CARLOS EDUARDO SEYFERT

**REPERCUSSÕES MORFOLÓGICAS DA LESÃO
TÉRMICA CORPORAL NOS COMPONENTES DO
PLEXO MIOENTÉRIC DO JEJUNO DE
RATOS ADULTOS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor
em Ciências (Ciências Morfofuncionais).

**São Paulo
2009**

CARLOS EDUARDO SEYFERT

**REPERCUSSÕES MORFOLÓGICAS DA LESÃO
TÉRMICA CORPORAL NOS COMPONENTES DO
PLEXO MIOENTÉRIC DO JEJUNO DE
RATOS ADULTOS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor
em Ciências.

Área de concentração: Ciências
Morfofuncionais.

Orientador: Prof. Tit. Edson Aparecido
Liberti.

**São Paulo
2009**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Seyfert, Carlos Eduardo.

Repercussões morfológicas da lesão térmica corporal nos
componentes do plexo mioentérico do jejuno de ratos adultos /
Carlos Eduardo Seyfert. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Edson Aparecido Liberti.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração:
Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Sistema nervoso
entérico.

Versão do título para o inglês: Morphological repercussions of burn
injury components of the myenteric plexus in the jejunum of adults rats .

Descritores: 1. Plexo mioentérico 2. Mucosa 3. Jejuno 4. Intestino
delgado 5. Lesão térmica corporal I. Liberti, Edson Aparecido II.
Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0108/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carlos Eduardo Seyfert.

Título da Tese: Repercussões morfológicas da lesão térmica corporal nos componentes do plexo mioentérico do jejuno de ratos adultos.

Orientador(a): Edson Aparecido Liberti.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a):
Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a):
Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a):
Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a):
Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente:
Assinatura:
Nome:
Instituição:

*As minhas três mulheres, Patricia,
Gabriela e Ana.
Aos meus pais Bruno e Helana.
A José e Maria Marega.*

AGRADECIMENTOS

A minha família, por todo sacrifício quando nas minhas ausências em semanas infintas sem dias certos para ficar em casa. A minha esposa Patricia que é meu porto seguro e minhas filhas Gabriela e Ana que mesmo sem saber sempre me deram força e coragem para realizar este e tantos outros trabalhos. A vocês “mulheres da minha vida”, não sei expressar em palavras o quanto são importantes para minha existência.

Aos meus pais Bruno e Helena, aos meus irmãos Alessandra e Ana, José Roberto, meus sobrinhos, Guilherme e Nathalia que em tudo que tenho realizado sempre me apóiam e acreditando nos meus sonhos.

A família Marega, os pais José e Maria e irmãos de minha esposa, que mesmo distantes, sempre estão ao nosso lado, ajudando e sendo referência de caráter e honestidade.

Ao Orientador, professor, amigo, irmão mais velho, pai, Avô Torto, “O Chefe” Dr. Edson Aparecido Liberti, que em sua humilde simplicidade nos permite sermos seus discípulos e ensina com amor, a sermos homens e mulheres.

A grande amiga Dra. Silvia de Campos Boldrini, por todos os seus conselhos serenos e por todo os seu pronto apoio a minha família.

Aos grandes amigos que sempre estiveram junto comigo nesta jornada: Dorival Terra Martini (Tchê), Flávia de Oliveira (F de Ó), Josemberg da Silva Baptista (Josy), Ricardo Bragança de Vasconcellos Fontes (Mestre), Willian Paganini Mayer (Willy) com vocês, tive momentos de alegria, tristeza, compartilhei problemas particulares, sonhos, medos, idéias... Quero poder um dia recordar junto com vocês, todos nossos inesquecíveis momentos.

Aos grandes amigos e colegas que fiz durante minha estada em São Paulo, no VQM – LAFACC e em todos os lugares em que trabalhei: Bruna C. Caixeta de Oliveira, Lynda Tamayo Arango, Lucilene F. Luiz, Luiz H. Silveira Rodrigues, Marcelo Arthur Cavalli, Marcelo Calderon, Eduardo Beber, Márcio Cristófar, Paulo Henrique de Matos Alves, Regina de Sousa Bolina, Sabrina Caixeta, Diana A. de Oliveira, Flávio Tampelini (Emo), Willian Grassi Bautz, Mateus Elias Pacheco, Rulian Ricardo

de Farias, Fabíola Jundurian “Bolonha”, Rejane Daniele Reginato, Adriana Costa, Carla Cristina Campos, Leonardo Liberti (Léo Chicó), Cibele Maciel de Miranda, Adriana Lima, Alan Benedito Bonani, Ana Paula (Bizu), Renato Tesser, Valquíria Barboza Mariotti, Paulo Aurucchio, Ana Lucia Auricchio, Flávia Ferreira, Ricardo Brasil (Teves), Rogério Albuquerque Azeredo, Ricardo Eustáquio da Silva (Ricardinho), Rubia Misawa, Priscila Girotti, Márcia Sanae Mizuno, Maria Teresa Jordão (Plu), Alexandre Melo (Baton), pelo apoio e ajuda inestimável, ensinamentos e por todos os grandes momentos que passamos juntos.

Aos meus novos amigos da Universidade Federal de Campina Grande, Edvanina de Sousa Costa Queiroz, Manoel Moisés Ferreira de Queiroz, Flávia Márcia Oliveira, Antônio Fernandes Filho, Francisco José Gonçalves Figueiredo, José Dilbery Oliveira da Silva e Francisco Fábio Marques da Silva, que a todo o momento sempre estiveram prontos a me auxiliar quando das minhas viagens a São Paulo para a conclusão deste trabalho.

A família Queiróz, por todo o apoio dado a minha família quando da nossa chegada à Cajazeiras.

Aos professores que constituíram a Banca do Exame de Qualificação, Profs. Dr. Eduardo Pompeu, Laura Beatriz Meciano Maifrino e Odair Alfredo Gomes, pela valiosa colaboração com suas sábias colocações.

A professora Dra. Patricia Castelucci sempre me auxiliou sem êxito quando foi preciso.

A professora Dra. Jacqueline Nelisi Zanoni, por ter me recebido na Universidade Estadual de Maringá e passado prontamente todos os seus conhecimentos na arte da imunohistoquímica.

As secretárias do departamento de Anatomia do ICB III, Cristiane Vitor Pinheiro, Maria Cristina dos Santos Faustino e Patrícia Rodrigues de Campos Rocha, pela paciência e auxílio em sempre que necessário.

Aos professores do Departamento de Ciências Morfofuncionais da Universidade Estadual de Maringá pelo apoio que me foi dado sempre que foi necessário.

Aos amigos do Laboratório de Análises Clínicas Souza, Dr. Robson Silva, Agenor Storti filho e Jair Aparecido Martins, que sempre desde minha graduação me auxiliaram. Tenho muito a agradecer por tudo o que fizeram para que eu pudesse realizar este trabalho.

As “professoras” Marta Maria da Silve Righetti e C. Rosana Duarte Prisco, por todo o conhecimento transmitido.

Aos professores e funcionários do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo por todo o apoio dedicado quando sempre precisei.

Agradeço a todos os profissionais que de alguma forma contribuíram com este trabalho e cujos nomes foram omitidos.

Enfim, agradeço a Deus que fez tudo isto!

*“Faz-se ciência com fatos como uma casa
de pedras, porém, um acúmulo de fatos
não é ciência, exatamente como um
monte de pedras não é uma casa.”
(Henry Poincaré)*

RESUMO

SEYFERT, C. E. **Repercussões morfológicas da lesão térmica corporal nos componentes do plexo mioentérico do jejuno de ratos adultos**. 2009. 82 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2009.

As lesões térmicas corporais (LTC) representam um sério problema de saúde atingindo principalmente crianças. A extensão e a profundidade da lesão são fatores determinantes para a alteração de várias estruturas, principalmente o tecido muscular. Alterações no trato gastrointestinal também são relatadas, sendo a principal delas, a atrofia das mucosas gástrica e intestinal, promovendo o surgimento de úlceras e a perda da barreira seletiva, responsável por evitar a invasão de endotoxinas. Na presente pesquisa avaliou-se através de técnicas histoquímicas, imunohistoquímicas e de microscopia de luz, as alterações ocorridas sobre os componentes do plexo mioentérico e a espessura da mucosa do jejuno em três porções: oral (O), média (M) e aboral (A), de ratos adultos com 30% da superfície corpórea exposta ao escaldamento, 4 dias (q4) e 10 dias (q10) após a LTC. Verificou-se em q10 o não restabelecimento da massa corpórea após 10 dias de lesão, a diminuição da área do jejuno bem como da espessura da mucosa. No plexo mioentérico, a área média do perfil celular dos neurônios nitrérgicos não variou entre os grupos queimados e controles. A densidade destes neurônios foi menor em q10 demonstrando que o tempo pós-LTC é um fator capaz de alterar essa densidade. Corpos neuronais altamente reativos à NADPH foram observados em q4 e q10. Principalmente as varicosidades grandes destacaram-se em q4 e q10, quando imunomarcadas pela SP e o VIP.

Palavras-chave: Plexo mioentérico; Mucosa; Jejuno; Intestino delgado; Lesão térmica corporal.

ABSTRACT

SEYFERT, C. E. **Morphological repercussions of burn injury components of the myenteric plexus in the jejunum of adult rats.** 2009. 82 p. PhD thesis (Morphofunctional Sciences) – Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, 2009.

Burn is a serious health problem in children. The extent and depth of burn are determinant factors to alter body structures as the striated muscle. Changes in the gastrointestinal tract are also described as gastric and intestinal mucosal atrophy. This can produce ulcerations and loss of selective barrier, responsible to avoid the absorption of endotoxins. In the present study using both histochemical and immunohistochemical methods and light microscopy techniques the myenteric plexus of the jejunum was evaluated in rats submitted to burn injury by scalding method. The scalding was performed in 30% of the body surface. The myenteric plexus as well as the mucosa of the oral (O), middle (M) and aboral (A) parts of the jejunum were analyzed four (q4) and ten (q10) days post-lesion. The loss of weight due the burn is not recovered in q10. In this group the surface area of the jejunum and the thickness of the mucosa decreased. The mean of neuronal profile of nitregic neurons was similar in q4, q10 and their respective controls. The density of nitregic neurons was lower in q10 showing that the time post injury is an important factor able to alter this parameter. The q4 and q10 groups exhibited neuronal bodies highly reactive to NADPH. The immunoreactivity to SP and VIP in q4 and q10 was expressed mainly in large varicosities.

Keywords: Myenteric plexus; Mucosa; Jejunum; Small intestine Burn injury.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lesão térmica corporal

1.2 Efeito da lesão térmica corporal sobre as estruturas corpóreas

1.3 Aspectos morfológicos e funcionais do jejuno

1.4 Sistema nervoso entérico

1.5 Métodos utilizados para marcação neuronal

1.6 Justificativa

2 OBJETIVOS

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Formação dos grupos

3.2 Lesão Térmica Corporal (LTC)

3.3 Coleta do jejuno

3.4 Técnica da NADPH-diaforase

3.5 Técnica da Acetilcolinesterase

3.6 Técnicas Imunohistoquímicas - VIP e Substância P

3.7 Técnicas rotineiras de histologia

3.8 Planimetria da espessura da mucosa

3.9 Análises: quantitativa e estatística

4 RESULTADOS

4.1 Análise quantitativa

4.1.1 Massa corpórea

4.1.2 Área do jejuno

4.1.3 Área da mucosa

4.1.4 Área do perfil celular dos neurônio NADPH-d

4.1.5 Densidade dos neurônios NADPH-d

4.2 Análise qualitativa

4.2.1 Morfologia dos neurônios, gânglios e da malha do plexo mioentérico reativos a NADPH-d

4.2.2 Morfologia dos neurônios, gânglios e da malha do plexo mioentérico reativos a AChE

4.2.3 Morfologia dos gânglios e da malha do plexo mioentérico imunorreativos a SP e ao VIP

4.2.4 Tecido conjuntivo associado ao plexo mioentérico

5 DISCUSSÃO

6 CONCLUSÕES

REFERÊNCIAS

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lesão térmica corporal

Segundo Pruitt (1990) as Lesões Térmicas Corporais (LTC) sérias, que necessitam de internações hospitalares em centros de queimados, acometem de 60 a 80 mil indivíduos nos EUA; destes (6 a 8%) são levados a óbito.

De acordo com a American Burn Association (GOSAIN e GAMELLI, 2005), dos 700 mil pacientes que sofreram LTC e procuraram os departamentos de emergência dos hospitais, cerca de 45 mil são hospitalizados e o óbito atinge, em média, 6% desses indivíduos.

No Brasil, as LTCs mais frequentes são aquelas por escaldamento e atingem principalmente, crianças com idades inferiores a 12 anos sendo 50% delas menores de 3 anos de idade, o que constitui um sério problema de saúde pública (ROSSI et al., 1998).

Dentre as poucas informações consistentes a respeito da LTC em nosso meio destacam-se as pesquisas realizadas por De Souza et al. (1998, 2002). Na primeira, durante o período compreendido entre 1990 e 1995, os autores verificaram que 229 casos de LTC eram causados por acidentes ocupacionais ou domésticos, envolvendo 32% de crianças com idade de 9 anos ou menos e determinaram uma taxa de mortalidade de 16% neste grupo. Na segunda avaliação, em um período de 6 anos, os autores verificaram que, dentre todas as lesões traumáticas registradas, 921 (1,5%) estavam associadas à LTC; 30% eram crianças com 9 anos ou menos e, dentre estas, aproximadamente 12% eram levadas a óbito.

1.2 Efeito da lesão térmica corporal sobre as estruturas corpóreas

A porcentagem de superfície corpórea afetada, a profundidade da lesão, a idade do paciente, os traumas associados e ainda, a ocorrência de uma lesão por inalação determinam a morbidez e a taxa de mortalidade causada pela LTC (CRAFT e KAGAN, 1998). Para esses autores, tanto os extremos relativos à idade como a presença de lesão por inalação foram as determinantes mais importantes consideradas em termos de sobrevivência. De fato, ao verificarem uma grande mortalidade em pacientes menores de 2 anos e maiores de 60 anos de idade,

notaram que uma injúria determinada por inalação, independente da idade ou da área afetada pela LTC, foi responsável por elevar a taxa de mortalidade. Estes mesmos autores afirmam ainda que, além das lesões visíveis na superfície corpórea, a LTC tem repercussões em todo o organismo comprometendo, no trato gastrointestinal (GI), suas respostas imunes.

Em queimaduras cutâneas, a área afetada está relacionada à elevação da taxa metabólica, sugerindo que o fator metabólico termo-regulador causado por deterioração ou perda da barreira de resfriamento evaporativo cutâneo normal, também contribui para o hipermetabolismo, embora a sua ação precisa não tenha sido estudada (DOWNEY et al., 1986). Para Clowers et al. (1983) e Baracos et al. (1983) pacientes queimados realmente exibem um período de hipermetabolismo o qual se estende do 9º para o 12º dia pós-lesão, sendo o seu grau proporcional à extensão e severidade do ferimento.

A extensa destruição de tecido é uma característica marcante da LTC, que leva a uma ativação de processos catabólicos pelo organismo, a fim de reparar a morfologia alterada. A resposta fisiológica verificada para o trauma por queimadura severa está associada ao aumento da energia consumida e ao substrato energético liberado das reservas de proteína e de gordura do organismo. Após a queimadura, a proteína é catabolizada, iniciando-se um sério processo de perda muscular ocorrendo com isso, a diminuição da força e da capacidade de reabilitação (HART et al., 2000a, 2000b).

Desta forma, a lesão térmica está associada a uma alteração dramática de funções em múltiplos órgãos e sistemas (CARRICO et al., 1986; FRY, 1988; JONES II et al., 1990; ALLGOWER et al., 1995; TREDGET e YU, 1992). Dentre os tecidos do organismo que mais sofrem com esse processo, o músculo parece ser um dos mais prejudicados (MUHLBACHER et al., 1984; BROOKS et al., 1986). Segundo Russo (1976), estando as proteínas destas estruturas mobilizadas, as mesmas serão aproveitadas para síntese protéica de tecidos de outros órgãos, ou então, transformadas em glicose, com a conseqüente eliminação pela urina, de nitrogênio sob a forma de uréia. Em estudos experimentais de queimadura produzida em 30% do corpo de ratos Fang et al. (1995) concluíram que as fibras musculares brancas são mais sensíveis aos efeitos da LTC, em relação às fibras vermelhas.

Para Mason (1979) e Klein et al. (1995), os sobreviventes de queimaduras severas apresentam não somente diminuição da massa muscular, mas também da massa óssea. De acordo com Rutan e Herndon (1990), crianças queimadas demonstram um retardo no crescimento por um período aproximado de 3 anos após a lesão.

A LTC também determina alterações no trato intestinal, tendo sido descrito, como a principal delas, a atrofia da mucosa intestinal (WILMORE et al., 1988; CHUNG et al., 1992). Com isso, ocorre o comprometimento da permeabilidade da barreira desempenhada por essa mucosa permitindo assim, o livre trânsito de bactérias e endotoxinas, culminando com um grave quadro de processo inflamatório (LEVOYER et al., 1992; PAPE, 1994; WANG et al.; 2000; WOODCOCK et al., 2001; TOMS e POWRIE, 2001).

Sori et al. (1988) e Deitch et al. (1996) relatam que patologias associadas ao trato intestinal, frequentemente levam pacientes com queimaduras ao óbito. Autores como Schweinburg et al. (1950) e Fine et al. (1959), destacam que estas patologias estão associadas ao deslocamento de endotoxinas e proteínas bacterianas oriundas da luz do intestino em direção a circulação porta, podendo promover alterações nas funções hepáticas e imune.

De acordo com Gosain e Gamelli (2005), as bactérias provenientes do intestino causam danos a estruturas distantes sendo estes, resultado de alterações físicas na barreira da mucosa intestinal, tendo como via de transporte até os diferentes órgãos, a linfa mesentérica.

As úlceras gástricas e duodenais parecem ser complicações comuns as lesões térmicas. Para amenizar os seus efeitos, Curling no ano de 1842, que foi o primeiro a descrevê-las, utilizava anti-ácidos e a suplementação nutricional. No entanto, mesmo com o auxílio de medicamentos, a distensão gástrica e o desconforto permaneceram (CURRIERI et al., 1986; WILMORE et al., 1988).

O provável comprometimento da parte central do sistema nervoso (SNC) devido a lesão térmica pode provocar no estômago, o comprometimento da motilidade gástrica, dificultando o seu esvaziamento (KEIT, 1980; KOO et al., 1985).

Em ratos que sofreram LTC em 30% da superfície corpórea Zhang et al. (2002) avaliaram a influência da apoptose das células epiteliais do intestino na integridade da barreira exercida pela mucosa. Verificaram 6 horas após a LTC, que o epitélio intestinal dos animais queimados estava mais desenvolvido que o grupo controle. Distinguiram ainda, células apoptóticas nos vilos ileais dos animais queimados 3 horas após a LTC. Concluíram que a ocorrência da apoptose nos enterócitos após a LTC pode ser um fator que determine a quebra da integridade do epitélio intestinal, com conseqüente comprometimento nas suas funções de barreira.

Para Jones et al. (1997) e Wolf et al. (1999) a LTC pode provocar uma complexa apoptose no epitélio intestinal, diminuindo, de maneira significativa, a proliferação de células mitóticas, com um considerável aumento de corpos apoptóticos (VAREDI et al., 2001).

Reforçando a teoria do comprometimento da barreira exercida pela mucosa do trato gastrintestinal através da LTC, McClelland et al. (1971) e Zinner et al. (1975), descreveram que o estresse promovido pela lesão causa úlceras gastroduodenais em pacientes, complicações estas que podem se prolongar por todo o curso da lesão, além de estender o tempo da injúria (SEAVITT, 1967 e McALHANY et al., 1974).

A LTC pode, ainda, promover a vasoconstrição e diminuição do fluxo sanguíneo nos vasos intestinais, levando a uma isquemia (HERNDON et al., 1978; MORRIS et al., 1988; JONES II et al., 1990; SAYDJARI et al., 1991; RAMZY et al., 2000; WANG et al., 2000).

Autores como Maejima et al. (1984) e Baker et al. (1988), descreveram que a LTC severa pode causar choque hemorrágico e oclusão arterial, promovendo o trânsito de bactérias intestinais e endotoxinas, provocando prejuízo na permeabilidade intestinal.

Muito embora as pesquisas sobre essa importante alteração metabólica e estrutural tenham se concentrado na musculatura estriada esquelética em geral e no que diz respeito ao sistema digestório, na mucosa do trato gastrintestinal, pouco se sabe sobre os efeitos da LTC nos plexos responsáveis pela manutenção da fisiologia normal deste trato, ou seja, os plexos mioentérico e submucoso.

Wang et al. (2000), considerando a Óxido nítrico sintase construtiva (cNOS) utilizada como neurotransmissor e a Óxido nítrico sintase induzível (iNOS), de efeito citotóxico, avaliaram os efeitos da LTC 8, 24, 48, e 72 horas pós-lesão, nos neurônios nitrérgicos do plexo mioentérico do jejuno de ratos adultos. Verificaram no grupo controle, que a maioria dos neurônios Óxido nítrico sintase (NOS) - positivos eram intensamente marcados, bem como suas fibras, com varicosidades evidentes. No grupo 8 horas pós-lesão notaram uma marcação menos intensa para os neurônios, porém, as fibras não mostravam alterações visíveis. Nos animais do grupo 24 horas pós-lesão, tanto os neurônios como as fibras se apresentaram mais intensamente marcados. Os grupos de 48 e 72 horas pós-lesão caracterizaram-se por conter neurônios e fibras com marcação mais fraca, comparativamente ao grupo controle. Concluíram que a maior intensidade de marcação do grupo 24 horas pós-lesão está relacionada a um aumento da atividade da iNOS que, com seu efeito citotóxico pode levar à lesão dos tecidos do intestino.

Avaliando os efeitos da suplementação de glutamina nas funções de barreira da mucosa intestinal, Peng et al. (2004), administraram em pacientes com LTC severa (30 a 75% da superfície corpórea e 20 a 58% de profundidade) 0,5g/kg de glutamina por 14 dias e observaram um aumento nos índices de atividade de endotoxinas plasmáticas e na proporção de lactose e manitol na urina, levando a uma diminuição no tempo de cura dos ferimentos e da permanência dos pacientes no hospital. Concluíram que a administração de glutamina via oral pode diminuir o grau da injúria intestinal e conseqüente diminuição na permeabilidade da mucosa.

Investigações sobre os efeitos das alterações provocadas pela NOS e pela Ciclo-oxigenase (COX) sobre o trânsito no intestino grosso após a LTC em 30% da superfície corpórea de ratos, foram realizadas por Gan e Chen (2005) que administraram injeções de S-methylisothiourrea (SMT), inibidor seletivo de iNOS, 7-nitronidazole (7-NI), inibidor seletivo do Óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e Nimesulide (NIM), inibidor seletivo da COX-2 respectivamente. Verificaram que o trânsito no intestino grosso apresentou, nos animais com LTC, um retardo de 36% no tempo em relação aos animais controle. A SMT e NIM favoreceram o progresso no transito nos cólons dos animais queimados, sem causar efeito nos animais controle. A 7-NI causou retardo no transito dos cólons dos animais controle, o que não ouve nos animais com LTC. Tanto o Ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) do

iNOS e COX-2 tiveram aumento significativo nos animais queimados; no entanto, o nNOS não teve alteração. Junto às células epiteliais e também junto as células dos gânglios do plexo mioentérico dos ratos com LTC, a expressão protéica do iNOS foi observada. Os autores sugerem que o NO produzidos pelo nNOS realiza um importante papel como mediador fisiológico na condição do transito nos cólons e que a produção de NO por iNOS e prostaglandinas sintetizadas por COX-2 estão envolvidas em patogenias, atrasando o transito nos cólons após a LTC. A expressão do iNOS nos neurônios dos gânglios do plexo mioentérico podem contribuir para a dismotilidade com a presença da LTC.

1.3 Aspectos morfológicos e funcionais do jejuno

A estratigrafia do trato intestinal é semelhante ao longo de seus segmentos. Assim, o intestino possui em contato com sua luz uma mucosa, constituída de um epitélio monoestratificado, formado por células que podem ter função de revestimento, secreção de muco e ainda a presença de células endócrinas produtoras de hormônios controladores da motilidade intestinal bem como o das secreções. Devido a intensa atividade metabólica e a ação física e química, as células da mucosa intestinal vivem pouco, sendo observada uma intensa atividade mitótica.

O epitélio está fixo a lâmina própria, constituída por tecido conectivo frouxo, matriz extracelular formada por colágeno e elastina. A presença de “placas” de tecido linfático é constante, bem como a de células relacionadas ao sistema imunológico, além de uma extensa rede de capilares.

Contribuindo na alteração da morfologia da mucosa, existe uma delgada camada de células de músculo liso – camada muscular da mucosa – entre a lâmina própria e a submucosa.

A submucosa possui em sua matriz extracelular colágeno e elastina, esta, mais distensível que o colágeno. Há também a presença de células secretoras exócrinas. Este extrato do trato intestinal é percorrido por vasos e nervos.

A camada muscular é a mais externa, sendo constituída de um extrato circular interno, responsável pela redução do diâmetro da luz intestinal e por uma lâmina muscular longitudinal externa, que reduz o comprimento do trato. Entre as lâminas musculares externas, existem células com características de miofibroblastos, as células intersticiais cujo potencial de membrana oscila espontaneamente, dando a elas a propriedade de marcapasso.

Entre a submucosa e a muscular externa há uma rede neural, o plexo submucoso e entre as musculares circular e longitudinal, há um outro plexo neural, o plexo mioentérico, que juntos formam o Sistema Nervoso Entérico.

Externamente ao trato intestinal, existe a lâmina serosa, formada por tecido conjuntivo, denominada de peritônio visceral.

A motilidade do intestino dá-se pelas células musculares lisas, nas quais seus filamentos não estão organizados em sarcômeros, como as estriadas esqueléticas e cardíacas. Suas células estão acopladas eletricamente através das “gap junctions”, assim, as correntes elétricas se propagam pelas células através destas junções. Não existem contatos notáveis entre a inervação e as células. Desta forma o mediador liberado pelas terminações nervosas se difunde e age difusamente sobre as células.

Na motilidade do intestino delgado, observamos o movimento pendular, que surge da contração da musculatura longitudinal em trechos delimitados. E os movimentos de segmentação, que correspondem a contração de trechos do intestino onde as regiões vizinhas, anterior e posterior o oposto acontece. Estes movimentos promovem a mistura do quimo às secreções intestinais, além de promover a sua propulsão, que acontece pelo movimento de peristalse, em forma de “onda”. Estas ondas peristálticas tem início ao acaso, nas partes onde é encontrado o quimo, se propagando por cerca de 20 cm. Esta movimentação esta associada as ondas lentas do ritmo elétrico basal. No entanto, a presença do quimo no interior da área a contrair-se, estimula mecanicamente e quimicamente, arco reflexos que envolvem os plexos e a liberação de hormônios que aumentam a excitabilidade das células musculares.

A intensidade da atividade motora no intestino delgado determina o tempo de trânsito e conseqüentemente, o tempo de contato do quimo com a mucosa intestinal.

1.4 Sistema nervoso entérico

Para realizar suas funções, os órgãos que formam o trato gastrointestinal apresentam uma inervação extrínseca, representada pelos nervos simpáticos e parassimpáticos do sistema nervoso autônomo, e uma inervação intrínseca sob responsabilidade do sistema nervoso entérico. O sistema nervoso entérico consiste de um elevado número de neurônios, da mesma ordem e magnitude que o número de neurônios da medula espinhal, formados por neurônios sensitivos, interneurônios e neurônios motores, que são responsáveis pelo controle das funções do tubo digestório, incluindo motilidade, secreção, absorção e vasomotilidade (FURNESS e COSTA, 1980). Compondo o sistema nervoso entérico existem dois plexos ganglionados (DOOD e ROLE, 1991), o plexo submucoso, localizado junto ao tecido conjuntivo da túnica submucosa, entre a camada muscular circular e a mucosa (GUNN, 1968) e o plexo mioentérico (DOOD e ROLE, 1991), que se encontra entre as camadas longitudinal e circular da túnica muscular.

O plexo mioentérico, está distribuído desde o esôfago até o canal anal, podendo localizar-se entre os estratos longitudinal e circular da túnica muscular (IRWIN, 1931; GUNN, 1968; GABELLA, 1979; STERNINI, 1988), como também em meio às fibras dos estratos circular e longitudinal da túnica muscular, dependendo do segmento e da espécie analisada (IWANOW, 1930; MATSUO, 1934; GABELLA, 1971; MELLO et al., 1996; MOLINARI et al., 1994). Os neurônios do sistema nervoso mioentérico, geralmente, apresentam-se formando gânglios; entretanto neurônios isolados também são observados em roedores (GABELLA, 1987).

Os principais efeitos do plexo mioentérico quando estimulado são: o aumento da contração tônica, “tônus”, da parede intestinal, maior intensidade das contrações rítmicas, ligeiro aumento na freqüência do ritmo de contração e maior velocidade de condução das ondas excitatórias ao longo da parede intestinal, resultando em movimentos mais rápidos das ondas peristálticas (HANSEN, 2003).

O plexo mioentérico não deve ser considerado totalmente excitatório, visto que alguns dos seus neurônios são inibitórios; como foi observado através da presença de neurotransmissor polipeptídico intestinal vasoativo (VIP). Os sinais inibitórios resultantes são especialmente úteis para inibir músculos esfínterianos intestinais que impedem o movimento do alimento entre sucessivos segmentos do trato gastrointestinal como por exemplo, o que ocorre na válvula íleo cecal, que controla o esvaziamento do intestino delgado no ceco. Ao contrário do plexo mioentérico, o plexo submucoso está, principalmente, relacionado com o controle da função no interior da parede de cada segmento do intestino. Por exemplo, muitos sinais sensitivos originam-se do epitélio gastrointestinal e, a seguir, são integrados no plexo submucoso para ajudar a controlar a secreção intestinal local, a absorção local e a contração também local da muscular da mucosa, responsável pelos vários graus de pregueamento da mucosa gástrica (HOBSON e AZIZ, 2003; FURNESS et al., 2004).

A ampla e complexa diversidade de neurotransmissores foi constatada através de estudos farmacológicos e eletrofisiológicos em diferentes níveis do sistema nervoso entérico, o que demonstram a existência de neurônios motores inibitórios, excitatórios e interneurônios, neurônios vasomotores, secretores e sensoriais, além de células nervosas que foram identificadas de acordo com suas propriedades eletrofisiológicas (COSTA, 1980; COSTA et al., 1985). Dessa forma, alguns perfis bioquímico-funcionais vêm sendo avaliados, com a proposição de detectar esses neurotransmissores. Alguns tipos de neurotransmissores liberados pelas terminações nervosas dos diferentes tipos de neurônios entéricos já foram identificados. Os dois mais conhecidos são a acetilcolina e a norepinefrina, os demais são: adenosina-trifosfato, serotonina, dopamina, colecistocinina, substância P (SP), polipeptídio intestinal vasoativo (VIP), somatostatina, leu-enkefalina, met-enkefalina e bombesina (FURNESS et al., 2004).

1.5 Métodos utilizados para marcação neuronal

Em seus primórdios, as análises dos neurônios entéricos foram feitas a partir da impregnação pela prata e azul de metileno (IRWIN, 1931; MATSUO, 1934;

DUPONT et al., 1965). A primeira baseia-se na afinidade de elementos neuronais a metais pesados, e a ela seguiu-se a impregnação pelo ouro e pelo ósmio. Com o azul de metileno evidencia-se o acúmulo de material ácido, como os corpúsculos de Nissl, região em que há agregação de material ribossômico. Da mesma maneira, utiliza-se também o azul de toluidina, o violeta de cresila (IRWIN, 1931; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008) e o azul cuprulínico (HEINICKE et al., 1987).

Com o método de Giemsa (BARBOSA 1978) é possível distinguir neurônios com maior ou menor intensidade basofílica, parâmetro que pode ser empregado para avaliar a desintegração dos corpúsculos de Nissl nos processos de cromatólise neuronal, como descrito por Erhart (1974), Cormack (1995), Natali e Miranda-Neto (1996) e Sant'Ana et al. (1997b), assim como a intensidade de síntese protéica.

A estas técnicas de evidenciação de elementos neuronais somam-se outras como a histoquímica, a imunohistoquímica e a imunofluorescência (GABELLA, 1969; BENNET, 1973; BOR-SENG-SHU et al., 1994; SANTER, 1994; YOUNG et al., 1993).

Dentre as técnicas histoquímicas, uma das mais utilizadas é a de evidenciação da enzima NADH-diaforase (GABELLA, 1969) que se baseia na reação de oxi-redução catalisada pela enzima mitocondrial NADH-diaforase. Para que ocorra a reação é fornecido, como substrato para mesma, o NADH e o acceptor artificial de elétrons o Nitro Blue Tetrazolium (NBT). Ao receber os elétrons, o NBT precipita-se formando grânulos de formazana de cor azul e insolúveis, evidenciando deste modo o corpo celular de neurônios com maior atividade da enzima NADH-diaforase positivos, que representam aqueles com maior atividade daquela enzima. De acordo, porém, com a literatura, esta técnica permite evidenciar parte da densidade neuronal, sendo que o número de neurônios observados é menor que o encontrado pelo método de Giemsa (FURLAN et al., 1999; MIRANDA-NETO et al., 2000; SANT'ANA et al., 1997a) e com a coloração pelo azul cuprulínico (HEINICKE et al., 1987).

No plexo mioentérico evidencia-se uma riqueza de neurotransmissores, dentre eles o óxido nítrico (NO), que é um potente neurotransmissor inibitório, não-adrenérgico não-colinérgico (BULT et al., 1990), que produz o relaxamento da

musculatura lisa do trato gastrointestinal (SHIMAMURA et al., 1993). A literatura tem demonstrado a validade do uso de técnicas histoquímicas para evidencição de NO, já que a enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS) co-existe com a β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) (SHERER-SINGLER, 1983; SANTER, 1994; KENAREN et al., 1995). Estudos têm demonstrado a presença do NO no plexo mioentérico da cobaia (FURNESS et al., 1994), no íleo de ratos adultos (MIRANDA-NETO et al., 2001); no colo ascendente de ratos desnutridos e com deficiência de vitaminas do complexo B (SANT'ANA et al., 2001); no íleo de ratos diabéticos suplementados com ácido ascórbico (ZANONI et al., 2003).

O NO é um radical livre instável e atua como uma molécula mensageira em uma variedade de tecidos neurais e não neurais (MONCADA et al., 1991). Ele é sintetizado como um produto da conversão do precursor fisiológico L-arginina (L-arg) para citrulina, em uma reação catalisada por uma NOS constitutiva dependente de cálcio (MONCADA et al., 1991). O NO, assim que é produzido por ser lipofílico, atravessa as membranas celulares das células efetoras. Nas células efetoras interage com a guanilato ciclase solúvel, ligando-se ao ferro da porção heme da enzima, resultando na mudança da guanosina monofosfato cíclico (cGMP) (BURKS, 1994). Este mensageiro secundário, produz uma variedade de efeitos nas células alvo.

Os neurônios que produzem NO podem ser identificados através de técnicas imunohistoquímicas para NOS (FABRICIUS et al., 1996) ou através de técnicas histoquímicas onde ocorre a redução do NBT, formando uma formazana insolúvel (azul escuro) na presença de NADPH (SCHERER-SINGLER et al., 1983). A distribuição dos neurônios NADPH-diaforase positivos é idêntica daqueles imunomarcados para NOS (BELAI et al., 1992; SANTER, 1994).

Segundo Moncada et al. (1991) existem duas grandes classes de enzimas sintetizadoras de óxido nítrico que são a NOS construtivas (cNOS) e a NOS induzida (iNOS), cada uma codificada por genes diferentes (NORRIS et al., 1994). A cNOS é responsável pela rápida biossíntese do NO e pode ser subdividida em NOS neuronal (nNOS), encontrada nos neurônios centrais e periféricos e NOS endotelial (eNOS), encontrada nos neurônios endoteliais. A iNOS é responsável pela síntese de NO em resposta a um agente indutor após horas ou dias em condições protetoras ou

fisiopatológicas e está presente em macrófagos, epitélio e diferentes tipos de células hepáticas e pancreáticas (CHAKDER et al., 1997).

A NOS pode ser sintetizada tanto no corpo celular neuronal, quanto no terminal do axônio, tendo efeito direto pós-juncional sobre as células musculares lisas (STERN, 2004). Existindo também, neurônios entéricos nitrérgicos nos sistemas: respiratório, digestório, urinário, genital bem como no coração de diferentes espécies animais (GRAZDANOVIC et al., 1994).

O NO não é considerado um transmissor convencional, pois não é armazenado em vesículas e devido à sua natureza gasosa, atravessa facilmente as membranas biológicas alcançando as células vizinhas logo que é produzida. Nos neurônios do plexo mioentérico do colo, o NO desempenha importante função inibitória (MONCADA et al., 1991; STARK e SZURZEWSKI, 1992; AIMI et al., 1993; MACKLOUF e GRIDER, 1993) participando do controle da motilidade do intestino (AIMI et al., 1993).

Um dos principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso entérico é a acetilcolina (OSINSKI e BASS, 1993; NAKAJIMA et al., 2000). A acetilcolina é sintetizada pela enzima acetiltransferase e sua degradação é efetuada por ação enzimática (DOOD e ROLE, 1991). A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela quebra da acetilcolina após sua liberação na fenda sináptica (OSINSKI e BASS, 1993) podendo ser utilizada como um marcador de atividade colinérgica (GABELLA, 1994), visto que, para a marcação da acetilcolina, não existe um método histoquímico (NAKAJIMA et al., 2000).

A acetilcolina foi isolada no intestino de mamíferos por Feldberg e Lin (1949). Segundo, Palmer e Koch (1995), a maioria dos neurônios do intestino é colinérgica. A inervação colinérgica excitatória é importante na sinalização interneuronal, assim como para a função adequada da musculatura lisa e das glândulas (DAVIS et al., 1998). A AChE é sintetizada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) e sua inativação na fenda sináptica ocorre, principalmente, de forma responsável pela quebra da AChE após sua liberação (OSINSKI e BASS, 1993) e pode ser utilizada como marcador de atividade colinérgica (GABELLA, 1994).

A perfeita função das sinapses exige que o neurotransmissor seja rapidamente removido da fenda sináptica, do contrário ocorreria excitação ou inibição do elemento pós-sináptico por tempo prolongado. A remoção do neurotransmissor pode ser feita por ação enzimática. É o caso da acetilcolina, que é hidrolisada pela enzima AChE em acetato de colina. A colina é imediatamente captada pela terminação nervosa colinérgica servindo como substrato para síntese de nova acetilcolina pela própria terminação. A acetilcolina é sintetizada no citoplasma do terminal axônico, sendo rapidamente absorvida por muitas vesículas sinápticas pequenas. Cerca de 300.000 vesículas encontram-se normalmente presentes nos terminais de uma só placa motora. Presa na matriz da lâmina basal existe grande quantidade de enzima acetiltransferase, capaz de destruir a acetilcolina (GUYTON e HALL, 2006).

O trato gastrointestinal dos mamíferos possui funções em comum, assim sendo, muitos neurônios entéricos desempenham funções equivalentes em todas as espécies. Desta forma, suprindo os músculos do trato gastrointestinal, existem motoneurônios excitatórios e inibitórios. Presumi-se que neurônios de diferentes regiões e em diferentes animais apresentem o mesmo procedimento químico (FURNESS et al., 1992).

1.6 Justificativa

Considerando-se que pesquisas foram desenvolvidas no sentido de se fundamentar sob os mais variados aspectos (estruturais e ultra-estruturais, bioquímicos, histoquímicos e imunohistoquímicos) as alterações dos plexos viscerais em processos como o envelhecimento (GOMES et al., 1997), a doença de Chagas (MAIFRINO et al. 2005) e a desnutrição (DE SOUZA et al., 1993; MAIFRINO et al., 1997; SANTER e CONBOY, 1990), entende-se que estudos sobre outros fatores (extrínsecos ou intrínsecos) que possam exercer possíveis influências sobre a estrutura desses plexos devem ser realizados justificando-se assim, a presente pesquisa com a LTC.

2 OBJETIVOS

Com o uso de técnicas de microscopia de luz, histoquímicas e imunohistoquímicas foram avaliados no jejuno de ratos submetidos a LTC:

- 1- A espessura da mucosa intestinal;
- 2- No plexo mioentérico:
 - A disposição e o arranjo dos gânglios e dos feixes nervosos;
 - A densidade, o número estimado e a área do perfil celular de neurônios reativos a NADPH-d;
 - A reatividade dos neurônios a AChE;
 - A imunoreatividade dos neurônios à SP e ao VIP.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Formação dos grupos

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) adultos, com 60 dias de idade, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, que foram divididos nos seguintes grupos: **q4** (animais com 4 dias pós LTC); **c4** (animais controle de 4 dias), **q10** (animais com 10 dias pós LTC) e **c10** (animais controle de 10 dias).

3.2 Lesão Térmica Corporal (LTC)

Cinco animais dos grupos q4 e q10 foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (60-70 mg/kg).

Posterior à anestesia, a pele foi exposta seguindo-se à tricotomia de uma área de aproximadamente 24 cm² (cerca de 15% da superfície corpórea) das regiões do dorso e do abdome (30% no total). Em seguida, os animais foram acomodados em um dispositivo com abertura quadrangular de aproximadamente 21 cm², através da qual a pele exposta das regiões dorsal e ventral era mantida em contato com a água a 85 °C, por um período de 10 segundos para a região dorsal e de 5 segundos para a região ventral (Figura 1). Os parâmetros de área exposta de pele e tempo de exposição ao escaldamento foram estabelecidos de acordo com o protocolo de Walker e Mason (1968). Os procedimentos de anestesia e de tricotomia também foram realizados nos animais dos grupos c4 e c10 a fim de se evitar, segundo Ibebunjo e Martyn (2001), possíveis influências dos mesmos nos resultados.

Após a LTC, os animais de todos os grupos (q4, c4, q10 e c10) foram mantidos, sem restrições de ração e de água, em gaiolas individuais, as quais permitem a higienização diária e o não contato dos animais com as suas fezes, a fim de eliminar possíveis contaminações. No decorrer dos períodos pós LTC, a massa corpórea dos animais de todos os grupos foi medida diariamente.

Figura 1. **A-** região ventral onde, após a tricotomia, foi exposta a pele de uma área de aproximadamente 24 cm². **B-** dispositivo idealizado para realização da LTC com área de 21 cm² (cerca de 15% da superfície corpórea). **C-** pele da região dorsal de animal do grupo q10 (10 dias pós LTC).

3.3 Coleta do jejuno

Após o sacrifício dos animais de todos os grupos com dose excessiva do mesmo anestésico seguiu-se à imediata laparotomia, quando foi retirado todo o intestino delgado, após uma incisão na região do piloro e outra, na junção ileocecal.

O intestino delgado foi então dividido em duas metades iguais, uma oral e outra aboral considerando-se a primeira como contendo o duodeno e o jejuno e a segunda metade o íleo (esta não utilizada). Após desprezado o duodeno (delimitado

através da prega duodeno jejunal) o restante da metade oral (considerada como jejuno) teve sua área total determinada em cm². Para esse procedimento, a víscera foi colocada entre uma lâmina de vidro e um negatoscópio, decalcada em papel vegetal e mensurada com o auxílio de um planímetro¹.

Em seguida, o jejuno foi dividido em três segmentos de comprimento equivalente, denominados **O** (oral), **M** (médio) e **A** (aboral). De cada um deles, foi utilizada a parte média desprezando-se para tanto, os cinco centímetros anteriores das partes **O** e **M** e os cinco centímetros posteriores das partes **M** e **A**. Entendeu-se que com essa padronização, não haveria interferência na amostra, nem da parte correspondente ao duodeno nem daquela referente ao íleo. A figura 2 ilustra essa padronização.

Figura 2. Esquema de coleta das partes O (oral), M (média) e A (aboral), em azul. As áreas descartadas de todos os segmentos estão identificadas com a cor cinza.

3.4 Técnica da NADPH-diaphorase

A fim de se evidenciar os neurônios nitrérgicos os segmentos O, M e A de todos os animais dos grupos estudados foram lavados e preenchidos com tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4), após ligadas as suas extremidades oral e aboral. Em seguida, os segmentos foram imersos em paraformaldeído a 4%, por um período de 30 minutos. Finda a fixação, os espécimes foram submetidos, durante 10 minutos, a 3 lavagens em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4) e imersos por 90 minutos no seguinte meio de incubação² em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4): 50 mg de NBT²; 100 mg de β -NADPH²; 0,3% de Triton X-100². Após a reação, os segmentos foram abertos e lavados 3 vezes em tampão fosfato por 5 minutos e então imersos em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato.

¹ OTT. Germany.

² Sigma.

Preparados totais de membrana dos segmentos O, M e A foram obtidos após a abertura longitudinal dos mesmos que, após distendidos e submetidos à microdissecção sob microscópio estereoscópico com transiluminação³ (quando se removeu as camadas mucosa e submucosa, com auxílio de pinças e tesouras oftalmológica) foram montados com glicerina tamponada entre lâmina e lamínula.

3.5 Técnica da Acetilcolinesterase

Após a remoção e limpeza dos segmentos, como descrito no item anterior, os mesmos foram preenchidos com solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (onde permaneceram imersos por um período de 1 hora a 4 °C), sendo posteriormente lavados durante 12 horas em solução de Krebs contendo hialuronidase⁴ e tetra-isopropil pirofosforamida² (iso-OMPA). A incubação foi realizada por um período de 24 horas a 4 °C, em meio contendo 0,17 M de acetilcolina², 6,5 ml de tampão fosfato (0,1 M; pH 7,1), 0,5ml de citrato de sódio (100 mM), 1ml de sulfato de cobre (30 mM), 1 ml de água destilada e 1 ml de ferricianeto de potássio (5 mM), acrescentando-se iso-OMPA e hialuronidase.

Seguido o período de incubação, os preparados de membrana tiveram removidas as camadas mucosa e submucosa, desidratados em álcool absoluto por 2 vezes durante três minutos, diafanizados em xilol por três minutos em 2 passagens e montados entre lâmina e lamínula com resina.

3.6 Técnicas Imunohistoquímicas - VIP e Substância P

Após coletados e lavados como anteriormente descrito (item 3.4) os segmentos O, M e A do jejuno, foram preenchidos com solução fixadora de Zamboni (paraformaldeído a 4%, Tampão fosfato de Sorensen e solução saturada de ácido pícrico) onde permaneceram imersas por um período de 9 a 18 horas a temperatura de 4 °C. Após o período de fixação, os segmentos foram abertos pela margem mesentérica e lavados sucessivamente em álcool 80% até a total remoção do

³ Zeiss Stemi SV 6.

⁴ 2000 UTR Aspen.

fixador, com posterior desidratação em álcool a 95% e duas vezes a 100%, por um período de 30 minutos cada. Findo o processo de desidratação, os espécimes foram diafanizados em xilol por um período de 30 minutos, reidratados em sequência decrescente de alcoóis (100%, 80% e 50%) por 30 minutos cada. Após a reidratação, os espécimes foram mantidos em PBS (0,1 M; pH 7,4) a 4 °C.

Para realização das técnicas imunohistoquímicas (VIP e Substância P), fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² de cada segmento (O, M e A) foram dissecados sob lupa, sendo removidas as camadas serosa, submucosa e mucosa, preservando-se as camadas musculares (longitudinal e circular). Os fragmentos assim preparados foram acondicionados em microtubos (tipo Ependorff devidamente identificados) e lavados em solução de PBS (0,1 M; pH 7,4) e triton (0,3%) por 10 minutos e em seguida, lavados em solução contendo PBS e soro de cabra a 10%, por 2 horas sob agitação. Após este período, os fragmentos foram incubados em anticorpo primário anti VIP ou Anti Substância P na proporção de 1:200, onde permaneceram por um período de 18 horas. Após a incubação, os fragmentos foram lavados em PBS 3 vezes (5 minutos cada), incubados em anticorpo anti coelho por 1 hora e lavados em PBS (0,1 M; pH 7,4) 3 vezes por um período de 5 minutos cada. Posteriormente, os fragmentos foram montados entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada.

3.7 Técnicas rotineiras de histologia

Os fragmentos O, M e A de cinco animais de cada grupo (q4, q10, c4 e c10) foram imersos em solução fixadora de Bouin por um período de 48 horas e, em seguida, lavados em água corrente por 24 horas e em sucessivas passagens em álcool 70%, para a retirada do excesso de fixador. Após estes procedimentos, os segmentos foram desidratados em série crescente de alcoóis, do 70% ao absoluto, sendo neste último por 3 vezes, com a posterior diafanização em xilol (3 vezes) e inclusão em parafina.

Cortes semi-seriados de 5 µm de espessura foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-eosina (BERMER et al., 1976) para evidenciação da estratigrafia da parede do jejuno; Tricromio de Masson (ROMEIS, 1968) para estudo da organização

estrutural dos gânglios mioentéricos e do Picro-sírius (MONTES e JUNQUEIRA, 1991) que, sob luz polarizada permitiu a diferenciação das fibras colágenas dos tipos I e III.

Os preparados de membrana e os cortes histológicos das diferentes técnicas aqui empregadas foram analisados ao microscópio de luz⁵ acoplado a um sistema de análise de imagem⁶ que permitiu a realização de mensurações e quantificações dos diferentes tecidos, bem como a documentação fotográfica de todo o material.

3.8 Planimetria da espessura da mucosa

Para a mensuração da área da mucosa do jejuno nas três partes estudadas (O, M e A), em todos os grupos (c4, q4, c10 e q10), foi realizada a planimetria em cortes corados com HE. Para tanto, foram escolhidos 10 cortes aleatórios de cada parte do jejuno para cada animal, perfazendo um total de 150 medidas em cada um dos grupos estudados (c4, q4, c10, q10).a metodologia consistiu do emprego de um software analizador de imagens⁷, que permitiu obter medidas da área da luz intestinal bem como da área interna à camada muscular (mucosa) sendo a medida da área interna subtraída da externa, obtendo-se assim a área da mucosa (Figura 3).

Figura 3. Fotomicrografia da parte O do jejuno corado pelo HE, mostrando em vermelho o contorno da área da luz do segmento e em amarelo, o contorno da área interna a camada muscular.

⁵ Zeiss, Axioskop 40.

⁶ Image Pro-plus 3.0.

3.9 Análises: quantitativa e estatística

A densidade dos neurônios reativos a NADPH-d, foi realizada nos preparados totais de membrana dos 5 animais de cada grupo estudado, com o auxílio de microscópio de luz⁵, com objetiva de 16x. Foram quantificados 90 campos microscópicos aleatórios (perfazendo um total de 62,37 mm²) em uma área de superfície dos preparados totais de membrana de aproximadamente 4,5cm². Todos os neurônios de cada campo foram contados. Para a análise do tamanho da área do corpo celular foram mensurados aleatoriamente, com o auxílio de um software analisador de imagens⁶, 60 neurônios de cada segmento do jejuno (O, M e A) de todos os animais dos grupos estudados.

Os valores referentes a densidade e área do perfil celular dos neurônios reativos a NADPH-d; área da mucosa do jejuno nas partes, bem como a área total do jejuno e a massa corpórea dos animais, foram submetidos a uma análise de variância ANOVA, com o pós teste de *Tukey*, quanto existiam diferenças estatísticas significantes entre os segmentos (O, M, A), entre os tratamentos (4 e 10 dias), bem como entre os tratamentos e seus respectivos controles.

4 RESULTADOS

4.1 Análise quantitativa

4.1.1 Massa corpórea

A massa de cada animal foi mensurada diariamente, procurando-se realizá-la sempre nos mesmos horários, a fim de evitar algum possível erro de medida.

Embora tenha ocorrido um ligeiro aumento de massa no grupo c4 e uma estabilidade dessa variável no grupo q4 ao longo dos 4 dias, não foram observadas diferenças estatísticas significantes, como mostra a figura 4.

Figura 4. Aumento da massa corpórea em gramas nos animais dos grupos c4 e q4, com a linha de tendência linear e equação da reta.

Para os animais dos grupos c10 e q10 foram observadas diferenças estatísticas significantes ao longo do período estudado. Na figura 5, pode-se observar a evolução do ganho de massa ao longo dos 5 últimos dias de experimento, num ritmo mais lento nos animais q10.

Figura 5. Aumento da massa corpórea em gramas nos animais dos grupos c10 e q10, com a linha de tendência linear e equação da reta.

4.1.2 Área do jejuno

Nos animais de 4 dias, a média da área variou de $52,9 \pm 2,09 \text{ cm}^2$ no grupo c4 a $57,4 \pm 3,41 \text{ cm}^2$ no grupo q4. Tais valores apareceram de forma inversa para nos animais de 10 dias, onde a média da área do jejuno variou de $53,5 \pm 3,57 \text{ cm}^2$ no grupo c10 a $60,7 \pm 3,98 \text{ cm}^2$ no grupo q10. Avaliando a área do jejuno dos animais, foi possível verificar que o tratamento e o tempo são fatores que influenciam este parâmetro. Assim, foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos controle e seus respectivos tratamentos (c4-q4, c10-q10), bem como entre os dois grupos controle (c4-c10). (Figura 6).

Figura 6. Médias das áreas do jejuno dos animais dos grupos controle (c) e queimado (q) de 4 e 10 dias.

4.1.3 Área da mucosa

Foram observadas diferenças entre todos os grupos (c4, c10, q4, q10) e em todas as regiões estudadas (O, M, A), com a marcante diminuição da área da mucosa dos grupos q4 e q10, quando comparados aos seus respectivos controles. No entanto, as diferenças estatísticas significantes ($P < 0,05$) foram detectadas apenas entre as regiões O ($4,67 \pm 0,87$) e A ($4,25 \pm 1,09$) do grupo q4 quando comparadas com a região M ($7,43 \pm 1,62$) do grupo c10, e entre as regiões A dos grupos q4 e c10 ($7,33 \pm 2,55$) (Figura 7).

Figura 7. Médias da área da mucosa do jejuno, expressa em mm² das regiões Oral (O), Média (M) e Aboral (A) dos grupos c e q de 4 e 10 dias.

4.1.4 Área do perfil celular dos neurônios NADPH-d

Ao se avaliar separadamente sob o aspecto estatístico, as médias da área do perfil celular dos neurônios das partes O, M e A do jejuno entre os animais dos grupos c4 e c10 não foram detectadas diferenças significativas ($P>0,05$). No entanto, quanto compararmos as mesmas partes entre os animais dos grupos q4 e q10, nota-se uma tendência ao aumento da área média da área do perfil celular nos animais de 10 dias (q10). Entre os grupos de 4 dias (c4 e q4) e entre os grupos de 10 dias (c10 e q10) observou-se que o grupo q10 foi aquele que apresentou as maiores médias da área do perfil celular. Todavia, muito embora tenha sido notada essa tendência, estatisticamente não ocorreram diferenças entre as médias (Figura 8).

Figura 8. Médias da área do perfil celular expressa em μm^2 , das regiões O, M e A dos grupos c e q de 4 e 10 dias.

Para apresentar a frequência das diferentes áreas do perfil do corpo celular dos neurônios NADPH-d positivos, foram construídos histogramas com 15 intervalos de frequência, e uma escala representando a área do perfil celular, variando de 0 a 1000 (μm^2), desta forma todas as variações ocorridas no que diz respeito a este fator puderam ser apresentadas. A barra que representa a frequência de cada intervalo, em cada histograma, aparece às vezes com espessura diferente devido à faixa de variação da área do perfil do corpo celular dentro dos 15 intervalos de frequência adotados.

As figuras 9 e 10 ilustram a distribuição da área do perfil do corpo celular nos diferentes grupos. A análise desta distribuição em todos os grupos estudados (c4, q4, c10, q10) e nos diferentes segmentos (O, M, A) permitiu verificar que a maior concentração da área do perfil celular em todas as variáveis, manteve-se no intervalo de 200 a 300 μm^2 .

Figura 9. Distribuição do tamanho da área do perfil celular dos neurônios NADPH-d em μm^2 , ao longo de 15 intervalos de frequência, das regiões O, M e A dos grupos c e q de 4 dias.

Figura 10. Distribuição do tamanho da área do perfil celular dos neurônios NADPH-d em μm^2 , ao longo de 15 intervalos de frequência, das regiões O, M e A dos grupos c e q de 10 dias.

4.1.5 Densidade dos neurônios NADPH-d

As médias referentes a densidade dos neurônios nitrérgicos nas regiões O, M e A dos grupos c e q de 4 e 10 dias por centímetro quadrado estão expressas na Figura 11.

A análise dos dados permitiu verificar a existência de diferenças estatisticamente significantes referentes aos grupos controle (c4 e c10) e ao tempo de lesão (q4 e q10).

Assim, foram observadas diferenças entre as regiões O, M e A dos grupos c4 e q4 em relação a todas as regiões dos grupos c10 e q10. Ainda, entre a região O do grupo c4 ($23,44 \pm 3,53$) quando comparada com a região A do grupo q4 ($18 \pm 2,88$), não sendo detectada nenhuma distinção entre os grupos de 10 dias (c10 e q10).

Confrontando os dados referentes aos grupos c4 e q4 com os grupos c10 e q10, observou-se diferenças significantes entre os tempos de tratamento.

Figura 11. Média da densidade dos neurônios nitrérgicos por cm², das regiões Oral, Média e Aboral dos grupos c e q de 4 e 10 dias.

4.2 Análise Qualitativa

4.2.1 Morfologia dos neurônios, gânglios e da malha do plexo mioentérico reativos a NADPH-d

Relativamente a reação da NADPH, não foram notadas diferenças nas partes O, M e A do jejuno entre os animais dos grupos c4 e q4 e entre os animais dos grupos c10 e q10. Sob um aspecto geral, verificou-se em todos os grupos estudados (c4, c10, q4 e q10) a presença de gânglios distribuídos de maneira esparsa exibindo número variável de neurônios e espaços em seu interior como pode ser verificado na figuras 12 e 14.

Os neurônios se caracterizaram por apresentar diferentes aspectos relativos ao contorno do perfil celular. Desta maneira, foram observados neurônios em sua maioria com aspecto alongado, ovalado e relativamente poucos de forma circular, estes últimos apresentando-se com margens nitidamente crenadas como verificado nas figuras 12 e 13.

Quanto à intensidade de marcação do citoplasma determinada pela reação da NADPH notou-se nos animais dos grupos c4 e c10 um aspecto heterogêneo, ou seja, foram detectados neurônios pouco reativos, independentemente do contorno do seu perfil celular. Nos animais dos grupos q4 e q10 foi nítido o predomínio de neurônios com citoplasma intensamente corado, caracterizando uma homogeneidade da reação nos neurônios dos animais com LTC, conforme mostram as figuras 13 e 14.

Relativamente aos axônios, verificou-se nos animais dos grupos q4 e q10 que os mesmos se apresentaram formando uma rede onde se destacavam feixes interganglionares bem evidentes e relativamente espessos, constituindo uma malha primária, de trajeto perpendicular às fibras musculares. Ainda nesses grupos, a grande maioria dos axônios estava distribuída ao longo da parede da víscera, paralelos às fibras musculares formando as malhas secundárias, ao longo das quais eram nítidas as varicosidades que se aglomeravam em determinados locais. Em alguns trechos, fibras de trajeto perpendicular eram notadas, constituindo uma delgada malha terciária. As varicosidades também foram observadas nas malhas primárias (feixes interganglionares) e, em relativa abundância, no interior dos

gânglios (Figuras 13 e 14). Os axônios com suas varicosidades não foram destacados nos animais dos grupos c4 e c10, como mostra a figura 12.

Figura 12. **Plexo mioentérico do jejuno dos animais dos grupos c4 e c10 reativos à NADPH.** A- aspecto geral do plexo, com gânglios pequenos e esparsamente distribuídos. B- Dois neurônios de aspecto circular e margens crenadas. Notar as diferenças relativas à intensidade de marcação (→). C- Gânglio com espaço em seu interior (*) e neurônios com diferentes contornos e intensidades de marcação. D- Gânglio com número relativamente grande de neurônios e espaços em seu interior (*). E- Neurônio com corpo celular alongado (→), destacando-se o seu axônio (↗). F- Gânglio com neurônio ovalado (→).

Figura 13. **Plexo mioentérico do jejuno dos animais dos grupos q4 e q10 reativos à NADPH.** A- Neurônios de diferentes tamanhos e formatos (→) e delgadas malhas terciárias (▸). B- Aspecto de parte da rede formada pelos axônios, destacando-se o trajeto paralelo das fibras nervosas em relação às fibras musculares (→) e algumas delas, perpendiculares à direção das fibras musculares (▸). C- Gânglio com espaço em seu interior (*) e fibras constituindo as malhas primária (→), secundária (→) e terciária (▸).

4.2.2 Morfologia dos neurônios, gânglios e da malha do plexo mioentérico reativos a AChE

Em linhas gerais, as características do plexo mioentérico relativamente a esta técnica não diferiram entre as partes O, M e A do jejuno dos animais de todos os grupos. Desta forma, foram detectados no interior dos gânglios, corpos neuronais de diferentes tamanhos (pequenos, médios e grandes) com diferentes reatividades à AChE, bem como malhas interganglionares primárias, secundárias e terciárias.

Comparativamente, algumas particularidades foram notadas entre os animais controle (c4, c10) e aqueles submetidos à LTC (q4, q10). Como característica, nos animais dos grupos controle, os gânglios apresentavam quantidade variável de corpos celulares intensamente reativos, com poucos neurônios de baixa reatividade. As malhas interganglionares nesses grupos exibiram o padrão básico, sendo identificadas desde as primárias até as terciárias.

Ao se analisar os animais dos grupos q4 e q10, a reatividade dos corpos neuronais era muito variável indo da intensa até a completa ausência de reatividade. Convém ressaltar que os corpos neuronais reativos geralmente eram os de grande tamanho e que muitos gânglios foram observados com a maioria dos corpos neuronais completamente sem reatividade, conferindo ao gânglio um aspecto de quase vazio. Malhas interganglionares de aspecto normal, com arranjo quadrangular, foram verificadas nesses grupos, porém, em muitos trechos, a mesma exibiu um padrão alterado, sugestivo de degradação, preferencialmente da malha terciária. (Figura 15).

4.2.3 Morfologia dos gânglios e da malha do plexo mioentérico imunorreativos a SP e ao VIP

Com o uso dessas técnicas, não foram detectadas diferenças significativas que permitissem distinguir entre as partes O, M e A em todos os grupos estudados (c4, q4, c10 e q10).

Ao se avaliar a imunorreatividade à SP notou-se que, no geral, ela não foi intensa nos grupos controle (c4 e c10) onde principalmente as varicosidades grandes (que se apresentaram com maior densidade) exibiram intensa imunorreatividade tanto no interior dos gânglios como nas malhas. Todavia, ela foi mais intensa do que aquela verificada nos grupos experimentais (q4 e q10) que exibiram fraca imunorreatividade. Nesses animais, somente poucas varicosidades grandes foram detectadas com relativa intensidade de imunomarcção. (Figura 16).

A imunorreatividade dos componentes do plexo mioentérico ao VIP, apresentou-se mais intensa e de melhor visualização, quando comparada com aquela da SP. Nos animais dos grupos controle (c4, c10) varicosidades de diferentes tamanhos e grande quantidade foram detectadas, tanto no interior dos gânglios ao redor dos corpos neuronais, como nas malhas interganglionares.

Nos animais dos grupos experimentais (q4, q10) a imunomarcção ocorreu nas varicosidades de diferentes tamanhos, porém, com intensidade bem mais baixa do que aquela observada nos animais controle. Entretanto, ao se comparar os grupos submetidos à LTC entre si, o grupo q10 foi aquele que exibiu a imunomarcção menos intensa. (Figura 17).

Figura 16. Fotomicrografias do plexo mioentérico do jejuno de ratos imunorreativos a substância P dos grupos c4 (A), q4 (F), c10 (D e E) e q10 (B e C). A, D, E- Gânglios com feixes de fibras nervosas em seu interior, apresentando relativa densidade de varicosidades moderadamente imunorreativas; B, C, F- Gânglios contendo feixes de fibras nervosas cujos prolongamentos exibem poucas varicosidades com imunorreatividade moderada, restrita as varicosidades grandes.

4.2.4 Tecido conjuntivo associado ao plexo mioentérico

Nos cortes histológicos corados pelo método de Masson, observou-se a cápsula conjuntiva dos gânglios do plexo mioentérico, em todos os grupos estudados. Evidenciada na cor azul, a mesma mostrou-se relativamente delgada nos animais dos grupos controle (c4 e c10). Em muitos gânglios dos animais submetidos a LTC (q4 e q10) além da cápsula apresentar-se fortemente corada, sugerindo uma maior espessura, foram notados delgados septos conjuntivos que separavam os neurônios entre si.

Avaliando os gânglios com a coloração do Picro-sírius sob luz polarizada, detectou-se na estrutura de sua cápsula, a presença de fibras colágenas do tipo I (evidenciadas nas cores amarelo, laranja ou vermelho) em todos os grupos estudados. Todavia, foi possível verificar que, nos animais dos grupos q4 e q10, estas eram mais densamente arranjadas. A malha de tecido conjuntivo mais profundamente situada (malha submucosa) exibiu padrão semelhante em todos os grupos, ou seja, ocorreu o predomínio de fibras colágenas do tipo I. (Figura 19).

5 Discussão

Com relação ao efeito da LTC sobre a massa corpórea observou-se um aumento que se processou mais lentamente nos animais do grupo q10, fato não observado no grupo q4, onde este parâmetro não teve aumento significativo. Esses dados sugerem que provavelmente o tempo de 4 dias após a LTC não tenha sido suficiente para que promovesse alterações na massa corpórea dos animais do grupo q4, o que pode ser confirmado ao se avaliar a massa corpórea dos animais do grupo q10 nos 4 primeiros dias após a LTC, quando também não se verificou diferença importante quanto ao peso nessa fase.

Os dados aqui expressos corroboram com os de Oliveira (2006) que, avaliando os efeitos da Lesão Térmica em músculos de animais jovens (21 dias de idade), nutridos, desnutridos e renutridos, observou que entre os grupos nutridos controles e nutridos queimados de 4 e 14 dias, existiam diferenças significantes na massa corpórea entre os grupos.

Por outro lado os resultados para o grupo q10 não concordam com os de Galvanini (2008), onde o autor avalia os efeitos da LTC no estômago de ratos adultos de 90 dias de idade por um período de 10 dias. Seus dados demonstraram um aumento normal da massa dos animais controle, o que não aconteceu nos animais submetidos à LTC, cuja perda de massa corpórea nos 6 primeiros dias ocorreu sem que fosse restabelecido o peso inicial ao término do período experimental.

Outros tipos de estresse podem também determinar alterações na massa corporal. Desta forma, Lima (1999) estudando os efeitos do tumor de Walker-256 em ratos adultos (cerca de 50 dias de idade) observou a perda de 27% do peso nos animais do grupo experimental quando comparados com os animais controle. A desnutrição protéica é outro fator que causa alteração na massa corpórea dos animais, sendo observadas diferenças significantes entre os animais controle e os desnutridos e renutridos com diferentes idades (ZANIN et al., 2003; OLIVEIRA, 2006; GOMES et al., 2006; MISAWA, 2007; BAPTISTA, 2008). O Diabetes é um estresse que pode promover tanto um ganho quanto uma perda de massa corpórea, o que foi relatado por Mello et al. (2009) em ratos diabéticos com 7 meses de idade. Por outro lado, Defani et al. (2003), Fregonesi et al. (2005) e Soares et al. (2006) descreveram a diminuição da massa corporal em animais diabéticos tratados com

glutamato monossódico, e Hernandez et al. (2000) observaram diminuição significativa do peso corpóreo dos animais tratados com cloreto de benzalcônio.

Observando a área total do jejuno dos animais, foram encontradas diferenças entre os grupos tratados (q4 e q10) e os seus respectivos controle (c4 e c10) tendo os animais queimados exibido uma área menor. Diferentes pesquisas tem demonstrado que podem ocorrer alterações na área dos segmentos intestinais, quando estes são expostos a algum tipo de estresse, levando ao aumento ou a diminuição da área do segmento estudado. Os dados aqui expressos corroboram aqueles verificados por Lima et al. (1999), Kietzer (2002), Marega (2002), que relataram a diminuição da área dos intestinos delgado e grosso em animais portadores do tumor de Walker-256.

Através da exposição do íleo de ratos (HERNANDES et al., 2000) e do colo descendente de equinos (BATISTA et al., 2003), ao cloreto de benzalcônio, observou-se o aumento do segmento estudado, o que também ocorre com estômago e o colo (megaestômago e megacolo) na fase aguda (30 e 90 dias da lesão) da desnervação extrínseca (SILVA et al., 2004). Ainda, a desnutrição protéica é apontada como um fator que promove a diminuição a área do intestino, como observado por Castelucci et al. (2002) no intestino grosso e Gomes et al. (2006) no intestino delgado de ratos jovens. Por outro lado, o Diabetes parece ter efeitos variados como a determinação da diminuição da área do colo proximal de ratos adultos (FURLAN et al., 2002) ou o aumento da área do estômago de ratos adultos (FREGONESI et al., 2005).

Com relação a área da mucosa, a marcante diminuição nos grupos q4 e q10 está de acordo com os dados de Wilmore et al. (1988) e Chung et al. (1992) que, ao avaliarem os efeitos da LTC sobre a mucosa intestinal relataram sua atrofia, o que compromete a barreira exercida pela mucosa, permitindo o livre trânsito de bactérias e endotoxinas, promovendo um processo inflamatório grave (LEVOYER et al., 1992; PAPE, 1994; WANG et al., 2000; WOODCOCK et al., 2001; TOMS e POWRIE, 2001). Muito embora tenha sido descrito que tais alterações ocorrem provavelmente pelo alto índice de células apoptóticas que surgem após a LTC, autores como Jones et al. (1997); Wolf et al.(1999); Varedi et al. (2001) e Zhang et al. (2002) fazem tais afirmações sem contudo avaliarem a área e a espessura da mucosa.

Os dados referentes a espessura da mucosa demonstraram que esta se apresenta mais delgada nos grupos queimado (q4 e q10), diferentemente do que foi observado por Galvanini (2008), que demonstrou no estômago de ratos um aumento desta camada 10 dias após a LTC.

A diminuição da altura dos vilos do intestino delgado foi descrita por Lima et al. (1999), em ratos com tumor de Walker-256. Em animais diabéticos, Freitas (2008) relata que não existem alterações na altura das vilosidades e nos fundos de criptas do jejuno de ratos adultos. Batista et al. (2003) descrevem que o tempo pós exposição ao cloreto de benzalcônio é um fator determinante para o aumento ou diminuição da espessura da mucosa do colo descendente de equinos, destacando o aumento no 1º e no 15º dia após o contato com a droga e uma diminuição após 3 dias da exposição. Hernandez et al. (2000) relata a presença de vilosidades mais altas e criptas mais fundas nos animais tratados com o cloreto de benzalcônio, corroborando com os achados de Batista et al. (2003). Muito embora na presente pesquisa não se tenha avaliado a altura dos vilos da mucosa, pode-se inferir que a diminuição da sua espessura como um todo está diretamente relacionada a uma redução geral da altura dos vilos. Tal assertiva abre uma possibilidade para a realização de estudos posteriores também para uma avaliação da proliferação celular na mucosa intestinal, uma vez que foi comprovado por Silva et al. (2004) que fatores como a desnervação extrínseca do intestino delgado promovem a diminuição da proliferação celular na mucosa em animais adultos.

Com relação a área do perfil celular dos neurônios do plexo mioentérico reativos a NADPH-d, foi observada apenas uma tendência ao aumento no grupo q10; entretanto, estatisticamente não foram notadas de uma maneira geral, diferenças significantes entre os grupos abordados. Tais resultados não estão de acordo com aqueles de Galvanini (2008), no estômago de ratos submetidos a LTC, quando foi relatada uma diminuição dos corpos neuronais reativos tanto a NADH-d quanto a NADPH-d.

Vários fatores podem afetar o tamanho da área do perfil celular dos neurônios do plexo mioentérico. O Diabetes é descrito como aquele que determina um aumento da área do perfil celular desses neurônios como os imuno-reativos ao VIP presentes no jejuno (DEFANI, 2003); os imuno-reativos ao NOS no íleo

(PEREIRA, et al., 2008) e os reativos a NADPH-d no estômago (FREGONESI et al., 2005). No entanto, Freitas et al. (2008) descrevem que o perfil celular dos neurônios imunorreativos a miosina V presentes no jejuno de ratos diabéticos não se alterou ao longo do período estudado. Com relação a desnutrição protéica, Gomes et al. (2006) e Castelucci et al. (2002) não observaram alteração na área do perfil celular dos neurônios, respectivamente do jejuno e do colo. Com o envelhecimento, há um aumento dos corpos neuronais no estômago de humanos (ANARUMA, 1994) e em animais apresentando o tumor de Walker-256, dependendo da víscera estudada, podem não ser notadas variações nesse parâmetro, como no caso do intestino delgado (MAREGA, 2002) ou então a diminuição da área do perfil dos neurônios nitrérgicos no intestino grosso (KIETZER, 2002). Analisando essas variáveis, pelo menos nos períodos aqui abordados, não se pode afirmar categoricamente que a LTC seja um fator capaz de alterar a área dos neurônios mioentéricos do jejuno e que se uma diminuição foi relatada para o estômago (GALVANINI, 2008), provavelmente essa diferença esteja relacionada à víscera abordada. Isto sugere uma avaliação futura dos efeitos da LTC em outras vísceras do tubo digestório, como o colo. Aliás, considerando-se que Oliveira (2006) verificou diminuição significativa no diâmetro das fibras musculares estriadas esqueléticas em ratos submetidos à LTC, pesquisas sobre os efeitos desse fator merecem ser realizadas de maneira bastante acurada no esôfago, uma vez que é conhecida a presença de fibras musculares estriadas esqueléticas em sua estrutura.

No que diz respeito a densidade dos neurônios do plexo mioentérico reativos a NADPH-d, não foram observadas diferenças entre as partes O, M e A nos grupos estudados, o que está de acordo com Gomes et al. (2006), que não notaram diferenças quanto à densidade de neurônios entre as partes proximal, média e distal do intestino delgado de ratos desnutridos. Diferenças na densidade neuronal considerando-se as regiões de uma determinada víscera foram descritas por Oliveira et al. (2000) entre as partes glandular e aglandular do estômago de ratos e por Fregonesi et al. (2001) entre as curvaturas maior e menor do estômago de ratos. Muito embora não se tenha notado diferença entre as partes, no presente estudo não foi preocupação avaliar as diferenças de densidade entre as partes ao longo da circunferência da víscera (mesentérica, intermediária e antimesentérica), como

realizado nos estudos de Miranda-Neto et al. (2001) e Pereira (2006), que relataram diferenças sob esse aspecto, respectivamente no jejuno e no duodeno de ratos.

Alterações na densidade da população neuronal em animais que sofrem algum tipo de estresse são descritas, como o aumento na densidade dos neurônios NADH e NADPH-d do estômago de animais submetidos a LTC (Galvanini, 2008), que não estão de acordo com os dados aqui expressos, uma vez que observou-se uma diminuição na densidade neuronal, nos animais do grupo q10. Esses dados permitem concordar com a análise dos efeitos da desnutrição em ratos, realizada por Santer e Conboy (1990) no jejuno e por Santana et al. (1997) no intestino grosso, quando verificaram uma diminuição significativa na densidade da população neuronal do plexo mioentérico. Ainda, os dados sobre a LTC no jejuno corroboram aqueles descritos sobre os efeitos do diabetes, que também promoveu uma diminuição na densidade dos neurônios do plexo mioentérico no estômago (FREGONESI, et al., 2001), no duodeno (MELLO et al., 2009), no jejuno (FREITAS et al., 2008) e no intestino grosso (PEREIRA, et al., 2008) de ratos. Avaliando os efeitos do tumor de Walker-256, Marega (2002) e Kietzer (2002) observaram o declínio acentuado da população neuronal no intestino delgado e grosso de ratos, respectivamente. Muito embora a LTC tenha promovido uma diminuição no grupo q10, os efeitos do tumor foram muito mais deletérios, pois a perda neuronal foi extremamente significativa. Fato esse que pode ser considerado para os efeitos do cloreto de benzalcônio sobre o íleo (HERNANDES et al, 2000) e a contaminação dos animais por herbicida (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) no duodeno (PEREIRA, 2006) promoveram o declínio da população neuronal do plexo mioentérico do íleo e do duodeno. O mesmo pode-se considerar para o fator envelhecimento, que diminuiu drasticamente a densidade neuronal, respectivamente no estômago e no colo de humanos (ANARUMA, 1994; GOMES et al., 1997).

A disposição das malhas do plexo mioentérico de todos os grupos estudados apresentou-se, de maneira geral, com a mesma conformação em todas as técnicas empregadas (NADPH, AChE, SP e VIP). Assim, esta apresentou-se com aspecto quadrangular, com nítidos feixes interganglionares primários, secundários e terciários. No entanto, no que diz respeito à imunoreatividade a AChE, em alguns trechos do plexo dos animais q4 e q10, esta malha apresentou-se desorganizada faltando até mesmo os feixes terciários. Essa alteração da malha terciária também

foi detectada por Kietzer (2002) no plexo do intestino grosso de ratos portadores do tumor de Walker-256

A presença de varicosidades de diferentes tamanhos foi observada tanto na reação histoquímica para o NADPH como nas reações imunohistoquímicas para a SP e o VIP, com destaque para a imunomarcção pelo VIP que apresentou-se muito intensa nos animais controle e com reatividade moderada nos animais q10 e discreta no grupo q4. A imunoreatividade do plexo mioentérico a SP foi menos intensa quando comparada àquela do VIP; todavia, a mesma apresentou-se maior nos grupos controle (c4 e c10), com a presença de feixes e grandes varicosidades bem definidas, sendo e muito sutil nos grupos experimentais (q4 e q10).

Os gânglios mioentéricos, com formatos variados, exibiram espaços em seu interior, nas marcações da NADPH e da AChE, principalmente nos grupos q4 e q10. Neurônios com formatos preferencialmente alongados e ovalados apresentavam contorno crenado. A evidenciação dos corpos celulares reativos a NADPH e a AChE ocorreu de maneira distinta, sendo heterogênea (isto é, com variação de reatividade) nos animais controle em relação aos neurônios nitrérgicos o que não foi observado nos animais queimados, onde todos os corpos celulares estavam intensamente marcados. Por outro lado, a reatividade a AChE demonstrou a presença de grande número de neurônios intensamente marcados nos animais controle, o que não foi observado nos grupos q4 e q10, onde além da presença de neurônios com intensa reatividade, foram observados muitos neurônios com baixa ou nenhuma reatividade.

Essas observações em muito se assemelham àquelas verificadas por Galvanini (2008) no estômago de ratos submetidos à LTC e em animais desnutridos e renutridos, descritas por Castelucci et al. (2002) e Gomes et al. (2006), no plexo mioentérico dos intestinos grosso e delgado, respectivamente.

Com as técnicas imunohistoquímicas para a SP o VIP, evidenciou-se preferencialmente as fibras nervosas com varicosidades de diferentes tamanhos destacando-se as grandes intensamente reativas nos animais controle, e em menor intensidade nos grupos queimado. Os achados relativos a essas técnicas apresentam-se semelhantes aos descritos por Galvanini, no estômago de ratos submetidos à LTC.

Ao se confrontar as informações acerca da conformação geral do plexo mioentérico, bem como as alterações nele ocasionadas direta ou indiretamente pela LTC, com dados referentes a desnutrição, diabetes, tumor de Walker-256 e o envelhecimento, pode-se inferir que as funções gastrintestinais são passíveis de prejuízo da sua função normal. Um dado morfológico importante a ser acrescido e que permite embasar essa afirmação, foi a diminuição da área da mucosa detectada nos animais queimados.

Relativamente à cápsula conjuntiva associada aos gânglios do plexo mioentérico, Kietzer (2002) detectou na cápsula dos gânglios mioentéricos do intestino grosso de animais com o tumor de Walker-256, uma grande densidade de fibras do tipo III, o que também foi descrito por Gomes et al. (2006) no jejuno de animais desnutridos. Na presente pesquisa verificou-se o espessamento da cápsula ganglionar e a presença de septos no interior dos gânglios, todos formados por fibras colágenas do tipo I. Tais aspectos foram observados no plexo mioentérico do colo humano de indivíduos idosos (GOMES et al. 1997) e relacionados a uma compensação à perda neuronal decorrente do envelhecimento. Este espessamento de “compensação” parece não aplicar-se à LTC, uma vez que o mesmo foi observado os envoltórios dos músculos estriados esqueléticos, mormente o endomísio (OLIVEIRA, 2006). Portanto se é verdadeiro que dentre os tecidos, o músculo parece ser um dos mais prejudicados (MUHLBACHER et al., 1984; BROOKS et al., 1986; HART et al., 2000a, 2000b), também pode-se admitir como correta a afirmação de que o tecido conjuntivo sofre com as diferentes espécies de queimaduras. Estudos ulteriores nesse sentido devem ser realizados, incluindo-se uma avaliação da distribuição do colágeno no tecido muscular cardíaco.

5 CONCLUSÕES

Pela análise proporcionada pelas diferentes metodologias acerca das repercussões morfológicas da LTC no plexo mioentérico do jejuno de ratos, é lícito concluir que:

1. A área do jejuno e de sua mucosa diminuiu significativamente nos animais queimados;
2. Não foram verificadas diferenças no plexo mioentérico entre as partes O, M e A do jejuno quanto a densidade dos neurônios reativos ao NADPH-d;
3. Não foram observadas diferenças entre as partes O, M e A do jejuno com relação à área do perfil celular dos neurônios nitrérgicos;
4. A reatividade dos neurônios nitrérgicos ocorreu de forma mais intensa nos grupos q4 e q10 comparativamente aos seus controles;
5. Ocorreu uma diminuição do número de neurônios nitrérgicos somente nos animais do grupo q10;
6. Neurônios com reatividade a AChE variando desde muito elevada até à ausência de reatividade foram detectados nos grupos q4 e q10; diferentemente do observado nos respectivos controles onde a marcação ocorreu de uma forma mais homogênea;
7. A ausência das malhas terciárias reativas a AChE foi detectada nos grupos q4 e q10;
8. A imunorreatividade ao VIP e a SP foi menos intensa nos grupos q4 e q10;
9. Ocorreu um aumento do tecido conjuntivo na cápsula ganglionar dos grupos q4 e q10, representado por uma maior densidade das fibras colágenas do tipo I.

REFERÊNCIAS*

AIMI, Y.; KIMIRA, H.; KINOSHITA, T.; MINAMI, Y.; FUJIMURA, M.; VINCENT, S. R. Histochemical localization of nitric oxide synthase in rat enteric nervous system. **Neuroscience**, v. 53, p. 553-560, 1993.

ALLGOWER, M.; SCHOENENBERGER, G. A.; SPARKES, B.G. Burning the largest immune organ. **Burns**, v. 21, p. 7-47, 1995.

BAKER, S. P.; WHITFIELD R. A.; O'NEILL B. County mapping of injury mortality. **J. Trauma**, v. 28, n. 6, p. 741-745, 1988.

BAPTISTA, J. S. **Repercussões morfológicas no timo de ratos jovens submetidos à desnutrição protéica e à renutrição precocemente corrigida**. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BARACOS., V.; RODENMANN, H. P.; DINARELLO, C. A.; GOLDBERG, A. L. Stimulation of muscle protein degradation and prostaglandin E₂ release by leukocytic pyrogen (interleukin-1). **N. Engl. J. Med.**, v. 308, p. 553-557, 1983.

BARBOSA, A. J. A. Técnica Histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. **Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol.**, v. 11, p. 95-97, 1978.

BATISTA, F. A. **Aspectos morfológicos e morfométricos do cólon descendente de eqüinos tratados pelo cloreto de benzalcônio**. 2003. 59 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

BEHMER, W. G.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. São Paulo: EDART, 1975.

BELAI, A.; SCHMIDT, H. H. H. W.; HOYLE, C. H., V.; HASSALL, C. J. S.; SAFFREY, M. J.; MOSS, J.; FORSTERMANN, U.; MURAD, F.; BURNSTOK, G. Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in the myenteric plexus of the rat gut. **Neurosc. Letters**, v. 143, p. 60-64, 1992.

BÉNARD, H; BUSNEL, R. G.; CHAUCHARD, P.; MAZOUÉ, H.; POLONOVSKI, M. Actions vitaminiques B1 et B2 des pternes et de l'acide folique sur les rats ceocumectomisés. **Compt. Rend. Acad. Sci.**, p. 223-226, 1946.

BENNET, T. Fluorescence histochemical observations on catecholamine-containing cell bodies in Auerbach's Plexus. **Z. Zellforsch**, v. 139, p. 69-81, 1973.

BOR-SENG-SHU, E.; CHADI, G.; BOR-JIUN-SHU, F.; FERRAZ-DE-CARVALHO, C. A.; DE SOUZA, R. R. Myenteric neurons of the mouse small intestine. Morphometry and acetylcholinesterase activity. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 101-108, 1994.

BROOKS, J.; HAMMOND, J. S. Nonverbal communication: role of the speech pathologist on the burn team. **J. Burn Care Rehabil.**, v. 7, n. 1, p. 42-44, 1986.

BULT, H.; BOECKXSTAENS, G. E.; PELCKMANS, P. A; JORDANS, F. H.; VAN MAERCKE, Y. M.; HERMAN, A. G. Nitric oxide as na inhibitor nan-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. **Nature**, v. 345, p. 345-347, 1990.

BURKS, T. F. Neurotransmitters. In: JOHNSON, L. R.; BARRET, K. E. **Physiology of the gastrointestinal tract**. New Yourk: Raven Press, 1994. p. 2211-2242.

CARRICO, C. J.; MEAKINS J. L.; MARSHALL, J. C. FRY, D.; MAIER R., V. Multiple-organ-failure syndrome. **Arch Surg**, v. 121, n. 2, p. 196-208, 1986.

CASTELUCCI, P.; DE SOUZA, R. R.; ANGELIS, R. C.; FURNESS, J. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pre- and posnatal protein deprivation and posnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. **Cell Tissue Res.**, v. 310, p. 1-7, 2002.

CHAKDER, S.; BANDYOPADHYAY, A.; RATTAN, S. Neuronal NOS gene expression in gastrointestinal myenteric neurons and smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. 1868-1875, 1997.

CHUNG, D. H.; EVERS, B. M.; TOWNSEND JR, C. M.; HUANG, K. F.; SHIMODA, I.; HERNDON, D. N.; THOMPSON, J. C. Burn-induced transcriptional regulation og small intestinal ornithine decarboxylase. **Am. J. Surg.**, v. 163, n. 1, p. 157-162, 1992.

CLOWERS, G. H. A.; GEORGE, B. A.; VILLEE, C. A.; SAVARIS, C. A. Muscle proteolysis induced by circulating peptide in patients with sepsis and trauma. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, p. 545-552, 1983.

CORMACK, D. H. **Ham histologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

COSTA, M.; BUFFA, R.; FURNESS, J. B.; SOLCIA, E. Immunohistochemical localization of polypeptides in pheripheral autonomic nerves using whole mount preparations. **Histochemistry**, v. 65, p. 157-165, 1980.

COSTA, M.; FURNESS, J. B.; PULLIN, C. O.; BORNSTEIN, J. Substance P enteric neurons mediate non-cholinergic transmission to the circular muscle of the guinea-pig intestine. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 328, p. 446-453, 1985.

CRAFT, B.; KAGAN, R. J. Current management of burns. **Med. Update Psychiatr.**, v. 3, n. 2, p. 53-57, 1998.

CURRIERI, P. W.; LUTERMAN, A. Burns. In: SHWARTZ, S. I.; BRUNICADI, C. F.; BILLIAR, T. R.; BRANDT, M. L.; DUNN, D. L., HUNTER, J. G.; POLLOCK, R. E. **Schwartz SI. Principles of Surgery**. 8. ed. New York: Mc Graw-Hill, 1986. p. 302.

DAVIS, K. A.; MASELLA, J.; BLENNERHASSETT, M. G. Acetylcholine metabolism in the inflamed rat intestine. **Exp. Neurol.**, v. 152, p. 251-258, 1998.

DE SOUZA, D. A.; MARCHEASM, W. G.; GREENE, L. J. Epidemiological date and mortality rate of patients hospitalized with burns in brazil. **Burns**, v. 24, n. 5, p. 433-438, 1998.

DE SOUZA, R. R.; MANÇO, A. R. X.; MARCHESAN, W. G.; GREENE, L. J. Epidemiológica date of patients hospitalized with burns and other traumas in some cities in the southeast of Brazil from 1991 to 1997. **Burns**, v. 28, n. 2, p. 107-114, 2002.

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

DEFANI, M. A.; ZANONI, J. N.; NATALI, M. R. M.; BAZOTTE, R. B.; MIRANDA-NETO, M. H. Effect of Acetyl-L-carnitine on VIP-ergic neurons in the jejunum submucous plexus of diabetic rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 61, n. 4, p. 962-967, 2003.

DEITCH, E. A.; RUTAN, R.; WAYMACK, J. Trauma, shock, and gut translocation. **New Horiz.**, v. 4, p. 289-299, 1996.

DOOD, J.; ROLE, L. W. The autonomic nervous system. In: KANDEL, E. R. **Principles of neural science**. 3 ed. New York: Elsevier, 1991.

DOWNEY, R. S.; MONAFO, W. W.; KARL, I. E.; MATTHEWS, D. E.; BIER, D. M. Protein dynamics in skeletal muscle after trauma: local and systemic effects. **Surgery**, v. 99, n. 3, p. 265-273, 1986.

DUPONT, J. R.; JERVIS, H. R.; SPRINZ, H. Auerbach's plexus of the rat cecum in relation to the germfree state. **J. Comp. Neurol.**, v. 125, p. 11-18, 1965.

ERHART, E. **A neuroanatomia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1974.

FABRICIUS, M.; RUBIN, I.; BUNDGAARD, M.; LAURITZEN, M. NOS activity in brain and endothelium: relation to hypercapnic rise of cerebral blood flow in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. H2035-2044, 1996.

FANG, C. H.; JAMES, H. J.; OGLE, C.; FISCHER, J. E.; HASSELGREN, P. O. Influence of burn injury on protein metabolism different types of skeletal muscle and the role of glucocorticoids. **J. Am. Coll. Surg.**, v. 180, p. 33-42, 1995.

FELDBERG, W.; LIN, R. Acetylcholine release and synthesis the wall of the small intestine. **J. Physiol. Lond.**, v. 109, p. 3-4, 1949.

FINE, J.; FRANK, E.; HERBERT, R.; RUTENBERG, S.; SCHWEINBURG, F. The bacterial factor in traumatic shock. **N. Engl. J. Med.**, v. 260, p. 214, 1959.

FREGONESI, C. E. P. T.; MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L.; ZANONI, J. N. Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach rats with streptozotocin-induced diabetes. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 59, n. 1, p. 50-53, 2001.

FREGONESI, C. E. P. T.; MOLINARI, S. L.; ALVES, A. M. P.; DEFANI, M. A.; ZANONI, J. N.; BAZOTTE, R. B.; MIRANDA-NETO, M. H. Morphoquantitative aspects of nitrgergic myoenteric neurons from the stomach of diabetic rats supplemented with acetyl-L-carnitine. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 34, p. 93-97, 2005.

FREIRAS, P.; NATALI, M. R. M.; PEREIRA, V. F.; MIRANDA-NETO, M. H.; ZANONI, J. N. Myenteric neurons and intestinal mucosa of diabetic rats after ascorbic acid supplementation. **W. J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 42, p. 6518-6524, 2008.

FRY, D. E. Multiple system organ failure. **Surg. Clin. North. Am.**, v. 68, p. 107-122, 1988.

FURLAN, M. M. D. P.; MOLINARI, S. L.; MIRANDA-NETO. Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 60, n. 3, p. 576-581, 2002.

FURNESS, J. B.; BORNSTEIN, J. C.; MURPHY, R.; POMPOLO, S. Roles of peptides in transmission in the enteric nervous system. **Trends Pharmac. Sci.**, v. 15, p. 66-71, 1992.

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

FURNESS, J. B.; LI, Z. S.; YOUNG, H. M.; FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of guinea-pig: a quantitative description. **Cell Tissue Res.**, v. 277, p. 139-149, 1994.

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

GABELLA, G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. **Experient**, v. 25, p. 218-219, 1969.

_____. Innervation of the gastrointestinal tract. **Intern. Rev. Cytol.**, v. 59, p. 129-193, 1979.

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

_____. Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract. In: JOHNSON, L. R. **Physiol. of the gastroint. tract**, v. 1, p. 751-793, 1994.

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

GALVANINI, P. A. **Efeitos da lesão térmica corporal na mucosa e nos componentes do plexo mioentérico do estômago de ratos**. 2008. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GAN, H. T.; CHEN, J. D. Z. Role of nitric oxide and prostaglandins in pathogenesis of delayed colonic transit after burn injury in rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 288, p. R1316-R1324, 2005.

GOMES, O. A.; DE SOUZA, R. R.; LIBERTI, E. A. A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. **Gerontology**, v. 43, n. 4, p. 210-217, 1997.

GOMES, O. A.; CASTELUCCI, P.; FONTES, R. B., V.; LIBERTI, E. A. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of

the rat small intestine: A quantitative morphological study. **Auton. Neurosci.**, v. 126, n. 127, p. 277-284, 2006.

GOSAIN, A. G.; GAMELLI, R. L. Role of the gastrointestinal tract in burn sepsis. **J. Burn Care Rehabil.**, v. 26, p. 85-91, 2005.

GROZDANOVIC, Z.; BAUMGARTEN, H. G.; BRUNING, G. Histochemistry of NADPH-diaphorase, a marker for neuronal nitric oxide synthase, in the peripheral autonomic nervous system of the mouse. **Neuroscience**, v. 48, p. 225-235, 1994.

GUNN, M. Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. **J. Anat.**, v. 102, p. 223-239, 1968.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HANSEN, M. B. The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. **Pharmacol. Toxicol.**, 92, p. 249-257, 2003.

HART, D. W.; WOLF, S. E.; CHINKES, D. L.; GORE, D. C.; MILCAK, R. P.; BEAUFORD, R. B.; OBENG, M. K.; LAL, S.; GOLD, W. F.; WOLF, R. R.; HERNDON, D. N. Determinants of skeletal muscle catabolism after severe burn. **Ann. Surg.**, v. 4, n. 232, p. 455-465, 2000a.

HART, D. W.; WOLF, S. E.; MCALK, R.; CHINKES, D. L.; RAMZY, P. I.; OBENG, M. K.; FERRANDO, A. A.; WOLF, R. R.; HERNDON, D. N. Persistence of muscle catabolism after severe burn. **Surgery**, v. 128, n. 2, p. 312-319, 2000b.

HEINICKE, E. A.; KIERNAN, J. A.; WISJSMAN, J. Specific, selective, and complete staining of neurons of the myenteric plexus, using Cuprolinic blue. **J. Neurosci. Methods**, v. 21, p. 45-54, 1987.

HERNANDES, L.; ZUCOLOTO, S.; ALVARES P. Effect of myenteric denervation on intestinal epithelium proliferation and migration of suckling and weanling rats. **Cell Prolif.**, v. 33, p. 127-138, 2000.

HERNDON, D. N.; WILMORE, D. W.; MASON, A. D. Development and analysis of a small animal model simulating the human post- burn hypermetabolic response. **J. Surg. Res.**, v. 25, p. 394-403, 1978.

HOBSON, A. R.; AZIZ, Q. Central nervous system processing of human visceral pain in health and disease. **News Physiol. Sci.**, v. 18, p. 109, 2003

IBEBUNJO, C.; MARTYN, J. A. J. Disparate dysfunction of skeletal muscles located near and distant from burn site in the rat. **Muscle Nerve**, v. 24, n.10, p.1283-94, 2001.

IRWIN, D. A. The anatomy of Auerbach's plexus. **Am. J. Anat.**, v. 49, p. 141-166, 1931.

IWANOW, I. F. Die sympatitischs innervation des verdaungstraktes einiger vogelarten. **Z. Mikrosk. Anat. Forsch.**, v. 22, p. 469-492, 1930.

JONES II, W. G.; MINEI, J. P.; BARBER, A. E.; RAYBURN, L. L.; FAHEY, T. J.; SHIRES III, G. T.; SHIRES, G. T. Bacterial translocation and intestinal atrophy after thermal injury and burn wound sepsis. **Ann. Surg.**, v. 211, n. 4, p. 399-405, 1990.

JONES, B. A.; GORE G. J. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. g1174-g1188, 1997.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KENAREN., v.; VANHATALOS, S.; KILUOTO, T.; KIVILAAKSO, E.; SOINILA, S. Co-localization of NADPH-diaphorase reactivity and vasoactive intestinal polypeptide in human colon. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 54, p. 177-183, 1995.

KIETZER, K. S. **Avaliação morfoquantitativa do plexo mioentérico do intestino grosso de ratos com tumor de Walker-256**. 2002. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

KLEIN, G. L.; HERNDON, D. N.; LAUGHMAN, C. B.; RUTAN, T. C; YOUNG, W. E.; PLEMBLETON, G. Long-term reduction in bone mass after severe burn injury in children. **J. Pediatr.**, v. 126, p. 252-256, 1995.

KOO, M. W. L.; OGLE, C. W.; CHO, C. H. The effect of cold-resistaint stress on gastric emptyng in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 23, p. 969-972, 1985.

LEVOYER, T.; CIOFFI, W. G. Jr.; SHIPPEE, R.; MCMANUS, W. F.; MASON, A. D. Jr.; PRUITT, B. A. Jr. Alterations in intestinal permeability after thermal injury. **Arch. Surg.**, v. 127, n. 1, p. 26-29, 1992.

LIMA, M. M. R. **Metabolismo de glutamina e glicose nas células da mucosa intestinal de ratos portadores do Tumor de Walker-256: comparação com o efeito da desnutrição**. 1999. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MACKLOUF, G.; GRIDER, J. R. Non-adrenergic non-colinergic inhibitory neurotransmitters of the gut. **News Physiol. Sci.**, v. 8, p. 195-199, 1993.

MAEJIMA, K.; SHIMODA, K.; BERG, R. D. Assessment of mouse on bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Jikken Doutsu.**, v. 33, n. 3, p. 345-349, 1984.

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

MAIFRINO, L. B.; PRATES, J. C.; DE SOUZA, R. R.; LIBERTI, E. A. Morphometry and acetylcholinesterase activity of the myenteric plexus of thje wild mouse *Calomys callosus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 5, p. 627-632, 1997.

MAREGA, P. **Características estruturais do plexo mioentérico do intestino delgado de ratos portadores do tumor de Walker-256: uma análise morfoquantitativa.** 2002. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MASON, A. D. Jr. Weight loss in burned patients. **J. Trauma**, v. 19, p. 903-904, 1979.

MATSUO, H. A contribution on the anatomy of Auerbach's plexus. **Jap. T. Med. Sci. Anat.**, v. 4, p. 417-428, 1934.

McALHANY, J. C. Jr.; CZAJA, A. J.; VILLARREAL, Y. PRUITT, B. A. Jr. The gastric mucosal barrier in thermally injured patients: correlation with gastroduodenal endoscopy. **Surg. Forum**, v. 25, p. 414-416, 1974.

McCLELLAND, D. B.; SAMSON, R. R. PARKIN, D. M.; SHEARMAN, D. J. Bacterial agglutination by secretory IgA from human gastrointestinal secretions and colostrum. **Gut**, v. 12, n. 10, p. 860, 1971.

MELLO, E., V. S.; MIRANDA NETO, M. H.; NATALI, M. R. M. Estudo da parede do colo proximal de ratos. **Unimar**, v. 18, n. 2, p. 369-386, 1996.

MELLO, S. T.; MIRANDA-NETO, M. H.; ZANONI, J. N.; FURLAN, M. M. D. P. Effects of insulin treatment on HuC/HuD, NADH diaphorase, and nNOS-positive myenteric neurons of the duodenum of adult rats with acute diabetes. **Dig. Dis. Sci.**, v. 54, p. 731-737, 2009.

MIRANDA NETO, M. H.; FURLAN, M. M. D. P.; SANT'ANA, D. M. G.; MOLINARI, S. L. Evaluation of the areas of neuronal cell bodies and nuclei in the myenteric plexus of the duodenum of adult rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 58, n. 2A, 2000.

MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L.; NATALI, M. R. M.; SANT'ANA, D. M. G. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 59, n. 1, p. 54-59, 2001.

MISAWA, R. **Estudo morfoquantitativo de neurônios entéricos do íleo imunorreativos ao receptor P2X₂, a calbindina, a calretinina, a colina acetil transferase e ao óxido nítrico de animais submetidos à desnutrição e a renutrição protéica.** 2007. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MOLINARI, S. L.; FERNANDES, C. A.; OLIVEIRA, L. R.; SANT'ANA, D. M. G.; MIRANDA-NETO, M. H. NADH-diaphorase positive myenteric neurons of the aglandular region of stomach of rats (*Rattus norvegicus*) subjected to desnutrition. **Rev. Chil. Anat.**, v. 20, n. 1, p. 19-23, 2002.

MOLINARI, S. L.; PEREIRA, M. S.; DE SOUZA, R. R.; MIRANDA NETO, M. H. Estudos morfológicos do plexo mioentérico do estômago glandular do pato (*Anas* sp.). **Unimar**, v. 16, n. 2, p. 419-426, 1994.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U. The use of the picosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 3, p. 1-11, 1991.

MORRIS, S. E.; NAVARATNAM, M.; TOWNSEND, C. M.; HERNDON, D. N. Bacterial translocation and mesenteric blood flow in a large animal model after cutaneous thermal and smoke inhalation injury. **Surg. Forum**, v. 39, p. 189-190, 1988.

MUHLBACHER, F.; KAPADIA, C. R.; COLPOYS, M. F.; SMITH, R. J.; WILMORE, D. W. Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 247, n. 1, p. E75-83, 1984.

NAKAJIMA, K.; TOOYAMA, I.; YASUHARA, O.; AIMI, Y.; KIMURA, H. Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase of a peripheral type (pChAT) in the enteric nervous system of rats. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 18, p. 31-40, 2000.

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

OLIVEIRA, L. R.; MOLINARI, S. L.; PEREIRA, M. A. S.; MIRANDA-NETO, M. H. SANT'ANA, D. M. G. Localização dos neurônios mioentéricos no estômago aglandular e glandular de ratos (*Rattus norvegicus*). **Arq. Cienc. Saúde Unipar**, v. 4, p. 215-220, 2000.

OLIVEIRA, F. **Características histoquímicas das fibras musculares do m. gastrocnêmio de ratos desnutridos submetidos à lesão térmica por escaldamento**. 2006. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

OSINSKI, M. A.; BASS, P. Chronic denervation of rat jejunum results in cholinergic supersensitivity due to reduction of cholinesterase activity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 266, p. 287-297, 1995.

PALMER, J. M.; KOCH, T. R. Altered neuropeptide content and cholinergic enzymatic activity in inflamed guinea pig jejunum during parasitism. **Neuropeptides**, v. 28, p. 287-297, 1995.

PAPE, H. C.; DWENGER, A.; REGEL, G.; AUF, M.; KOLCK, F.; GOLLUB, F.; WISNER, D.; STURM, J.A.; TSCHERNE, H. Increased gut permeability after multiple trauma. **Br. J. Surg.**, v. 81, p. 850-852, 1994.

PENG, X.; YAN, H.; YOU, Z.; WANG, P. WANG, S. Effects of enteral supplementation with glutamine granules on intestinal mucosal barrier function in severe burned patients. **Burns**, v. 30, p. 135-139, 2004.

PEREIRA, A. P. C. **Efeito da ingestão do ácido 2,4 diclorofenoxiacético sobre os neurônios mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*)**. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PEREIRA, R., V. F.; MIRANDA-NETO, M. H.; SOUZA, I. D. S.; ZANONI, J. N. Vitamin E supplementation in rats with experimental diabetes mellitus: analysis of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons from terminal ileum. **J. Mol. Hist.**, v. 39, p. 595–603, 2008.

PRUITT, B. A. Infection and burn patient. **Br. J. Surg.**, v. 77, n. 10, p. 1081-1082, 1990.

RAMZY, P. I.; WOLF, S. E.; IRTUN, O.; HART, D. W.; THOMPSON, J. C.; HERNDON, D. N. Gut epithelial apoptosis after severe burn: effects of gut hypoperfusion. **J. Am. Coll. Surg.**, v. 3, n. 190, p. 281-287, 2000.

ROMEIS, B. **Mikroskopische Technick**. 6. ed. München: Oldenbourg, 1968.

ROSSI, L. A.; BRAGA, E. C. F.; BARRUFFINI, R. C. P.; CARVALHO, E. C. Childhood burn injuries: circumstances of occurrences and their prevention in Riberão Preto, Brazil. **Burns**, v. 24, n. 5, p. 416-419, 1998.

RUSO, A. C. **Tratamento das queimaduras**. São Paulo, Sarvier, 1976.

RUTAN, R. L.; HERNDON, D. N. Growth delay in postburn pediatric patients. **Arch. Surg.**, v. 125, n. 3, p. 392-395, 1990.

SANT'ANA, D. M. G.; MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L.; SANT'ANA, M. A. Neuron number in the myenteric plexus of the ascending colon of rats; a comparative study using two staining techniques. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 55, p. 460-466, 1997a.

SANT'ANA, D. M. G.; MIRANDA-NETO, M. H.; SOUZA, R. R.; MOLINARI, S. L. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon of rats subjected to proteic desnutrition. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 55, p. 687-695, 1997b.

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

SANTER, R. M. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 49, p. 115-121, 1994.

SANTER, R. M.; CONBOY, V. B. Prenatal undernutrition permanently decreases enteric neuron number and sympathetic innervation of Auerbach's plexus in the rat. **J. Anat.**, v. 168, p. 57-62, 1990.

SAYDJARI, R.; DEETHUIZEN, G. I.; TOWNSEND, C. M. Jr. Bacterial translocation and its relationship to visceral blood flow, gut mucosal ornithine decarboxylase activity, and DNA in pigs. **J. Trauma**, v. 31, p. 639-644, 1991.

SCHERER-SINGLER, U.; VINCENT, S. R.; KIMURA, H.; McGEER, E. G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. **J. Neurosci. Method.**, v. 9, n. 3, p. 229-234, 1983.

SCHWEINBURG, F.B.; SELIGMAN, A.M.; FINE, J. Transmural migration of intestinal bacteria; a study based on the use of radioactive Escherichia coli. **N. Engl. J. Med.**, v. 11, n. 242, p. 747-751, 1950. Suppl. 19.

SEAVITT, S. Duodenal and gastric ulceration after burnes. **Br. J. Surg.**, v. 57, p. 32-41, 1967.

SHIMAMURA, K.; FUJISAWA, A.; TODA, N.; SUNANO, S. Effects of N^G-nitro-Larginine on electrical and mechanical responses to stimulation of non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory nerves in circular muscle of the gastric fundus. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 231, p. 103-202, 1993.

SILVA, J. M. **Efeito agudo e crônico da desnervação autonômica extrínseca na dinâmica celular do epitélio do intestino delgado de ratos Wistar.** 2003. 93 f. Tese (Doutorado em Biologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, São Paulo.

SOARES, A.; SCHOFFEN, J. P. F.; GOLVEIRA, E. M.; NATALI, M. R. M. Effects of the neonatal treatment with monosodium glutamate on myenteric neurons and the intestine wall in the ileum of rats. **J. Gastroenterol.**, v. 41, p. 674–680, 2006.

SORI, A.J.; RUSH, B.F.JR.; LYSZ, T.W.; SMITH, S.; MACHIEDO G.W. The gut as source of sepsis after hemorrhagic shock. **Am. J. Surg.**, v. 155, n. 2, p.187-192, 1988.

STARK, M. E.; SZURZEWSKI, J. H. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. **Gastroenterology**, v. 103, p. 1928-1949, 1992.

STERN, J. E. Nitric oxide and homeostatic control: an intercellular signaling molecule contributing to autonomic and neuroendocrine interaction?. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v. 2-3, p. 84-197, 2004.

STERNINI, C. Structural and chemical organization of the myenteric plexus. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 50, p. 81-93, 1988.

TOMS, C.; POWRIE, F. Control intestinal inflammation by regulatory T cells. **Microbes Infect.**, v. 3, p. 929-935, 2001.

TREDGET, E. E.; YU, Y. M. The metabolic effects of thermal injury. **World J. Surg.**, v. 16, p.175-182, 1999.

VAREDI, M.; CHINERY, R.; GREELEY Jr., G. H.; HERNDON, D. N.; ENGLANDER, E. W. Thermal injury effects on intestinal crypt cell proliferation and death are cell position dependent. **Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.**, v. 280, p. G157-G163, 2001.

WALKER, H. L.; MASON, J. A. D. A standard animal burn. **J. Trauma**, v. 8, p. 1049-1051, 1968.

WANG, Q. G.; HE, L. Y.; CHEN, Y. W.; HU, S. L. Enzymohistochemical study on burn effect on rat intestinal NOS. **W. J. Gastroenterol.**, v. 6, n. 3, p. 421-423, 2000.

WILMORE, D. W.; SMITH, R. J.; O'DWYER, S. T.; JACOBS, D. O.; ZIEGLER, T. R.; WANG, X. D. The gut: A central organ after surgical stress. **Surgery**, v. 104, n. 5, p. 917-923, 1988.

WOLF, S. E.; IKEDA, H.; MATIN, S.; DEBROY, M. A.; RAJARAMAN, S.; HERNDON, D. N.; THOMPSON, J. C. Cutaneous burn increases apoptosis in the gut epithelium of mice. **J. Am. Coll. Surg.**, v. 1, n. 188, p. 10-16, 1999.

WOODCOCK, N. P.; ROBERTSON, J.; MORGAN, D. R.; GREGG K. R.; MITCHELL C. J.; MACFIE J. Bacterial translocation and immunohistochemical measurement of gut immune function. **J. Clin. Pathol.**, v. 54, p. 619-623, 2001.

YOUNG, H. M.; FURNESS, J. B.; SEWELL, P.; BURCHER, E. F.; KANDIAH, C. J. Total numbers of neurons in myenteric ganglia of the guinea-pig small intestine. **Cell Tissue Res.**, v. 272, p. 197-200, 1993.

ZANIN, S. T. M.; MOLINARI, S. L.; SANT'ANA, D. M. G.; MIRANDA-NETO, M. H. Neurônios NADH-diaforase positivos do jejuno de ratos adultos (*Rattus norvegicus*) desnutridos. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 61, n. 3, p. 650-653, 2003.

ZANONI, J. N.; BUTTOW, N. C.; BAZOTTE, R. B.; MIRANDA NETO, M. H. Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid. **Aut. Neurosci.**, v. 104, p. 32-38, 2003.

ZHANG, C.; SHENG, Z. Y.; HU, S.; GAO, J. C.; YU, S.; LIU, S. The influence of apoptosis of mucosal epithelial cells on intestinal barrier integrity after scald in rats. **Burns**, v. 28, p. 731-737, 2002.

ZINNER, M. J.; TURTINEN, L.; GURLL, N. L. Stress ulceration and the gastric mucosal barrier. **Am Surg.**, v. 41, n. 4, p. 209-213, 1975.