

FERNANDO CARLOS DE SOUSA

**ESTUDO SOBRE A RESTRIÇÃO
PROTÉICA E SEUS EFEITOS NO PLEXO
MIOENTÉRICO DE RATOS EM
ENVELHECIMENTO**



MARINGÁ-PR

2006

FERNANDO CARLOS DE SOUSA

**ESTUDO SOBRE A RESTRIÇÃO PROTÉICA E
SEUS EFEITOS NO PLEXO MIOENTÉRICO DE
RATOS EM ENVELHECIMENTO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de Concentração – Biologia Celular), da Universidade Estadual de Maringá, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcílio Hubner de Miranda Neto

**Maringá-PR
2006**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S725e Sousa, Fernando Carlos de
 Estudo sobre a restrição protéica e seus efeitos no
 plexo mioentérico de ratos em envelhecimento /
 Fernando Carlos de Sousa. – Maringá, PR : [s.n.],
 2006.
 98 f. : il.

 Orientador : Prof. Dr. Marcílio Hubner de Miranda
 Neto.

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
 Maringá. Programa de Pós-graduação em Ciências
 Biológicas, 2006.

 1. Desnutrição protéica - Envelhecimento -
 Deficiência. 2. Desnutrição - Pobreza -
 Envelhecimento. 3. Desnutrição protéica - Plexo
 mioentérico. 5. I. Universidade Estadual de Maringá.
 Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. II.
 Título.

CDD 21.ed.611.018

Aos meus cúmplices,
Edimara Rodrigues de Castro e Vinícius Castro Sousa.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de realização deste curso de Mestrado.

À professora Dra Sonia Lucy Molinari, quem primeiro fez nascer em mim o amor pela anatomia, e ao meu orientador, professor Dr. Marcílio Hubner de Miranda Neto. Agradeço especialmente por não terem me ensinado somente “ciência”, mas cidadania e ética. A sua conduta pessoal e profissional me influenciará por toda vida.

Às professoras Sonia Tranin de Mello, Dra Maria Raquel Marçal Natali e Dra Célia Regina Gomes Godoy, por me ensinarem que o mérito de um cientista deve ser dado por sua capacidade e esforço para alcançar o conhecimento e não pela posse de um dado conhecimento nem pelo domínio de uma técnica; o conhecimento em si é livre e deve ser compartilhado.

À professora Larissa Renata de Oliveira que gentilmente me enviou anotações pessoais de seus estudos sobre o estômago do rato. Obrigado, pelo apoio no início dos meus estudos sobre o Sistema Nervoso Entérico, por me familiarizar ao Laboratório de Neurônios Entéricos da UEM, e pela amizade verdadeira.

Aos professores, Dr. Sergio Zucoloto (USP), Dr. David Torralardona (Itália) e Dra Liliana Luciano (Alemanha), que gentilmente me enviaram artigos científicos. Obrigado por sua colaboração e generosidade. O artigo clássico da Dra Luciano que recebi autografado vai ser sempre motivo de orgulho.

À Cleonira Sarro e José Antonio de Souza pelo suporte técnico necessário para produção deste trabalho e pelos quase dez anos de convivência.

Aos amigos do Laboratório de Neurônios Entéricos da Universidade Estadual de Maringá, João Paulo Schoffen e Priscila de Freitas, pelo companheirismo, suporte e amizade ao longo de vários anos.

Às professoras Caroline Rosa Fillaneli e Vilma Balielo e toda equipe do Campus Maringá da PUCPR, pela amizade e apoio.

Aos meus pais e irmãos, que mesmo com todas as dificuldades apoiaram o meu sonho de criança de ser cientista. O sonho virou projeto e esta é mais uma etapa. Obrigado por acreditarem em mim.

Agradeço a Deus que além da vida e de toda provisão me deu Yeshua Ha Mashiach (Jesus o Messias) a Torá, a BritChadashá e demais escrituras que nos ensinam o caminho.

O que é mais difícil? O que parece mais simples: ver
com os olhos o que está diante deles.
Goethe

APRESENTAÇÃO

Em consonância com a Resolução Nº 01/2003-CCPBC do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, esta dissertação de mestrado é composta por um artigo científico completo e um de revisão na forma exigida pelas revistas científicas em que pretendemos publicá-los, assim sendo:

SOUSA, F.C.; MIRANDA-NETO, M.H. Desnutrição: inter-relações entre os aspectos celulares e sociais. Este artigo será submetido à apreciação do corpo editorial da revista *Arquivos da APADEC* (ISSN 1414-7149), visando sua publicação.....Pág. 15

SOUSA, F.C.; MIRANDA-NETO, M.H. Efeitos da alimentação hipoprotéica sobre os neurônios NADH-diaforase positivos do estômago de ratos em envelhecimento / Effects of hypoproteic feeding on the NADH-diaphorase positive neurons of the stomach of aging rats. Este artigo será submetido à apreciação do corpo editorial da revista *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* (ISSN 1566-0702), visando sua publicação.....Pág. 35

Normas para publicação da revista *Arquivos da APADEC* (ISSN 1414-7149).....Pág. 90

Normas para publicação da revista *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* (ISSN 1566-0702).....Pág. 93.

RESUMO

A desnutrição protéico-calórica é o tipo mais comum de desnutrição no mundo e afeta milhares de pessoas. Existem dois extremos de desnutrição protéico-calórica: o marasmo e o kwashiorkor. O marasmo é um quadro de redução total na oferta de alimento; enquanto o kwashiorkor é caracterizado pela maior deficiência de proteínas em relação aos carboidratos.

O maior custo dos alimentos ricos em proteínas em relação aos carboidratos acarreta uma maior prevalência de desnutrição por deficiência de proteínas em populações com baixa renda, as quais já são mais vulneráveis a muitos outros problemas e geralmente menos amparadas pelo Estado, tornando o problema da desnutrição uma questão social.

Neste trabalho, refletimos sobre como os altos índices de pobreza e concentração de renda historicamente tem contribuído para altos índices de desnutrição no Brasil. Acreditamos que os conhecimentos sobre a dimensão social e fisiológica da desnutrição não devem ficar restritos ao meio acadêmico e por isso nos empenhamos em produzir um trabalho com uma linguagem voltada para educadores e pessoas da comunidade em geral, a fim de levar para fora dos muros da universidade a discussão sobre pobreza, desnutrição e seus efeitos.

O aumento na população de idosos é um fenômeno que está ocorrendo em muitos países, inclusive no Brasil, e muitos estudos têm sido realizados buscando compreender os mecanismos de envelhecimento e subsidiar práticas e ações para promover o envelhecimento saudável. Devido às alterações metabólicas e fisiológicas do envelhecimento, como menor eficiência na absorção e utilização dos nutrientes e redução na massa muscular, os idosos são predispostos a sofrerem desnutrição protéica. Também é comum os idosos apresentarem queixas de problemas gastrointestinais, como

esvaziamento gástrico retardado, acalasia, etc. Como o sistema nervoso entérico é o principal sistema de controle das atividades do trato gastrointestinal, realizamos um estudo experimental, utilizando como modelo o plexo mioentérico do estômago de ratos, a fim de realizar um paralelo entre a desnutrição protéica e o envelhecimento.

O modelo de restrição protéica utilizado neste trabalho tem sido empregado por vários anos no Laboratório de Neurônios Entéricos da Universidade Estadual de Maringá. Em animais jovens, esse modelo tem se mostrado eficiente em promover um quadro de carência de proteínas semelhante ao kwashiorkor encontrado em humanos submetidos a dietas com redução de proteínas e oferta de carboidratos. Atualmente, o modelo está sendo utilizado em animais em fase mais avançada de envelhecimento.

Para a realização desta pesquisa, utilizamos 10 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, distribuídos em dois grupos. O grupo controle foi formado por cinco animais que, ao longo do período experimental (entre os 210 e 345 dias de vida), foram alimentados com dieta comercial para roedores, contendo 22% de proteínas. No grupo restrição protéica, foram utilizados cinco animais que, durante o período experimental, foram alimentados com dieta hipoprotéica (8% de proteínas), obtida a partir de adição de amido de milho na dieta comercial. Durante o período experimental, foi controlada a evolução do ganho de peso e o consumo de ração dos animais. Ao final do período experimental, os animais tiveram seu peso e seu comprimento mensurados; então foram mortos, e seus estômagos coletados. Os estômagos foram preparados para estudo neuronal.

Para evidenciação dos neurônios, utilizou-se a técnica histoquímica da NADH-diaforase. Através de microdissecção, foram obtidos preparados totais das regiões aglandular e glandular do estômago de cada um dos animais. Esses preparados foram utilizados para estudo quantitativo e morfométrico dos neurônios NADH-diaforase

positivos. No estudo morfométrico, foi mensurada a área do perfil do corpo de 100 neurônios por animal – 50 da região aglandular e 50 da região glandular – utilizando-se um sistema computadorizado. Para quantificação dos neurônios, lâminas com os preparados totais de estômago foram observadas em microscópio de luz, e contou-se o número de neurônios em 80 campos de visualização (19 mm^2) por animal – 40 na região aglandular e 40 na região glandular.

Nossos resultados sugerem que a oferta de dieta com 8% de proteínas, quando comparada com a alimentação por ração padronizada (22% de proteínas), causa modificações em parâmetros corporais, alimentares e neuronais de ratos em envelhecimento.

Nos parâmetros corporais, encontramos alterações no padrão de crescimento dos animais alimentados com dieta hipoprotéica, com redução de 5,5% no ganho de peso médio e aumento na formação de gordura retroperitoneal e periepididimal, com média de 19%, sugerindo redução na massa muscular e aumento na massa adiposa. Observamos que os animais alimentados com a ração hipoprotéica apresentaram hipofagia, em relação aos animais alimentados com a ração padrão. O tratamento também levou à redução das proteínas totais e das globulinas no plasma, mas não reduziu a albumina plasmática. Essas alterações sugerem que a dieta oferecida levou à redução na disponibilidade tecidual de aminoácidos, indicando que o teor de 8% de proteínas encontra-se abaixo do requerimento nutricional de ratos entre os 210 e 345 dias de vida.

Com relação aos parâmetros neuronais analisados, observamos que a restrição protéica intensifica a redução no número de neurônios NADH-diaforase positivos em animais em envelhecimento. Os animais submetidos à restrição protéica, em relação aos animais controle, apresentaram menor número de neurônios no plexo mioentérico das

regiões aglandular (20%) e glandular (10%) do estômago. O estudo morfométrico revelou que os animais submetidos à restrição protéica apresentaram redução no tamanho do perfil do corpo dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos. A redução no número e tamanho dos neurônios NADH-diaforase positivos indica redução na atividade metabólica mitocondrial desses neurônios e redução na atividade e/ou expressão da enzima NADH-diaforase.

A população de neurônios NADH-diaforase positivos tem sido relatada em alguns estudos como resistente à redução por envelhecimento em animais com dieta padrão. Discute-se a possibilidade de que dietas com redução no teor de proteínas podem alterar esse padrão por induzirem alterações sistêmicas e intracelulares.

Palavras-chave: pobreza, envelhecimento, restrição protéica, sistema nervoso entérico.

ABSTRACT

Protein malnutrition is the commonest type of undernutrition and affects thousands of individuals worldwide. There are two extremes of protein-caloric undernutrition: marasmus and kwashiorkor. Marasmus is a picture of total reduction of food offer, while kwashiorkor is characterized by greater protein than carbohydrate deficiency.

The higher costs of protein-rich foods compared to carbohydrates leads to a greater prevalence of malnutrition due to protein deficiency in low-income populations, which are already more vulnerable to many other problems and often less supported by the State. This makes of malnutrition a social issue.

In this work, we consider how the high indexes of poverty and income concentration have historically contributed to the high prevalence of malnutrition in Brazil. We believe that the awareness about the social and physiological dimensions of malnutrition should not be restricted to academic circles and thus we made efforts to produce manuscript accessible to educators and the community in general, so as to bring the discussion about poverty, malnutrition and their effects out of the walls of the university.

The increase of the elderly population is a phenomenon occurring in many countries, Brazil included, and many studies have been undertaken to understand the aging mechanisms and give support to practices and actions towards healthy aging. Due to the metabolic and physiological changes of aging, such as lower absorption efficiency and nutrient utilization, and decreased muscle mass, older people are prone to suffer from protein malnutrition. It is also common that the elderly complain of gastrointestinal problems, such as delayed gastric emptying, achalasia, etc. As the enteric nervous system is the major controlling system of the gastrointestinal tract

activities, we carried out an experimental study, using the myenteric plexus of the rat stomach as a model, to trace parallels between protein malnutrition and aging.

The model of protein restriction used in this work has been employed for several years in the Laboratory of Enteric Neurons of the State University of Maringá. In young animals, this model was shown to be effective in promoting a picture of protein lack similar to the kwashiorkor found in humans subjected to low-protein diets and carbohydrate offer. At present, the model is being used in animals at an advanced stage of aging.

For this research, 10 male rats (*Rattus norvegicus*) were allotted to two groups. The control group was composed of five animals that, during the experimental period (from 210 to 345 days of life) were fed with commercial rodent chow, containing 22% protein. In the protein restriction group, it was used five animals that, during the experimental period, were fed with hypoproteic chow (8% protein), obtained from the addition of corn starch to the commercial chow. Throughout this period, body weight gain and food ingestion were recorded. At the end of the experiment, the animals were weighted and measured, then killed and the stomachs collected. These were prepared for neuronal study.

For the staining of the neurons, it was used the histochemical technique of the NADH-diaphorase. Through microdissection, whole-mounts were obtained from the forestomach and glandular stomach of each of the animals. These whole-mounts were used for the quantitative and morphometric assessment of the NADH-diaphorase positive neurons. In the morphometric study, the area of the cell body profile of 100 neurons per animal – 50 from the forestomach and 50 from the glandular stomach – was measured using a computerized system. For neuronal counts, the laminae of the whole-mounts were observed under light microscope and the number of neurons in 80 visual

fields (19 mm²) per animal – 40 from the forestomach and 40 from the glandular stomach – was counted.

Our results suggest that the offer of an 8%-protein diet, when compared to standard chow feeding (22% protein), causes changes in body, feeding and neuronal parameters in aging rats.

As for the body parameters, we found changes in the growth pattern of the animals fed with hypoproteic diet, with reduction of 5.5% in the mean weight gain and increase in the formation of retroperitoneal and periepididymal fat pads of 19% on average, suggesting reduction in the muscle mass and increase in the adipose mass. We observed that the animals fed with hypoproteic chow were hypophagic, compared to the animals fed with standard chow. The treatment also reduced total proteins and globulins from the plasma, but did not decrease plasma albumin. These changes suggest that the diet led to a decreased tissue availability of aminoacids, indicating that the 8%-protein level is below the nutritional requirement of rats aging from 210 and 345 days.

As for the neuronal parameters investigated, we observed that protein restriction intensifies the decrease in the number of NADH-diaphorase positive neurons in aging animals. The animals subjected to protein restriction, relative to the controls, showed smaller number of neurons in the myenteric plexus of the forestomach (20%) and glandular stomach (10%). The morphometric study revealed that the animals subjected to protein restriction showed decreased size of the cell body profile of the NADH-diaphorase positive neurons. The decreased number and size of these neurons points to a decreased mitochondrial metabolic activity and decreased activity and/or expression of the NADH-diaphorase enzyme.

The population of NADH-diaphorase positive neurons has been reported in some studies as being resistant to reduction due to aging in animals with standard chow.

It is discussed the possibility that diets with reduced protein levels can modify this pattern by inducing systemic and intracellular changes.

Key words: poverty, aging, protein restriction, enteric nervous system.

**Desnutrição: inter-
relações entre os
aspectos celulares
e sociais**



Desnutrição: inter-relações entre os aspectos celulares e sociais

Fernando Carlos de Sousa*, Marcílio Hubner de Miranda Neto**

*** Professor – Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)**

****Professor – Departamento de Ciências Morfofisiológicas,
Universidade Estadual de Maringá (UEM)**

Correspondência para:

Fernando Carlos de Sousa

Rua Olímpio Mendes da Rocha, 206B, Vila Esperança, Maringá-PR.

CEP 87020-780

Fone: 44 3263-9637

Fax: 44 3028-8400

e-mail: fernandoanatomia@uol.com.br

DESNUTRIÇÃO: INTER-RELAÇÕES ENTRE OS ASPECTOS CELULARES E SOCIAIS

Resumo. No presente artigo, buscou-se reunir informações sobre a desnutrição no tocante a fisiopatologia e estatísticas sobre indicadores nutricionais e sociais no Brasil. Percebe-se que a desnutrição protéico-calórica possui causas e conseqüências variadas e complexas que infelizmente são estudadas de maneira fragmentada, comprometendo a real compreensão da dimensão do problema. Isto nos motivou à produção deste artigo, que busca reunir reflexões sobre as múltiplas questões que envolvem a desnutrição, desde o nível social ao nível microscópico, uma vez que as alterações celulares, sejam elas fisiológicas ou morfológicas, decorrem de uma ingestão inadequada de alimentos associada a diferentes fatores: fisiológicos, sociais, culturais ambientais, políticos, éticos e morais.

Palavras-Chave: desnutrição; pobreza; fisiopatologia.

Malnutrition: interrelations between cellular and social aspects

Abstract. In the present paper we seek to gather information concerning malnutrition on its physiopathology and statistical data about nutritional and social indicators in Brazil. In face of the data, could be perceived that protein-caloric malnutrition has diverse and complex causes and consequences that unfortunately are studied in a fragmented manner hindering the real understanding of this problem's dimension. This point of view had motivated the production of this paper that aimed to gather reflections concerning the varied subjects involving malnutrition from social to the microscopic level since both morphological and physiological cellular alterations are due the inadequate food intake associated to many different factors, such as: physiological, social, cultural, environmental, political, ethical and moral ones.

Key words: malnutrition; poverty; physiopathology

INTRODUÇÃO

A célula é a unidade funcional dos seres vivos. Isso quer dizer que a vida de um organismo é a somatória do trabalho de todas as suas células. Toda atividade biológica, desde processos de defesa contra agentes agressores até o pensamento e os sentimentos tão complexos dos seres humanos se apóiam sobre uma base celular, o que implica um gasto constante de energia por parte de cada uma das células que constituem o organismo humano. Pode-se inclusive afirmar que viver é consumir energia para reproduzir. Portanto, desde a concepção até a morte, ocorre um processo contínuo de reprodução celular que permite ao organismo crescer, enquanto jovem, reparar tecidos lesados, repor células mortas, substituir células envelhecidas por células jovens, bem como sintetizar neurotransmissores, enzimas diversas, hormônios, proteínas estruturais, anticorpos e vários outros compostos que formam a matéria viva ou que são indispensáveis para a sua manutenção.

O substrato requerido pelas células para obtenção de energia, bem como a matéria prima para a síntese de todos os compostos celulares vêm da dieta. Assim, uma dieta adequada deve considerar fatores qualitativos (tipos necessários de nutrientes) e quantitativos (quantidade necessária de cada nutriente).

Existe uma ampla gama de estudos nutricionais capazes de indicar a “dieta ideal” para cada faixa etária ou até mesmo para cada indivíduo, de acordo com as suas condições de saúde. Noções básicas de nutrição são oferecidas desde a pré-escola, entretanto, no Brasil e em todo o mundo, o número de desnutridos é muito expressivo.

As carências nutricionais resultam da ingestão inadequada de carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais, originando com frequência quadros de desnutrição protéica ou desnutrição protéico-calórica.

A oxidação intracelular dos carboidratos e dos lipídios é a principal fonte de energia para manutenção das atividades celulares. Pelo fato de essa energia – fornecida pelos carboidratos e lipídios, e em certas ocasiões por outros compostos celulares – ser medida laboratorialmente na unidade de calorias, é que se denomina de desnutrição calórica ou déficit calórico a deficiência de carboidratos e lipídios.

A ingestão de alimentos ricos em açúcares (carboidratos) como arroz, biscoito, pão macarrão, rapadura, mandioca, batata-doce, entre outros, garante ao organismo fontes baratas de energia, pois esses alimentos, ao serem digeridos, liberam moléculas de açúcares simples, como a glicose e a frutose, que são transportadas pelo sangue até as células, onde servem à respiração celular, ou seja, são oxidadas (queimadas), liberando a energia necessária à vida celular e à vida de todo o organismo, possibilitando, dessa maneira, a realização das atividades físicas e mentais características do fazer humano. Portanto falar em deficiência de calorias é falar em redução na disponibilidade de energia pelas células e, conseqüentemente, em redução da capacidade humana para produzir trabalho físico e mental, comprometendo a capacidade dos sujeitos de interagirem com o mundo.

Por outro lado, as proteínas – que também são moléculas energéticas, mas em humanos normalmente não são usadas como fonte primária de energia – possuem atividades muito diversas: atuam como elemento estrutural, conferindo consistência, dureza e resistência ao corpo; estão presentes na composição de muitos hormônios; formam anticorpos que são elementos do nosso sistema imunológico, e também as enzimas que compõem a maquinaria celular, ou seja, o conjunto de estruturas responsáveis pelo funcionamento e pela regulação do metabolismo em cada célula do organismo.

Mesmo quando não são utilizadas como fonte de energia, as proteínas desempenham papéis fundamentais na respiração celular, pois são as proteínas dos alimentos que, após serem digeridas, fornecem aminoácidos que serão utilizados para a produção de enzimas que atuam na cadeia respiratória. Por causa disso, a carência de proteínas pode comprometer seriamente a captação, o transporte e a utilização do oxigênio, elemento fundamental para a utilização dos alimentos energéticos na respiração celular. Em outras palavras, a utilização dos alimentos energéticos de maneira eficaz é diretamente dependente do acesso do sujeito ao oxigênio do ar e de seu transporte até as células, onde, no nível mitocondrial, atuará como “comburente” na reação de queima (oxirredução) característica da respiração celular.

É importante que cada cidadão compreenda que a função dos pulmões é promover a hematose, enquanto a verdadeira respiração é um fenômeno celular, cuja função é a liberação da energia contida nas ligações químicas dos alimentos energéticos como a glicose, obtida principalmente a partir da digestão do amido presente em diversos alimentos como pão, arroz, macarrão, batata, etc. É também interessante que cada indivíduo reflita sobre a seguinte questão: o que é mais caro para ser obtido, glicose ou oxigênio? Realizamos essa pergunta numerosas vezes durante aulas na graduação, cursos para professores do ensino fundamental e médio e para profissionais da saúde e, na maioria das vezes, as pessoas respondiam que a glicose é mais difícil de ser obtida, já que deve ser comprada com os alimentos, enquanto o oxigênio está disponível no ar. Verifica-se por tal resposta um grande engano decorrente do ensino fragmentado praticado em todos os níveis de escolarização. Cabe lembrar que a glicose é encontrada geralmente em alimentos de baixo custo. Por outro lado, o transporte do oxigênio dos pulmões até as células depende da existência de um número ideal de hemácias no sangue, e que essas hemácias sejam ricas em hemoglobina

(combinação de proteína com ferro), que transporta o oxigênio em direção às células e traz o gás carbônico por elas produzido. Acontece que as hemácias vivem cerca de 120 dias. Após esse período, são destruídas pelo fígado e pelo baço e substituídas por novas hemácias produzidas pela medula óssea vermelha. Para a produção de novas hemácias ser eficaz, faz-se necessária uma ingestão adequada de proteínas e ferro, pois a proteína, ao ser digerida nos intestinos, transforma-se em aminoácidos que são lançados na corrente sanguínea e distribuídos para diferentes órgãos e tecidos, onde podem ser utilizados para produção de enzimas, anticorpos, partes de células e novas células que garantem a renovação dos tecidos. A baixa ingestão de proteínas, portanto, compromete todos os processos citados, podendo resultar em maior incidência de infecções - devido à redução das defesas do organismo - retardo no crescimento de crianças, envelhecimento precoce dos adultos, redução na quantidade e na qualidade das hemácias com comprometimento do transporte de gases.

Nas classes sociais em que dinheiro para comprar alimento não é um problema, o excesso de ingestão de alimentos ricos em amido e/ou gordura em detrimento daqueles que contêm vitaminas, minerais e proteínas está geralmente vinculado a maus hábitos alimentares. Já entre os mais pobres, a tendência a ingerir muito carboidrato é, em princípio, uma decorrência da questão financeira, pois os alimentos ricos em carboidratos são geralmente mais baratos e mais fáceis de serem obtidos do que aqueles ricos em proteína. Concorrem, portanto, para uma alimentação distorcida: questões culturais; questões ambientais (seca prolongada); questões políticas (falta de uma política adequada de distribuição de alimentos); questões econômicas e sociais (concentração de renda, baixos salários e desemprego); e questões éticas e morais (desvios do dinheiro público, roubo da merenda escolar).

Portanto a desnutrição protéico-calórica tem causas e conseqüências variadas e complexas, as quais infelizmente são estudadas de maneira fragmentada, comprometendo a real compreensão da dimensão do problema. Esse fato nos motivou à produção deste artigo, que busca reunir reflexões quanto às múltiplas questões sobre a desnutrição, desde o nível social ao nível microscópico.

DESNUTRIÇÃO PROTÉICO-CALÓRICA

CONCEITO DE DESNUTRIÇÃO E FORMAS EXTREMAS DE DESNUTRIÇÃO PROTÉICO-CALÓRICA (marasmo e kwashiorkor)

A desnutrição é definida como um estado patológico de diferentes graus de intensidade e variadas manifestações clínicas. Ela é produzida pela deficiente assimilação dos componentes dos diferentes grupos de nutrientes. O conceito de desnutrição compreende desde formas graves de desnutrição protéico-calórica, como o marasmo e o kwashiorkor, bem como formas intermediárias ou moderadas, além da deficiência de outros nutrientes (vitaminas e/ou minerais), que pode ocorrer separadamente ou, como é comum, associada ao déficit protéico-calórico.

Os quadros clínicos denominados de marasmo e o kwashiorkor representam dois extremos da desnutrição protéico-calórica. Entretanto, independentemente da forma clínica encontrada, há deficiência protéica. Mesmo nos casos em que a ingestão protéica é adequada, a deficiência calórica faz as proteínas serem utilizadas para fins energéticos. A desnutrição protéico-calórica pode ser encontrada em todas as partes do mundo e em todas as idades, sendo mais comum em crianças pobres dos países em desenvolvimento (OLIVEIRA & MARCHINI, 1998).

MARASMO

Marasmo é uma deficiência crônica de energia. Em estados avançados, caracteriza-se por perda da massa muscular e ausência de gordura subcutânea.

A glicose, um carboidrato, é fonte primária de energia para o tecido nervoso, as hemácias, os leucócitos e outros tecidos que dela dependem. Para manter a função, o nível de glicose deve ser mantido dentro de uma faixa normal em todos os momentos. Para isso, após as refeições, parte da glicose absorvida dos alimentos é armazenada na forma de glicogênio e utilizada durante o jejum. Nos seres humanos as reservas de glicose na forma de glicogênio duram cerca de 24 horas.

O organismo pode sintetizar glicose a partir de outros compostos, processo chamado de neoglicogênese ou gliconeogênese, sendo o principal substrato para isso os aminoácidos, moléculas que formam as proteínas. Todos esses processos estão sujeitos a mecanismos de controle, principalmente controle hormonal. Durante o jejum o hormônio insulina tem sua secreção diminuída, e os hormônios catabólicos – epinefrina, tiroxina, hormônio do crescimento e glucagon – têm sua liberação aumentada. Tais hormônios estimulam a quebra do glicogênio e a liberação de aminoácidos das proteínas musculares e outros substratos disponíveis para a gliconeogênese. Conforme a inanição prossegue, o corpo se adapta, e no fígado, a gliconeogênese diminui a produção de 90% de glicose para menos de 50%. Simultaneamente a isso aumenta sua produção pelos rins, para suprir a redução da produção ocorrida no fígado.

Além de glicose, durante o jejum, a gordura armazenada no tecido adiposo é usada como fonte de energia primariamente pelos músculos, inclusive o músculo cardíaco. A liberação e o uso de ácidos graxos das gorduras armazenadas no tecido adiposo requerem que os níveis de insulina sejam mantidos baixos e que haja um aumento dos hormônios glucagon, cortisol, epinefrina e do hormônio do crescimento. Esses hormônios estimulam a liberação de ácidos graxos do tecido adiposo. Tais ácidos graxos viajam pela corrente sanguínea, ligados às proteínas presentes no plasma, e são

captados pelo fígado. Nas mitocôndrias hepáticas, os ácidos graxos podem dar origem a compostos denominados de corpos cetônicos.

A adaptação à inanição depende da produção de corpos cetônicos. Conforme se eleva o nível de corpos cetônicos durante o jejum, o tecido nervoso adapta-se aumentando a síntese das enzimas necessárias para a utilização dos corpos cetônicos como fonte primária de energia. Como o tecido nervoso, principal consumidor de glicose, está utilizando um combustível alternativo para a glicose, a demanda de proteína muscular para gliconeogênese diminui. Dessa forma, em um indivíduo que está adaptando-se à inanição, as perdas de proteína são minimizadas, e a massa muscular poupada. Apesar de a gordura não poder ser transformada em glicose, ela fornece corpos cetônicos para o tecido nervoso e para os músculos. Enquanto a água estiver disponível, o indivíduo de peso normal pode jejuar por um mês – são mantidos índices nutricionais relativamente normais, função imunológica e outros sistemas. Porém, após esse tempo, quando as reservas de gordura esgotam-se, a proteína será utilizada e o indivíduo morrerá (WAITZBERG & MOREIRA-JÚNIOR, 2001; MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005).

KWASHIORKOR

O kwashiorkor é um quadro que se instala quando a dieta é muito mais deficiente de proteínas do que de calorias. Esse quadro foi primeiro descrito por Cicely D. Willians, em 1933, quando trabalhava como médica voluntária na África. O termo kwashiorkor vem de um dialeto africano e quer dizer “a doença do primeiro filho quando nasce o segundo”.

Cicely observou que as mulheres africanas, ao terem seus filhos, alimentavam-nos com o leite materno, uma boa fonte de nutrientes. Entretanto como elas logo engravidavam novamente, quando o próximo filho nascia, o precedente deixava de ser

alimentado com leite materno e passava a receber uma dieta monotonamente à base de farinha de milho, capaz fornecer os carboidratos necessários para o fornecimento de calorias, mas incapaz de suprir as necessidades protéicas de um organismo em crescimento (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005).

A adaptação não é possível para os doentes de kwashiorkor porque a ingestão de carboidratos estimula a liberação de insulina.

A insulina é um hormônio de armazenamento que impede as reservas de gordura de serem empregadas para combustível. Ela também inibe a transformação de gordura em corpos cetônicos. A secreção de insulina impede a quebra de proteína muscular, e esta não pode ser utilizada para produzir albumina e outras proteínas necessárias aos órgãos e ao sangue. Dessa forma, por ser a albumina importante para a retenção de água no sangue, quando reduzida, ocorre acúmulo de água nos tecidos e edema. A função neural e a absorção intestinal ficam comprometidas, ocorre redução da capacidade cardíaca, fadiga e redução da função imunológica.

A desnutrição protéico-calórica não adaptada é perigosa não apenas porque a perda de proteína ininterrupta pode se tornar prejudicial à vida, por comprometer os músculos do coração e o sistema respiratório, mas também porque compromete o sistema nervoso e o imunológico. Limitando a defesa do indivíduo, ela o torna suscetível a um ciclo vicioso de infecções, diarreia, mais perda de nutrientes, infecções oportunistas e morte (RIELLA, 2001; MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2005).

MARASMO-KWASHIORKOR

O quadro misto marasmo-kwashiorkor é uma combinação de deficiência calórica crônica com deficiência protéica crônica ou aguda. Isso ocorre, por exemplo, quando um paciente marasmático é submetido a um estresse agudo, como trauma cirúrgico ou infecção, de forma que o kwashiorkor se adiciona à desnutrição calórica prévia. O

marasmo-kwashiorkor apresenta uma mistura da sintomatologia dos dois estados comentados anteriormente (OLIVEIRA & MARCHINI, 1998; WAITZBERG & MOREIRA-JÚNIOR, 2001).

ALTERAÇÕES NA ALTURA E NO PESO

Além das alterações fisiológicas já descritas para os quadros de marasmo e de kwashiorkor, é importante ressaltar as alterações na altura e no peso provocadas pela desnutrição protéico-calórica, uma vez que essas alterações, por serem mais fáceis de aferir, são largamente utilizadas em estudos do estado nutricional de grandes populações.

Para avaliação da desnutrição infantil, são utilizados os índices de peso relativo à idade (peso/idade) e altura relativa à idade (altura/idade), pois a desnutrição crônica afeta o desenvolvimento e leva à redução da altura e do peso de crianças. Admite-se como padrão de altura e peso para determinada idade os dados coletados em extensos estudos na população dos Estados Unidos. A partir daqueles dados, considera-se que a ocorrência de crianças com baixa altura/idade, com frequência maior do que 2,3%, e a ocorrência de crianças com baixo peso/idade, com frequência maior do que 5% da população infantil, indicam severo impedimento do desenvolvimento, porque tais frequências são extremamente raras em populações consideradas bem nutridas.

Para a população adulta, utiliza-se o índice de massa corporal (IMC), expresso pelo peso em quilos dividido pela altura em metros ao quadrado. Segundo o Comitê de Especialistas da Organização Mundial da Saúde, valores de IMC inferiores a $18,5 \text{ kg/m}^2$ indicam nível mínimo de reservas energéticas no adulto. Esse valor pode ser encontrado em populações que não apresentam restrição alimentar, mas em um índice percentual limitado entre 3 a 5% das pessoas. Essa fração representaria o contingente de indivíduos constitucionalmente magros em uma população. Admite-se que indivíduos com IMC

menor que $18,5 \text{ kg/m}^2$, presentes em frequência superior a 5% da população, indiquem exposição da população a déficits protéico-calóricos que levam ao déficit de crescimento e/ou à redução da massa corporal, caracterizando o quadro de desnutrição protéico-calórica (MONTEIRO, 1995; NÓBREGA, 1998).

POBREZA, FOME E DESNUTRIÇÃO NO BRASIL

Estudos estatísticos sobre pobreza, a fim de simplificar dos resultados, consideram apenas a situação monetária, utilizando o conceito de linha de pobreza, que no caso brasileiro baseia-se no valor do salário-mínimo.

O salário-mínimo foi precedido pela criação da “ração essencial mínima”, em 1938, a qual seria composta dos alimentos necessários para a manutenção da saúde de um trabalhador adulto. Criado em 1º de maio de 1940, o salário-mínimo, anunciado à nação pelo discurso do presidente Vargas, seria capaz de garantir o indispensável para o sustento do trabalhador e de sua família, segundo afirmação daquele presidente (VASCONCELOS, 2005).

Considera-se como pobre a pessoa com renda individual per capita abaixo de 0,5 (meio) salário-mínimo, e como indigente aqueles com renda inferior a 0,25 (um quarto) salário-mínimo; mas o uso de uma linha de pobreza fixa pode gerar problemas. Algo que pode ser citado como exemplo é o fato de no Brasil haver um grande contingente de aposentados, cujo piso da aposentadoria é o salário-mínimo. Se estabelecermos uma linha de pobreza um centavo abaixo do valor de um salário-mínimo, esses aposentados não serão incluídos como pobres; por outro lado, se estabelecermos uma linha de pobreza um centavo acima do salário-mínimo, todos eles serão contados como pobres. Outro problema é que para compor as estatísticas oficiais são coletados apenas dados da população residente, excluindo-se uma massa de pessoas que moram na rua.

No período de 1977 a 1998, o percentual de pobres manteve-se em relativa estabilidade oscilando entre 40 e 45% da população. Atingiu seu ápice na recessão econômica do início dos anos de 1980, entre 1983 e 1984, quando ultrapassou os 50% da população, e reduziu significativamente com o início do plano Cruzado, em 1986, e no plano Real em 1994. Entretanto o número total de pobres aumentou de 10 milhões em 1977 para 50 milhões em 1998 devido ao aumento na população (BARROS et al., 2000).

De acordo com HOFFMANN (1995) o número de pobres nesse período cresceu mais na área urbana do que na rural, em função do processo de urbanização da população do país.

A tendência de queda nos índices de pobreza sofreu novo retrocesso em 2003, segundo dados da Pesquisa Nacional de Amostragem de Domicílios (PNAD), e conforme análise realizada pelo Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), em 2002, eram 49 milhões de pessoas em 10 milhões de domicílios em situação de pobreza, representando 29% da população e 22% de todos os domicílios daquele ano (IPEA – BRASIL: O ESTADO DE UMA NAÇÃO 2005). Em 2003, os pobres foram 53,9 milhões de pessoas, representando 31,7% da população pesquisada. A maior incidência de pobres na zona rural do que na zona urbana e os índices mais elevados de pobreza nas regiões Norte e Nordeste, quando comparados com os das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, já haviam sido demonstrados no primeiro grande estudo oficial sobre pobreza, em 1974, e se mantém até hoje. Em 2003, a proporção de pobres no meio rural era mais do que o dobro da observada no meio urbano – 57,1% contra 27% (IPEA – RADAR SOCIAL 2005).

Além da desigualdade entre as regiões Norte, Nordeste e Sul, Sudeste e Centro-Oeste e entre zona rural e zona urbana, outros contrastes marcam a situação da pobreza

no Brasil. A porcentagem de pessoas com renda per capita abaixo de 0,5 salário-mínimo varia 12,1% em Santa Catarina a 62,3% em Alagoas. Outro contraste é que 44,1% dos negros vivem em domicílios com renda per capita inferior a meio salário-mínimo, a proporção de brancos que sobrevivem com o mesmo valor é de 20,5% (IPEA – RADAR SOCIAL 2005). Afora isso, segundo os dados de 2003, 1% dos brasileiros mais ricos, que correspondem a apenas 1,7 milhão de pessoas, apropria-se de 13% do total das rendas domiciliares, sendo esse percentual bastante próximo da soma dos recursos apropriados pelos 50% mais pobres, que equivalem a 86,9 milhões de pessoas. Nesse contexto, BARROS et al. (2000) afirma que o Brasil é um país de pobres e não um país pobre, pois o país gera muita riqueza, mas a desigualdade gerada na distribuição da riqueza é o verdadeiro motor da pobreza.

Segundo MONTEIRO (2003), por serem mais vulneráveis as crianças são um bom indicativo da situação nutricional de uma região ou de um país. Crianças desnutridas ou com baixa estatura correspondiam, em 1996, a 10,4% da população infantil brasileira.

É interessante notar que há uma tendência histórica nos dados para desnutrição, sobretudo quanto à desnutrição infantil, sobreporem-se aos dados da pobreza, ou seja, a desnutrição é maior na área rural e principalmente na região Nordeste, locais onde também é maior a quantidade de pessoas vivendo abaixo da linha da pobreza.

A relação direta entre pobreza e desnutrição já havia sido demonstrada por dados disponíveis em 1989, quando se verificou que crianças em famílias com renda per capita inferior 0,25 salário-mínimo apresentavam quase cinco vezes mais chances de sofrerem de desnutrição do que crianças em famílias com renda per capita igual ou superior a um salário-mínimo. Para os adultos, a ocorrência de desnutrição entre aqueles com renda

per capita inferior a 0,25 salários-mínimos era mais que o dobro do que para aqueles com renda per capita maior ou igual a um salário-mínimo.

Para adultos, no Brasil como um todo, os dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2002-2003 indicam haver apenas baixa ocorrência de desnutrição em mulheres (IBGE, 2004). Entretanto, a estratificação dos dados dessa pesquisa revela que a situação da desnutrição no Brasil passou de um mal generalizado, como observado na década de 1970, para um fenômeno mais localizado, refletindo outras desigualdades do país, em especial aquelas para a distribuição de renda. Por exemplo, o índice de desnutrição entre mulheres adultas é maior para aquelas com renda per capita de até 0,25 salário-mínimo, 8,5%, e maior para aquelas residentes na área rural do Nordeste, 7,2%, sendo que o maior índice de desnutrição adulta ocorre em mulheres na cidade de Salvador, 10,3%. Mesmo quando toma-se os dados para todo o país, o índice de desnutrição feminina em mulheres entre 20 e 24 anos é de 12,2%, e de 7,3% entre as de 25 e 29 anos. Para homens acima de 75 anos de idade, chega-se ao índice de 8,9% de desnutrição.

Alguns dados recentes revelam outras faces dos problemas nutricionais no Brasil. WAITZBERT et al. (2001) estudaram 4.000 pacientes maiores de 18 anos de idade, em hospitais do sistema público de saúde brasileiro, no ano de 1996. Os autores concluíram que: 1) 48,1% apresentavam desnutrição, sendo 12,6% dos casos considerados graves; 2) a maior incidência de pacientes desnutridos encontra-se nas regiões Norte e Nordeste, onde a renda per capita é menor (em Belém-PA, 78,8% dos pacientes eram desnutridos; 76% é o percentual de desnutridos em Salvador-BA; e 67,6% em Natal-RN); 3) os pacientes desnutridos tinham tempo de hospitalização maior em relação aos não desnutridos, gerando maior custo para o Estado; 4) é deficiente o

conhecimento dos profissionais dos hospitais estudados sobre a necessidade de acompanhamento nutricional dos pacientes.

Após cinco anos, um estudo realizado por MELLO et al. (2003), com pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, não encontrou grande melhora. Segundo os autores, o custo de tratamento de um paciente desnutrido é quatro vezes maior do que o de um paciente não desnutrido.

A associação pobreza e restrição alimentar crônica gera um processo que extrapola a dimensão da fisiologia celular e se estende até a dimensão psicológica e social. GUIBU (1998) relata um aumento de 20 a 30% na procura por atendimento psiquiátrico na região de Crato, sul do Ceará, durante o período de estiagem e escassez de alimento, e afirma que os famintos desenvolviam um quadro de “loucura de fome”. HARPHAM (2000), em um editorial da Revista Brasileira de Psiquiatria, afirma que a associação entre pobreza e saúde mental em países em desenvolvimento é hoje bem demonstrada por estudos que enfatizam a alta prevalência de saúde mental precária, especialmente em áreas geográficas de população de baixa renda, como favelas, assentamentos e bairros miseráveis. BLUE (2000), analisando dados coletados em três bairros da cidade de São Paulo, demonstrou que no bairro Brasilândia, onde há maior proporção de migrantes, maior número médio de pessoas por cômodo da casa, menor número médio de anos na escola e menor renda familiar, a incidência de distúrbios psicóticos e neuróticos chegava a 22% da população; enquanto no bairro Aclimação, onde todos os fatores mencionados eram melhores, a incidência era de 11%. MAIA et al. (2004), estudando a saúde mental de idosos em uma região metropolitana de Montes Claros-MG, encontrou uma prevalência de 29,3% de pessoas com transtorno na população em geral, enquanto a prevalência em idosos favelados era de 57,1%.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A desigualdade na distribuição de renda é o motor dos elevados índices de pobreza no Brasil. As parcelas mais pobres da população, historicamente, estão entre os mais afetados pela desnutrição protéico-calórica. O tratamento paliativo dessas pessoas onera o Estado e não melhora sua condição de vida. Por isso, o Estado deve usar a pesada carga tributária paga pelos cidadãos para prover meios de distribuição da renda gerada no país e acesso igual a saneamento básico, educação, saúde e outros direitos previstos pela constituição.

Acreditamos que as mudanças na atual situação não virão somente de ações do Estado, nem serão conquistadas por meio da violência, como sugerem alguns movimentos sociais. Faz-se necessária uma mudança de cultura em relação ao que é público, pois enquanto prevalecer a idéia de que os recursos públicos não são de ninguém em detrimento da idéia de que eles são de todos, os desvios, e a má utilização de tais recursos, bem como a roubalheira prevalecerão sobre o bom senso, e, ao lado de uns poucos abastados, conviverão legiões de miseráveis. Nesse processo, a educação, seja ela formal ou não, tem um papel fundamental. Portanto, para mudar a situação atual, é preciso que as instituições públicas (escolas, universidades, poder judiciário, etc.), a sociedade civil (ONG's, associações, etc.) e cada cidadão sejam conscientes dos seus direitos, deveres e atitudes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, R.P.; HENRIQUES, R.; MENDONÇA, R. Desigualdade e pobreza no Brasil: retrato de uma estabilidade inaceitável. *RCBS*, 15(42): 123-142, 2000.

BATISTA-FILHO, M. Da fome à segurança alimentar: retrospectiva e visão prospectiva. *Cad. Saúde Pública*, 19(4): 872-873, 2003.

BLUE, I. Individual and contextual effects on mental health status in São Paulo, Brazil. *Rev Bras Psiquiatr*, 22(3): 116-123, 2000.

BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de orçamento familiar (POF) 2002-2003. 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: capturado em 27/02/06.

BRASIL. INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (IPEA). Brasil: o estado de uma nação. 2005. 89 p. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/Destaques/brasilestadodeumanacao.htm>. Acesso em: capturado em 27/02/06.

BRASIL. INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (IPEA). Radar Social 2005. 2005. 141 p. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br>. Acesso em: capturado em 27/02/06.

DOMENE, S.M.A.; ZABOTTO, C.B.; MENEGELLO, R.; GALEAZZI, M.A.M.; TADDEI, J.A.A.C. Perfil nutricional de crianças e suas mães em bolsões de pobreza do município de Campinas, SP – 1996. *Rev. Nutr.*, 12(2): 183-189, 1999.

GUIBU, F., 1998. Seca e fome acirram distúrbios mentais. *Folha de São Paulo*, 31/05/1998. 1º caderno, p.17-18.

HARPHAM, T. Saúde mental, desenvolvimento e pobreza. *Rev Bras Psiquiatr*, 22(3): 103, 2000.

HOFFMANN, R. Pobreza, insegurança alimentar e desnutrição no Brasil. *Estudos Avançados*, 9(24): 159-172, 1995.

INSTITUTO CIDADANIA. Projeto Fome Zero – uma proposta de política de segurança alimentar para o Brasil. São Paulo: Fundação Djalma Guimarães. 2001. 118p.

KANE, A.; KUMAR, V. Patologia ambiental e nutricional. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Robbins – patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.362-411.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. *Krause – alimentos, nutrição & dietoterapia*. 9.ed. São Paulo: Roca, 2005. p.74-76.

MAIA, L.C.; DURANTE, A.M.G.; RAMOS, L.R. Prevalência de transtornos mentais em área urbana no norte de Minas Gerais, Brasil. *Rev Saúde Pública*, 38(5): 650-656, 2004.

MELLO, E.D.; BEGHETTO, M.G.; TEIXEIRA, L.B.; POLANCZYK, V.C.L. Desnutrição hospitalar cinco anos após o IBRANUTRI. *Rev Bras Nutr Clin*, 18(2): 65-39, 2003.

MONDINI, L.; MONTEIRO, C.A. Relevância epidemiológica da desnutrição e da obesidade em distintas classes sociais: métodos de estudo e aplicação à população brasileira. *Rev. Bras. Epidemiol.*, 1(1): 28-39, 1998.

MONTEIRO, C.A. A dimensão da pobreza, da fome e da desnutrição no Brasil. *Estudos Avançados*, 9(24): 195-207, 1995.

MONTEIRO, C.A. et al. A evolução da desnutrição entre adultos. In: MONTEIRO, C.A. (org). Velhos e novos males da saúde no Brasil – a evolução do país e de suas doenças. 2.ed. São Paulo: Hucitec NUPENS/USP, 2000. p.115-125.

MONTEIRO, C.A. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. *Estudos Avançados*, 17(48): 7-20, 2003.

NOBREGA, F.J. *Distúrbios da nutrição*. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. p.53-64.

OLIVEIRA, J.E.D. A desnutrição dos pobres e dos ricos – dados sobre a alimentação no Brasil. São Paulo: Sarvier, 1996. p.36.

OLIVEIRA, J.E.D.; MARCHINI, J.S. *Ciências nutricionais*. São Paulo: Sarvier, 1998. p.305-321.

RIELLA, M.C. Insuficiência renal aguda. In: MAGNONI, D., CUKIER, C. *Perguntas e respostas em nutrição clínica*. São Paulo: Roca, 2001. p.193-203.

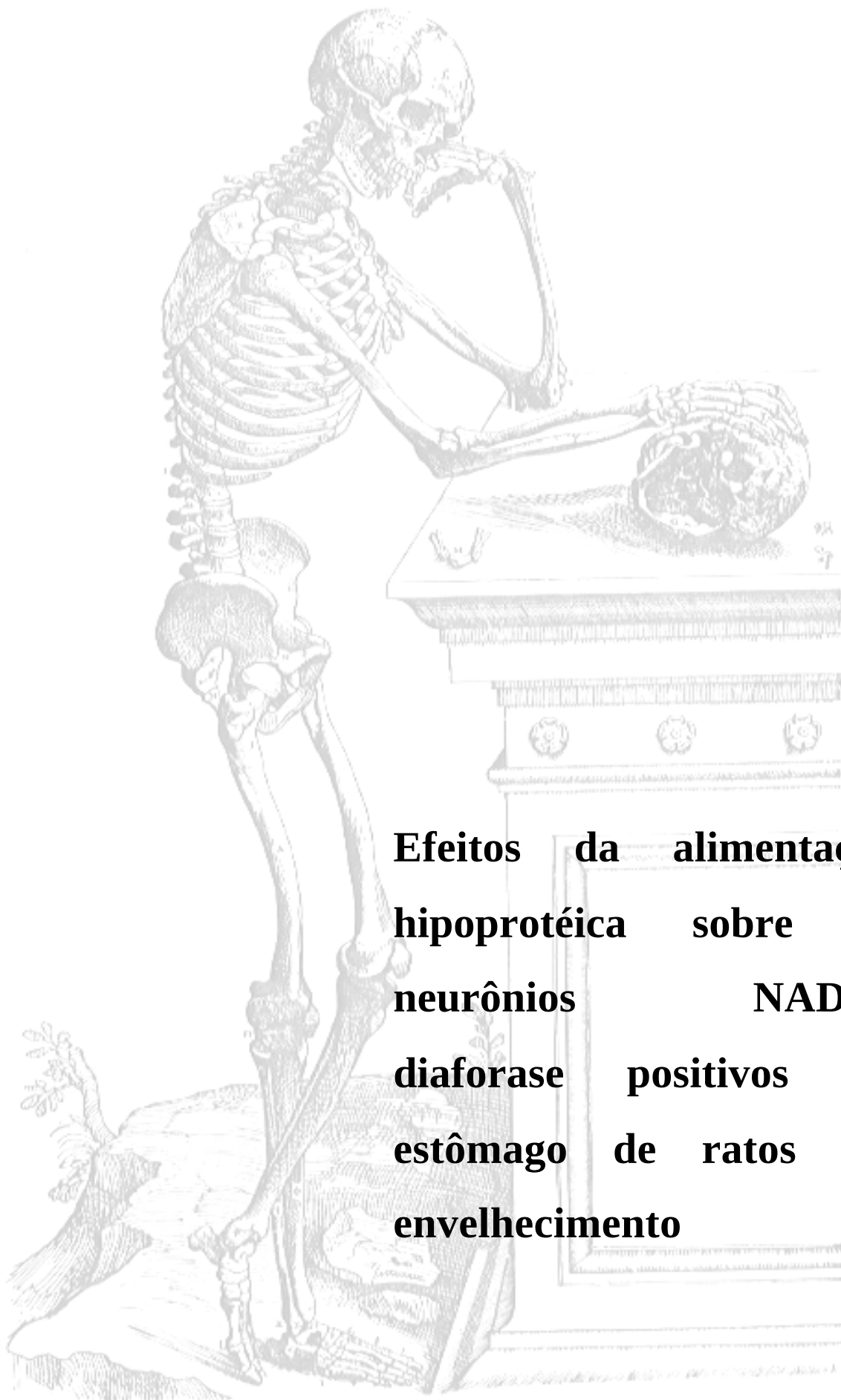
VASCONCELOS, F.A.G. Combate à fome no Brasil: uma análise histórica de Vargas a Lula. *Rev. Nutr.*, 18(4): 439-457, 2005.

VERAS, R.P.; RAMOS, R.L.; KALACHE, A. Crescimento da população idosa no Brasil: transformações e conseqüências na sociedade. *Rev. Saúde públ.*, 21(3): 225-233, 1987.

VERAS, L.C.; DURANTE, A.M.G.; RAMOS, L.R. Prevalência de transtornos mentais em área urbana no norte de Minas Gerais, Brasil. *Rev Saúde Pública*, 38(5): 650-656, 2004.

WAITZBERG, D.L.; MOREIRA-JÚNIOR, J.C. Desnutrição e suas conseqüências. In: MAGNONI, D.; CUKIER, C. *Perguntas e respostas em nutrição clínica*. São Paulo: Roca, 2001. p.7-10.

WAITZBERG, D.L.; CAIAFFA, W.T.; CORREIA, M.I.T.D. Hospital malnutrition: the Brazilian national survey (IBRANUTRI): a study of 4000 patients. *Nutrition*, 17(7/8): 573-580, 2001.



**Efeitos da alimentação
hipoprotéica sobre os
neurônios NADH-
diaforase positivos do
estômago de ratos em
envelhecimento**

**Efeitos da alimentação hipoprotéica sobre os neurônios
NADH-diaforase positivos do estômago de ratos em
envelhecimento**

Fernando Carlos de Sousa*, Marcílio Hubner de Miranda Neto**

*** Professor – Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)**

****Professor – Departamento de Ciências Morfofisiológicas,
Universidade Estadual de Maringá (UEM)**

Correspondência para:

Fernando Carlos de Sousa

Rua Olímpio Mendes da Rocha, 206B, Vila Esperança, Maringá-PR.

CEP 87020-780

Fone: + 55 44 3263-9637

Fax: + 55 44 3028-8400

e-mail: fernandoanatomia@uol.com.br

EFEITOS DA ALIMENTAÇÃO HIPOPROTÉICA SOBRE OS NEURÔNIOS NADH-DIAFORASE POSITIVOS DO ESTÔMAGO DE RATOS EM ENVELHECIMENTO

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da restrição no teor de proteínas na dieta sobre o plexo mioentérico do estômago de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) em envelhecimento. Dois grupos de animais foram alimentados *ad libitum*: um com ração padrão (22% de proteína); e o outro com a ração hipoprotéica (8% de proteína), entre os 210 e 345 dias de vida. Em comparação com os animais alimentados com dieta padrão, os animais alimentados com ração hipoprotéica apresentaram: hipofagia (consumo em média 30% menor); ganho médio de peso 4,46% menor; maior quantidade de gordura retroperitoneal e periepídidimal (19% em média); menor índice de Lee; redução nas proteínas totais plasmáticas e globulinas; e manutenção da albumina. A análise quantitativa e morfométrica dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos, visualizados em preparados totais das regiões glandular e aglandular do estômago, evidenciou nos animais submetidos à dieta hipoprotéica maior número de neurônios pequenos e menor número de neurônios médios, demonstrando que o crescimento dos neurônios foi afetado pela dieta. A quantificação dos neurônios em 80 campos de visualização microscópicos (19 mm^2) – 40 na região aglandular e 40 na região glandular – foi ajustada para a área de cada região do estômago do animal correspondente. Nos animais alimentados com dieta hipoprotéica, observou-se redução de 20% nos neurônios NADH-diaforase positivos na região aglandular e de 10% na região glandular.

Palavras-chave: dieta hipoprotéica, envelhecimento, estômago, neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos.

1 - INTRODUÇÃO

Indivíduos jovens em crescimento apresentam necessidade proporcionalmente elevada de proteínas na dieta, à medida que organismo reduz sua velocidade de crescimento, diminui proporcionalmente sua necessidade nutricional de proteínas. Entretanto a transição da fase adulta para a velhice é caracterizada por alterações na composição corporal e na atividade metabólica com marcante efeito sobre os aspectos nutricionais.

Devido ao expressivo aumento da população de idosos em muitos países, as diferentes condições em que essas pessoas vivem e os elevados custos para os governos para a assistência dessa população, muitos estudos tem tentado determinar indicadores para avaliação e promoção da saúde de populações em envelhecimento.

Baseando-se na literatura sobre as alterações decorrentes do envelhecimento, o Comitê de Especialistas da FAO/WHO/ONU (1998), em seu relato técnico sobre as necessidades de energia e proteína, publicado originalmente em 1985, aconselha não reduzir o teor de proteínas na dieta dos indivíduos em envelhecimento, mantendo-se os 0,75 g/kg/dia recomendados para adultos. O Comitê de Avaliação Científica das Referências Nutricionais Diárias do Instituto de Medicina das Academias Nacionais dos Estados Unidos (2005), revisando as necessidades de proteínas, recomenda para indivíduos em envelhecimento o consumo de proteínas na proporção de 0,8 g/kg/dia. Ambas as orientações se basearam principalmente em estudos de balanço de nitrogênio, e os dois os comitês concordam que a adequação dessas indicações carece de análises por meio de outras abordagens de pesquisa.

Como o sistema nervoso tem importância vital e possui um alto requerimento metabólico, muitos estudos têm abordado os efeitos da desnutrição protéico-calórica sobre os diferentes componentes do sistema nervoso. Pollitt (2000), que por mais de 30

anos tem conduzido pesquisas sobre os efeitos da desnutrição protéico-energética e da deficiência de ferro sobre o desenvolvimento intelectual de crianças, fazendo uma revisão da literatura sobre o assunto, afirma que tanto em modelos animais quanto em estudos com humanos fica evidente que a desnutrição protéico-energética durante a infância causa prejuízos das funções cognitivas, das emoções e do desenvolvimento motor.

Visando a avaliar os efeitos da restrição protéica sobre o sistema nervoso autonômico, muitos autores têm utilizado o sistema nervoso entérico como modelo de estudo. O sistema nervoso entérico está localizado na parede do trato gastrointestinal, desde o esôfago até o ânus, e atua no controle da motricidade, secreção e absorção. É formado por corpos de neurônios e por fibras nervosas. Os corpos dos neurônios entéricos podem ocorrer isolados, mas a grande maioria se organiza em grupos cercados pela glia entérica e por uma capa de tecido conjuntivo, formando duas redes de gânglios interconectados por fibras nervosas, ou seja, dois plexos nervosos ganglionados. Cada um desses plexos está disposto como uma camada bidimensional de gânglios interconectados, tendo ainda fibras que intercomunicam os dois plexos. Os plexos são denominados de acordo com sua localização na parede do trato gastrointestinal. O plexo submucoso está localizado no tecido conjuntivo da túnica submucosa, e o plexo mioentérico entre as camadas da túnica muscular externa. Os neurônios entéricos fazem sinapse com neurônios simpáticos e parassimpáticos. Esse arranjo morfológico mais simples do que o do sistema nervoso central, a grande complexidade bioquímica, sua importância funcional, a facilidade de acesso e a disponibilidade de várias técnicas de evidênciação neuronal tornam o sistema nervoso entérico uma ferramenta valiosa em várias linhas de pesquisa em neurociência.

O envelhecimento leva à neurodegeneração no sistema nervoso entérico, de forma muito mais intensa do que no sistema nervoso central, contribuindo para o aumento dos problemas gastrointestinais em idosos (Wade e Cowen, 2004). Entretanto Schoffen et al. (2005) comentam que a despeito de haverem muitos estudos sobre os efeitos da restrição protéica sobre o sistema nervoso entérico de animais em fases iniciais de desenvolvimento (desde a gestação até a fase adulta), são escassos os estudos em animais em período mais avançado de envelhecimento.

Nesta pesquisa foram analisados parâmetros corporais, consumo de ração e realizado um estudo quantitativo e morfométrico dos neurônios mioentéricos NADH-diforase positivos do plexo mioentérico do estômago de ratos em envelhecimento submetidos à dieta hipoprotéica.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Design do experimento

Todos os procedimentos deste estudo envolvendo o uso de animais estão de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiros de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Dez (10) ratos (*Rattus norvegicus*) machos, da linhagem Wistar, foram utilizados neste experimento. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos: *Controle* – alimentados com ração padronizada para roedores NUVILAB-NUVITAL® (recomendada pelo National Research Council & National Health Institute – EUA), com teor de proteínas de 22%; *Restrição Protéica* – alimentados com ração com teor de 8% de proteínas, produzida a partir da adição de amido de milho na dieta NUVILAB® (Natali et al., 2000). Essa ração foi suplementada com vitaminas hidrossolúveis do complexo B e mistura salina (American Institute of Nutrition, 1977;

Natali e Miranda-Neto, 1996). Ração e água foram oferecidas *ad libitum* durante toda a duração do experimento.

Os animais permaneceram por 135 dias – entre os 210 e 345 dias de vida – em gaiolas individuais, sob condições constantes de temperatura e ciclo claro/escuro de 12/12 horas. O peso corporal foi controlado quinzenalmente, e o consumo de ração controlado por uma semana (sete dias) a cada mês. Esse controle consistia na oferta de 100 gramas de ração diariamente para cada animal e pesagem da sobra.

Aos 345 dias de idade, os animais foram pesados. Foi mensurado o comprimento naso-anal (CNA), e coletadas amostras de sangue para análise de: proteínas totais (Método de Biureto – LABTEST); albumina (Verde de Bromocresol – LABTEST); e globulinas (obtidas pela diferença entre proteínas totais e albumina). Após inalação de éter etílico, os animais foram mortos e laparotomizados. A gordura retroperitoneal e a gordura periepídidimal foram removidas por dissecação e pesadas. Os estômagos foram lavados, pesados e decalcados.

2.2 – Evidenciação dos neurônios NADH-diaforase positivos e obtenção dos preparados totais

Os estômagos foram preenchidos com solução de Krebs (pH 7,3), lavados duas vezes nessa solução (10 minutos cada lavagem), imersos por 5 minutos em solução 0,3% de Triton X-100; em seguida, passaram por mais duas lavagens de 10 minutos cada em solução de Krebs. Para marcação dos neurônios através da atuação da enzima NADH-diaforase, os estômagos permaneceram imersos por 45 minutos em um banho de incubação, contendo para cada 100 mL: 25 mL a 0,5% de solução estoque de Nitro Blue Tetrazolium (NBT – Sigma); 25 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,3; 50 mL de água destilada; e 50 mg de β -NADH (Sigma).

Para obtenção dos preparados totais, os estômagos foram primeiro seccionados ao longo das curvaturas gástricas maior e menor, obtendo-se uma face ventral e outra dorsal. Depois foram seccionados ao longo da prega limitante, para separação entre as regiões aglandular e glandular (figura 1). Preparados totais contendo a túnica muscular externa, túnica serosa e o plexo mioentérico foram obtidos por microdissecção sob esteromicroscópio com remoção das túnicas mucosa e submucosa. Os preparados foram desidratados em sério crescente de concentração de álcool etílico, diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética.

2.3 – Estudo morfométrico e quantitativo

Para estudo morfométrico, imagens das lâminas foram capturadas através de sistema computadorizado de captura de imagens (Image-Pro Plus® 4.5 – Media Cybernetics), acoplado ao microscópio de luz (OLYMPUS BX40), utilizando-se objetiva de 40X. Nas imagens obtidas, foram mensurados o perfil do corpo de 100 neurônios por animal – 50 da região aglandular e 50 da região glandular – utilizando-se o software Image Tool 3.0 – uma ferramenta produzida e distribuída gratuitamente (freeware) pelo Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Texas em Santo Antonio (UTHSCSA – EUA). Para o estudo quantitativo neuronal, as lâminas foram visualizadas em microscópio de luz (OLYMPUS BX40) com objetiva de 40X. Contou-se o número de neurônios em 80 campos de visualização por animal (19 mm^2) – 40 ($9,50 \text{ mm}^2$) da região aglandular e 40 ($9,50 \text{ mm}^2$) da região glandular. A captura de imagem e a contagem neuronal foram realizadas por amostragem aleatória de campos localizados junto à prega limitante para a porção aglandular do estômago e região junto à prega limitante e curvatura gástrica menor para a porção glandular.

Os decalques dos estômagos foram digitalizados, e a área do perfil estomacal foi mensurada, utilizando-se o software Image Tool 3.0 – UTHSCSA.

2.4 – Análise estatística

Os resultados foram tabelados, e a análise estatística realizada com auxílio do software GraphPad Prisma® 4, através do teste t de Student, com 95% de confiança.

3 - RESULTADOS

3.1 – Parâmetros corporais e consumo de ração

As tabelas 1, 2 e 3 agrupam os parâmetros corporais, o consumo de ração e a análise de proteínas plasmáticas dos animais.

3.1 – Análise neuronal

A marcação através da técnica da NADH-diaforase evidenciou o plexo mioentérico, tanto da região aglandular quanto da região glandular, com a maioria de seus neurônios organizados em glânglios de tamanho e formato variados e com uma menor quantidade de neurônios ocorrendo de forma isolada. A intensidade de marcação varia consideravelmente entre os neurônios. O formato do corpo celular varia, ocorrendo neurônios com contorno arredondado, periforme e estrelado.

Os glânglios marcados pela técnica da NADH-diaforase não se distribuem uniformemente por todo o estômago. Na região aglandular, estão concentrados na região central e próximo à prega limitante; enquanto na região glandular, concentram-se principalmente ao longo da curvatura gástrica menor.

Por meio da quantificação do número de neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos em 40 campos de visualização (9,50 mm²) da região aglandular, obtivemos média de $697,3 \pm 25,45$ nos animais do grupo controle e de $628,4 \pm 53,51$ no grupo restrição protéica. A quantificação de 40 campos de visualização (9,50 mm²) da região glandular do estômago revelou média de $724,8 \pm 71,87$ nos animais dos grupos controle e de $697,0 \pm 88,08$ no grupo restrição protéica.

Para a análise dos dados de contagem neuronal, os valores obtidos a partir da contagem do número de neurônios em 40 campos de visualização, equivalentes a 9,50 mm² em cada região do estômago de cada animal, foram extrapolados para a área de cada uma das regiões do estômago do animal correspondente, para obtermos um valor especulativo sobre o número total de neurônios em cada região do estômago de cada animal. A área de cada região do estômago foi obtida a partir da área total do estômago do animal e atribuindo-se à região aglandular 1/3 da área total e à região glandular 2/3 (Luciano e Reale, 1992). Obteve-se, assim, uma extrapolação do número total de neurônios em cada uma das regiões do estômago de cada um dos animais. Na região aglandular, obteve-se, nos animais controle uma média de $13.450 \pm 623,4$ neurônios; e nos do grupo restrição protéica média de $10.700 \pm 768,5$. Na região glandular dos animais do grupo controle obteve-se média de 26.780 ± 3.269 ; e no grupo restrição protéica média de 23.930 ± 3.155 (figura 2).

Os dados da mensuração de 50 neurônios em cada uma das regiões do estômago de cada um dos animais foram tabelados, e computou-se o número de neurônios em classes com intervalos arbitrários de 100 μm^2 . Dessa forma evidencia-se o leque de variação na área neuronal. As figuras 3 e 4 representam os dados da análise da área do perfil do corpo celular de 250 neurônios por grupo experimental, em cada região do estômago.

4 - DISCUSSÃO

4.1 – Efeitos sobre os parâmetros corporais e consumo de ração

Ao longo de todo período experimental, os animais do grupo restrição protéica comeram em torno de 30% menos do que os animais do grupo controle. Entretanto, a diferença no ganho médio de peso foi pequena, pois o grupo controle ganhou em média 5%, enquanto o grupo com restrição protéica ganhou 0,54%.

Molinari et al. (2002) verificaram que ratos jovens – dos 90 aos 210 dias de idade – submetidos à dieta com teor protéico de 8%, quando comparados com animais que receberam dieta com teor protéico de 22%, ganharam 30,33% menos peso, demonstrando que nessa faixa etária a restrição protéica possui efeitos mais drásticos do que os verificados no presente experimento. Segundo White (2000), dietas muito próximas ao requerimento de proteínas ou no limite dele, estimulam a hiperfagia em ratos; por outro lado, dietas com quantidade de proteína muito acima ou muito abaixo do requerimento dos animais levam à hipofagia. Portanto são fortes as evidências que, nesta fase da vida desses roedores, 8% de proteínas é um teor situado abaixo dos requerimentos nutricionais.

Quando se compara o ganho médio de peso nos dois grupos, observa-se que as diferenças são pequenas, e também que os ratos submetidos à restrição protéica, embora tenham ingerido menor quantidade de alimento, não perderam peso na mesma proporção. Isto sugere que esses animais sofreram redução na sua taxa metabólica. Por outro lado, uma análise individualizada revelou que o ganho de peso foi relativamente homogêneo entre os animais alimentados com dieta com teor de 22% de proteína, variando de 0,45% a 11,29 %. Já entre os animais submetidos à restrição de proteínas, constatou-se que um animal perdeu 14,12 % do peso, enquanto outro ganhou 12,9%; os demais tiveram pequenos ganhos de peso.

Ao final do experimento, os animais do grupo restrição protéica apresentaram índice de Lee médio 6% menor do que os animais do grupo controle. Isso demonstra que os animais do grupo restrição protéica possuíam, proporcionalmente, menor massa corporal para o tamanho do seu corpo, pois o índice de Lee, expresso pela raiz cúbica do peso dividido pelo comprimento naso-anal multiplicando-se o resultado por 1.000, demonstra uma relação entre o tamanho do animal e o seu peso de forma semelhante ao

Índice de Massa Corporal (IMC), amplamente utilizado em humanos. Apesar do menor índice de Lee, da hipofagia e de apresentarem em média menor ganho de peso ao longo do experimento, os animais do grupo restrição protéica apresentavam peso de gordura abdominal em média 19% maior. Mesmo o rato que perdeu 14,12% de seu peso corporal apresentou 1,83 gramas dessa gordura por 100 gramas de peso corporal. O rato do grupo restrição protéica que mais ganhou peso (12,9% de ganho) apresentou 3,42 gramas de gordura abdominal por 100 gramas de peso corporal; e o que mais ganhou peso, no grupo controle (11,29% de ganho), apresentou 2,15 gramas por 100 gramas de peso corporal. Houve, portanto, uma diferença de 62,86 %. Esses dados indicam que a redução de proteínas associada à elevação do teor de carboidratos tende a promover a formação de acúmulos de tecido adiposo e redução da massa magra, mesmo quando há menor ingestão de alimentos e ganho ou perda de peso.

Verifica-se, portanto, que o modelo experimental utilizado neste estudo assemelha-se mais ao quadro de kwashiorkor, caracterizado por dieta predominantemente pobre em proteínas, mas com oferta de carboidratos. Essa condição é tão freqüentemente achada em populações humanas devido ao baixo custo de alimentos ricos em carboidratos e maior custo de alimentos ricos em proteínas o que predispõe populações pobres a situações de carência de proteínas. Tal condição também é muito encontrada em indivíduos hospitalizados, devido a distúrbios na capacidade de eles controlarem o balanço protéico e/ou à inadequação da dieta. Nessa condição, a absorção de glicose estimula a secreção de insulina e inibe a secreção dos hormônios catabólicos. A insulina desloca o metabolismo para a utilização de carboidratos e inibe a lipólise e a proteólise, dificultando, dessa forma, a mobilização das proteínas das reservas musculares e viscerais para a síntese de compostos nitrogenados em outros tecidos. Assim, o kwashiorkor é um tipo de desnutrição protéico-calórica não adaptável

que leva a alterações nas funções neuronais e imunológicas (Mahan e Escott-Stamp, 2005).

A redução das proteínas plasmáticas totais e das globulinas suporta a hipótese de que a dieta oferecida expôs os animais do grupo restrição protéica a um quadro de carência de proteínas com redução da disponibilidade tecidual de aminoácidos. A não observação de edema em ratos submetidos à restrição protéica é um dado comum na literatura (Saint'Ana, 2001), e a não redução da albumina plasmática pode explicar a resistência desses animais à formação de edema (Natali et al., 2005).

4.2 – Análise quantitativa dos neurônios NADH-diaforase positivos

Tomando-se como referência o número de neurônios dos animais do grupo controle, verifica-se, nos animais do grupo restrição protéica, menor densidade neuronal, em torno de 9,88% para a região aglandular e de 3,83% para a região glandular. Essas diferenças, embora pequenas, acentuam-se ao considerarmos que os animais do grupo restrição protéica apresentaram estômagos com área do perfil em média 6% menor e peso médio em torno de 10% menor do que os animais controle com a mesma idade. Essa redução na área do estômago foi levada em consideração na análise quantitativa neuronal. Se não ocorrer redução no número de neurônios, a redução na área do estômago leva a uma maior compactação dos gânglios, levando a valores maiores na contagem neuronal ou, no caso de perda neuronal, a compactação dos gânglios pode mascarar a redução. Assim, se não houve redução no número de neurônios marcados, esperava-se que essa redução na área estomacal levasse a um maior agrupamento dos gânglios, resultando em valores proporcionalmente maiores nas análises de contagem neuronal, ou seja, esperava-se que os animais com restrição de proteínas apresentassem 6% a mais no número de neurônios. Ao estimarmos o número total de neurônios do estômago, com base nas densidades verificadas (figura 2), nota-se

que os animais com restrição protéica possuem menor número de neurônios do que os do grupo controle – em torno de 20% para região aglandular e 10% para região glandular. Essa projeção revela dados compatíveis com as conclusões de autores que constataram que o número e o tamanho dos neurônios entéricos guardam uma estreita relação com a massa do órgão por eles inervados (Saffrey e Burnstock, 1994, Molinari et al., 2002).

Estudos com o intestino delgado demonstraram que em ratos em envelhecimento a restrição alimentar apresenta efeito protetor, prevenindo a perda neuronal decorrente do envelhecimento em diversas subpopulações neuronais no plexo mioentérico. A população de neurônios NADH-diaforase positivos, por outro lado, apresentou redução em torno de 15%, indicando que, com relação à enzima NADH-diaforase, a restrição alimentar leva à redução na atividade e/ou expressão (Johnson et al., 1998; Cowen et al., 2000). Paradoxalmente, já foi observado que em animais em envelhecimento, alimentados *ad libitum*, a população de neurônios NADH-diaforase positivos sofreu menor redução (43% comparado com 52%) do que a população de neurônios marcados por imunistoquímica para proteína do gene 9.5, que marca a grande maioria dos neurônios mioentéricos (Cowen et al., 2000).

Nossos dados (figura 2) mostram que a redução na oferta de proteínas para 8% intensifica a redução no número de neurônios NADH-diaforase positivos no estômago de ratos em envelhecimento, indicando que a atividade e/ou expressão dessa enzima é sensível à redução no nível de proteínas da dieta, o que pode interferir diretamente na atividade mitocondrial dos neurônios que a expressam. Olowookere et al. (1990), estudando mitocôndrias hepáticas de ratos alimentados entre 21 e 51 dias de vida com uma ração com 3,47% de proteínas, demonstraram intensa deterioração mitocondrial com redução na atividade enzimática – 25% para isocitrato, β -hidroxibutirato e

succinato desidrogenases, e 50% para NADH-citocromo c redutase – e redução na eficiência de síntese de ATP.

A marcação dos neurônios NADH-diaforase positivos baseia-se na formação de grânulos de formazana a partir da redução enzimática do receptor artificial de elétrons (NBT) com que o tecido é incubado. Segundo Fang et al. (1995), a enzima ou as enzimas que catalisam essa reação ainda não foram completamente estudadas, mas sabe-se que possuem localização mitocondrial, e sua análise revela dados sobre a atividade metabólica da célula. Esses autores demonstraram a co-localização da enzima NADH-diaforase com a enzima manganês superóxido dismutase (Mn SOD) no compartimento mitocondrial de vários tipos celulares, inclusive neurônios mioentéricos, postulando que essas duas enzimas participam do controle do estresse oxidativo.

A expressão e a atividade da enzima NADH-diaforase não pode ser correlacionada com a expressão de um dado neurotransmissor. Assim, a marcação por histoquímica para NADH-diaforase não se relaciona a uma população neuronal restrita, mas relaciona-se com o nível de metabolismo dos neurônios.

Neste trabalho, o tempo de incubação dos estômagos para marcação dos neurônios NADH-diaforase positivos foi fixado em 45 minutos, possibilitando-nos avaliar o nível de atividade metabólica dos neurônios mioentéricos entre os diferentes estômagos – aqueles com maior atividade, exibindo maior marcação nesse tempo, e aqueles com menor atividade metabólica, exibindo menor marcação. Portanto a menor quantificação de neurônios nos animais do grupo restrição protéica revela menor atividade metabólica, menor adaptação ao estresse oxidativo e/ou menor atividade ou expressão da enzima. Alguns autores não fixam o tempo de incubação, permitindo que diferentes preparados permaneçam tempos diferentes no meio de incubação, buscando apenas obter o maior contraste entre os elementos neuronais e outros elementos dos

tecidos adjacentes; Cowen et al. (2000), por exemplo, utilizou essa metodologia. A utilização de tempos maiores de incubação permite que mesmo neurônios com menor atividade enzimática possam tornar-se marcados, aumentando a estimativa de neurônios NADH-diaforase positivos e dificultando a comparação da atividade metabólica entre diferentes preparados.

4.3 – Análise morfométrica dos neurônios NADH-diaforase positivos

Nos histogramas de distribuição da frequência de neurônios, de acordo com seu tamanho (figuras 2 e 3), observa-se que nos animais do grupo restrição protéica ocorre um deslocamento para a esquerda, indicando acentuado predomínio de neurônios pequenos (neurônios com até $200 \mu\text{m}^2$) e redução dos neurônios de tamanho médio (neurônios entre $200,1$ e $300 \mu\text{m}^2$), em comparação com os animais controle.

Em um trabalho clássico, Gabella (1971), utilizando a mesma técnica de marcação neuronal e histogramas semelhantes aos utilizados neste trabalho, já havia demonstrado que na medida em que ratos recém-nascidos atingem a fase adulta, ocorre no plexo mioentérico aumento no tamanho dos neurônios. Postulou que esse processo de neuroplasticidade poderia ser importante para compensar o aumento no território de inervação dos neurônios, causado pelo aumento no tamanho dos segmentos do trato gastrointestinal. Phillips et al. (2003) observaram aumento na área de neurônios mioentéricos, tanto nos NADPH-diaforase positivos quanto nos marcados pelo Azul Cuprolínico, no cólon e no reto de ratos com 24 meses, e atribuíram a hipertrofia a um mecanismo compensatório para a perda neuronal; na porção aglandular do estômago, observaram neurônios com média de tamanho similar aos descritos por Gabella (1971), com manutenção do tamanho dos neurônios entre 3 e 24 meses.

Santer e Baker (1988), marcando neurônios NADH-diaforase positivos e utilizando histogramas de classificação dos neurônios por tamanho, de forma

semelhante ao utilizado neste trabalho, descreveram que, apesar de haver perda neuronal no jejuno, íleo, cólon e reto de ratos entre os 6 e 24 meses de vida, não foram observadas alterações estatisticamente significantes na distribuição dos neurônios em classes de tamanho com ambos os grupos, apresentando predomínio de neurônios de tamanho médio e grande.

Cowen et al. (2000), comparando a frequência de neurônios, de acordo com seu diâmetro, entre ratos com 6 e 24 meses, alimentados *ad libitum*, e animais com 24 meses, submetidos à restrição de 50% na oferta de alimento, afirmaram que os neurônios mioentéricos continuam a crescer após os 6 meses de vida. Nos animais submetidos à restrição alimentar, os neurônios marcados imunistoquimicamente para proteína do gene 9.5, apesar de poupados da redução neuronal, sofreram redução no seu crescimento com redução no número de neurônios grandes e aumento no número de neurônios pequenos.

Nossos resultados (figuras 3 e 4) sugerem que ratos em envelhecimento, alimentados com dieta hipoprotéica (8%), retêm um padrão de distribuição dos neurônios NADH-diaforase positivos no plexo mioentérico das regiões aglandular e glandular do estômago mais semelhante ao descrito por Gabella (1971) para animais mais jovens, isto é, com predomínio de neurônios pequenos. Esse padrão também é encontrado em um histograma de distribuição de neurônios, de acordo com seu tamanho, no trabalho de Schoffen et al. (2005), que compararam os neurônios mioentéricos marcados imunoistoquimicamente para proteína miosina V do cólon de ratos alimentados com dieta hipoprotéica (8%), entre os 210 e 360 dias de idade, com os de ratos nesse mesmo intervalo de envelhecimento, alimentados com ração padrão (22% de proteínas).

Levando em consideração as conclusões de Phillips et al. (2001), El-Salhy (1999) e outros, relatadas por Saffrey (2004), de que ocorre uma significativa redução no número de neurônios mioentéricos com o envelhecimento, ainda que em estágios tardios, e do proposto por Phillips et al. (2003) de que paralelamente à redução neuronal ocorre hipertrofia nos neurônios restantes, nossas observações de que ratos em envelhecimento, alimentados com dieta hipoprotéica, apresentam redução no número de neurônios metabolicamente ativos e maior quantidade de neurônios pequenos, permitem-nos inferir que, nessas condições, esses animais falham em invocar um processo de neuroplasticidade de hipertrofia dos neurônios a fim de compensar a perda neuronal.

Em síntese, os animais em envelhecimento tratados com dieta com 8% de proteína apresentaram hipofagia (30%), entretanto não ocorreu perda de peso correspondente. Por outro lado, apresentaram menor área e perfil estomacal e redução no índice de Lee associado à maior proporção de gordura abdominal, indicando perda de massa magra e acúmulo de tecido adiposo. A redução da proteína plasmática total suporta a hipótese de que a dieta oferecida expôs os animais do grupo restrição protéica a uma redução na disponibilidade tecidual de aminoácidos.

A redução na população e na área do perfil do corpo dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos indica redução na atividade e/ou expressão da enzima NADH-diaforase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Institute of Nutrition, 1977. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. J Nutr. 107, 1340-1348.
- Cowen, T., Johnson, R.J.R., Soubeyre, V., Santer, R.M., 2000. Restricted diet recues rat enteric motor neurons from age related cell death. Gut 47, 653-660.

- El-Salhy, M., Sandström, Holmlund, F., 1999. Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. *Mechanisms of Ageing and Development* 107, 93-103.
- EUA. Institute of Medicine of the National Academies - Food and Nutrition Board. Dietary references intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids., 2005. National Academies Press, Washington DC, 1357 pp.
- Fang, S. Thomas, R.M., Conklin, J.L., Oberly, L.W., Christensen, J., 1995. Co-localization of manganese superoxide dismutase and NADH diaphorase.. *J Histochem Cytochem* 43, 849-855.
- FAO/WHO/ONU, 1998. Necessidades de energia e proteínas. Roca, São Paulo, 225 pp.
- Gabella, G., 1971. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J. Anat.* 109, 81-94.
- Johnson, R.J.R., Schemann, M., Santer, R.M., Cowen, T., 1998. The effects of age on the overall population and on subpopulations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J. Anat.* 192, 479-488.
- Luciano, L., Reale, E., 1992. The “limiting ridge” of the rat stomach. *Arch. Histol. Cytol.* 55, 131-138.
- Mahan, K.L., Escott-Stump, S., 2005. Krause’s food, nutrition & diet therapy. 10 ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 1194 pp.
- Molinari, S.L., Fernandes, C.A., Oliveira, L.R., Sant’Ana, D.M.G., Miranda-Neto, M.H., 2002. NADH-diaphorase positive myenteric neurons of the aglandular region of the stomach of rats (*Rattus norvegicus*) subjected to desnutrition. *Rev. Chil. Anat.* 20, 19-23.

- Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., 1996. Effect of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of the duodenum of rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 54, 273-279.
- Natali, M.R.M., Molinari, S.L., Valentini, L.C., Miranda-Neto, M.H., 2005. Morphoquantitative evaluation of the duodenal myenteric neuronal population in rats fed with hypoproteic ration. *Biocell* 29, 39-46.
- Olowookere, J.O., Olorunsogo, O.O., Malomo, S.O., 1990. Effects of defective in vivo synthesis of mitochondrial proteins on cellular biochemistry and physiology of malnourished rats. *Ann Nutr Metab* 34, 147-154.
- Phillips, R.J., Powley T.L., 2001. As the gut ages: timetables for aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. *J. Comp. Neurol.* 434, 358-377.
- Phillips, R.J., Kieffer E.J., Powley T.L., 2003. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. *Auton. Neurosci.* 106, 69-83.
- Pollitt, E., 2000. Developmental sequel from early nutritional deficiencies: conclusive and probability judgements. *J. Nutr.* 130, 350S-353S.
- Saffrey, M.J., Burnstock, G., 1994. Growth factors and the development and plasticity of the enteric nervous system. *J. Aut. Nervous System.* 49, 183-196.
- Saffrey, M.J., 2004. Ageing of the enteric nervous system. *Mechanisms of Ageing and Development* 125, 899-906.
- Sant'Ana, D.M.G., Molinari, S.L., Miranda-Neto, M.H., 2001. Effects of protein and vitamin b deficiency on blood parameters and myenteric neurons of the colon of rats. *Arq Neuropsiquiatr* 59, 493-498.
- Santer, R.M., Baker, D.M., 1988. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 25, 59-67.

- Schoffen, J.P.F., Soares, A., Freitas, P., Buttow, N.C., Natali, M.R.M., 2005. Effects of a hypoproteic diet on myosin-V immunostained myenteric neurons and the proximal colon wall of aging rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 122, 77-83.
- Wade, P.R., Cowen, T., 2004. Neurodegeneration: a key factor in the aging gut. *Neurogastroenterol Motil* 16, 19-23.
- White, B.D., Porter, M.H., Martin R.J., 2000. Effects of age on the feeding response to moderately low dietary protein in rats. *Physiol Behav.* 68, 673-681.

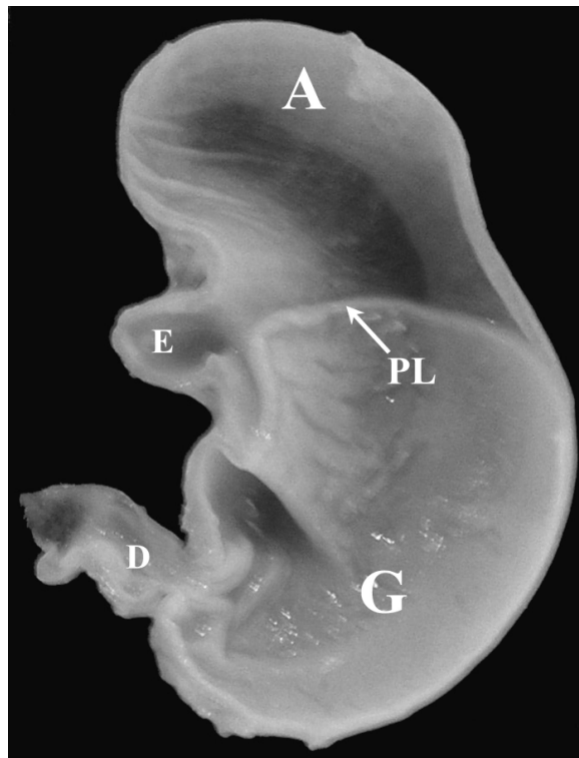


Figura 1 – Estômago do rato (*Rattus norvegicus*). E – esôfago; A – região aglandular; PL – prega limitante; G – região glandular; D – duodeno. Secção longitudinal ao longo das curvaturas gástricas maior e menor. Vista interna da face dorsal

Tabela 1 – Consumo de Ração e parâmetros corporais dos animais dos grupos controle (C) e restrição protéica (RP). Gordura abdominal = gordura retroperitoneal + gordura periepididimal. Média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente (teste *t* Student, $p < 5\%$)

PARÂMETROS	GRUPOS	
	C	RP
Consumo de ração (g/dia)	27,5 $\pm$ 1,57 _a	20,0 $\pm$ 0,97 _b
Peso inicial (g)	437,9 $\pm$ 7,55 _a	432,9 $\pm$ 20,41 _a
Peso final (g)	459,4 $\pm$ 12,09 _a	435,2 $\pm$ 30,32 _a
Ganho de peso (%)	5%	0,54%
Índice de Lee	316,2 $\pm$ 3,05 _a	297,6 $\pm$ 5,33 _b
Gordura abdominal (g)	9,64 $\pm$ 0,88 _a	11,83 $\pm$ 2,14 _a

Tabela 2 – Proteínas plasmáticas (g/dL) dos animais dos grupos controle (C) e restrição protéica (RP). Média $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente (teste *t* Student, $p < 5\%$)

GRUPOS	PROTEÍNA TOTAL	ALBUMINA	GLOBULINAS
C	6,76 $\pm$ 0,14 _a	3,19 $\pm$ 0,10 _a	3,57 $\pm$ 0,12 _a
RP	6,23 $\pm$ 0,09 _b	4,12 $\pm$ 0,17 _b	2,11 $\pm$ 0,21 _b

Tabela 3 – Peso e área do perfil estomacal dos animais dos grupos controle (C) e restrição protéica (RP). Média $\pm$ desvio padrão

GRUPOS	PESO (g)	ÁREA (mm ²)
C	2,33 $\pm$ 0,10	521,5 $\pm$ 28,82
RP	2,11 $\pm$ 0,12	488,9 $\pm$ 17,29
Diferença	10%	6%

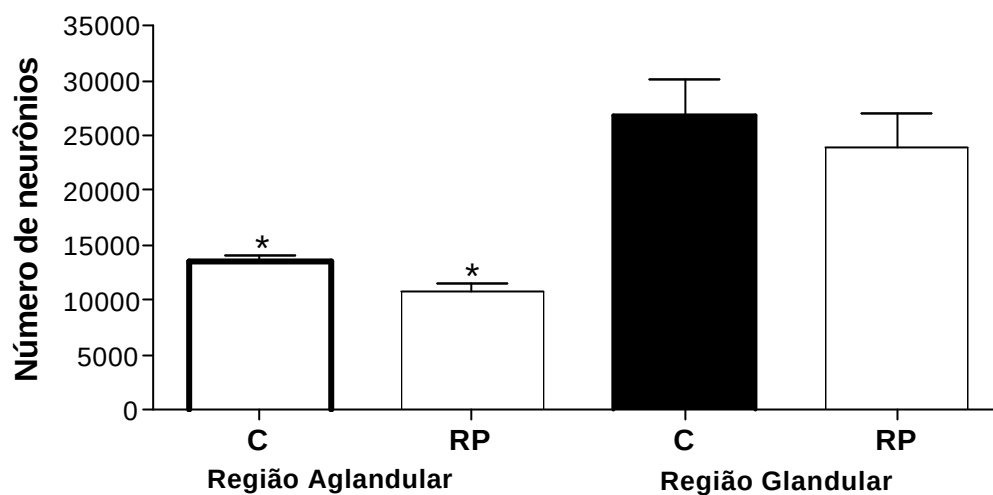


Figura 2 – Número total de neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos nas regiões aglandular e glandular do estômago. Grupos controle (C) e restrição protéica (RP). * estatisticamente significativa (teste *t* Student, $p < 5\%$)

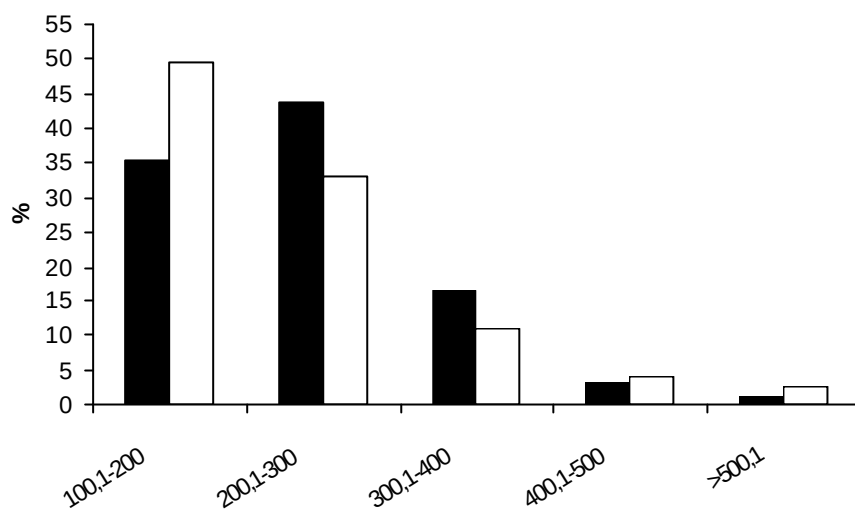


Figura 3 – Distribuição por tamanho dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos da região aglandular do estômago, classificados em intervalos de 100 μm^2 . Grupos controle (■) e restrição protéica (□)

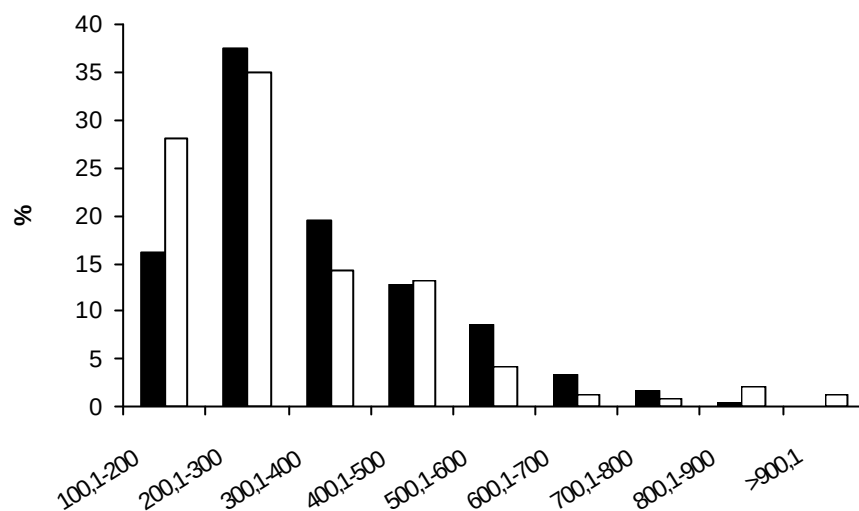
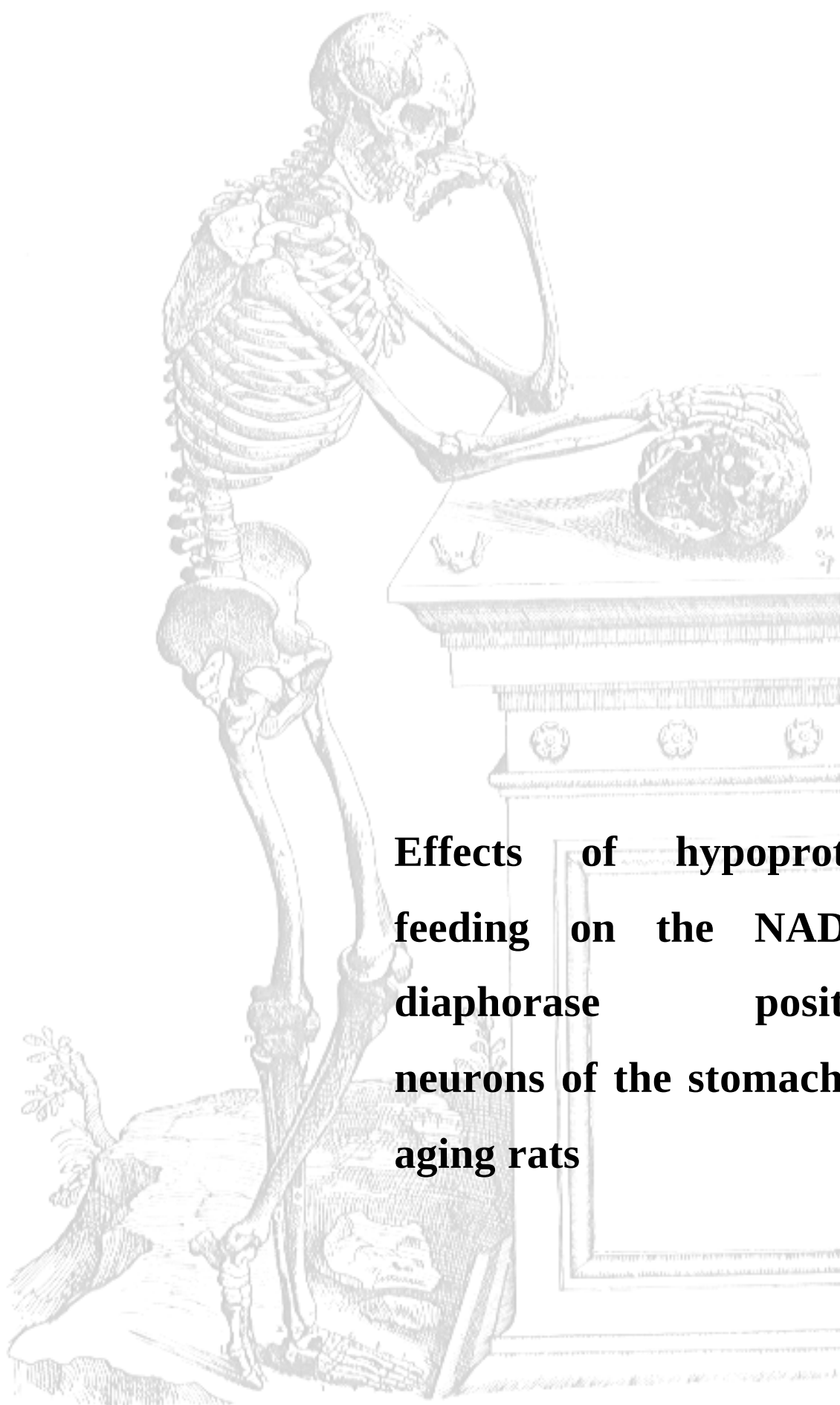


Figura 4 – Distribuição por tamanho dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos da região glandular do estômago, classificados em intervalos de 100 μm^2 . Grupos controle (■) e restrição protéica (□)



**Effects of hypoproteic
feeding on the NADH-
diaphorase positive
neurons of the stomach of
aging rats**

**Effects of hypoproteic feeding on the NADH-diaphorase
positive neurons of the stomach of aging rats**

Fernando Carlos de Sousa*, Marcílio Hubner de Miranda Neto**

*** Professor – Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR)**

****Professor – Department of Morphophysiological Sciences, State
University of Maringá (UEM)**

Address to correspondence:

Fernando Carlos de Sousa

Street Olímpio Mendes da Rocha, 206B, Vila Esperança, Maringá-PR.

ZIPCODE 87020-780

Phone: + 55 44 3263-9637

Fax: + 55 44 3028-8400

e-mail: fernandoanatomia@uol.com.br

EFFECTS OF HYPOPROTEIC FEEDING ON THE NADH-DIAPHORASE POSITIVE NEURONS OF THE STOMACH OF AGING RATS

Abstract: The purpose of this work was to evaluate the effects of restricting the protein level in the diet on the myenteric plexus of the stomach of aging Wistar rats (*Rattus norvegicus*). Two groups of animals were fed *ad libitum*, one with standard chow (22% protein) and the other with hypoproteic chow (8% protein), from the 210th to the 345th day of life. Compared to the animals fed with standard chow, the animals fed with hypoproteic chow exhibited hypophagia (ingestion about 30% lower), mean weight gain 4.46% lower, greater amount of retroperitoneal and periepididymal fat (19% on average), lower Lee index, decrease of total plasma proteins and plasma globulins and maintenance of plasma albumin. The quantitative and morphometric analysis of the NADH-diaphorase positive myenteric neurons, observed in whole-mounts of the glandular stomach and forestomach, yielded a larger number of small neurons and a smaller number of medium neurons in the animals subjected to the hypoproteic chow, demonstrating that the neuronal growth was affected by the diet. The counting of the neurons in 80 microscopic fields (19 mm²), 40 on the forestomach and 40 on the glandular stomach, was adjusted to the area of each region of the stomach of the corresponding animal. In the animals fed with hypoproteic chow it was observed a 20% decrease in the NADH-diaphorase positive neurons of the forestomach and a 10% decrease in those of the glandular stomach.

Key words: hypoproteic chow, aging, stomach, NADH-diaphorase positive myenteric neurons.

1 – INTRODUCTION

Growing young individuals have a relatively high protein requirement in the diet; as the organism slows down its growth rate, its nutritional needs of proteins decreases accordingly. Nevertheless, the transition from adulthood to old age is characterized by changes in body composition and metabolic activity with marked effects on the nutritional aspects. Due to the expressive increase in the population of old people in many countries, to the different conditions in which these persons live, and to the high costs for the governments to provide assistance to this population, many studies have been trying to determine indices for assessment and promotion of health in aging populations.

Based on the literature on the changes due to aging, the Specialists Committee of the FAO/WHO/ONU (1998), in its technical report on energy and protein needs, originally published in 1985, recommended that there should not be a decrease in the protein level of the diet for aging individuals, and that the 0.75 g/kg/day for adults should be maintained instead. The Committee of Scientific Evaluation of the Daily Nutritional References of the Medical Institute of the National Academy of the United States (2005), reviewing the protein needs, recommended that aging individuals should consume 0.8 g protein/kg/day. Both recommendations were based primarily on nitrogen balances and both Committees agree that the adequacy of these recommendations lacks analyses through other research approaches.

As the nervous system has a vital importance and a high metabolic requirement, many studies have assessed the effects of protein-calorie malnutrition on the different components of the nervous system. Pollitt (2000), that for over 30 years has been conducting research about the effects of protein-energy malnutrition and iron deficiency on the intellectual development of children, in a literature review on the issue states that,

both in animal models and in human studies, it becomes evident that protein-energy malnutrition during childhood impairs cognitive functions, emotions and motor development.

Aiming at investigating the effects of protein restriction on the Autonomic Nervous System, many authors have been using the Enteric Nervous System as a model. The Enteric Nervous System is located in the wall of the gastrointestinal tract from the esophagus to the anus and acts in the control of motility, secretion and absorption. It is formed by neuronal cell bodies and nerve fibers. The bodies of the enteric neurons may be isolated, but most of them are organized in groups surrounded by the enteric glia and a sheath of connective tissue, forming two nets of ganglia interconnected by nerve fibers, that is, two ganglionated nerve plexuses. Each of these plexuses is arranged as a bidimensional layer of interconnected ganglia; nerve fibers linking the two plexuses also occur. The plexuses are named according to their location in the gastrointestinal wall. The submucous plexus is located in the connective tissue of the submucosa and the myenteric plexus between the layers of the muscularis externa. Sympathetic and parasympathetic neurons synapse on the enteric neurons. This morphological arrangement, simpler than that of the Central Nervous System, the great biochemical complexity, the functional importance, the easy access and the availability of many techniques of neuronal staining, make the Enteric Nervous System a valuable tool in several research lines in Neuroscience.

Aging leads to a neurodegeneration of the Enteric Nervous System which is much more severe than that of the Central Nervous System and contributes to the increased incidence of gastrointestinal dysfunctions in the elderly (Wade & Cowen, 2004). Nevertheless, Schoffen et al. (2005) comment that, despite many studies about the effects of protein restriction on the Enteric Nervous System of animals in early

stages of development (from gestation to adulthood), the investigations in animals of advanced age are scarce.

In this study it was analyzed body parameters, food ingestion, and quantitative and morphometric aspects of the NADH-diaphorase positive myenteric neurons of the myenteric plexus of the stomach, of aging rats subjected to hypoproteic diet.

2 - MATERIAL AND METHODS

2.1 – Experimental design

All the procedures of this study concerning the use of animals are in accordance with the ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the State University of Maringá (UEM).

Ten male rats (*Rattus norvegicus*) were used in this investigation. The animals were randomly divided into two groups: *Control* – fed with standard chow for rodents NUVILAB-NUVITAL® (recommended by the National Research Council & National Health Institute – USA), with protein level of 22%; *Protein Restriction* – fed with chow having protein level of 8%, manufactured through the addition of corn starch to the NUVILAB® chow (Natali et al., 2000). This chow was supplemented with hydrosoluble vitamins of the B complex and saline mixture (American Institute of Nutrition, 1977; Natali & Miranda-Neto, 1996). Chow and water were supplied *ad libitum* during the whole experimental period.

The animals were kept for 135 days, from the 210th to the 345th day of age, in individual cages under constant conditions of temperature and light/dark cycles of 12/12 hours. Body weight was recorded each fifteen days and chow ingestion recorded during seven days per month. This record consisted in supplying 100g of chow to each animal daily and weighting the leftovers.

At the age of 345 days the animals were weighted, the naso-anal length (NAL) was measured and blood samples were collected for the analysis of total protein (Biuret Method – LABTEST), albumin (Bromocresol Green – LABTEST) and globulins (obtained through total protein minus albumin). After inhalation of ethylic ether the animals were killed and laparotomized. The retroperitoneal and periepididymal fat pads were dissected out and weighted. The stomachs were washed, weighted and outlined on cardboard.

2.2 – Staining of the NADH-diaphorase positive neurons and preparation of the whole-mounts.

The stomachs were filled with Krebs solution (pH 7.3), washed twice in this solution (10 min each wash), immersed for 5 min in 0.3% Triton X-100 solution, and again doubly washed (10 min each wash) in Krebs solution. For staining of the neurons through the activity of the NADH-diaphorase enzyme, the stomachs were immersed for 45 min in an incubation medium containing, for each 100 mL: 25 mL of 0.5% stock solution of Nitro Blue Tetrazolium (NBT – Sigma), 25 mL of phosphate buffer 0.1M, pH 7.3, 50 mL of distilled water, and 50 mg of β -NADH (Sigma).

For the preparations of the whole-mounts, the stomachs were first sectioned along the greater and lesser gastric curvatures, so that a ventral and a dorsal face were obtained, then sectioned along the limiting ridge for separation of the forestomach from the glandular stomach (figure 1). Whole-mounts containing the muscularis externa, serosa and the myenteric plexus were obtained through microdissection under stereomicroscope with removal of both the mucosa and submucosa. The whole-mounts were dehydrated in a series of ethylic alcohol of increasing concentration, cleared in xylol and mounted between glass and coverglass with synthetic resin.

2.3 – Morphometric and quantitative study.

For the morphometric study, images of the whole-mounts laminae were captured through a computerized system of image capture (Image-Pro Plus® 4.5 – Media Cybernetics) coupled to the light microscope (OLYMPUS BX40) using 40X objective. In the images obtained it was measured the profile of 100 neurons per animal, 50 from the forestomach and 50 from the glandular stomach, using the software Image Tool 3.0, a tool produced and freely delivered (freeware) by the Health Sciences Center of the University of Texas at San Antonio (UTHSCSA – EUA). For the quantitative study the laminae were observed under light microscope (OLYMPUS BX40) with 40X objective and the number of neurons in 80 fields per animal (19 mm^2) was counted, 40 fields (9.5 mm^2) in the forestomach and 40 fields (9.5 mm^2) in the glandular stomach. Image capture and neuronal counts were made through random sampling of fields near the limiting ridge on the forestomach and near the limiting ridge and lesser gastric curvature on the glandular stomach.

The outlines of the stomachs were digitalized and the area of the stomach profile was measured with the software Image Tool 3.0 – UTHSCSA.

2.4 – Statistical analysis.

The results were fed into tables and the statistical analysis was carried out with the aid of the software GraphPad Prism® 4 using Student's t test for a 95% confidence interval.

3 - RESULTS

3.1 – Body parameters and chow ingestion.

Tables 1, 2, and 3 group the body parameters, chow ingestion and analysis of the plasma proteins of the animals.

3.1 – Neuronal analysis.

The staining with the NADH-diaphorase technique highlighted the myenteric plexus, both of the forestomach and the glandular stomach, with most of its neurons arranged in ganglia of varied sizes and shapes and a smaller amount of isolated neurons. The intensity of staining varies markedly among the neurons. So varies the cell body shape, which can be round, pyriform or stellate.

The ganglia stained with NADH-diaphorase were not uniformly distributed on the stomach. At the forestomach they are clustered at the central region and near the limiting ridge, while at the glandular stomach they are clustered along the lesser gastric curvature.

The counting of NADH-diaphorase positive myenteric neurons in 40 fields (9.50 mm^2) of the forestomach yielded a mean of 697.3 ± 25.45 neurons in the animals of the control group and of 628.4 ± 53.51 neurons in the protein restriction group. The counting of 40 fields (9.50 mm^2) of the glandular stomach revealed a mean of 724.8 ± 71.87 neurons in the animals of the control group and of 697.0 ± 88.08 neurons in the protein restriction group.

For the analysis of the neuronal counts, the values obtained from 40 fields, corresponding to 9.50 mm^2 of each gastric region, were projected to the area of each region, so that we could obtain an speculative value of the total number of neurons in each region of the stomach of each animal. The area of each region was obtained from the total area of the stomach of the animal and considering the forestomach as representing one-third of the total area and the glandular stomach as the remaining two thirds (Luciano & Reale, 1992). Thus, it was obtained a projection of the total number of neurons in each region of the stomach of each animal. In the forestomach a mean of $13,450 \pm 623.4$ neurons was obtained in the control animals and of $10,700 \pm 768.5$ neurons in the protein restriction group. In the glandular stomach the mean was 26,780

$\pm 3,269$ in the animals of the control group and in the protein restriction group the mean was $23,930 \pm 3,155$ (figure 2).

The data on the measurements of 50 neurons of each gastric region of each animal were fed into tables and the number of neurons in size groups of $100 \mu\text{m}^2$ arbitrary intervals was established. This procedure highlights the range of variation of neuronal areas. Figures 3 and 4 represent the data on the analysis of the area of the cell body profile of 250 neurons per group in each region of the stomach.

4 - DISCUSSION

4.1 – Effects on body parameters and chow consumption.

During the whole experimental period the animals of the protein restriction group ate about 30% less than the animals of the control group. However, the difference of the mean weight gain was small, once the control group gained 5% on average while the protein restriction group gained 0.54%. Molinari et al. (2002) verified that young rats – from 90 to 210 days old – subjected to a 8%-protein diet, when compared to animals receiving 22%-protein diet, gained 30.33% less weight, demonstrating that at this age range protein restriction has more drastic effects than those of the present experiment. According to White (2000), diets very close to or at the limit of protein requirement stimulate hyperphagia in rats; on the other hand, diets with protein amounts well above or well below the requirement of the animals lead to hypophagia. Therefore, the evidence is strong that at this life stage of these rodents, 8% protein is a level below the nutritional requirements.

When the mean weight gain of the two groups is compared, it is observed that the differences are small and also that the rats subjected to protein restriction, although eating less food, did not lose weight at the same rate. This suggests that these animals had a reduced metabolic rate. On the other hand, an individual analysis revealed that the

weight gain was relatively homogeneous among the animals fed with diet of 22% protein, varying from 0.45% to 11.29%. Of the animals subjected to protein restriction, one lost 14.12% of its weight, another gained 12.9%, and the others had small weight gains.

At the end of the experiment the animals of the protein restriction group showed a mean Lee index 6% lower than that of the animals of the control group. This demonstrates that the animals of the protein restriction group had, proportionately, less body mass relative to the size of their bodies, once the Lee index, expressed as the cubic root of the weight divided by the naso-anal length, multiplied by 1,000, is a relation between the size of the animal and its weight, similar to the Body Mass Index (BMI) widely used in humans. In spite of the lower Lee index, the hypophagia, and the smaller weight gain during the experiment, the animals of the protein restriction group had an abdominal fat weight 19% greater on average. Even that rat that lost 14.12% of its body weight showed 1.83 g of this fat/100 g body weight. The rat of the protein restriction group that gained more weight (12.9%) showed 3.42 g of abdominal fat/100 g body weight and that of the control group that gained more weight (11.29%) showed 2.15 g of fat/100 g body weight; therefore, the difference was of 62.86%. These data indicate that the protein reduction together with the increased level of carbohydrates tends to promote adipose tissue accumulation and reduction of the lean mass, even when there is less food ingestion and weight gain or loss.

It is verified, then, that the experimental model used in this investigation resembles kwashiorkor, which is characterized by a diet particularly poor in proteins but plenty of carbohydrates. This condition is frequently found in human populations due to the low cost of carbohydrate-rich foods rich and the greater cost of protein-rich foods, predisposing poor populations to situations of protein lack. This condition is also

frequently found in hospitalized individuals, due to disturbances in the patient's ability to control protein balance and/or inadequate diet. In this situation glucose absorption stimulates insulin secretion and inhibits the secretion of the catabolic hormones. Insulin shifts metabolic pathways towards the use of carbohydrates and inhibits lipolysis and proteolysis, in this way hindering protein mobilization from the muscle and visceral reservoirs to the synthesis of nitrogenous compounds in other tissues. Therefore, kwashiorkor is a non-adaptable type of protein-calorie malnutrition that leads to changes in neuronal and immunological functions (Mahan & Escott-Stamp, 2005).

The reduction of total plasma proteins and plasma globulins sustains the hypothesis that the diet offered exposed the animals of the protein restriction group to a situation of protein lack with reduction in the tissue availability of aminoacids. The absence of edema in rats subjected to protein restriction is a common observation in the literature (Sant'Ana, 2001), and the maintenance of plasma albumin can explain the resistance of these animals to edema formation (Natali et al., 2005).

4.2 – Quantitative analysis of the NADH-diaphorase positive neurons.

Taking the number of neurons of the animals of the control group as a reference, it is noticed a smaller neuronal density in the animals of the protein restriction group, of about 9.88% for the forestomach and 3.83% for the glandular stomach. These differences, although small, are magnified when it is considered that the animals of the protein restriction group had stomachs with profiles about 6% smaller and mean weight about 10% lower than the age-matched control animals. This decreased gastric area was taken into account in the neuronal quantitative analysis. If there is no decrease in the number of neurons, the decreased gastric area leads to a greater proximity of the ganglia and greater values of neuronal counts; in the case of neuronal loss the proximity of the ganglia can mask the reduction in the neuron numbers. Thus, if there was no decrease in

the number of stained neurons, it was expected that the decreased gastric area led to a greater grouping of the ganglia, resulting in values of neuronal counts proportionately greater; in other words, it was expected that the animals under protein restriction showed 6% more neurons. When it is observed the estimate of the total number of neurons of the stomach with basis on the verified densities (figure 2), it is seen that the animals under protein restriction have less neurons than those of the control group – about 20% in the forestomach and 10% in the glandular stomach. This projection reveals data compatible to those of other authors, who verified that the number and size of the enteric neurons keep an intimate relation with the mass of the organ innervated by them (Saffrey & Bunstock, 1994; Molinari et al., 2002).

Studies with the small intestine demonstrated that in aging rats food restriction had a protective effect, preventing neuronal loss due to aging in several neuronal subpopulations of the myenteric plexus. The population of NADH-diaphorase positive neurons, on the other hand, had a decrease of approximately 15%, indicating that, as far as the NADH-diaphorase enzyme is concerned, food restriction leads to decreased activity and/or expression (Johnson et al., 1998; Cowen et al., 2000). Paradoxically, it was observed that in aging rats fed *ad libitum* the population of NADH-diaphorase positive neurons suffered a smaller reduction (43% compared to 52%) than the population of neurons immunohistochemically stained for the 9.5 gene protein, which stains most of the enteric neurons (Cowen et al., 2000).

Our data (figure 2) show that the reduction in the offer of proteins to 8% intensifies the reduction in the number of NADH-diaphorase positive neurons in the stomach of aging rats, indicating that the activity and/or expression of this enzyme is sensitive to the dietary protein level reduction, which could interfere directly with the mitochondrial activity of the neurons that express it. Olowookere et al. (1990), studying

the hepatic mitochondria of rats fed with a 3.47%-protein chow from the 21st to the 51st days of age, demonstrated an intense mitochondrial deterioration with reduced enzymatic activity, 25% for isocitrate dehydrogenase, β -hydroxybutyrate dehydrogenase and succinate dehydrogenase, and 50% for NADH-cytochrome c reductase, and reduced efficiency of the ATP synthesis.

The staining of NADH-diaphorase positive neurons is based on the formation of formazan granules from the enzymatic reduction of an artificial electron acceptor (NBT) the tissue is incubated with. According to Fang et al. (1995), the enzyme or enzymes that catalyze this reaction were not still completely studied, but it is known that they have mitochondrial location and their analysis reveals data on the metabolic activity of the cell. These authors demonstrated the co-localization of the NADH-diaphorase enzyme with the enzyme manganese superoxide dismutase (Mn SOD) in the mitochondrial compartment of several cell types, including myenteric neurons, and postulated that these two enzymes participate of oxidative stress control.

The expression and activity of the NADH-diaphorase enzyme cannot be correlated with the expression of a given neurotransmitter. Therefore, the histochemical staining for NADH-diaphorase is not related to a discrete neuronal population, but is related to the metabolic level of the neurons.

In this work the incubation time of the stomachs for the staining of the NADH-diaphorase positive neurons was set at 45 minutes, which allows the evaluation of the level of metabolic activity of the myenteric neurons between the different samples, those with greater activity exhibiting greater staining at this time and those with lower metabolic activity exhibiting lower staining. In this way, the smaller number of neurons in the animals of the protein restriction group reveals lower metabolic activity, smaller adaptation to oxidative stress and/or lower activity or expression of the enzyme. Some

authors do not set the incubation time, allowing different samples to remain in the incubation medium for different time intervals, aiming only at obtaining the greatest contrast between the neuronal elements and other elements of the underlying tissues; for example, Cohen et al. (2000) used this methodology. The use of larger incubation times allows even neurons of lower enzymatic activity to be stained, increasing the estimates of NADH-diaphorase positive neurons and making it difficult the comparison of the metabolic activity between different whole-mounts.

4.3 – Morphometric analysis of the NADH-diaphorase positive neurons.

In the frequency distribution histograms of the neurons according to their size (figures 3 and 4) it is observed that in the animals of the protein restriction group there is a leftward displacement, indicating a marked predominance of small neurons (of up to $200 \mu\text{m}^2$) and a diminishment of the medium neurons (those between 200.1 and $300 \mu\text{m}^2$), in comparison with the control animals.

In a classic work Gabella (1971), using the same technique of neuronal staining and histograms similar to those of this investigation, already demonstrated that as newborn rats reach adulthood there is an increase in the size of the neurons in the myenteric plexus, and postulated that this process of neuroplasticity could be important to compensate for the increased innervation territory of the neurons caused by the increase on the size of the segments of the gastrointestinal tract. Phillips et al. (2003) observed an increase in the area of the myenteric neurons, both NADPH-diaphorase positive and those stained with Cuprolinic Blue, in the colon and rectum of 24-month old rats, and attributed the hypertrophy to a compensatory mechanism to neuronal loss. At the forestomach, they observed neurons of mean size similar to those described by Gabella (1971), with maintenance of the neuronal size between the third and 24th month of age.

Santer & Baker (1988) stained NADH-diaphorase positive neurons and used histograms of neuron classification by size, in a way similar to that used in this work, and described that, despite there being a neuronal loss in the jejunum, ileum, colon and rectum of rats between the sixth and the 24th month of life, statistically significant changes were not observed in the size distribution of the neurons, with both groups presenting predominance of medium and large neurons.

Cowen et al. (2000), comparing the incidence of neurons according to their diameter between six- and 24-month old rats fed *ad libitum* and 24-month old animals subjected to a 50% food restriction, stated that the myenteric neurons continue to grow after the sixth month of age. In the animals subjected to food deprivation, the neurons immunohistochemically stained for the 9.5 gene protein, despite spared from neuronal loss, suffered decreased growth with resultant reduction in the number of large neurons and increase in the number of small ones.

Our results (figures 2 and 3) suggest that the aging rats fed with hypoproteic diet (8%) keep a pattern of distribution of the NADH-diaphorase positive neurons in the myenteric plexus of the forestomach and glandular stomach similar to that described by Gabella (1971) for younger animals, that is, with predominance of small neurons. This pattern is also found on an histogram of distribution of neurons according to size in the work of Schoffen et al. (2005), which compares the myenteric neurons immunohistochemically stained for myosin V of the colon of rats fed with hypoproteic diet (8%) between the 210th and the 360th day of age, with those of age-matched rats fed with standard chow (22% protein).

Taking into account the reports of Phillips et al. (2001), El-Salhy (1999) and others, as mentioned in Saffrey (2004) that there is a significant reduction in the number of myenteric neurons with aging, albeit in late stages; and the proposal of Phillips et al.

(2003) that in addition to neuronal decrease there is a hypertrophy of the remaining neurons; our observations that aging rats fed with hypoproteic diet show reduction in the number of metabolically active neurons and greater amounts of small neurons allow us to state that in these conditions these animals fail at triggering a neuroplasticity process of neuronal hypertrophy to compensate for the neuronal loss.

In summary, aging animals treated with 8%-protein diet showed hypophagia (30%), but a corresponding weight loss did not take place. On the other hand, they showed smaller gastric area and profile and lower Lee index together with greater proportion of abdominal fat, indicating loss of lean mass and accumulation of adipose tissue. The decreased total plasma protein sustains the hypothesis that the diet offered exposed the animals of the protein restriction group to a reduction in the tissue availability of aminoacids.

The reduction on the population and area of the profile of the cell body of the NADH-diaphorase positive myenteric neurons indicates decrease on the activity and/or expression of the NADH-diaphorase enzyme.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- American Institute of Nutrition, 1977. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr.* 107, 1340-1348.
- Cowen, T., Johnson, R.J.R., Soubeyre, V., Santer, R.M., 2000. Restricted diet rescues rat enteric motor neurons from age related cell death. *Gut* 47, 653-660.
- El-Salhy, M., Sandström, Holmlund, F., 1999. Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. *Mechanisms of Ageing and Development* 107, 93-103.

- EUA. Institute of Medicine of the National Academies - Food and Nutrition Board. Dietary references intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. 2005. National Academies Press, Washington DC, 1357 pp.
- Fang, S. Thomas, R.M., Conklin, J.L., Oberly, L.W., Christensen, J., 1995. Co-localization of manganese superoxide dismutase and NADH diaphorase. *J Histochem Cytochem* 43, 849-855.
- FAO/WHO/ONU, 1998. Necessidades de energia e proteínas. Roca, São Paulo, 225 pp.
- Gabella, G., 1971. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J. Anat.* 109, 81-94.
- Johnson, R.J.R., Schemann, M., Santer, R.M., Cowen, T., 1998. The effects of age on the overall population and on subpopulations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J. Anat.* 192, 479-488.
- Luciano, L., Reale, E., 1992. The “limiting ridge” of the rat stomach. *Arch. Histol. Cytol.* 55, 131-138.
- Mahan, K.L., Escott-Stump, S., 2005. Krause’s food, nutrition & diet therapy. 10 ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 1194 pp.
- Molinari, S.L., Fernandes, C.A., Oliveira, L.R., Sant’Ana, D.M.G., Miranda-Neto, M.H., 2002. NADH-diaphorase positive myenteric neurons of the aglandular region of the stomach of rats (*Rattus norvegicus*) subjected to desnutrition. *Rev. Chil. Anat.* 20, 19-23.
- Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., 1996. Effect of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of the duodenum of rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 54, 273-279.

- Natali, M.R.M., Molinari, S.L., Valentini, L.C., Miranda-Neto, M.H., 2005. Morphoquantitative evaluation of the duodenal myenteric neuronal population in rats fed with hypoproteic ration. *Biocell* 29, 39-46.
- Olowookere, J.O., Olorunsogo, O.O., Malomo, S.O., 1990. Effects of defective in vivo synthesis of mitochondrial proteins on cellular biochemistry and physiology of malnourished rats. *Ann Nutr Metab* 34, 147-154.
- Phillips, R.J., Powley T.L., 2001. As the gut ages: timetables for aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. *J. Comp. Neurol.* 434, 358-377.
- Phillips, R.J., Kieffer E.J., Powley T.L., 2003. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. *Auton. Neurosci.* 106, 69-83.
- Pollitt, E., 2000. Developmental sequel from early nutritional deficiencies: conclusive and probability judgements. *J. Nutr.* 130, 350S-353S.
- Saffrey, M.J., Burnstock, G., 1994. Growth factors and the development and plasticity of the enteric nervous system. *J. Aut. Nervous System.* 49, 183-196.
- Saffrey, M.J., 2004. Ageing of the enteric nervous system. *Mechanisms of Ageing and Development* 125, 899-906.
- Sant'Ana, D.M.G., Molinari, S.L., Miranda-Neto., 2001. M.H. Effects of protein and vitamin b deficiency on blood parameters and myenteric neurons of the colon of rats. *Arq Neuropsiquiatr* 59, 493-498.
- Santer, R.M., Baker, D.M., 1988. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 25, 59-67.
- Schoffen, J.P.F., Soares, A., Freitas, P., Buttow, N.C., Natali, M.R.M., 2005. Effects of a hypoproteic diet on myosin-V immunostained myenteric neurons of the proximal colon wall of aging rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 122, 77-83.

Wade, P.R., Cowen, T., 2004. Neurodegeneration: a key factor in the aging gut. *Neurogastroenterol Motil* 16, 19-23.

White, B.D., Porter, M.H., Martin R.J., 2000. Effects of age on the feeding response to moderately low dietary protein in rats. *Physiol Behav.* 68, 673-681.

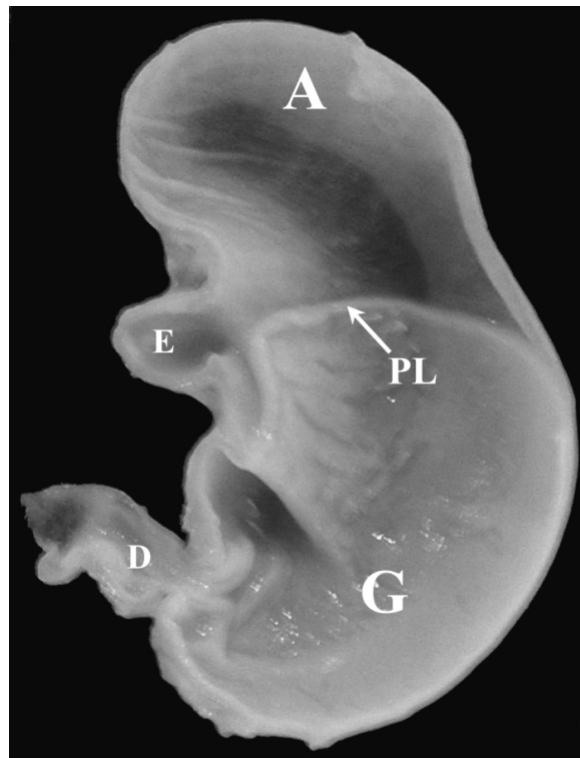


Figure 1 – Stomach of rat (*Rattus norvegicus*). E – esophagus, A – forestomach, PL – limiting ridge, G – glandular stomach and D – duodenum. Longitudinal section along the greater and lesser gastric curvatures. Inner view of the dorsal face.

Table 1 – Chow ingestion and body parameters of the animals of the control group (C) and protein restriction group (RP). Abdominal fat = retroperitoneal fat + periepididymal fat. Mean $\pm$ standard deviation. Means followed by different letters differ statistically (Student's t test, $p < 5\%$).

PARAMETERS	GROUPS	
	C	RP
Chow ingestion (g/day)	$27.5 \pm 1.57_a$	$20.0 \pm 0.97_b$
Initial weight (g)	$437.9 \pm 7.55_a$	$432.9 \pm 20.41_a$
Final weight (g)	$459.4 \pm 12.09_a$	$435.2 \pm 30.32_a$
Weight gain (%)	5%	0,54%
Lee index	$316.2 \pm 3.05_a$	$297.6 \pm 5.33_b$
Abdominal fat (g)	$9.64 \pm 0.88_a$	$11.83 \pm 2.14_a$

Table 2 – Plasma proteins (g/dL) of the animals of the control group (C) and protein restriction group (RP). Mean $\pm$ standard deviation. Means followed by different letters differ statistically (Student's t test, $p < 5\%$).

GROUPS	TOTAL PROTEIN	ALBUMIN	GLOBULINS
C	$6.76 \pm 0.14_a$	$3.19 \pm 0.10_a$	$3.57 \pm 0.12_a$
RP	$6.23 \pm 0.09_b$	$4.12 \pm 0.17_b$	$2.11 \pm 0.21_b$

Table 3 – Weight and profile area of the stomach of the animals of the control group (C) and food restriction group (RP). Mean $\pm$ standard deviation.

GROUPS	WEIGHT (g)	AREA (mm ²)
C	2.33 $\pm$ 0.10	521.5 $\pm$ 28.82
RP	2.11 $\pm$ 0.12	488.9 $\pm$ 17.29
Difference	10%	6%

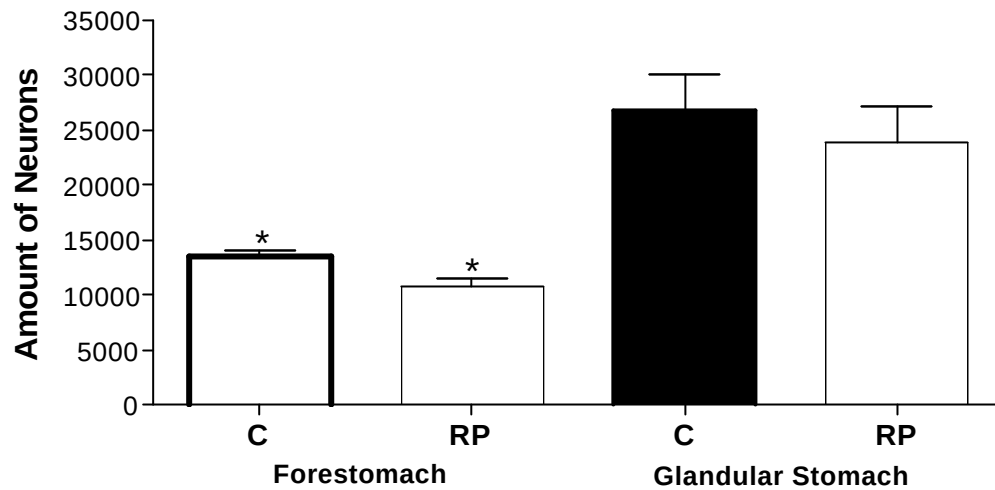


Figure 2 – Total number of NADH-diaphorase positive myenteric neurons of the forestomach and glandular stomach. Groups: Control (C) and protein restriction (RP). * statistically significant (Student's t test, $p < 5\%$).

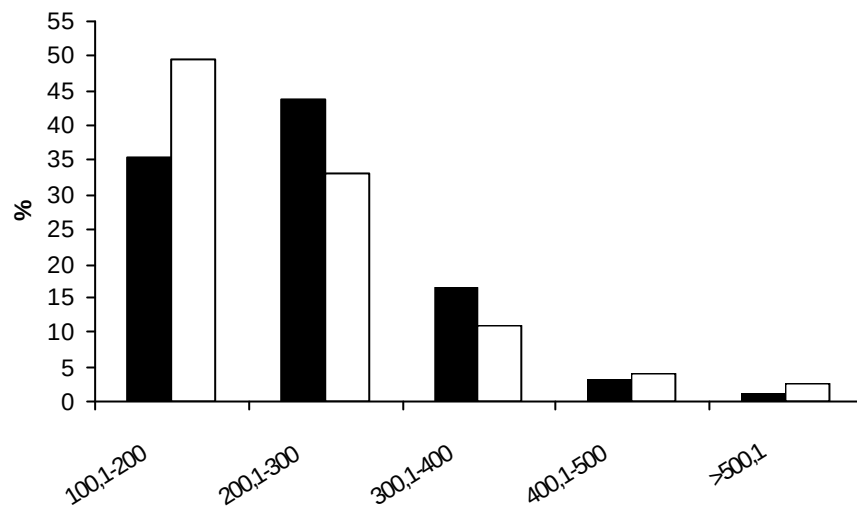


Figure 3 – Distribution by size of the NADH-diaphorase positive myenteric neurons of the forestomach, grouped at 100 μm^2 intervals. Groups control (■) and protein restriction (□).

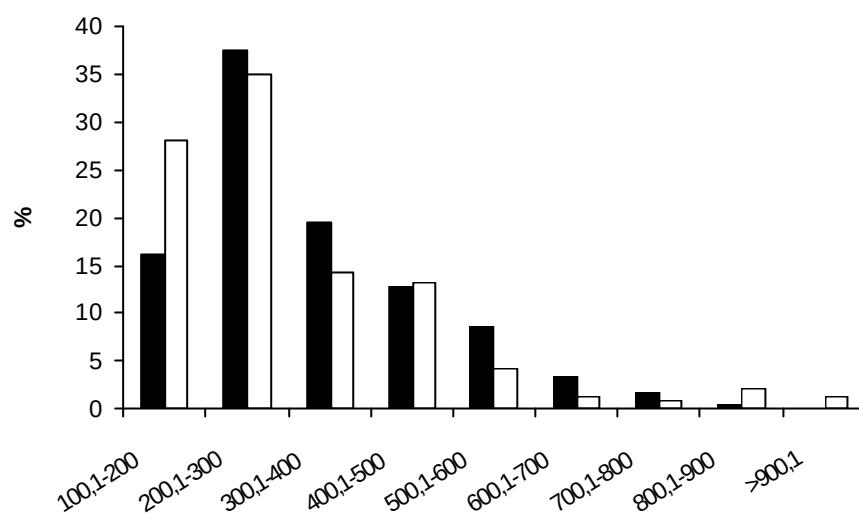


Figure 4 – Distribution by size of the NADH-diaphorase positive myenteric neurons of the glandular stomach, grouped at 100 μm^2 intervals. Groups control (■) and protein restriction (□).



ARQUIVOS DA APADEC (ISSN: 1414-7149)

ÓRGÃO OFICIAL DA ASSOCIAÇÃO PARANAENSE PARA O DESENVOLVIMENTO
DO ENSINO DA CIÊNCIA E DO PROMUD – PROGRAMA MUSEU DINÂMICO
INTERDISCIPLINAR DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES

Submissão

O periódico *Arquivos da Apadec* publica artigos de interesse para professores do Ensino Fundamental e Médio, abordando as Ciências em geral. Poderão ser submetidos artigos originais, artigos de revisão, artigos contendo jogos matemáticos ou práticas de laboratório e notas não submetidos a outros periódicos relacionados a Ciências, Matemática e Educação. Os artigos deverão ser enviados aos Editores: Arquivos da Apadec – Programa Museu Dinâmico Interdisciplinar da Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790 – Bloco H-79 – sala 023 – CEP 87020-900 – Maringá-PR. Os artigos serão submetidos ao Conselho Científico do periódico que avaliará os artigos, podendo sugerir modificações para aprimorar o conteúdo dos mesmos; adotar modificações para aperfeiçoar a estrutura, clareza e redação do texto e recusar artigos. Os artigos serão publicados obedecendo, preferencialmente, a ordem cronológica de recebimento. Artigos publicados são de responsabilidade exclusiva dos autores.

Estilo e forma

Os artigos devem ser digitados utilizando-se o editor de textos Winword 7.0, com letra Times New Roman tamanho 12, espaço 2 e margens de 2,5 cm, não excedendo 16 páginas incluindo ilustrações, tabelas e referências bibliográficas. Os autores devem encaminhar 3 cópias impressas e uma cópia em disquete. Os artigos deverão, obrigatoriamente, apresentar uma *Página de rosto*, contendo o título do trabalho, sugestão de título resumido (“título curto”), nome(s) do(s) autor (es), identificação profissional e endereço para correspondência; *Corpo do trabalho*; *Referências bibliográficas*, obedecendo as características abaixo:

Artigos originais (trabalho experimental ou pesquisa de campo):

- Página de rosto, contendo: título, sugestão de título curto, autores, filiação, autor para correspondência;
- Corpo do trabalho: Título; Resumo (no máximo 250 palavras); Palavras-Chave (em número de 3); *Title; Abstract; Key words*; Introdução; Material e Método; Resultados (*este capítulo pode conter, além de texto, tabelas, figuras, ilustrações e fotografias*); Discussão; Conclusão;
- Referências Bibliográficas.

Artigos de revisão:

- Página de rosto, contendo: título, sugestão de título curto, autores, filiação, autor para correspondência;
- Corpo do trabalho: Título; Resumo (no máximo 250 palavras); Palavras-Chave (em número de 3); *Title; Abstract; Key words*; Introdução; Desenvolvimento; Considerações Finais;
- Referências Bibliográficas.

Artigos contendo jogos matemáticos ou práticas de laboratórios:

- Página de rosto, contendo: título, sugestão de título curto, autores, filiação, autor para correspondência;

- Corpo do trabalho: Título; Resumo (no máximo 250 palavras); Palavras-Chave (em número de 3); *Title; Abstract; Key words*; Introdução com objetivo; Fundamentação Teórica (opcional); Procedimentos;
- Sugestão de leitura e/ou referências bibliográficas.

Notas:

- Página de rosto, contendo: título, sugestão de título curto, autores, filiação, autor para correspondência;
- Corpo do trabalho: Título; Resumo (no máximo 50 palavras); Palavras-Chave (em número de 3); *Title; Abstract; Key words*; Desenvolvimento (máximo 4 páginas);
- Sugestões de leitura (máximo 6).

Ilustrações:

Serão aceitas no máximo 2 (duas) fotos de 10x15 ou 5x8 ou pranchas de 16cm x 24cm *em preto e branco*. **Ilustrações coloridas serão custeadas pelo autor do trabalho.** Cada figura deve ser enviada em arquivo separado. Cada arquivo deve ser denominado como “Figura **n.ext**”, onde **n** é o número de ordem da figura e **ext** é a extensão, de acordo com o formato da figura (jpg, gif, tif etc.). As imagens devem ser enviadas na melhor resolução possível (imagens com resolução menor que 300 dpi podem comprometer a qualidade final do trabalho). As indicações nas figuras devem utilizar fontes *sans-serif*, como Arial ou Helvética, para maior legibilidade. Figuras compostas por várias outras devem ser enviadas, cada parte, em arquivos separados identificados por letras (figura1a.gif, figura1b.gif etc). As legendas devem estar em arquivo separado. É imprescindível que o autor abra os arquivos que preparou para submissão e verifique, cuidadosamente, se as figuras, os gráficos ou tabelas estão, efetivamente, no formato desejado. **As ilustrações deverão ser limitadas (em número e tamanho), ao perfeito entendimento do texto. O Editor reserva-se o direito de descartar ilustrações que não atendam a este requisito.**

Citações:

Todas as citações deverão fazer parte das Referências Bibliográficas. As citações dos autores no texto deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação da seguinte forma:

- Citação direta – quando é feita a transcrição literal do texto original, esta deverá ser indicada entre aspas. Ex.: “arbusto originário da América Tropical...” (BALIANE, 1982); BALIANE (1982) registra “arbusto originário da América Tropical...”
- Citação indireta – quando se exprime a idéia do autor. Ex: ...segundo KLOCKNER (1997) a...;
- Citação de uma citação – quando for impossível obter uma referência, poderá ser utilizada a citação de citação. Este recurso deve ser evitado, devendo ser utilizado **somente quando for impossível** obter o artigo original. Nestes casos, no texto deverá ser indicado o sobrenome do autor original (em minúsculo), seguindo-se da expressão apud, então, o sobrenome do autor que o citou (todo maiúsculo) e o ano de publicação. Ex: Souza apud SILVA (1998). Apenas o trabalho de SILVA (1998) deverá fazer parte das referências bibliográficas.
- Dois autores (NATALI & MOLINARI, 1995).
- Mais de dois autores: cita-se o nome do primeiro autor seguido da expressão et al. (SILVA et al., 1995).

Apresentação das Referências Bibliográficas / Sugestões de Leitura:

Artigos de periódico

ARAÚJO, E.J.A.; FERREIRA, J.R.; NASCIMENTO, D.S.; NASCIMENTO, M.O. I EXPOBIO, uma estratégia de saída para situações de perigo eminente na coletividade: a exclusão social. *Arq. Apadec*, 7(1):12-17, 2003.

Livro – autor de todo o livro

SILVA, P. *Farmacologia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.53-60.

Livro – autor de capítulo dentro de um livro editado por outro autor principal

CIPOLLA-NETO, J.; CAMPA, A. Ritmos biológicos. In: AIRES, M.M. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.17-19.

Teses, Dissertações e Monografias

SANT'ANA, D.M.G. *Estudo morfológico e quantitativo do plexo mientérico do colo ascendente de ratos adultos normoalimentados e submetidos à desnutrição protéica*. 1996. 30f. il. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1996.

Resumo de Congresso

CONEGERO, C.I.; MIRANDA-NETO, M.H. Estudo comparado do sistema pelve-ureteral de humanos e suínos. In: ENCONTRO CIENTÍFICO DA UEM, 4., 1992, Maringá. *Anais...* Maringá, 1992. p.132.

Resumo de Eventos em Periódicos

STALLONE, T.; PRADO, I.M.M.; CAMBONI, A.; DI DIO, L.J.A.; MACCHIARELLI, G.; CORRER, S. Distribution of collagen in the mucosa and submucosa of the terminal ileum in swine. In: LV CONGRESSO SOCIETÀ ITALIANA DI ANATOMIA, 2001, Florença. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, Florença, Itália, 106(3):256, 2001. Resumo.

Entidade Coletiva

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, INSTITUTO DO CÂNCER, COORDENAÇÃO DE CONTROLE DE CÂNCER (Pro-ONCO), DIVISÃO DA EDUCAÇÃO. Manual de orientação para o “Dia Mundial Sem Tabaco”. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer. 1994. 19p.

Documentos Eletrônicos Disponíveis na Internet**1- Com indicação de autoria:**

Nome do autor, título do trabalho. Mês e ano. Disponível: endereço eletrônico. Data em que foi capturado o trabalho. Ex:

SANCHEZ-CABALLERO, H.J.; REFOJO-DE-BRUNO, M.L. El "heredocomplejo morbido" y otros determinante de la psoriasis. Revision sobre 584 casos. Jul.-Sept. 1981. Disponível: <http://www.bireme.br/cgi-bin/IAH2>. Acesso em: 18/09/99.

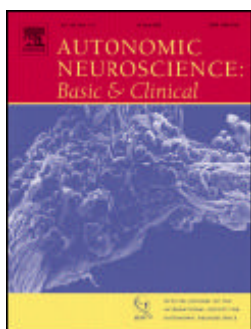
2- Sem indicação de autoria:

Título do trabalho. Mês e ano. Disponível: endereço eletrônico. Data em que foi capturado o trabalho.

3- Entidades Coletivas:

Nome da entidade. Título do trabalho. Mês e ano. Disponível: endereço eletrônico. Data em que foi capturado o trabalho. Ex:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO. Núcleo de Processamento de Dados. Cursos - NPD/UFES. 1997. Disponível: <http://npd1.ufes.br/~cursos/>. Acesso em: 02/03/1997.



Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical **ISSN: 1566-0702**

Guide for Authors

Types of Article Full-length articles of original research; short communications; review type articles; clinical reports and book reviews. The Editor-in-Chief should be consulted whenever a review article is under consideration. Rapid Communications will be accepted if extremely concise, fully documented and dealing with a novel and important observation in a research area in rapid expansion. These will receive priority handling both in the reviewing and publishing processes such that their publication will be advanced.

Ethics *Human Experiments.* Papers describing experimental work on human subjects which carry a risk of harm must include a statement (a) that the experiments were conducted with the understanding and the consent of each subject, and (b) a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments. *Animal Experiments.* Papers describing experiments on living animals should provide (a) a full description of any anaesthetic and surgical procedure used, and (b) evidence that adequate steps were taken to ensure that animals did not suffer unnecessarily at any stage of the experiment, and comply with the existing **national and international** guidelines on the conduct of animal experiments.

Copyright Submission of a paper to *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* will imply that it represents original research not previously published (except in the form of an abstract or a preliminary report) and that it is not being considered for publication elsewhere. It also implies the transfer of the Copyright from the author to the publisher. Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all listed authors concur with the submission and that a copy of the final manuscript has been approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out. If accepted, the manuscript shall not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editors and Publisher. If illustrations or other small parts of articles or books already published elsewhere are used in papers submitted to *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, the written permission of author and Publisher concerned must be included with the manuscript. In these cases, the original source must be indicated in the legend of the illustration.

Special regulations for readers and authors in the USA regarding copying and copyright are to be found in the preliminary pages of each issue.

Online submission of manuscripts *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* uses an online, electronic submission system called EES (Elsevier Editorial System). By accessing the following website

<http://ees.elsevier.com/autneu>

you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. When submitting a manuscript to EES, authors need to provide an electronic version of their manuscript. The author should select a set of classifications from a list, and a category designation for their manuscript (original article, letter to the editor, short communication, etc.). Details of five reviewers that are required with a submission can be provided in the comments box or at a later stage when uploading the files for submission.

Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or journal procedures to the Editorial Office (anbc@ucl.ac.uk). Once the uploading is done, the system automatically generates an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, will be by e-mail.

Manuscript Preparation Articles for publication should be in English and should be submitted with double spacing to any of the Associate Editors or to the Editor-in-Chief. All Clinical papers should be sent to Dr. Phillip Low, all Basic Science papers to the other Associate Editors; this can be accomplished online by selecting the appropriate set of classifications. The Title of the paper should be as concise, clear and informative as possible and should not exceed 120 letters and spaces; it should be free of unusual typographical characters so that it will not be too difficult for other authors to type it and retrieve it. The Title page should also contain the full name(s) of the author(s), their academic or professional affiliation, a selection of relevant keywords, and the full postal address, with telephone and fax numbers, and e-mail address where available, of the author with whom the Editors should correspond. The Abstract should summarize the results obtained and the major conclusions in such a way that a reader not familiar with the particular area of work can understand the implications of the work. The Abstract should not exceed one twentieth of the length of the manuscript. Full-length papers should normally be divided into the following headings: *Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion (and Conclusions), (Acknowledgements) and References*. Short Communications should have an Abstract but no section headings. Abbreviations should be used sparingly and should be avoided in the Abstract.

Literature References Citations in the text should be given in parentheses at the appropriate place by author(s) name(s) followed by the year in chronological order according to the Harvard system (Paintal, 1973; Birdsall et al., 1980). With more than two authors, name only the first followed by "et al." (Birdsall et al., 1980). When two or more papers by the same author(s) appear in one year, distinguish them by a, b, etc. after the date.

The Reference List should be submitted in double spacing. It should be arranged in alphabetical order of the first author's name. If the first author's name appears more than once, the order is as follows: (1) single author: chronological sequence; (2) author and co-author: alphabetically according to co-author; (3) author and more than one co-

author: chronological sequence (as in the text these will be referred to as "et al."). Reference must be complete including, in this order: author's name, initials, year of publication, title of article, title of the journal, volume, first and last page number of the article cited. Title abbreviations should conform to those adopted by List of Serial Title Word Abbreviations (available from International Serial data System, 20 Rue Bachaumont, 75002 Paris, France, ISBN 2-904938-02-8).

Examples: Paintal, A.S., 1973. Vagal sensory receptors and their reflex effects. *Physiol. Rev.* 53, 159-227. Birdsall, N.J.M., Hulme, B.C., Hamner, R., Stockton, J.R., 1980. Subclasses of muscarinic receptors. In: Yamamura, H.I., Olsen, R.W., Usdin, E. (Eds.), *Psychopharmacology and Biochemistry of Transmitters and Receptors*. Elsevier, Amsterdam, pp. 97-100. Leiblich, I., 1982. *Genetics of the Brain*. Elsevier, Amsterdam, 492 pp.

Unpublished experiments may be mentioned only in the text. They must not be included in the list of References. Papers which have been accepted for publication but which have not appeared may be quoted in the reference list as "in press". Personal communications may be used only when written authorization from the investigator is submitted with the manuscript. They must not be included in the list of references. All references listed should be referred to in the text and vice versa.

Figures Figures of good quality should be submitted online as a separate file. The lettering should be large enough to permit photographic reduction. Legends should be typed together on a separate page in the electronic manuscript. If a figure cannot be submitted online, a hardcopy may be sent; please contact the Editorial Office (anbc@ucl.ac.uk) for further instructions.

Colour illustrations must be approved by the editors and the extra costs of colour reproduction will be charged to the author(s).

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g. ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, a limited number of colour figures may be printed in the journal without cost, at the discretion of the Editor, who will make the judgement based on the academic necessity of the colour illustrations. For further information on the preparation of the electronic artwork, please see

<http://www.elsevier.com/locate/authorartwork>.

Tables

Tables should be submitted online as a separate file and should bear a short descriptive title. Legends for each table should appear on the same page as the table.

Preparation of Supplementary Material

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to

publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our Author Gateway at <http://authors.elsevier.com>.

Supplementary files can be submitted on disk; these files can be stored on 3.5 inch diskette, ZIP-disk, or CD/DVD (either MS-Windows or Macintosh).

Proofs Authors will receive proofs by e-mail (PDF), which they are requested to correct and return within 48 hours. No new material can be inserted in the text at the time of proof reading. For Rapid Communications, in the interest of speed no proofs will be sent to the authors; proofreading will be undertaken by the Publisher.

Reprints A total of 25 reprints of each paper will be provided free of charge to the author(s). Additional copies can be ordered at prices shown on the reprint order form, which will be sent to the author on acceptance of the article for publication.

Page charge. There will be no page charge.

For complete up-to-date addresses of Editors please check the link to Editorial Board at the beginning of these instructions.

<http://authors.elsevier.com>"0") have been used properly, and format your article (tabs, indents, etc.) consistently. Characters not available on your word processor (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open but indicated by a unique code (e.g., Gralpha, #, etc., for the Greek letter α). Such codes should be used consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key. Do not allow your word processor to introduce word splits and do not use a justified layout. Please adhere strictly to the general instructions on style/arrangement and, in particular, the reference style of the journal. Further information may be obtained from the Publisher.

Literature References

Citations in the text should be given in parentheses at the appropriate place by author(s) name(s) followed by the year in chronological order according to the Harvard system (Paintal, 1973; Birdsall et al., 1980). With more than two authors, name only the first followed by "et al." (Birdsall et al., 1980). When two or more papers by the same author(s) appear in one year, distinguish them by a, b, etc. after the date.

The Reference List should be typed in double spacing. It should be arranged in alphabetical order of the first author's name. If the first author's name appears more than once, the order is as follows: (1) single author: chronological sequence; (2) author and co-author: alphabetically according to co-author; (3) author and more than one co-author: chronological sequence (as in the text these will be referred to as "et al."). Reference must be complete including, in this order: author's name, initials, year of

publication, title of article, title of the journal, volume, first and last page number of the article cited. Title abbreviations should conform to those adopted by List of Serial Title Word Abbreviations (available from International Serial data System, 20 Rue Bachaumont, 75002 Paris, France, ISBN 2-904938-02-8).

Examples:

Paintal, A.S., 1973. Vagal sensory receptors and their reflex effects. *Physiol. Rev.* 53, 159-227.

Birdsall, N.J.M., Hulme, B.C., Hamner, R., Stockton, J.R., 1980. Subclasses of muscarinic receptors. In: Yamamura, H.I., Olsen, R.W., Usdin, E. (Eds.), *Psychopharmacology and Biochemistry of Transmitters and Receptors*. Elsevier, Amsterdam, pp. 97-100.

Leiblich, I., 1982. *Genetics of the Brain*. Elsevier, Amsterdam, 492 pp.

Unpublished experiments may be mentioned only in the text. They must not be included in the list of References. Papers which have been accepted for publication but which have not appeared may be quoted in the reference list as "in press". Personal communications may be used only when written authorization from the investigator is submitted with the manuscript. They must not be included in the list of references. All references listed should be referred to in the text and vice versa.

Illustrations

Each illustration should bear the author's name and be numbered in Arabic numerals (Fig. 1, Fig. 2, etc.), must be referred to in the text and should be accompanied by a legend (typed with double spacing on separate pages). An illustration, together with its legend, should be understandable with minimal reference to the text.

a. All illustrations should be designed to fit either a single column (7 cm) or the full text width (16 cm).

117

b. Line drawings: these should be drawn in Indian ink on white card, drawing or tracing paper or be quality black and white prints. Line drawings should normally be about twice the final size. Symbols should be used sparingly and direct labelling with an explicative term or abbreviation is preferred. All symbols and lettering should be large enough to permit reduction.

c. Micrographs. These should be mounted on thin cardboard and submitted in a form suitable for direct reproduction without reduction. The maximum space available for micrographs is 1619 cm. Micrographs should be carefully cropped, to leave out areas of low information content, and they should be grouped and arranged to optimize the available space. They should be separated by gutters of 2-3 mm and be directly labelled by the author with Letraset or similar lettering aids. Micrographs must have a calibration bar. Illustrations and legends should not be placed sideways. The original manuscript should be accompanied by a set of illustrations marked "For Printer". In the 4 copies of the paper, the illustrations should be original photographs or good quality photocopies. (Xerox copies are not acceptable).

d. Specific requests for reproduction of illustrations for a particular size (e.g. 100%) should be mentioned on the reverse side of the figure.

e. Colour illustrations must be approved by the editors and the extra costs of colour reproduction will be charged to the author(s).

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g. ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are

reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, a limited number of colour figures may be printed in the journal without cost, at the discretion of the Editor, who will make the judgement based on the academic necessity of the colour illustrations. For further information on the preparation of the electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/locate/authorartwork>

Tables

Tables of numerical data should be typed/printed out (double spacing) on a separate page, numbered in sequence in Arabic numerals (Table 1, 2, etc.), provided with a heading and referred to in the text as Table 1, 2, etc.

Preparation of Supplementary Material

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our Author Gateway at <http://authors.elsevier.com>

Supplementary files can be submitted on disk; these files can be stored on 3.5 inch diskette, ZIP-disk, or CD (either MS-Windows or Macintosh).

Proofs

Authors should keep a copy of their manuscript as proofs will be sent to them without the manuscript. Proofs will be drawn on lower-quality paper. Only printer's errors may be corrected (clearly marked in the text with red pen and clarified in the margin), no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed at this stage. For RapidCommunications, in the interest of speed no proofs will be sent to the authors; proofreading will be undertaken by the Publisher.

Reprints A total of 50 reprints of each paper will be provided free of charge to the author(s). Additional copies can be ordered at prices shown on the reprint order form, which will be sent to the author on acceptance of the article for publication.

Page charge There will be no page charge.

For complete up-to-date addresses of Editors please check the link to Editorial Board at the beginning of these instructions.

<http://authors.elsevier.com>