05$. Em 21 dias, os grupos DM, NN e NM apresentaram diferenças significantes entre si, independente da região, $p < 0,05$. Em 42 dias, os grupos DM, NN, NM e RM apresentaram diferenças significantes entre si, independente da região, $p < 0,05$.

5.2.4 Densidade numérica dos neurônios evidenciados pela técnica da NADH-d

Na figura 31 e na Tabela 6 estão expressos os dados correspondentes à DNN nos segmentos P e D do intestino grosso de todos os grupos experimentais das faixas etárias de 21 e de 42 dias.

Ao se considerar o fator idade, verificou-se que em todos os grupos de 21 dias, independente do segmento (P e D) a DNN foi significativamente maior que seus correspondentes de 42 dias. Quanto à densidade entre os animais de 21 dias, diferenças significativas foram detectadas em todos grupos, independente do segmento, o mesmo ocorrendo na faixa etária de 42 dias. A maior DNN, tanto aos 21 como aos 42 dias, foi observada no grupo subnutrido (DM), independentemente do segmento.

Figura 31 - Representação gráfica da média e desvio padrão da densidade neuronal pela técnica de NADH-d, nas regiões P e D do intestino grosso (mm²)

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Os grupos DM, NM e NN apresentaram diferenças significantes entre si em 21 dias, nas regiões P e D, $p < 0,05$. Nos grupos DM, NM e NN, 42 dias $\neq$ 21 dias, independente das regiões P e D, $p < 0,05$. Em 42 dias, os grupos NN, DM, NM e RM apresentaram diferenças significantes entre si, independente das regiões P e D, $p < 0,05$.

RESULTADOSTabela 6 - Densidade numérica neuronal (nº de neurônios/mm²) evidenciados pela técnica de NADH-d nos segmentos P e D do intestino grosso (mm²)

Grupos	Densidade NADH-d (mm ²)	
	Proximal	Distal
NN21	1110,67 ± 10,14 ^{a, b}	1110,67 ± 22,66 ^{a, b}
DM21	1351,23 ± 20,84 ^d	1320,89 ± 27,47 ^d
NM21	1184,36 ± 21,87	1189,77 ± 24,41
NN42	844,11 ± 14,54 ^{§, a1, b1, c}	853,86 ± 10,56 ^{§, a1, b1, c}
DM42	1097,67 ± 23,80 ^{§, d1, e}	1070,58 ± 18,21 ^{§, d1, e}
NM42	898,29 ± 22,14 ^{§, f}	895,04 ± 18,53 ^{§, f}
RM42	938,38 ± 14,54 [§]	934,05 ± 16,52 [§]

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Dados expressos em média ± desvio padrão. § = 42 dias ≠ 21 dias, p<0,05. Em 21d: ^aNN≠DM, p<0,05; ^bNN≠NM, p<0,05; ^dDM≠NM, p<0,05. Em 42 dias: ^{a1}NN≠DM, p<0,05; ^{b1}NN≠NM, p<0,05; ^cNN≠RM, p<0,05; ^{d1}DM≠NM, p<0,05; ^eDM≠RM, p<0,05; ^fNM≠RM, p<0,05.

5.2.5 Número total estimado de neurônios evidenciados pela técnica da NADH-d

As médias (± DP) do NTN de todos os grupos experimentais está representada na figura 32. Nos animais de 21 dias, esse parâmetro foi 35,7% maior no grupo NN quando comparado ao grupo NM. Comparativamente, entre os animais de 21 dias e 42 dias, o grupo que exibiu o maior aumento do NTN foi o DM (119,6%).

Figura 32 - Representação gráfica da média e desvio padrão do NTN pela técnica de NADH-d, nas regiões P e D do intestino grosso

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Os grupos NN, DM e NM apresentaram diferenças significativas entre 21 dias e 42 dias, $p < 0,05$. Em 21 dias o grupo NN apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo NM, $p < 0,05$.

5.2.6 Área do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica NADH-d

Os dados relativos às médias ($\pm$ DP) da APN dos segmentos P e D dos animais de 21 dias e 42 dias estão representados na figura 33 e tabela 7.

Ao se considerar o fator idade, esse parâmetro foi significativamente maior nos grupos de 42 dias, relativamente aos seus correspondentes de 21 dias. Entre os grupos de 21 dias, a APN dos animais NN foi bem maior que a dos grupos DM tanto no segmento P (55,4%), como no segmento D (73,3%). Essa diferença foi mais sutil quando comparada ao grupo NM, ou seja, 7,4% no segmento P, e 4,4% no segmento D.

Aos 42 dias, foi o grupo NN que exibiu a maior APN, independente do segmento. Em todos os grupos dessa faixa etária, independentemente do grupo, o segmento P foi significativamente menor em comparação ao segmento D.

RESULTADOS

Figura 33 - Representação gráfica da média e desvio padrão da área do perfil neuronal pela técnica de NADH-d, nas regiões P e D do intestino grosso (μm^2)

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Nos grupos DM, NM e NN, 42 dias $\neq$ 21 dias, nas regiões P e D, $p < 0,05$. Em 21 dias, o grupo DM apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos NN e NM, nas regiões P e D, $p < 0,05$. Em 42 dias, os grupos DM, NM, RM e NN apresentaram diferenças significantes entre si, nas regiões P e D, $p < 0,05$. Em 42 dias, independente do grupo, $P \neq D$, $p < 0,05$.

Tabela 7 - Área do perfil dos corpos neuronais evidenciados pela técnica de NADH-d nos segmentos P e D do intestino grosso (μm^2)

Grupos	Área do perfil dos corpos neuronais NADH-d (μm^2)	
	Proximal	Distal
NN21	450,686 $\pm$ 15,542	472,326 $\pm$ 9,142
DM21	290,092 $\pm$ 16,227 ^d	272,624 $\pm$ 14,437 ^d
NM21	419,478 $\pm$ 10,459	452,560 $\pm$ 15,364
NN42	774,524 $\pm$ 22,770 ^{\$.a1, b1, c, g}	799,524 $\pm$ 4,275 ^{\$.a1, b1, c}
DM42	422,746 $\pm$ 16,106 ^{\$.d1, e, g}	467,656 $\pm$ 16,336 ^{\$.d1, e}
NM42	695,850 $\pm$ 15,796 ^{\$.f, g}	701,654 $\pm$ 14,155 ^{\$.f}
RM42	542,116 $\pm$ 28,157 ^{\$.g}	599,462 $\pm$ 22,003 ^{\$.g}

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Dados expressos em média $\pm$ DP. ^{\$.} = 42 dias $\neq$ 21 dias, $p < 0,05$. Em 21 dias: ^dDM $\neq$ NM, $p < 0,05$. Em 42 dias: ^{a1}NN $\neq$ DM, $p < 0,05$; ^{b1}NN $\neq$ NM, $p < 0,05$; ^cNN $\neq$ RM, $p < 0,05$; ^{d1}DM $\neq$ NM, $p < 0,05$; ^eDM $\neq$ RM, $p < 0,05$; ^fNM $\neq$ RM, $p < 0,05$. Em 42 dias: ^gP $\neq$ D, $p < 0,05$.

Ao se avaliar a distribuição de frequência (%) da APN dos neurônios dos diferentes grupos reativos à NADH-d expressa no histograma da figura 34, verifica-se que nos animais de

RESULTADOS

21 dias, independente do segmento, a área da maioria dos neurônios concentrou-se entre 400-500 μm^2 nos grupos NN e NM, e entre 200-300 μm^2 no grupo DM. Com relação aos animais de 42 dias, embora no segmento P tenha ocorrido uma tendência da APN dos neurônios concentrarem-se entre 200-500 μm^2 no grupo DM, e entre 400-700 μm^2 no grupo RM, a distribuição foi mais homogênea em relação aos grupos de animais de 21 dias.

Figura 34 - Representação gráfica da frequência (%) dos neurônios NADH-d positivos nas regiões P e D, em 21 dias e 42 dias, encontrados nos intervalos de área do perfil do corpo neuronal

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: (A) Frequência (%) dos neurônios NADH-d na região P dos grupos DM, NM e NN de 21 dias. (B) Frequência (%) dos neurônios NADH-d na região D dos grupos DM, NM e NN de 21 dias. (C) Frequência (%) dos neurônios NADH-d na região P dos grupos DM, NM, NN e RM de 42 dias. (D) Frequência (%) dos neurônios NADH-d na região D dos grupos DM, NM, NN e RM de 42 dias.

5.2.7 Densidade numérica dos neurônios evidenciados pela técnica da NADPH-d

A figura 35 e os dados da Tabela 8 correspondem à DNN nos segmentos P e D do intestino grosso de todos os grupos experimentais.

Ao se considerar o fator idade, em todos os grupos, os animais de 21 dias apresentaram uma DNN significativamente maior que seus correspondentes de 42 dias, independente do

RESULTADOS

segmento. Quanto aos animais de 21 dias, também independente do segmento, esse parâmetro foi maior no grupo DM quando comparado aos grupos NN e NM. Aos 42 dias, tanto no segmento P como no D, todos os grupos apresentaram diferenças significativas entre si.

Figura 35 - Representação gráfica da média e desvio padrão da densidade neuronal pela técnica de NADPH-d, nas regiões P e D do intestino grosso (mm²)

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Os grupos DM, NM, NN e RM apresentaram diferenças significantes entre si, independentemente da idade e da região, $p < 0,05$. Independente do grupo, 42 dias $\neq$ 21 dias, nas regiões P e D, $p < 0,05$. Em 42 dias, a região P $\neq$ da região D, independente do grupo, $p < 0,05$.

Tabela 8 - Densidade numérica neuronal (nº de neurônios/mm²) evidenciados pela técnica de NADPH-d nos segmentos P e D do intestino grosso (mm²)

Grupos	Densidade NADPH-d (mm ²)	
	Proximal	Distal
NN21	331,58 $\pm$ 12,35	339,16 $\pm$ 8,22
DM21	496,28 $\pm$ 42,42	497,37 $\pm$ 45,72
NM21	353,52 $\pm$ 18,44	353,52 $\pm$ 12,01
NN42	165,79 $\pm$ 6,18 ^{\$, a1, b1, c, g}	150,62 $\pm$ 8,90 ^{\$, a1, b1, c}
DM42	264,39 $\pm$ 11,75 ^{\$, d, e, g}	238,39 $\pm$ 9,38 ^{\$, d, e}
NM42	184,21 $\pm$ 6,64 ^{\$, f, g}	177,71 $\pm$ 4,53 ^{\$, f}
RM42	210,22 $\pm$ 4,53 ^{\$, g}	202,63 $\pm$ 6,18 ^{\$}

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. ^{\$} = 42 dias $\neq$ 21 dias, $p < 0,05$. Em 42 dias: ^{a1} NN $\neq$ DM, $p < 0,05$; ^{b1} NN $\neq$ NM, $p < 0,05$; ^c NN $\neq$ RM, $p < 0,05$; ^d DM $\neq$ NM, $p < 0,05$; ^e DM $\neq$ RM, $p < 0,05$; ^f NM $\neq$ RM, $p < 0,05$. Em 42 dias: ^g P $\neq$ D, $p < 0,05$.

5.2.8 Número total estimado de neurônios evidenciados pela técnica da NADPH-d

As médias ($\pm$ DP) do NTN de todos os grupos representadas na figura 36 permitem verificar que, comparando-se os animais de 21 e 42 dias, a única diferença ocorreu no grupo subnutrido (DM), onde esse parâmetro foi significativamente menor aos 21 dias. Entre os animais de 42 dias, o grupo NN apresentou um NTN 25,4% e 11,5% menor quando comparado aos grupos DM e RM, respectivamente.

Figura 36 - Representação gráfica da média e desvio padrão do NTN pela técnica de NADPH-d, nas regiões P e D do intestino grosso

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: O grupo DM apresentou diferença significativa entre 21 dias e 42 dias, $p < 0,05$. Em 42 dias, o grupo DM apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos NN e NM, $p < 0,05$. O grupo RM apresentou diferença significativa em relação ao grupo NN, $p < 0,05$.

5.2.9 Área do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica NADPH-d

Quando se avalia as médias ($\pm$ DP) relativas às APN dos segmentos P e D dos animais de 21 dias e 42 dias representadas na figura 37 e tabela 9 observou-se em todos os grupos que, quanto ao fator idade, esse parâmetro foi significativamente maior nos animais de 42 dias, em relação aos seus correspondentes de 21 dias, independente do segmento.

Entre os grupos com 21 dias, os animais nutridos (NN) exibiram em relação aos animais subnutridos (DM), um aumento da APN de 58,2% no segmento P, e de 41,7% no segmento D.

RESULTADOS

Estatisticamente, ainda nos animais do grupo DM de 21 dias, o segmento P exibiu uma diminuição da APN, quando comparado ao segmento D.

Figura 37 - Representação gráfica da média e desvio padrão da área do perfil neuronal pela técnica de NADPH-d, nas regiões P e D do intestino grosso (μm^2)

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Nos grupos DM, NM e NN, 42 dias $\neq$ 21 dias, nas regiões P e D, $p < 0,05$. Em 21 dias, o grupo DM apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos NN e NM, nas regiões P e D, $p < 0,05$. Em 21 dias, a região P $\neq$ da região D no grupo DM, $p < 0,05$. Em 42 dias, os grupos DM, NM, RM e NN apresentaram diferenças significantes entre si, independente da região, $p < 0,05$.

Tabela 9 - Área do perfil dos corpos neuronais evidenciados pela técnica de NADPH-d nos segmentos P e D do intestino grosso (μm^2)

Grupos	Área do perfil dos corpos neuronais NADPH-d (μm^2)	
	Proximal	Distal
NN21	409,220 $\pm$ 7,283 ^a	398,415 $\pm$ 7,666 ^a
DM21	258,612 $\pm$ 21,361 ^{d, h}	281,154 $\pm$ 9,637 ^d
NM21	406,694 $\pm$ 6,652	392,722 $\pm$ 13,718
NN42	580,612 $\pm$ 7,664 ^{§, a1, b1, c}	573,186 $\pm$ 13,657 ^{§, a1, b1, c}
DM42	403,766 $\pm$ 11,646 ^{§, d, e}	400,218 $\pm$ 11,640 ^{§, d, e}
NM42	562,458 $\pm$ 9,334 ^{§, f}	555,484 $\pm$ 5,741 ^{§, f}
RM42	492,540 $\pm$ 13,068 [§]	481,138 $\pm$ 14,327 [§]

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. [§] = 42 dias $\neq$ 21 dias, $p < 0,05$. Em 21 dias: ^hP $\neq$ D no grupo DM, $p < 0,05$. Em 42 dias: ^{a1}NN $\neq$ DM, $p < 0,05$; ^{b1}NN $\neq$ NM, $p < 0,05$; ^cNN $\neq$ RM, $p < 0,05$; ^dDM $\neq$ NM, $p < 0,05$; ^eDM $\neq$ RM, $p < 0,05$; ^fNM $\neq$ RM, $p < 0,05$.

RESULTADOS

Ao se avaliar a distribuição de frequência (%) da APN dos neurônios dos diferentes grupos reativos à NADPH-d expressa no histograma da figura 38, observa-se que, nos animais de 21 dias, independente do segmento (P e D), a área da maioria dos neurônios do grupo DM concentrou-se no intervalo entre 200-300 μm^2 , enquanto que nos grupos NN e NM, o predomínio ocorreu no intervalo entre 300-500 μm^2 para o segmento P, e entre 300-400 μm^2 para o segmento D. Considerando os animais de 42 dias, em ambos os segmentos, os neurônios dos grupos DM e RM estavam concentrados nas áreas entre 200-300 μm^2 e 300-400 μm^2 , respectivamente. Independente do segmento, verificou-se a APN da maioria dos neurônios dos grupos NN e NM no intervalo entre 500-600 μm^2 .

Figura 38 - Representação gráfica da área média da frequência (%) dos neurônios NADPH-d positivos nas regiões P e D, em 21d e 42d

Fonte: (TAMPELINI, F. S., 2016).

Legenda: **(A)** Frequência (%) dos neurônios NADPH-d na região P dos grupos DM, NM e NN de 21 dias. **(B)** Frequência (%) dos neurônios NADPH-d na região D dos grupos DM, NM e NN de 21 dias. **(C)** Frequência (%) dos neurônios NADPH-d na região P dos grupos DM, NM, NN e RM de 42 dias. **(D)** Frequência (%) dos neurônios NADPH-d na região D dos grupos DM, NM, NN e RM de 42 dias.

6 DISCUSSÃO

Neste item serão abordados os resultados obtidos correlacionando-os com a literatura à qual se teve acesso.

Diversos autores descrevem os efeitos da dieta AIN-93G com diferentes concentrações de caseína, em vários tecidos de animais (CASTELUCCI et al., 2002; BINOTTI, 2003; BOLDRINI, 2003; BRANDÃO et al., 2003; GOMES et al., 2006; LIBERTI et al., 2007; GREGGIO et al., 2010; MISAWA et al., 2010; MATOS, 2012; BAPTISTA et al., 2013; GIROTTI et al., 2013; BOLINA, 2014). Entretanto, a metodologia aqui utilizada, empregando uma dieta constituída por proteína vegetal e, portanto, com baixa qualidade proteica (MAGA et al., 1973; CARIAS et al., 1995), forneceu dados ainda não elucidados acerca do comportamento do plexo mioentérico do intestino grosso de animais a ela submetidos, e renutridos nos períodos pré e pós-natal.

Assim, confrontar as repercussões desse tipo de dieta (padrão de Moçambique) no plexo mioentérico nos segmentos proximal e distal do intestino grosso de animais em diferentes idades, com uma dieta rica em proteína animal (grupo NN) e mista grupo NM) ainda é tema original.

6.1 ASPECTOS GERAIS E AVALIAÇÃO METABÓLICA

Em todos os parâmetros metabólicos e aspectos gerais avaliados, os animais de 42 dias de todos os grupos apresentaram valores significativamente maiores quando comparados aos animais de 21 dias. Considerando-se que a manutenção de uma frequência nutricional adequada assegura o crescimento, a maturação e a duplicação celular, e o consequente desenvolvimento dos órgãos, e que qualquer alteração na composição e periodicidade nutricional afeta esse desenvolvimento, as necessidades mínimas de proteína requeridas para o crescimento dos indivíduos submetidos à dieta de Moçambique podem ser consideradas satisfatórias sob o aspecto biológico. Essas considerações corroboram com Oliveira e Angelis (2001), que observaram desenvolvimento proporcional em animais de diferentes faixas etárias, independentemente da dieta aplicada a qualidade e a quantidade da proteína ingerida.

Ao **final do experimento e durante o monitoramento metabólico** tanto aos 21 quanto aos 42 dias, o aumento significativo do peso dos animais do grupo NN quando comparado aos demais grupos, e o menor peso dos animais do grupo DM corroboram com os dados de animais jovens submetidos a dieta aprotéica (CASTELUCCI et al., 2002; GOMES et al., 2006) e com porcentagens de caseína desde 5% a 8% (ARAÚJO et al., 2003; BRANDÃO et al., 2003; BAPTISTA et al., 2013; BOLINA, 2014; CAVALLI et al., 2015). Também estão de acordo com autores que submeteram os animais à restrição alimentar (CIRINO et al., 2013; SCHOFFEN et al., 2014a; SCHOFFEN et al., 2014b); à dieta com proteína vegetal (OLIVEIRA; ANGELIS, 2001); e subnutrição materna (HOWIE et al., 2012). O fato de Natali et al. (2005) e Schoffen et al. (2005) não detectarem diferenças significativas quanto ao peso corporal entre animais subnutridos (dieta com 8% de caseína) e animais controle (dieta com 22% de caseína), provavelmente está relacionado à idade dos animais, uma vez que esses autores avaliaram animais na fase adulta.

As diferenças quanto ao peso relatadas nos demais estudos é devida, principalmente, pela má absorção dos nutrientes (CHANDRA, 1991; WATERLOW, 1997; NUNES, 2002; ROMANI; LIRA, 2004; ABREU et al., 2006; SAWAYA, 2006) e por alterações na proliferação celular da medula óssea (BORSATTO, 1999). Ainda, dietas com restrição de calorias, proteínas, aminoácidos e minerais, podem levar a uma diminuição do peso corporal devido ao aumento do metabolismo lipídico e alteração dos processos oxidativos, refletindo diretamente na composição corporal (DUFFY et al., 1997; SLAVIN, 2005; CIRINO et al., 2013).

Da mesma forma, ao se avaliar em todos os grupos o **comprimento do animal** e as **dimensões do intestino grosso** (comprimento e área), observou-se aumento desses parâmetros nos animais com 42 dias, quando comparados aos de 21 dias. Entre os grupos da mesma faixa etária, os animais controle (NN21 e NN42) exibiram resultados maiores quando comparados àqueles submetidos à dieta de Moçambique (DM21 e DM42), o que permite inferir que, mesmo ocorrendo desenvolvimento de 21 para 42 dias, comparativamente ao grupo controle a dieta vegetal alterou esses parâmetros, caracterizando um estado de subnutrição. Resultados semelhantes foram encontrados no comprimento e na área do intestino grosso de animais com as mesmas idades da presente pesquisa submetidos a dietas aprotéica e com baixo teor de caseína (SANT'ANA et al., 1997; CASTELUCCI et al., 2002; ARAÚJO et al., 2003; GOMES et al., 2006), e também no intestino delgado de animais com restrição proteica (FIRMANSYAH et al., 1989; TORREJAIS et al., 1995; NATALI et al., 2000; BRANDÃO et al., 2003; NATALI et al., 2005). Considerando-se que Schoffen et al. (2014b) também observaram uma diminuição no comprimento do intestino grosso de animais idosos submetidos a uma dieta com

restrição alimentar de 50% em relação ao grupo controle, os valores sempre baixos dessas dimensões nos animais experimentais podem ser interpretados como uma resposta adaptativa à taxa metabólica reduzida, e à diminuição na biodisponibilidade e volume de nutrientes e fibras da dieta (NATALI et al., 2005).

Convém ressaltar que, nos demais grupos, o grupo RM, que começou a receber a ração suplementada Moçambique após o desmame, e o grupo NM, com dieta constituída por proteínas vegetal e animal apresentaram um aumento significativo da massa corporal e ingestão alimentar, entretanto, sem alcançarem os valores verificados no grupo NN. Outros autores também verificaram o mesmo comportamento em animais submetidos a dieta hipoprotéica (5% de caseína) e renutridos (CASTELUCCI et al., 2002; GOMES et al., 2006; BAPTISTA et al., 2015; CAVALLI et al., 2015). Se por um lado, esses dados mostram a rapidez com que os animais renutridos recuperam suas atividades metabólicas normais, por outro, nota-se que uma dieta vegetal não consegue restaurar plenamente a massa corporal, pelo menos no tempo de vida dos animais estabelecido na presente pesquisa.

Muito embora a dieta padrão de Moçambique seja constituída por calorias e proteínas, a redução do peso corporal nos grupos que a utilizaram (DM, NM e RM) pode estar relacionada ao fato do amendoim, por ser rico em fibras e proteínas, promover a saciedade com consequente diminuição da ingestão alimentar (KIRKMEYER; MATTES, 2000). Assim, a sua inclusão na dieta é capaz de inibir a fome, o desejo de comer e o apetite pós-prandial, aumentando, assim, os níveis de saciedade e plenitude alimentar (KIRKMEYER; MATTES, 2000; TAN et al., 2014; MAROSTI, 2016). Acrescente-se a isso, o fato de a dieta baseada em proteína vegetal causar uma ineficiência na absorção de energia, e um aumento no gasto energético e na oxidação da gordura (TAN et al., 2014).

Se for considerado que a quantidade de leptina é diretamente proporcional à quantidade de tecido adiposo e informa ao hipotálamo sobre a quantidade de energia armazenada e a consequente regulação da ingestão alimentar (SAVINO et al., 2007; WERNETTE et al., 2011), e que a grelina estimula o apetite através da liberação de enzimas gástricas e hormônio do crescimento, desencadeando no hipotálamo uma hiperativação dos mecanismos de recrutamento de energia (WERNETTE et al., 2011), o mecanismo de controle do apetite parece estar alterado no processo de subnutrição proteica reportado no presente trabalho.

Assim, presume-se que a participação do amendoim na dieta desencadeia uma retroalimentação negativa, ou seja, uma ingestão alimentar em excesso pelo animal, sem saciá-lo (PIMSTONE et al., 1968).

Quanto à **ingestão de água e excreção de urina**, os maiores valores foram observados nos grupos NM e RM, e os menores, no grupo DM, o que sugere a ocorrência de retenção de líquidos nos tecidos desses animais, característica típica do Kwashiorkor. Muito embora não haja um consenso na literatura sobre o motivo dessa retenção líquida, acredita-se que a hipoalbuminemia causada pela baixa ingestão proteica, seja o mecanismo responsável (COULTHARD, 2015).

A diminuição na **excreção de fezes** nos grupos DM, NM e RM difere de autores como Totani, Araki e Tateishi (2010), onde esse parâmetro aumentou em animais que utilizaram outro tipo de proteína vegetal em suas dietas. Como não foi estabelecida na presente pesquisa a razão ingestão alimentar/excreção de fezes, uma explicação creditada, é que hormônios como a motilina e substância P, bem como uma inibição da absorção de água no TGI, promovem um aumento no volume do conteúdo do colo, resultando na aceleração da excreção fecal (TOTANI et al., 2010a; TOTANI et al., 2010b). Uma característica interessante observada no grupo NN quanto às características, foi o seu maior volume e o baixo grau de hidratação, em contraste com os grupos DM, NM e RM que utilizaram a dieta vegetal, com volume menor e pastosa, aderindo às paredes do coletor. Para Cummings (1993) e Totani et al. (2010a), o aspecto pastoso das fezes ocorre devido à maior dificuldade na quebra da membrana da célula vegetal pela microflora, com consequente diminuição na absorção de nutrientes, o que desencadeia um aumento na retenção hídrica do TGI. Assim, admite que os diferentes tipos de dieta promovam alterações funcionais, uma vez que no segmento proximal do intestino grosso, relacionado à estocagem do bolo fecal; a absorção de fluídos e eletrólitos, encontra-se um antiperistaltismo (ou retropulsão), o que prolonga a retenção do material fecal e aumenta a capacidade de mistura, armazenagem e absorção do excesso de fluídos (HASLER et al., 1990; TAKAHASHI; OWYANG, 1998; GAGLIARDO, 2006). Já no segmento distal do intestino grosso, voltado para a eliminação das fezes, observa-se uma intensa contração peristáltica, resultando na propulsão das fezes já desidratadas. (CHRISTENSEN et al., 1984; HASLER et al., 1990; MESSENGER et al., 1994; GAGLIARDO, 2006).

6.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, MORFOMÉTRICAS E ULTRAESTRUTURAIS DA MUCOSA E DA PAREDE DO INTESTINO GROSSO

O intestino grosso desempenha um papel chave no balanço hidroeletrólítico, na formação e eliminação das fezes (CHRISTENSEN, 1989), na secreção de muco para a

lubrificação e proteção da mucosa intestinal e na digestão de bactérias não-enzimáticas da alimentação (OVALLE; NAHIRNEY, 2008). Em animais submetidos à privação nutricional em diferentes idades, foram relatadas alterações funcionais como o padrão de motilidade e absorção intestinal (TAKANO, 1964); morfológicas, como o comprimento intestinal e a espessura das túnicas mucosa e muscular (SCHOFFEN et al., 2005) e numéricas relativas ao número de células caliciformes (FRANCO et al., 2010).

Sob o aspecto qualitativo, independentemente do tipo de dieta, idade, do segmento e do grupo experimental, verificou-se no presente trabalho a preservação das características morfológicas das camadas musculares, submucosa e mucosa. Assim, pode-se considerar que essas observações estão de acordo com o descrito por Schoffen et al. (2014b) que, ao estudarem o colo proximal de animais submetidos à restrição alimentar (50%) não encontraram alterações na estrutura de quase todas as camadas da parede intestinal, com exceção da túnica mucosa, que apresentou criptas mais profundas e dispersas; e uma muscular da mucosa espessa quando comparada ao grupo controle.

Ao se comparar o grupo NN com os grupos DM, RM e NM observou-se um aumento na espessura da camada muscular dos animais nutridos, destacando-se que já aos 21 dias, é nítida a diminuição das camadas muscular e mucosa no grupo DM em comparação com os demais. Em um estudo com a mesma metodologia e grupos experimentais da presente pesquisa, Marosti (2016) descreveu uma diminuição na altura das vilosidades do intestino delgado no grupo DM aos 21 e 42 dias.

Em termos numéricos, ocorreu no grupo DM uma diminuição da parede aos 42 dias quando comparado ao grupo NN, independente do segmento; no entanto, aos 21 dias, essa diferença só foi observada no segmento proximal. Ao se avaliar a área da mucosa, esse parâmetro também foi menor nos grupos DM (21 e 42 dias) independente do segmento estudado. Resultados semelhantes foram descritos por autores como Natali et al. (2005), De Azevedo et al. (2007), e Franco et al. (2010) que constataram, em ratos subnutridos, uma atrofia da camada muscular externa e da mucosa do duodeno, íleo e jejuno, respectivamente; Cirilo et al. (2013), que ao avaliarem o intestino delgado de animais idosos submetidos à restrição alimentar, observaram uma diminuição na espessura da parede ileal e da mucosa, na altura dos vilos, profundidade das criptas, e Marosti (2016) que verificou uma diminuição na altura das vilosidades em animais subnutridos aos 21 e 42 dias e na área da mucosa aos 21 dias.

Essas alterações morfométricas da parede e mucosa intestinal, estão diretamente relacionadas à composição das dietas e disponibilidade de nutrientes na luz intestinal, atuando como fator trófico (MACARI et al., 2002) ou hipotrófico (FIRMANSYAH et al., 1989). Para

Natali et al. (2005), o estado nutricional deficitário provoca uma diminuição no armazenamento proteico das fibras musculares lisas da parede intestinal, resultando em menor espessura de suas camadas constituintes. Considerando que as proteínas vegetais apresentam uma menor digestibilidade e absorção de nutrientes, e uma maior resistência às enzimas digestivas quando comparadas às proteínas de origem animal, é lícito sugerir que essas características sejam capazes de promover as alterações morfométricas observadas nos grupos tratados com a dieta de Moçambique (DM21 e DM42).

Por outro lado, a espessura da camada muscular aumentada no colo proximal de animais idosos submetidos à restrição alimentar (SCHOFFEN et al., 2014b), a perda de células gliais, envolvidas no controle neuromuscular (BASSOTTI et al., 2007) e no desenvolvimento de patologias intestinais (SCHOFFEN et al., 2014a), e a redução dos neurônios colinérgicos e de suas atividades excitatórias, com consequente aumento da atividade inibitória nitrérgica (WISKUR; MEERVELD, 2010), podem levar à hipertrofia das camadas intestinais mediante um quadro de subnutrição.

Sob o aspecto qualitativo, verificou-se em todos os grupos que as fibras colágenas participam da estrutura da cápsula gangliolar, cujos septos delgados em direção ao interior do gânglio, são observados especialmente aos 42 dias, como descrito no intestino delgado aos 21 e 42 dias (GOMES et al., 2006; MAROSTI, 2016), e somente no intestino delgado de animais nutridos com 21 dias (BRANDÃO et al., 2003).

No presente estudo, observou-se, aos 42 dias, que as fibras colágenas do tipo I, predominaram nos grupos NN, DM e NM, e as do tipo III no grupo RM. Outros trabalhos que avaliaram o componente colágeno do intestino delgado de ratos descreveram que, aos 42 dias, as fibras do tipo I predominaram nos grupos nutrido (N42) e renutrido (R42) (GOMES et al., 2006) e nos grupos NN e DM (MAROSTI, 2016). Já as fibras do tipo III, predominaram no grupo subnutrido (D42) (GOMES et al., 2006) e nos grupos NM e RM (MAROSTI, 2016). As fibras elásticas foram bem evidenciadas na cápsula dos gânglios mioentéricos, exceto no grupo DM aos 21 e 42 dias, em todos os grupos experimentais do trabalho de Marosti (2016) sobre o plexo mioentérico do intestino delgado de animais com 42 dias, e ausentes nos animais subnutridos com proteína animal aos 21 e 42 dias (BRANDÃO et al., 2003; GOMES et al., 2006). Desta forma, comparando-se somente os grupos subnutridos com dieta vegetal e animal, verifica-se que, embora com baixo teor, a proteína obtida do amendoim (grupo DM) é capaz de produzir fibra do tipo I, mais espessas e resistentes, um indicativo de maturação desse tecido nessa fase do animal, mas com comprometimento do sistema elástico, sugestivo de perda de mobilidade da estrutura capsular.

As fibras dos sistemas colágeno e elástico, que fornecem força de tensão e resiliência aos tecidos (MONTES, 1996; CAVES et al., 2011) podem ter sua síntese alterada na subnutrição, por uma diminuição do suprimento proteico, e consequente dano à resistência mecânica da parede intestinal (NAKAJIMA et al., 2008). De fato, a influência da subnutrição na composição e função desse tipo de tecido foi detectada por Nakagima et al. (2008), que verificaram uma perda na resistência mecânica do íleo e colo distal, associado a uma diminuição do colágeno da parede intestinal. Também Myers et al. (1983) estão de acordo com essas assertivas, uma vez que, ao avaliarem os efeitos da desnutrição no intestino delgado de animais idosos, observaram uma diminuição do conteúdo colágeno nas paredes da víscera, devido à restrição proteica.

Sabendo-se do estresse mecânico que os gânglios do plexo mioentérico sofrem durante os movimentos do TGI, e que a integração entre esses sistemas é fundamental para a preservação estrutural do plexo mioentérico (DE SOUZA et al., 1988). as alterações do componente colágeno e elástico promovidas pela subnutrição, sugerem o comprometimento das proteínas que o constituem e a perda da capacidade de resiliência e das propriedades biomecânicas.

Com relação a imunorreatividade dos neurônios mioentéricos à ChAT, SP e VIP, foi possível observar, nos segmentos proximal e distal, diferenças significativas principalmente entre os animais dos grupos NN e DM. Relativamente à ChAT, os neurônios imunorreativos nos animais do grupo DM concentravam-se preferencialmente em gânglios pequenos, ao contrário do observado nos gânglios do grupo NN, onde, pelo menos a metade do gânglio era ocupada por neurônios imunorreativos.

Dados semelhantes foram observados por Gomes et al. (2006) no intestino delgado de animais com dieta aproteica, onde a atividade histoquímica para AChE e a imunoreatividade para ChAT mostraram que a maioria dos gânglios continham neurônios com moderada coloração ou ausente, não apresentando distribuição homogênea do citoplasma em relação ao grupo nutrido. O mesmo aspecto para a AChE foi observado no intestino delgado (BRANDÃO et al., 2003) e no esôfago (LIBERTI et al., 2007) de ratos subnutridos aos 21 dias.

No presente trabalho, a imunorreatividade à SP e ao VIP foi fraca no grupo DM. Estudo com VIP no plexo mioentérico de animais subnutridos (5% de caseína) demonstrou, aos 42 dias, uma baixa densidade de varicosidades pequenas e grandes ao redor dos pericários dos neurônios (GREGGIO et al., 2010). Desta forma, ao se considerar que a ChAT a AChE e a SP detectam neurônios responsáveis pela contração da musculatura lisa, e que o VIP atuam no seu

relaxamento, pode-se admitir que animais subnutridos, tanto por dieta vegetal como animal, exibam alterações na motilidade dos intestinos delgado e grosso.

A análise dos aspectos ultraestruturais, mormente aos 42 dias, permitiu verificar nos nucléolos do grupo NN material fibrilar eletrondenso, e pouco destacado no grupo DM, eletrondensidade esta aparentemente recuperada no grupo RM. Dados semelhantes foram observados no intestino grosso de animais de 42 dias submetidos à subnutrição pré e pós-natal (CASTELUCCI et al., 2002), no esôfago de animais subnutridos aos 21 dias (LIBERTI et al., 2007) e no intestino delgado de animais subnutridos aos 21 e 42 dias (MAROSTI, 2016). Além disso, no grupo DM, as cisternas do retículo endoplasmático apresentaram-se pouco evidenciadas e com aglomerados de ribossomos, e cromatina nuclear irregularmente distribuída. Essas observações estão de acordo com o descrito nos neurônios do plexo mioentérico do esôfago por Greggio et al. (2010). Para Liberti et al. (2007), muitas das alterações ultraestruturais aqui observadas em animais subnutridos, sugerem um atraso no desenvolvimento das células que constituem a parede intestinal determinado pela privação proteica.

6.3 AVALIAÇÃO MORFOQUANTITATIVA DOS NEURÔNIOS DO PLEXO MIOENTÉRICO REATIVOS À NADH-D E NADPH-D

O desbalanço nutricional é causa frequente de alterações no plexo mioentérico, podendo desencadear diversas desordens gastrointestinais (SCHOFFEN et al., 2005; SCHOFFEN et al., 2014a). Muito embora o SNE seja bem-desenvolvido ao nascimento em animais e humanos, ele não está completamente maduro nessa fase, e portanto continua seu desenvolvimento após o nascimento (GERSHON, 2000). Sob o aspecto morfoquantitativo dos neurônios mioentéricos, diversos estudos têm avaliado os efeitos dos diferentes tipos de restrição alimentar na inervação do esôfago, intestino delgado e intestino grosso de ratos durante a gravidez e lactação (LEITE-MELO et al., 1997; NATALI; MIRANDA-NETO, 1999; BRANDÃO et al., 2003; NATALI et al., 2005; GOMES et al., 2006; GREGGIO et al., 2010); poucos dias após o desmame (FIRMANSYAH et al., 1989; CASTELUCCI et al., 2002); jovens (NATALI et al., 2003; HERMES et al., 2008; SCHOFFEN et al., 2014a) e idosos (COWEN et al., 2000; PORTO et al., 2012; SCHOFFEN et al., 2014a).

No que se refere ao aspecto geral da conformação e distribuição dos gânglios do plexo mioentérico reativos à NADH-d, independente do segmento e da idade dos animais, todos os

grupos experimentais apresentaram características em comum, aqui previamente descritas, como gânglios de diferentes tamanhos e formas contendo quantidade variável de neurônios. Ainda, independente do segmento e grupo estudado, os neurônios se apresentaram com diferentes formatos e tamanhos, com os grandes exibindo atividade citoplasmática intensa e homogênea, com contornos regulares; os médios, com reatividade citoplasmática moderada ou fraca e de contornos e formatos irregulares, características estas predominantes nos neurônios pequenos.

Essas variações morfométricas também foram evidenciadas ao longo do TGI de ratos recém-nascidos e adultos (GABELLA, 1971), no intestino delgado de diferentes espécies (GABELLA, 1990) e no intestino delgado de animais nutridos com proteína animal, submetidos somente à dieta com proteína vegetal e dieta mista (MAROSTI, 2016). Ao estudar o plexo mioentérico respectivamente do esôfago e do intestino delgado de animais subnutridos, Gomes et al. (2006) e Greggio et al. (2010), verificaram neurônios com reatividade fraca mas sem sinais de alterações nucleares sugestivas de morte celular, em contraste com a reatividade citoplasmática intensa ou moderada de neurônios grandes e médios nos grupos nutrido e renutrido. Essa característica nos neurônios de animais subnutridos também foi observada por Castelucci et al. (2002) no intestino grosso de animais submetidos a uma dieta aprotéica, e que desapareceu com a recuperação proteica.

Quanto à reatividade à NADPH-d aqui descrita em todos os grupos como, por exemplo, gânglios de tamanhos, formatos e número variado de neurônios nitrérgicos forte e fracamente reativos, e a presença de malhas primária, secundária e terciária, pode-se concordar com estudos que utilizaram ratos submetidos à lesão térmica (SEYFERT, 2009); camundongos com distrofia muscular de Duchenne (BEBER, 2011) e subnutrição e renutrição proteica nos períodos pré e pós-natal (MAROSTI, 2016).

A densidade neuronal maior evidenciada pela técnica de NADH-d em todos os grupos de 21 dias relativamente aos grupos correspondentes de 42 dias, independente do segmento intestinal, também foi detectada por Marosti (2016) no intestino delgado. De acordo com Gabella (1971), o tamanho do intestino pode explicar a maior densidade de neurônios nos animais mais jovens, uma vez que esta diminui à medida que o intestino cresce. De fato, autores como Gabella (1971) e Marese et al. (2007) notaram no intestino delgado de ratos uma redução na densidade neuronal durante o desenvolvimento pós-natal em ratos, o mesmo sendo descrito por Vries et al. (2010) no intestino grosso.

No entanto, em se tratando de densidade no plexo mioentérico de animais submetidos à restrição alimentar, detectada pela NADH-d utilizada como marcador pan-neuronal, os

resultados divergem entre os diversos autores. Assim, um aumento na densidade neuronal foi verificado por Castelucci et al. (2002); Gomes et al. (2006) e Schoffen et al. (2014), respectivamente no intestino grosso de animais submetidos à restrição alimentar, à dieta aprotéica, e à dieta hipoprotéica. Entretanto, ao utilizar a Myosina-V também como um marcador pan-neuronal, Schoffen et al. (2005) não observaram diferenças no colo proximal de animais subnutridos (8% caseína) em relação ao grupo controle (22% caseína).

No presente estudo, não foram detectadas diferenças na densidade neuronal entre os segmentos proximal e distal do intestino grosso, dados que corroboram com os observados nos segmentos proximal, médio e distal do intestino grosso (CASTELUCCI et al., 2002; GOMES et al., 2006) e nos segmentos, oral, médio e aboral do intestino delgado (MAROSTI, 2016) de animais subnutridos, nutridos e renutridos.

Schoffen et al. (2014a) atribuem a maior densidade neuronal dos neurônios do SNE em animais subnutridos ao aumento no número de células enteroendócrinas serotoninérgicas que agem como fatores de crescimento, e que promovem o desenvolvimento (GERSHON, 2000; GERSHON, 2013) e a neurogênese (LIU et al., 2009), como também maior capacidade de sobrevivência e de plasticidade neuronal (LI et al., 2011). Em contrapartida, a menor densidade neuronal verificada em animais com restrição proteica, pode ser explicada pela associação de dois fatores: a restrição proteica por si só e o envelhecimento dos animais, que leva à perda neuronal devido alteração na capacidade adaptativa das células e tecidos. (NATALI et al., 2005).

Assim, dentre as hipóteses para se explicar esses resultados discrepantes entre os pesquisadores, deve-se considerar o tempo de restrição da dieta; o período de realização do experimento; o segmento intestinal analisado e o fenótipo neuronal (SCHOFFEN, et al., 2014b).

Os dados referentes à densidade neuronal de NADPH-d, mostraram, em todos os grupos, uma densidade de neurônios nitrérgicos significativamente maior nos animais de 21 dias, independente do segmento e, também dentre estes e independente do segmento, esse parâmetro foi maior no grupo DM quando comparado aos grupos NN e NM, como também descrito por Marosti (2016) no intestino delgado. Em animais de 42 dias, comparativamente aos grupos NN, NM e RM, o grupo DM apresentou maior densidade neuronal tanto no segmento P como no D, uma característica também descrita por Porto et al. (2012) no duodeno de animais subnutridos (5% caseína). Todavia, ao se considerar o esôfago, o comportamento foi diferente, ou seja, os grupos subnutrido e nutrido não exibiram diferenças significativas (LIBERTI et al., 2007).

DISCUSSÃO

A APN evidenciada pela técnica de NADH-d aumentou nos grupos de 42 dias, relativamente aos seus correspondentes de 21 dias, como também ocorreu com o intestino delgado de ratos (MAROSTI, 2016). Cumpre ressaltar que nessa fase, em todos os grupos, a APN do segmento P foi significativamente menor em comparação ao segmento D.

Entre os grupos de 21 e de 42 dias, a APN dos animais NN foi bem maior que a dos grupos DM tanto no segmento P (55,4%), como no segmento D (73,3%). Muito embora esse parâmetro tenha aumentado significativamente no grupo RM, esse aumento não foi suficiente para atingir os níveis do grupo NN. No intestino grosso de animais submetidos à privação proteica pré e pós-natal, Castelucci et al. (2002) também descreveram uma diminuição da APN aos 21 e 42 dias, assim como Schoffen et al. (2014b) em ratos adultos (90 dias) submetidos à restrição alimentar (50%). De acordo com Giancamillo et al. (2010), essa redução da APN em animais subnutridos pode ocorrer em resposta às mudanças na luz do TGI, e como mecanismo compensatório ao número de neurônios mioentéricos à redução da atividade celular e síntese de proteínas estruturais e baixa ingestão de nutrientes (NATALI et al., 2005; SCHOFFEN et al., 2014b). Além disso, o grande número de células nervosas e a redução na espessura da túnica muscular, diminuem a demanda funcional desses neurônios para manter a motilidade do colo, provocando a atrofia neuronal (SCHOFFEN et al., 2014a).

Em contrapartida, trabalhos que utilizaram o esôfago de animais de 21 dias (LIBERTI et al., 2007) e o intestino delgado de animais de 42 dias (GOMES et al., 2006; GREGGIO et al., 2010; MAROSTI, 2016) e 365 dias (NATALI et al., 2005), não relataram alterações na APN em animais subnutridos, possivelmente devido a respostas específicas inerentes ao órgão avaliado (GOMES et al., 2006).

Com a renutrição proteica aqui promovida (grupo RM) verificou-se um aumento da APN quando comparou-se com os animais subnutridos (DM), entretanto, esse aumento não foi suficiente para atingir os níveis do grupo controle (NN). Já Castelucci et al. (2002), observaram um aumento da APN no colo de animais renutridos, sugerindo que os neurônios entéricos podem se recuperar do estresse causado pela subnutrição. Por outro lado, no intestino delgado de ratos, Santer e Conboy (1990) afirmaram que diante de uma redução no número de neurônios provocada pela subnutrição, a renutrição, por si só, não é capaz de promover a recuperação neuronal.

Ao se avaliar a APN dos neurônios nitrérgicos (NADPH-d), observou-se em todos os grupos que, quanto ao fator idade, esse parâmetro foi significativamente maior nos animais de 42 dias, em relação aos seus correspondentes de 21 dias, independente do segmento. Autores como Marosti (2016), também relataram esse aumento aos 42 dias, nos segmentos oral, médio

e anal do intestino delgado. Entre os grupos com 21 dias, a APN do grupo NN aumentou de forma significativa nos segmentos P (58,2%) e D (41,7%) em relação aos animais do grupo DM. No esôfago de animais subnutridos com as mesmas faixas etárias aqui avaliadas, Liberti et al. (2007) e Greggio et al. (2010) obtiveram o mesmo valor para esse parâmetro entre animais nutridos e subnutridos, sugerindo, mais uma vez, que essas diferenças são peculiares ao tipo de víscera avaliada; no caso do esôfago, formado em parte por musculatura lisa, e em parte por musculatura estriada.

O NTN estimado pela técnica da NADH-d foi maior nos animais de 42 dias relativamente aos de 21 dias, nas seguintes proporções: grupo DM - 119,6%; grupo NN -54%; grupo NM - 106,8%. Todavia, independentemente da idade, não foram detectadas diferenças no NTN entre os grupos DM e NN, fato também verificado por Castelucci et al. (2002) no intestino grosso de animais submetidos à privação proteica pré e pós-natal, Natali et al. (2005) no duodeno, e Schoffen et al. (2005) no colo proximal de ratos. Esses dados sugerem que, independente da diminuição do peso corporal, comprimento e área intestinais, a subnutrição não promove perda neuronal, como descrito em outras situações às quais o plexo mioentérico é submetido, ou seja, o mal de Chagas (MAIFRINO et al., 2005) a distrofia muscular de Duchenne (BEBER, 2011), e o envelhecimento (DE SOUZA et al., 1993).

Em contrapartida, o menor NTN verificado intestino delgado (SANTER; CONBOY, 1990; GOMES et al., 2006) e intestino grosso (SANT'ANA et al., 1997; ARAÚJO et al., 2003) de animais subnutridos, pode ser explicado pela alteração no tamanho do intestino (GOMES et al., 2006) e pela inabilidade do SNE em gerar novos neurônios mesmo com o retorno de uma nutrição adequada, em caso de morte neuronal provocada pela subnutrição (SANTER; CONBOY, 1990).

Quanto aos neurônios nitrérgicos, a única diferença verificada para o NTN entre todos os grupos das diferentes idades, foi a diminuição significativa desse parâmetro nos animais subnutridos (DM). Aos 42 dias, o grupo NN apresentou um NTN menor quando comparado ao grupo DM, diferentemente do relatado por Marosti (2016) no intestino delgado, com a mesma dieta aqui empregada, uma vez que esse parâmetro foi semelhante nos grupos NN e DM.

7 CONCLUSÕES

De acordo com as proposições da presente pesquisa, e com nos resultados obtidos face a metodologia empregada, é lícito concluir-se que:

1. Os animais submetidos à Dieta de Moçambique (DM), além de exibirem dados metabólicos menores, foram também os que apresentaram o menor peso e comprimento. Embora, no geral, o comprimento e a área do intestino, bem como da área intestinal e da mucosa, independente do segmento estudado aumentaram de 21 para 42 dias, os menores parâmetros foram evidenciados no grupo DM, caracterizando um estado de subnutrição. A renutrição não foi capaz de recuperar esses parâmetros.
2. Sob o aspecto qualitativo, independentemente do tipo de dieta, idade, do segmento e do grupo experimental, não ocorreram alterações nas características morfológicas das camadas musculares, submucosa e mucosa.
3. Aos 42 dias, as fibras colágenas do tipo I predominaram no grupo DM e as do tipo III no grupo RM, o que demonstra, mesmo com baixo teor, a capacidade da proteína vegetal de maturar de forma precoce esse tipo tecido. As fibras elásticas não foram detectadas na cápsula dos gânglios mioentéricos do grupo DM aos 21 e 42 dias, indicativo do comprometimento da mobilidade dessa estrutura.
4. A fraca imunorreatividade dos neurônios mioentéricos à ChAT, SP e VIP nos animais do grupo DM sugere a presença alterações na motilidade do intestino grosso.
5. Sob o aspecto ultraestrutural, mormente aos 42 dias, os nucléolos com material fibrilar exibindo baixa eletrodensidade, cisternas do retículo endoplasmático pouco evidentes e com aglomerados de ribossomos, e cromatina nuclear irregularmente distribuída nos neurônios do grupo DM permite inferir um atraso no desenvolvimento celular.

CONCLUSÕES

-
6. Em todos os grupos estudados, independentemente do segmento intestinal e idade dos animais, não existem diferenças significativas no que diz respeito à morfologia dos gânglios do plexo mioentérico reativos à NADH-d e NADPH-d.
 7. A densidade de neurônios reativos à NADH-d e NADPH-d foi maior em todos os grupos de 21 dias relativamente aos grupos correspondentes de 42 dias, independente do segmento intestinal. A maior densidade, tanto aos 21 como aos 42 dias, foi observada no grupo subnutrido (DM), independentemente do segmento.
 8. Em todos os grupos, a área do perfil neuronal evidenciada pelas técnicas de NADH-d e NADPH-d aumentou de 21 para 42 dias, independente do segmento. Entre os grupos da mesma faixa etária, independente do segmento, a área neuronal foi maior no grupo NN, e menor no grupo DM. O grupo RM não recuperou esse parâmetro.
 9. O número estimado de neurônios reativos à NADH-d aumentou com a idade em todos os grupos. Na mesma faixa etária, não foram detectadas diferenças entre os grupos.
 10. Em ambas as faixas etárias, o número estimado de neurônios reativos à NADPH-d foi maior no grupo DM.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABREU, M.A.M.M.; WECKX, L.L.M.; HIRATA, C.H.W. Histological and ultrastructural aspects of the tongue in undernourished rats. **Rev. Bras. Otorrinolar.**, V. 72, n. 4, p. 523-527, 2006.

ALISSON, S. P. Malnutrition, disease and outcome. **Nutrition**, v. 16, p. 590-593, 2000.

ALVES, A. P.; DÂMASO, A.; PAI, V. D. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. **J. Pediatr.**, v. 84, n. 3, p. 264-271, 2008.

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. **Arq. Neuropsiquiatr.** v. 61, p. 226-233, 2003.

BAPTISTA, J.S. **Repercussões morfológicas no timo de ratos jovens submetidos à desnutrição proteica e à renutrição precocemente corrigida**. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BAPTISTA, J. S.; MAYER, W. P.; FONTES, R. B. V.; SEYFERT, C. E.; BOLDRINI, S. C.; LIBERTI, E. A. Morphological characteristics of the rat thymus during perinatal protein deprivation and early refeeding: a qualitative and quantitative study. **J. Morphol. Sci.**, v. 30, n. 1, p. 33-42, 2013.

BASSOTTI, G.; VILLANACCI, V.; FISOGNI, S.; ROSSI, E.; BARONIO, P.; CLERICI, C. Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: introducing the neuropathies. **World J. Gastroenterol.** v. 13, p. 4035-4041, 2007.

BEBER, E. H. **Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do intestino delgado de camundongos mdx: um modelo de distrofia muscular de Duchenne**. 2011. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart-Edusp, 1976. p. 225.

BHUTTA, Z. A. Addressing severe acute malnutrition where it matters. **Lancet**, v. 374, v. 9684, p. 94-96, 2009.

BINOTTI, C. B. **Repercussões morfológicas da desnutrição proteica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre o nervo alveolar inferior de ratos jovens**. 2003. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

REFERÊNCIAS

- BLACK, R. T.; ALLEN, L. Y.; BHUTTA, Z. A.; CAULFIELD, L. E.; ONIS, M.; EZZATI, M.; RIVERA, J. Maternal and child indernutrition: global and regional exposures and health consequences. **Lancet**, v. 371, n. 9608, p. 243-260, 2008.
- BOLDRINI, S. C. **Efeitos da desnutrição protéica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre o crescimento craniofacial de ratos wistar**: análise craniométrica, morfoquantitativa e ultra-estrutural. 2003. 69 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- BOLINA, C. S. **Efeitos da recuperação proteica pós-natal com suplementação de resveratrol na cartilagem articular da articulação do joelho de ratos wistar subnutridos**. 2014. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- BORSATTO, E. M. **Desnutrição proteica: avaliação *in vitro* da capacidade proliferativa de progenitores granulomonócitos da medula óssea de camundongos**. 1999. 83 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- BRANDÃO, M. C. S.; ANGELIS, R. C.; SOUZA, R. R.; FRÓES, L. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pre- and post-natal protein energy deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric study in weanling rats. **Nutr. Res.**, v. 23, n. 2, p. 215-223, 2003.
- CARIAS, D.; CIOCCIA, A. M.; HEVIA, P. Grado de concordancia entre la digestibilidad de proteínas animales y vegetales medidas in vivo e in vitro y su efecto sobre el cómputo químico. **Arch. Latinoam. Nutrición.**, v. 45, n. 2, p. 111-116, 1995.
- CASTELUCCI, P.; DE SOUZA, R. R.; DE ANGELIS, R. C.; FURNESS, J. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. **Cell Tis. Res.**, v. 310, p. 1-7, 2002.
- CAVALI, M. A.; GONÇALVES, A.; PEREIRA, J. N. B.; SILVA, J. B.; BOLDRINI, S. C.; LIBERTI, E. A. Evaluation of protein undernourishment on the condylar process of the Wistar rat mandible correlation with insulin receptor expression. **J. Appl. Oral Scie.**, v. 23, n. 2, p. 135-144, 2015.
- CAVES, J. M.; CUI, W.; WEN, J.; KUMAR, V. A.; HALLER, C. A.; CHAIKOF, E. L. Elastin-like protein matrix reinforced with collagen microfibers for soft tissue repair. **Biomaterials**, v. 32, p. 5371-5379, 2011.
- CHANDRA, R. K. Nutrition & Immunity. **Clin. Immun.** v. 25, p. 1-10, 1992.
- CHRISTENSEN, J. Colonic motility. In: SCHULTZ, S. G.; WOOD, J. D.; RAUNER, B. B. **Handbook of physiology** – the gastrointestinal system. Maryland: American Physiological Society, 1989. p. 939-973.

REFERÊNCIAS

- CHRISTENSEN, J.; STILES, M. J.; RICK, G. A.; SUTHERLAND, J. Comparative anatomy of the myenteric plexus of the distal colon in eight mammals. **Gastroenterology**, v. 86, p. 706-713, 1984.
- CIRINO, C. P.; SCHOFFEN, J. P. F.; RAMPAZZO, A. P. S.; ZAPATER, M. C. V. U.; VICENTINI, F.A.; COMAR, J. F.; NATALI, M. R. M. Dietary restriction interferes with oxidative status and intrinsic intestinal innervation in aging rats. **Nutrition**, v. 29, p. 673-680, 2013.
- COLLINS, S.; DENT, N.; BINNS, P.; BAHWERE, P.; SADLER, K.; HALLAN, A. Management of severe acute malnutrition in children. **Lancet**, v. 368, p. 1992-2000, 2006.
- CONBOY, V. B.; SANTER, R. M.; SWIFT, G. L. Effect of prenatal undernutrition on prevertebral sympathetic neurons in the rat: a morphological and fluorescence histochemical study. **J. Anat.**, v. 154, p. 47-53, 1987.
- COSTA, M; FURNESS, J.B. The origins, pathways and terminations os neurons with VIP-like immunoreactivity in the guinea-pig small intestine. **Neurosc. Lett.**, v. 148, n. 8, p. 665-676, 1983.
- COSTA, M.; FURNESS, J. B.; POMPOLO, S.; BROOKES, S. J. H., BORNSTEIN, J. C.; BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Projections and chemical coding of neurons with 57 immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea-pig small intestine. **Neurosc. Let.**, v. 148, p. 121- 125, 1992.
- COULTHARD, M. G. Oedema in Kwashiorkor is caused by hypoalbuminaemia. **Paediatr. Int. Child Health.**, v. 35, n. 2, p. 83-89, 2015.
- COWEN, T.; JOHNSON, R. J.; SOUBEYRE, V.; SANTER, R. M. Restricted diet rescues rat enteric motor neurons from age related cell death. **Gut**. v. 47, p. 653-660, 2000.
- COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2009.
- CUMMINGS, J.H. The effect of dietary fiber on fecal weight and composition. In:**Handbook of dietary fiber in human nutrition**. CRC, 1993. p. 263-349.
- DE 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. **Arq. Ciên. Vet. Zool. Unipar**. v. 2, n. 2, p. 85-90, 2007.
- DE GIORGIO, R.; STANGHELLINI, V.; BARBARA, G.; CORINALDESI, R.; DE PONTI, F.; TONINI, M.; BASSOTTI, G.; STERNINI, C. Primary enteric neuropathies underlying gastrointestinal motor dysfunction. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 35, n. 2, p. 114-122, 2000.
- DE OLIVEIRA, F. **Características histoquímicas das fibras musculares do músculo gastrocnêmio de ratos wistar desnutridos submetidos à lesão térmica por escaldamento**.

2006. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DE SOUZA, R. R.; CARVALHO, C. A. F.; WATANABE, I. Identification of collagen, elastic, elaunin and oxytalan fibres in ganglia of the myenteric plexus of the human oesophagus. **Anat. Embryol.**, v. 179, p. 97-102, 1988.

DE SOUZA, R. R.; MORATELLI, H. B.; BORGES, N.; LIBERTI, E. A. Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. **Gerontol.** v. 39, p. 183-188, 1993.

DESAI, M.; CROWTHER, N.J.; LUCAS, A.; HALES, C. N. Organ-seletive growth in the offspring of protein-restricted mothers. **Brit. J. Nutr.**, v. 76, p. 591-603, 1996.

DUFFY, P. H.; LEAKEY, J. E. A.; PIPKIN, J. L.; TURTURRO, A.; HART, R. W. The physiologic, neurologic, and behavioral effects of caloric restriction related to aging, disease, and environmental factors. **Environ. Res.**, v. 73, p. 242,248, 1997.

FINKEL, Y.; ROSENTHAL, P.; MOLLESTON, J.; ALONSO, E. The role of pediatric gastroenterology and nutrition in developind countries. **J. Pediat. Gatroenterol. Nut.**, v. 39, p. 445-447, 2004.

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.**, v. 50, p. 261-280, 1989.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The state of food insecurity in the world: Undernourishment around the Word.** 2004. Disponível em: http://www.fao.org/docrep/007/y5650e/y5650e03.htm#P1_33>. Acesso em: 03 abr. 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The state of food insecurity in the world: undernourishment around the Word.** 2012. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i4646e.pdf>. Acesso em: 26 maio 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The state of food insecurity in the world: undernourishment around the word.** 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4646e.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The state of food insecurity in the world: undernourishment around the Word.** 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4646e.pdf>>. Acesso em: 16 abr. 2016.

FRANCO, C. L. M.; SANT'ANA, D. M. G.; ARAÚJO, E. J. Intestinal wall atrophy and increase of sulphomucin secretion in the jejunal epithelium of rats submitted to severe protein malnutrition. **Int. J. Morphol.**, v. 28, p. 497-502, 2010.

FURNESS, J. B. **The Enteric Nervous System.** Malden Mass: Blackwell, 2006.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. **Neurogastroenterol Motil**, v. 20, n. 1, p. 32-38, 2008.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 9, p. 286-294, 2012.

FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **J. Autonom. Nerv. Syst.**, v. 81, p. 87-96, 2000.

FURNESS, J. B.; CLERC, N.; GOLA, M.; KUNZE, W. A. A.; FLETCHER, E. L. Identification of component neurons and organisation of enteric nerve circuits. **Neurogastroenterology – from the basis to the clinics**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 134-147.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. Types of nerves in the enteric nervous system. **Neuroscience**, v.5, p. 1-20, 1980.

FURNESS, J. B.; JONES, C.; NURGALI, K.; CLERC, N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. **Prog. Neurobiol.**, v. 72, p. 143-164, 2004.

FURNESS, J. B.; LLOYD, K. C.; STERNINI, C.; WALSH, J. H. Projections of substance P, vasoactive intestinal peptide tyrosine hydroxylase immunoreactive nerve fibres in the canine intestine, with special reference to the innervation of the circular muscle. **Arc. Histol. Cytol.**, v.53, n.2, p. 129-140, 1990.

GABELLA, G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. **J. Anat.** v. 109, p. 81-94, 1971.

GABELLA, G. On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 30, p. 59-66, 1990.

GABELLA, G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pig and sheep. **Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 737-752, 1987.

GAGLIARDO, K. M. **Efeitos do exercício físico no envelhecimento inicial do plexo mioentérico do colo de rato wistar**: estudo quantitativo, morfométrico e ultraestrutural. 2006. 128 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

GERSHON, M. D. 5-hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.**, v. 20, p. 14-21, 2013.

GERSHON, M. D. **O segundo cérebro**. Rio de Janeiro: Campus, 2000.

GERSHON, M. D. **The second brain: the scientific basis of gut instinct and a groundbreaking new understanding of nervous disorders of stomach and intestine**. New York: HarperCollins, 1998.

GIANCAMILLO, A. D.; VITARI, F.; BOSI, G.; SAVONI, G.; DOMENEGHINI, C. The chemical code of porcine enteric neurons and the number of enteric glial cell are altered by dietary probiotics. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 22, p. 271-278, 2010.

GIROTTI, P. A.; MISAWA, R.; PALOMBIT, K.; MENDES, C. E.; BITTENCOURT, J. C.; CASTELUCCI, P. Differential effects of undernourishment on the differentiation and maturation of rat enteric neurons. **Cell Tissue Res.**, v. 353, n. 11, p. 367-380, 2013.

GOMES, O. A.; CASTELUCCI, P.; FONTES, R. B. V.; LIBERTI, E. A. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: A quantitative morphological study. **Auton. Neurosc.: basic and clinical**, v. 126, p. 277– 284, 2006.

GREGGIO, F. M.; FONTES, R. B. V.; MAIFRINO, L. B.; CASTELUCCI, P.; DE SOUZA, R. R.; LIBERTI, E. A. Effects of perinatal protein deprivation and recovery on esophageal myenteric plexus. **World J. Gastroenterol.**, v. 16, n. 5, p. 563-570, 2010.

GUNDERSEN, H. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary particles: The edge effect. **J. Micros.**, v. 111, n. 2, p. 219-223, 1977.

GUNDERSEN, H.; BENDTSEN, T.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MØLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.; PAKKENBERG, B.; SØRENSEN, F.; VESTERBY, A. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica scandinavica**, v. 96, n. 5, p. 379-394, 1988.

HAN, S. W.; CHEE, K. M.; CHO, S. J. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. **Food Chem.**, v. 172, p. 766-769, 2015.

HASLER, W. L.; KUROSAWA, S.; OWYANG, C. Regional cholinergic differences between distal and proximal colonic myenteric plexus. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 21, p. G404–G410, 1990.

HERMES, C.; AZEVEDO, J. F.; ARAÚJO, E. J. A.; SANT'ANA, D. M. G. Intestinal ascending colon morphometrics in rats submitted to severe protein malnutrition. **Int. J. Morphol.**, v. 26, p. 5-11, 2008.

HIANE, P. A.; MACEDO, L. R.; SILVA, G. M.; BRAGA, J. A. N. Avaliação nutricional da proteína de amêndoas de bocaiúva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) em ratos wistar em crescimento. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 191-206, 2006.

HOFFMAN, J. R.; FALVO, M. J. Protein – which is best? **J. Sports Scien. Med.**, v. 3, p. 118-130, 2005.

REFERÊNCIAS

- HOWIE, G. J.; SLOBODA, D.M.; VICKERS, M. H. Maternal undernutrition during critical Windows of development results in differential and sex-specific effects on postnatal adiposity and related metabolic profiles in adult rat offspring, **Brit. J. Nutr.**, v. 108, p. 298-307, 2012.
- JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining lus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem. J.**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- KIRKMEYER, S. V.; MATTES, R. D. Effects of food atributes on hunger and food intake. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v. 24, p. 1167-1175, 2000.
- KONDRUP, J.; ALLISON, S. P.; ELIA, M.; VELLAS, B.; ESPEN, M. P. guidelines for nutrition screening 2002. **Clin. Nutr.** v. 22, n. 6, p. 415–421, 2003.
- LANGLEY, J. N. **The autonomic nervous system**. London: W. Heffer, 1921. pt. 1.
- LEBOUVIER, T.; CHAUMETTE, T.; PAILLUSSON, S.; DUYCKAERTS, C.; BRULEY DES VARANNES, S.; NEUNLIST, M.; DERKINDEREN, P. The second brain and parkinson's disease. **The Europ. J. Neurosc.**, v. 30, n. 5, p.735-741, 2009.
- LEITE-MELO, E. V.; STABILE, S. R.; MIRANDA-NETO, M. H. Effect of maternal protein deprivation on morphological and quantitative aspects of the myenteric plexus neurons of proximal colon in rats. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 55, p. 106-113, 1997.
- LEVITSKY, D. A.; STRUPP, B. J. Enduring cognitive effects of early malnutrition: a theoretical reappraisal. **J. Nutr.**, v. 125, p. 221S-223S, 1995.
- LI, H.; STEIN, A. D.; BARNHART, H. X.; RAMAKRISHNAN, U.; MARTORELL, R. Associations between prenatal and postnatal growth and adult body size and composition. **Am J Clin Nutr.**, v. 77, n. 6, p.1498-1505, 2003.
- LI, Z.; CHALAZONITIS, A.; HUANG, Y.; MANN, J. J.; MARGOLIS, K. G.; YANG, Q. M.; KIM, D. O.; COTE, F.; MALLET, J.; GERSHON, M. D. Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. **J Neurosci.**, v. 31, p. 8998-9009, 2011.
- LIBERTI, E. A.; FONTES, R. B. V.; FUGGI, V. M.; MAIFRINO, L. B. M.; SOUZA, R. R. Effects of combined pre- and post-natal protein deprivation on the myenteric plexus of the esophagus of weanling rats: A histochemical, quantitative and ultrastructural study. **World J. Gastroenterol**, v. 13, n. 26, p. 3598-3604, 2007.
- LIU, M. T.; KUAN, Y. H.; WANG, J.; HEN, R.; GERSHON, M. D. 5-HT4 receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice. **J. Neurosci.**, v. 29, p. 9683-9699, 2009.

MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. São Paulo: Editora Funep, p. 75-95, 2002.

MACEDO, M. L. R.; DAMICO, D. C. S. Effects of protein fractions from *Zea mays* L. on development and survival of mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus* (Boh.). **Insect. Sci. Applic.**, v. 20, p. 135-139, 2000.

MAGA, J. A.; LORENZ, K.; ONAUEMI, O. Digestive acceptability of proteins as measured by the initial rate of *in vitro* proteolysis. **J. Food Science**, v.38, p. 173-174, 1973.

MAIFRINO, L. B.; AMARAL, S. O.; WATANABE, I.; LIBERTI, E. A.; DE SOUZA, R. R. Trypanosoma cruzi: preliminar investigation of NADH-d positive and somatostatin-immunoreactive neurons in the myenteric plexus of the mouse colon during the infection. **Exp. Parasitol.**, v. 111, n. 4, p. 224-229, 2005.

MARESE, A. C. M.; FREITAS, P.; NATALI, M. R. M. Alterations os the number and the profile of myenteric neurons of Wistar rats promoted by age. **Auton Neurosci.**, v. 137, p. 10-18, 2007.

MAROSTI, A. R. **Análise morfoquantitativa e ultraestrutural dos componentes do plexo mioentérico do intestino delgado de ratos submetidos à dieta padrão de Moçambique nos períodos pré e pós-natal**. 2016. 194 p. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

MARTINS, H. Causas, conseqüências e custos da desnutrição em Moçambique. **Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa**. Portugal, 2008.

MARTINS, V. J. B.; FLORÊNCIO, T. M. M. T.; GRILLO, L. P.; FRANCO, M. C. P.; MARTINS, P. A.; CLEMENTE, A. P.G.; SANTOS, C. D. L.; VIEIRA, M. F. A.; SAWAYA, A. L. Long-lasting effects of undernutrition. **Internat. J. Environ. Res. Public Health.**, v. 8, n. 6, p. 1817-1846, 2011.

MATOS, R. S. B. **Aspectos histoquímicos e quantitativos da renutrição precoce e tardia no córtex cerebral de rato wistar**. 2012. 178 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MENDONÇA, L. P. **Repercussões morfológicas da subnutrição proteica e da dieta padrão de Moçambique no nervo isquiático de ratos nos períodos pré e pós-natal**. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

MESSENGER, J. P.; BORNSTEIN, J. C.; FURNESS, J. B. Electrophysiological and morphological classification of myenteric neurons in the proximal colon of guinea-pig. **Neuroscience**, v. 60, p. 227-244, 1994.

MIRANDA-NETO, M. U.; MOLINARI, S. L.; STABILLE, S. R.; SANT'ANA, D. M. G.; NATALI, M. R. M. Morphologic and quantitative study of myenteric neurons of the jejunum

of malnourished rats (*Rattus norvegicus*). **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 57, n. 2-B, p. 387-391, 1999.

MISAWA, R.; GIROTTI, P. A.; MIZUNO, M. S.; LIBERTI, E. A.; FURNESS, J. B.; CASTELUCCI, P. Effects of protein deprivation and re-feeding on P2X2 receptors in enteric neurons. **World J. Gastroenterol.**, v. 16, n. 29, p. 3651-3663, 2010.

MONTE, C. M. G. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. **J Pediatr.**, v. 76, p. 285-297, 2000.

MONTEIRO, A. C. T.; PAES, S. T.; SANTOS, J. A.; LIRA, K. D. S.; MORAES, S. R. A. Effects of physical exercise during pregnancy and protein malnutrition during pregnancy and lactation on the development and growth of the offspring's femur. **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 3, p. 233-238, 2010.

MONTEIRO, C. A. A Dimensão da pobreza, da fome e da desnutrição no Brasil. **Estudos Avançados.**, v. 9, p. 1195-1202, 1995.

MONTES, G. S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell Biol. Intern.**, v. 20, n. 1, p. 15-27, 1996.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 26, n. 4, p. 471-483, 2002.

MULLER, O.; KRAWINKEL, M. Malnutrition and health in developing countries. **CMAJ**, v. 173, p. 279-286, 2005.

MYERS, B. A.; DUBICK, M. A.; GERREITS, J.; RUCKER, R. B.; JACKSON, A. C.; REISER, K. M.; WILLIAMS, S. M.; LAST, J. A. Protein deficiency: Effects on lung mechanics and the accumulation of collagen and elastin in rat lung. **J. Nutr.**, v. 113, p. 2308-2315, 1983.

NAKAJIMA, V.; KOBAYASI, S.; NARESSE, L. E.; LEITE, C. V. S.; CURI, P. R.; MONTOVANI, J. C. Alterations in the intestinal wall due to protein malnutrition in rats. Evaluation of the rupture strength and the tissue's collagen. **Acta Cir. Bras.**, v. 23, n. 5, p. 435-440, 2008.

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

NATALI, M. R. M.; MIRANDA-NETO, M. H.; ORSI, A. M. Effect of hypoproteic diet supply on adult Wistar on adult rats (*Rattus Norvegicus*). **Acta Scient.**, v. 22, p. 567-571, 2000.

REFERÊNCIAS

- 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. **Int J Morphol.**, v. 21, 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. 25, p. 45-54, 2005.
- NUNES, M.L.; BATISTA, B.B.; MICHELI, F.; BATISTELA, F. Efeitos da desnutrição precoce e reabilitação nutricional em ratos. **J. Pediatria.**, v. 78, p. 39-44, 2002.
- OLIVEIRA, B. C. C.; OLIVEIRA, F.; MARTINI, D. T.; PRISCO, C. R. D.; RIGUETTI, M.M. S.; LIBERTI, E. A.; BOLDRINI, S. C. The relative effects of severe burn injury and pre and post-natal protein deprivation on mandibular condyle morphology. **Histol. Histopathol.**, v. 25, p. 45-54, 2010.
- OLIVEIRA, I. M. V.; ANGELIS, R. C. Protein minimum requirements from some vegetable sources for laboratory growing rats. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 38, p. 23-28, 2001.
- ONIS, M.; MONTEIRO, J. A.; CLUGSTON, G. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO global database on child growth. **Bull. World Health Organiz.**, v. 71, n. 6, p. 703-712, 1993.
- OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **Netter bases da histologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- PACHNIS, V.; LARANJEIRA, C. Enteric nervous system development: recent progress and future challenges. **Autonom. Neurosci.**: basic and clinical, v. 151, p. 61-69, 2009.
- PARADA-SIMÃO, T. R.; OLIVEIRA, F.; PACHECO, M. E.; ALVES, P. H. M.; LIBERTI, E. A. Effects of protein malnutrition on muscle fibers of the brachial biceps and medial pterygoid of Wistar rats. **J. Morphol. Sci.**, v. 28, n. 3, p. 196-203, 2011.
- PHILLIPS, R. J.; POWLEY, T. L. Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. **Auton. Neurosci.**, v. 136, n. 1-2, p. 1-19, 2007.
- PIMSTONE, B.L.; BARBEZAT, G.; HANSE, J.D.; MURRAY, P. Studies on growth hormone secretion in protein-calorie malnutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 21, n. 5, p. 482-487, 1968.
- PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 179-187, 2006.
- PORTO, G. S.; PEREIRA, J. N. B.; TIBÚRCIO, V. G.; STABILLE, S. R.; DE FARIA, H. G.; GERMANO, R. M.; MARI, R. B. Effect of caloric restriction on myenteric neuroplasticity in the rat duodenum during aging. **Auton. Neurosci.**, v. 168, p. 43-47, 2012.

REFERÊNCIAS

-
- REED, M. G.; HOWARD, C. V. Surface-weighted star volume: concept and estimation. **J. Micros.**, v. 190, p. 350-360, 1998.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY-Jr, G. C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulatiob of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr.**, v. 123, p. 1931-1939, 1993.
- ROMANI, S.A.M.; LIRA, P.I.C. Fatores determinantes do crescimento infantil. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, v. 4, n. 1, p. 15-23, 2004.
- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia**: texto e atlas. 6. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2012.
- SANT'ANA, D. M. G.; MIRANDA-NETO, M. H.; DE SOUZA, R. R.; MOLINARI, S. L. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon of rats subjected to proteic desnutrition. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 55, n. 4, p. 687-695, 1997.
- SANTER, R. M. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. **J. Auton, Nerv. Syst.**, v. 49, n. 2, p. 115-121, 1994.
- SANTER, R. M.; BAKER, D. M. Enteric neuron numbers and size in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats **J. Auton, Nerv. Syst.**, v. 25, n. 1, p. 59-67, 1993.
- SANTER, R. M.; CONBOY, V. B. Prenatal undernutrition permanently decreases enteric neuron number and sympathetic innervation of Auerbach's plexus in the rat. **J. Anat.**, v. 168, p. 57-62, 1990.
- SARAIVA, L. R.; BRINDEIRO FILHO, D.; NORA, A. D. The heart in the child with severe protein-calorie malnutrition. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 58, n. 5, p. 353-357, 1992.
- SAVINO, W.; DARDENNE, M.; VELLOSO, L.A.; SILVA-BARBOSA, S.D. The thymus is a common target in malnutrition and infection. **Brit. J. Nutr.**, v. 98, n. 1, p. 11-16, 2007.
- SAWAYA, A.L. Malnutrition: longterm consequences and nutritional recovery effects. **Estudos Avançados**, v. 20, p. 147-158, 2006.
- SCHEMANN, M.; NEUNLIST, M. The human enteric nervous system. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 16, p. 55-59, 2004. Supplement 1.
- SCHOFFEN, J. P. F.; RAMPAZZO, A. P. S.; CIRILO, C. P.; ZAPATER, M. C. U.; VICENTINI, F. A.; COMAR, J. F.; BRACHT, A.; NATALI, M. R. M. Food restriction enhances oxidative status in aging rats with neuroprotective effects on myenteric neuron populations in the proximal colon. **Exper. Geront.**, v. 51, p. 54-64, 2014a.
- SCHOFFEN, J. P. F.; SOARES, A.; FREITAS, P.; BUTTOW, N. C.; NATALI, M. R. M. Effects of a hypoproteic diet on myosin-V immunostained myenteric neurons and the

proximal colon wall of aging rats. **Auton. Neurosc.**: basic and clinical, v. 122, p. 77–83, 2005.

SCHOFFEN, J. P. F.; VICENTINI, F.A.; MARCELINO, C. G.; ARAÚJO, E. J. A.; PEDROSA, M. M. D.; NATALI, M. R. M. Food restriction beginning at lactation interferes with the cellular dynamics of the mucosa and colonic myenteric innervation in adult rats. **Anais Acad. Bras. Ciên.**, v. 86, n. 4, p. 1833-1847, 2014b.

SEYFERT, C. E. **Repercussões morfológicas da lesão térmica corporal nos componentes do plexo mioentérico do jejuno de ratos adultos**. 2009. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SGARBIERI, V. C. Métodos de avaliação da qualidade nutricional dos alimentos. In: SGARBIERI, V. C. **Alimentação e nutrição**: fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo: Almed, 1987. p. 250-261.

SLAVIN, J. L. Dietary fiber and body weight. **Nutrition**, v. 21, p. 411-418, 2005.

SPANHEIMER, R.; ZLATEV, T.; UMPIERREZ, G.; DIGIROLAMO, M. Collagen production in fasted and food-restricted rats: response to duration and severity of food deprivation. **J. Nutr.**, v. 121, n. 4, p. 518-524, 1991.

STRATTON, R. J. “Elucidating effective ways to identify and treat malnutrition”. **Proceed. Nutr. Soc.**, v. 64, n. 3, p. 305–311, 2005.

TAKAHASHI, T.; OWYANG, C. Regional differences in the nitrergic innervation between the proximal and the distal colon in rats. **Gastroenterology**, v. 115, p. 1504-1512, 1998.

TAKANO, J. Intestinal changes in protein-deficient rats. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 3, p. 224-231, 1964.

TAN, S. Y.; DHILLON, J.; MATTES, R. D. A review of the effects of nuts on appetite, food intake, metabolism, and body weight. **Am J Clin Nutr.**, v. 100, p. 412-422, 2014.

TORREJAIS, M. M.; NATALI, M. R. M.; CONEGERO, C. I.; MIRANDA-NETO, M. H. Effects of proteic malnutrition after breastfeeding on the morphology in the intestinal wall and myenteric neurons of the ileum of rats. **Rev. Unimar**, v. 17, p. 315-327, 1995.

TOTANI, N.; ARAKI, Y.; TATEISHI, S. Effects of oil thermally processed with vegetable protein on gastrointestinal tract content transfer. **J. Oleo Sci.**, v. 59, n. 3, p. 115-120, 2010a.

TOTANI, N.; TATEISHI, S.; MORITA, A.; KIDA, H. The mechanism of weight-loss promoting effects of oil heated with vegetable protein. **J. Oleo Sci.**, v. 59, n. 9, p. 463-470, 2010b.

REFERÊNCIAS

VRIES, P.; SORET, R.; SUPLY, E.; HELOURY, Y.; NEUN LIST, M. Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 299, p. G539-G547, 2010.

WANDEN-BERGHE, C.; SANZ-VALERO, J.; ESCRIBA-AGUIR, V.; CASTELLÓ-BOTIA, I.; GUARDIOLA-WANDEN-BERGAE, R. Evaluation of quality of life related to nutritional status. **Brit. J. Nutr.**, v. 101, p. 950-960, 2009.

WATERLOW, C. J. **Malnutrition proteico-energetica**. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1997.

WATERLOW, C. J. Protein-energy malnutrition: the nature and extend of the problem. **Clin. Nutr.**, v.16, n.1, p. 3-9, 1997.

WEIGERT, C. Über eine methode zur färbung elastischer fasern. **ZBL All. Path. Pathol. Ana.**, v. 9, p. 292-292, 1898.

WERNETTE, C.M.; WHITE, B.D.; ZIZZA, C.A. Signaling proteins that influence energy intake may affect unintentional weight loss in elderly persons. **J. Am. Diet Assoc.**, v. 111, p. 864-873, 2011.

WHITNEY, E.; ROLFES, S. R. **Nutrição – entendendo os nutrientes**, 10. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

WILSON, A.; LLEWELLYN-SMITH, I.; FURNESS, J. B.; COSTA, M. The source of the nerve fibres forming the deep muscular and circular muscle plexuses in the small intestine of the guinea-pig. **Cell Tis. Res.**, v. 247, n. 3, p. 497-504, 1987.

WISKUR, B.; MEERVELD, B. G. The aging colon: the role of enteric neurodegeneration in constipation. **Curr, Gastroenterol. Rep.**, v. 12, p. 507-512, 2010.

WOODROOF, J. G. Composition and nutritive value of peanuts. In: AUTOR, A. B. **Peanut production, processing, products**. 3. ed. United Kingdom: Avi Publishing Co, 1983. p.165-179.

WORLD FOOD PROGRAMME (WFP). **Hunger map**. 2015. Disponível em: <<http://documents.wfp.org/stellent/groups/public/documents/communications/wfp275057.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Nutrition**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/nutrition/en/>>. Acesso em: 26 nov. 2015.

YANAGUIZAWA, M.; TABERNER, G. S.; AIHARA, A. Y.; YAMAGUCHI, C. D. K.; GUIMARÃES, M. C.; ROSENFELD, A.; FERNANDES, J. L.; FERNANDES, A. R. C. Imaging of growth plate injuries. **Radiol. Bras.**, v. 41, n. 3, p. 199-204, 2008.

REFERÊNCIAS

ZAR, J. H. **Bioestatistical analysis**. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1984.