

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**Efeitos da Desnervação Mientérica na População das
Células Intersticiais de Cajal no Cólon de Ratos**

Patrícia Modiano

Ribeirão Preto - 2004

Universidade de São Paulo

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Efeitos da Desnervação Mientérica na População das Células Intersticiais de Cajal no Cólon de Ratos

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia – Área de Concentração de Patologia Geral, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP – USP, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Sérgio Britto Garcia
Ribeirão Preto – SP
2004

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de Abreviaturas

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

1.2 Sistema Nervoso e Trato Gastrointestinal

1.3 Células de Cajal e Trato Gastrointestinal

2. JUSTIFICATIVA

3. OBJETIVOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

5. RESULTADOS

6. DISCUSSÃO

7. CONCLUSÕES

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. ANEXOS

Resumo

MODIANO, PATRÍCIA. **Efeitos da Desnervação Mientérica na População das Células Intersticiais de Cajal no Cólon de Ratos**. 2004. Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

Sabe-se que vários distúrbios da motilidade intestinal têm como substrato anátomo-patológico a presença de lesões ou ausência do plexo mientérico, associadas à diminuição da população das células intersticiais de Cajal que funcionam como marca-passo do peristaltismo intestinal. Não se sabe, no entanto, se a desnervação mientérica pode causar alterações na população das CIC.

O cólon descendente de ratos machos Wistar (com peso de aproximadamente 250g) foi tratado com a aplicação de uma solução de Cloreto de Benzalcônio a 0,3% na serosa por 30 minutos (Grupos CB) e os animais controles foram tratados com salina a 0,9% (Grupos C). Após o tratamento, os animais foram seguidos 2 dias, 7 dias, 15 dias e 60 dias. Depois destes períodos, os animais foram sacrificados. Dois segmentos foram removidos do cólon para processamento histológico e imunoistoquímico (c-kit), para a identificação das CIC. Em seguida foi realizada a contagem neuronal, a contagem de Células de Cajal e a morfometria das camadas musculares. Os seguintes resultados foram obtidos: houve redução significativa do número de neurônios do Plexo Mientérico dos segmentos tratados com Cloreto de Benzalcônio; houve uma redução do número de Células Intersticiais de Cajal e um significativo espessamento das camadas musculares comparadas ao grupos controle. Estes achados indicam que uma seletiva desnervação mientérica causada pelo Cloreto de Benzalcônio tem um importante papel na redução das Células de Cajal e no espessamento das camadas musculares colônicas.

Palavras-chave: desnervação mientérica, Células Intersticiais de Cajal, Cloreto de Benzalcônio

Abstract

MODIANO, PATRICIA. 2004. **Experimental denervation of the rat colon provides new evidence for a role of myenteric neurons on interstitial cells of Cajal maintenance or survival.** 2004 Dissertation to obtain Master degree in Experimental Pathology – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

Abstract. It is known that some intestinal motility disturbances have as anatomopathological substratum the presence of injuries or absence of myenteric plexus, associates to the reduction of the population of the interstitial cells of Cajal that function as pacemaker of the intestinal peristaltism. If it does not know, however, if the myenteric denervation can cause alterations in the population of the CIC.

The descending colon of male Wistar rats (average weigh 250g) was treated by a serosal application of a 0.3% solution of benzalkonium chloride (BAC) for 30 min. Control animals were treated with 0.9% saline. The rats were allocated to two groups: Group CC (n=8) in which the descending colon was treated with physiological saline and Group CB (n=8) in which the descending colon was treated with BAC. After treatment, the animals were followed 48 hours, 7, 15 and 75 days. At the end of experiment, the animals were sacrificed. Three segments were removed from the descending colon for neuronal counting, cells of Cajal counting and muscle layers thickness measurements. The following results were obtained: there was a significant reduction in neuron number in the myenteric plexus of segments treated with BAC. In these denervated segments, a remarkable reduction in the number of ICCs and a significant thickening of the muscle layers were observed when compared with the control group segments. The present findings indicate that selective myenteric neuronal denervation caused by benzalkonium

chloride plays a role in the reduction in the cells of Cajal and in thickening of intestinal muscle layers.

Key-words: myenteric denervation, Interstitial Cells of Cajal, Benzalkonium Chloride

Lista de Abreviaturas

CB	Cloreto de Benzalcônio
C	Controle
CIC	Células Intersticiais de Cajal
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SCF	Fator de Células Fonte
TNF-alfa	Fator de Necrose Tumoral alfa
IL 1	Interleucina 1
IL 8	Interleucina 8
TNF	Fator de Necrose Tumoral
min	Minutos
cm	Centímetros
H&E	Hematoxilina-Eosina
mm	milímetros
mM	Mili Molar

1. Introdução

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O controle do sistema nervoso do tubo digestivo (intrínscico) é exercido pelo sistema nervoso autônomo (SNA) ou extrínscico. A inervação intrínscica é feita pelo sistema nervoso entérico (SNE), o qual pode ser definido como um sistema de neurônios e suas células de suporte que são encontradas no interior da parede do tubo digestivo. Este sistema exibe uma complexidade que não é encontrada em nenhuma outra parte do sistema nervoso fora do sistema nervoso central, possuindo conexões com gânglios simpáticos pré-vertebrais, com gânglios sensoriais e com o sistema nervoso central. (FURNESS e COSTA, 1987).

Anatomicamente o SNE é constituído principalmente pelos plexos submucoso (de Meissner) e mientérico (de Auerbach), os quais são interligados por feixes nervosos e contínuos ao longo de todo o tubo digestivo. O plexo mientérico constitui-se de uma rede de fibras nervosas e pequenos gânglios que se localizam no plano entre as camadas musculares externas (longitudinal) e interna (circular) e inerva predominantemente a camada muscular da parede gastrointestinal. (FURNESS e COSTA, 1980). Entretanto foi demonstrado através de estudos farmacológicos que o plexo submucoso também participa da inervação da camada muscular interna. (HERMAN e BASS, 1990; SANDERS e SMITH, 1986).

O SNE foi descrito como sendo o “cérebro no intestino”, o qual coordena e regula a função gastrointestinal (JOHNSON, 1987; RAMALHO et al, 1993). Suas características fazem-no bastante similar ao cérebro, incluindo organização compacta de elementos gliais e neurais, ausência de colágeno, espaço extracelular restrito e neurotransmissores

comuns. Composto por vários subtipos neuronais distintos, possui aproximadamente o mesmo número de neurônios presente na medula espinhal.

Algumas desordens, especificamente degeneração e redução do número de neurônios intrínsecos, afetam a atividade normal do órgão envolvido, como observado em constipação, Doença de Hirschprung's, Aganglionose Congênita, megaesôfago e megacólon causado por lesões do SNE (HOWARD e NIXON, 1968; KÖBERLE, 1963).

AS Células Intersticiais de Cajal (CIC) estão intimamente relacionadas anatômica e funcionalmente ao SNE (NEWGREEN, 2002). Vários estudos sugerem que a diferenciação das CIC é dependente do SNE. Interessantemente, a redução no número de CIC foi observada em associação com várias doenças que são conhecidas por serem causadas por anormalidades do SNE.

Embora estudos morfológicos mostrem íntima associação entre neurônios entéricos e CIC, as consequências da desnervação entérica para as CIC não são descritas. Além do mais não existe na literatura o porquê as CIC são perdidas nos tecidos humanos em uma variedade de condições patológicas. O entendimento do papel das CIC nas doenças tem sido prejudicado porque inexistente um bom modelo experimental para a ablação das CIC. O único modelo experimental existente para a perda das CIC resulta do bloqueio da sinalização Kit (TORIHASHI, 1995; MAEDA, 1992) e este pode ou não sustentar alguma relação com a perda patológica das CIC. Foi postulado que estudos adicionais caracterizando a vulnerabilidade das CIC para uma variedade de estímulos são necessários para o entendimento do porquê CIC são negativamente afetadas em várias condições fisiopatológicas. CIC expressam o proto-oncogene c-kit e isto permite sua seletiva coloração pela imunistoquímica (WARD et al, 1994).

1.2. SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO E TRATO GASTROINTESTINAL

A desnervação intrínseca química do intestino é um modelo experimental utilizado para muitos propósitos e induz algumas características do Megacólon Chagásico. Este método consiste na aplicação tópica do Cloreto de Benzalcônio (CB). O CB é um surfactante comumente usado em antissepsia cirúrgica, soluções oftálmicas, componentes nebulizadores e *sprays* nasais. Este é um detergente catiônico na qual a estrutura ativa é responsável por sua rápida incorporação em membranas lipídicas celulares (GABELLA, 1989).

SATO et al. (1978) e SAKATA et al. (1979) demonstraram que a exposição da serosa do reto e cólon de rato a uma solução de Cloreto de Benzalcônio (CB) destruía os gânglios do plexo mioentérico, não afetando o número de neurônios do plexo submucoso. A partir de então, diversos trabalhos foram realizados com o objetivo de estudar propriedades mecânicas da musculatura desnervada, hiperplasia epitelial, atividade mioelétrica e proliferação da musculatura própria do intestino desnervado (RAMALHO et al, 1994).

SATO et al. (1978) demonstraram que o seletivo dano neuronal por CB foi devido a sua carga positiva. Eles sustentaram que a membrana do nervo é mais negativa do que a membrana muscular e assim as fibras nervosas estariam mais suscetíveis ao dano pelo agente catiônico. Entretanto, segundo os mesmos autores, evidências suportam a noção de que a neurotoxicidade entérica induzida por surfactantes pode estar atribuída mais às propriedades gerais dos surfactantes do que a carga especificamente. SAKATA

et al. (1979) sugeriram que CB tem um efeito prejudicial às membranas celulares causando sua despolarização ou prejudicando o transporte ativo do sódio. Uma vez que a carga negativa é conhecida por ser mais alta no tecido nervoso do que em outros tecidos como a musculatura lisa, este mecanismo pode explicar a seletiva desnervação ocorrida. Sabe-se que uma breve exposição da serosa do intestino de vários surfactantes pode levar à um dano irreversível e morte (FOX, MILLES e BASS, 1983).

Estudos confirmaram que baixas concentrações de CB não danificam a muscular lisa intestinal, enquanto maiores concentrações de CB rompem as camadas musculares e causam inflamação e perfuração intestinal (FOX et al 1983). Respostas inflamatórias são freqüentemente vistas após procedimentos de aplicação deste agente com numerosas células mononucleares nas camadas musculares e submucosa da parede intestinal (HADZIJAHCIC et al 1993).

FOX & BASS (1984) estudaram a atividade mioelétrica das áreas tratadas com CB e concluíram que a destruição dos neurônios mientéricos por surfactantes no jejuno de rato rompe o ritmo elétrico básico, mas não a propagação do Complexo Mioelétrico. Isso prova que neurônios mientérico tem um papel modulador na geração e propagação do ritmo elétrico básico. Fatores humorais como a motilina assim como outros neurônios submucosos podem ser mais importantes do que os neurônios mientéricos no controle no complexo mioelétrico.

Segundo SEE et al. (1988), após 24 h da aplicação do CB, total destruição da muscular longitudinal e destruição parcial da circular estava evidente. O plexo mioentérico também estava necrótico; no entanto; o plexo submucoso permaneceu intacto. 48 h após o tratamento, as células musculares lisas permanecentes na camada muscular circular começaram a se dividir como indicado pela presença de figuras mitóticas e incorporação de timidina H³. A repopulação da camada muscular longitudinal

começou neste período, aparentemente como resultado da migração das células atingindo a camada muscular circular. Cinco dias após tratamento, ambas camadas musculares tinham regenerado para seus estados originais. O plexo mientérico estava totalmente ausente. As células musculares da musculatura desnervada procederam a divisão até aproximadamente 15 dias, resultando em hiperplasia em ambas camadas musculares. Entre 15 e 105 dias, o número de células musculares na camada circular progressivamente declinou, eventualmente retornando ao valor visto no tecido controle. Em contraste, o número de células musculares da camada longitudinal permaneceu elevada pelo período do estudo (165 dias). SEE et al (1988) demonstraram que a aplicação de CB na superfície serosa do jejuno induz modificações em vários tempos após tratamento com o surfactante. Dentro de 12 h, CB tinha causado disrupção das camadas musculares lisas e do plexo mioentérico. Os neurônios sobreviventes estavam provavelmente danificados e não podiam ser exatamente identificados pela coloração de azul de toluidina. ZUCOLOTO et al(1997) observaram que a maior parte da muscular própria tornou-se necrótica após tratamento com CB, mas este processo foi seguido pela regeneração de ambas camadas musculares, a qual tornou-se mais espessa 10, 45, e 120 dias depois do tratamento.

MAGDALENA et al. (1990) descreveram detalhadamente as alterações provocadas pelo CB em tecidos. Observaram estes autores que uma parte da molécula do CB interage com proteínas da membrana de maneira específica. Na pele, a aplicação de CB induz ativação das células de Langhans e mastócitos. Além do mais, promove ativação de lipo-oxigenases e síntese e secreção de eicosanóides. Afetam a expressão dos genes das citocinas promovendo ativação, e secreção de mediadores inflamatórios e de muitas citocinas, como a Interleucina 1 (IL1), Fator de Necrose Tumoral e Interleucina 8 (IL8), resultando em irritação, hipersensibilidade retardada e reações alérgicas. Estes

autores demonstraram também efeitos nocivos de baixas concentrações de CB nas homeostases celulares. Observaram que em uma hora, a aplicação de soluções de CB variando de 0.0013% para 0.007% em células epiteliais da córnea in vitro é capaz de produzir uma diminuição de 50% na viabilidade celular, um aumento de 70% na concentração de cálcio intracelular e uma significativa diminuição de pH intracelular. Observaram também estes autores que os efeitos do CB à concentrações de 0.01% a 0.0001% foram progressivos e retardados, e a viabilidade e proliferação celular foram alterados em curso de tempo dependente da droga, mais rapidamente para 0.01% e mais gradualmente para concentrações menores ou equivalentes a 0.005%. As análises morfológicas mostraram estruturas celulares intactas com diminuído volume celular e nuclear, condensação de cromatina e uma alta expressão do marcador apoptótico Apo 2.7. Assim a toxicidade de CB foi protelada e prolongada, provavelmente pela incorporação e persistência das moléculas de CB em membranas celulares, onde somente pequena fração da população total de células entrou em processo apoptótico, com completa fragmentação de DNA, dificultando sua detecção pela eletroforese ou citometria. Estudando este modelo, observaram que após curta aplicação (10 min) de 0.1% e 0.05% de CB, a viabilidade de células tratadas rapidamente decresceu entre t inicial e meia hora depois do tratamento. As células mostraram características de abundante lise imediata, com fragmentação da membrana e um baixo volume celular. Os contínuos traços gordurosos vistos em eletroforese confirmaram a característica necrótica nas alterações celulares.

Sabe-se que a aplicação de CB na serosa do cólon de ratos resulta em aumento na espessura das camadas musculares circular e longitudinal e do epitélio da mucosa (OLIVEIRA et al. 1990). O aumento da espessura é devido primariamente a um aumento no número de células musculares lisas (hiperplasia). Pouca hipertrofia celular foi

observada. ZUCOLOTO et al.(1991) mostraram que a área muscular lisa jejunal dos segmentos estava marcadamente espessada 15, 30, 45 e 60 dias após tratamento com CB. Trabalhando com jejuno desnervado, SEE et al. (1988) encontraram hiperplasia muscular que pode ser explicada pelo aumento da demanda funcional, pois a musculatura lisa desnervada é sobrecarregada.

SEE et al. (1992) demonstraram um aumento de peso da mucosa intestinal, vilos maiores e criptas mais profundas 15 e 45 dias após o tratamento com CB. Hiperplasia na muscular longitudinal e circular foram encontradas em segmentos com CB. HOLLE (1991) relatou que CB causou hiperplasia e hipertrofia dos vilos e criptas ocupando 80-95% da área total da cripta, acelerada migração de células epiteliais da cripta para os vilos e hiperplasia da camada muscular.

RAMALHO et al. (1993) mostraram uma significativa redução do número de neurônios mioentéricos em todos os segmentos jejunais tratados com CB. Houve uma desnervação de 25% imediatamente após tratamento. Não houve uma diferença entre os números de neurônios contados 6, 12, 18 e 24 h após tratamento com CB, correspondendo uma desnervação de 96% em relação aos controles.

RAMALHO et al. (1994) observaram que a aplicação da solução de CB no jejuno resultou em intensa desnervação do plexo mioentérico em todos os fragmentos tratados. O grau de desnervação variou em função do tempo decorrido após o tratamento. Após o período de exposição da serosa (30 minutos), já se verificava desnervação de 25% em relação ao controle. Decorridas 6 h após a aplicação de CB, não mais se observou aumento do grau de desnervação, o qual permaneceu em torno de 97% em relação ao controle. Possivelmente, a lesão neuronal ocorreu, na grande maioria das células, ainda durante a exposição à droga, mas a afinidade pelo corante persistiu até a instalação de alterações degenerativas ou necrose celular. Isso favorece a hipótese de que a atividade

desnervante do CB está limitada a sua ação detergente sobre a membrana celular, estando a desnervação restrita à região de contato CB-bicamada fosfolipídica da membrana. Houve um significativo aumento no número de neurônios no grupo cronicamente desnervado (30 e 60 dias pós-tratamento) em relação ao grupo agudamente desnervado (1 e 10 dias pós-tratamento). Fenômenos de neuroplasticidade podem ser responsáveis por este acréscimo “crônico” de neurônios no segmento jejunal desnervado.

RAMALHO et al. (1994) observaram que o aumento da espessura da musculatura própria jejunal não se distribui igualmente em suas duas camadas longitudinal e circular. Enquanto nos grupos controle (30 e 60 dias), a musculatura circular foi significativamente mais espessa que a longitudinal, no segmento tratado com CB (60 dias) não mais se verificou esta diferença, demonstrando um espessamento da camada muscular longitudinal em relação à circular aos 60 dias .

ZUCOLOTO et al. (1997) sustentaram resultados que indicam que a aplicação de 2mM de solução de CB no cólon descendente reduziu o número de neurônios do plexo mioentérico 10, 45 e 120 dias após tratamento em comparação com os grupos controle após o tratamento com CB.

RAMALHO et al. (1993) sugerem que após desnervação com CB ocorra o mecanismo de neuroplasticidade na fase crônica após a cirurgia. Estes autores observaram que 24 horas após a aplicação do CB no jejuno de ratos houve uma diminuição de 96% do número de neurônios e após 60 dias a desnervação foi de 68%. Contudo este estudo foi realizado em cortes histológicos corados com azul de cuprilínico e não em preparados totais, pois a separação das camadas das paredes tornou-se difícil devido a reação inflamatória. Estes estudos podem ter sido provocados devido ao

estado de degeneração em que se encontrava o tecido, não permitindo a coloração de todas as células nervosas.

Outros estudos no intestino delgado comprovaram que devido à plasticidade neuronal ocorre um aumento de fibras imunoreativas na camada muscular 45 dias após a desnervação, sendo algumas fibras destas originadas do plexo submucoso (LUCK et al, 1993).

HANANI et al, 2003 estudando a regeneração dos plexos mioentérico na serosa de cólon de rato pela aplicação de cloreto de Benzalcônio, observaram que do 7º ao 60º dia, as fibras nervosas regeneraram-se e reinervaram a muscular. É provável que os neurônios mioentéricos sobreviventes sofreram variações tróficas que capacitaram-se restaurar, no mínimo parcialmente, a inervação da região afetada.

Trinta e sessenta dias após a aplicação do CB, a maioria das regiões desnervadas continham fibras nervosas. Entretanto, a densidade das fibras na área desnervada não havia retornado aos níveis controle ainda no 60 dia. O padrão de inervação muscular foi totalmente similar a do tecido normal. Observação na microscopia eletrônica mostrou que, primeiramente, as fibras nervosas crescendo novamente tinham pequenas porções dilatadas em vez de porções expandidas típicas, e poucas vesículas sinápticas espalhadas ou em porções axonais dilatadas ou não-dilatadas. Ao 30º dia, elas tornaram-se dilatações típicas, onde acumulavam vesículas sinápticas. Este relato indica que as fibras nervosas crescendo, primariamente são pouco diferenciadas e tornam-se gradualmente capazes de transportar e liberar vesículas sinápticas. Estes presentes resultados fornecem grande sustentação para a plasticidade dos nervos mientéricos. (HANANI et al, 2003).

O SNE, devido a facilidade de acesso quando comparado ao sistema nervoso central, tem sido objeto de estudo no mecanismo de plasticidade neuronal. A

neuroplasticidade é um fenômeno geral que indica a capacidade dos neurônios de poderem modificar-se de maneira mais durável frente a diversos fatores, tais como tolerância às drogas, prolongamentos de terminações axonais após lesões cerebrais, indução enzimática e eventos como a facilitação e a depleção sinápticas (SQUIRE, 1987). Alguns trabalhos visam estudar os papéis do SNE no controle de diversas funções e os mecanismos de adaptação a situações adversas, como os observadores nas doenças degenerativas neuronais (LINCOLN et al, 1984; QUALMAN et al, 1984; ROHRMANN et al, 1984; KNUSEL et al, 1990; JOST & SCHIMRIGK, 1993; SHANKLE et al, 1993).

Estas doenças podem induzir o megacólon que se caracteriza por uma dilatação e hipertrofia de parte do segmento cólico ou do cólon como um todo, ocorrendo na ausência de uma lesão obstrutiva (ADAMSON et al, 1932). As anormalidades do Sistema Nervoso Entérico, ou seja, degeneração e redução dos neurônios intrínsecos são considerados elementos essenciais na patogênese das doenças gastrointestinais. (HAGGER et al; 2000). O megacólon pode ser congênito ou adquirido. O primeiro é caracterizado por agenesia do plexo mientérico e é chamada de doença de Hirschprung (HOWARD & NIXON, 1968). No Brasil o megacólon adquirido mais importante é o de etiologia chagásica (KÖBERLE, 1963; MARTINS CAMPOS & TAFURI, 1973).

O modelo pode ser obtido experimentalmente através da aplicação tópica na serosa do cólon de um agente tensoativo catiônico como o cloreto de benzalcônio (CB), que provoca a desnervação mioentérica, semelhante ao megacólon chagásico (FERNANDES et al, 1991; OLIVEIRA et al, 1990).

As fibras nervosas do plexo entérico são conhecidas por conterem muitas substâncias ativas biologicamente (FEHÉR e PENZES L, 1987), no qual podem estar potencialmente relacionadas com a patogênese do megacólon. (OLIVEIRA et al, 1990).

Deve ser enfatizado que cloreto de benzalcônio destrói não somente os neurônios, mas também as fibras nervosas. (SAKATA et al, 1979).

O exato mecanismo que causa certos tipos de lesões que pode ocorrer primariamente nas porções terminais do trato gastrointestinal é desconhecido. Uma interessante, mas improvável hipótese é que os conteúdos semi-sólidos destes segmentos representam uma sobrecarga mecânica que pode também contribuir para o desenvolvimento desta síndrome. (OLIVEIRA et al, 1990).

Exames histológicos de rotina de megacólon experimental revelam hipertrofia das camadas musculares juntamente com a da mucosa e com uma indistinta reação inflamatória e/ou fibrose. (OLIVEIRA et al, 1990).

Podemos enfatizar que o método de desnervação do plexo mioentérico é potencialmente útil para obter o melhor entendimento dos processos patológicos provocados pelo mal funcionamento de alguns segmentos do trato digestivo como a cardia e o piloro. (OLIVEIRA et al., 1990).

Do mesmo modo que a ablação seletiva dos neurônios mioentéricos pode estar relacionada com a patogenia do megacólon, as Células de Cajal podem estar envolvidas com a fisiopatologia de doenças intestinais, como a Estenose Pilórica Hipertrofica Infantil (YAMATAKA et al, 1996; VANDERWINDEN et al, 1996), Doença de Hirschsprung's (YAMATAKA et al, 1995) e Pseudo-obstrução Intestinal Idiopática Crônica (ISOZAKI et al, 1997).

1.2 CÉLULAS DE CAJAL E TRATO GASTROINTESTINAL

No Século passado, Ramon y Cajal descreveu pequenas células estreladas ou fusiformes com núcleos proeminentes e processos varicosos que formavam redes no tecidos do trato gastrointestinal (CAJAL, 1893; 1911; TORIHASHI et al, 1997). Cajal considerou estas células um tipo especial de neurônio (CAJAL, 1911), mas Táxi (TÁXI, 1952; 1965) posteriormente concluiu que as células de Cajal nem são neurônios e nem células de Schwann. Cajal pode observar compostos de células enterogliais e processos neuronais, mas as células semelhantes a fibroblastos, de origem mesenquimal (YOUNG et al, 1996), encontradas em algumas regiões e descritas por TAXI (1965), STACH (1972), RUMENSEN e THUNEBERG (1982), e CHRISTENSEN, RICK e SOLL (1987b) constituem a única classe de células que é atualmente referida como Células Intersticiais de Cajal (CIC).

O exato papel das CIC permanece incerto, mas três funções são sugeridas para estas células: (1) CIC podem ser células marcapasso (THUNEBERG, 1982); (2) agirem como intermediários neurais (DANIEL e POSEY-DANIEL, 1984; DANIEL e BEREZIN, 1992); (3) CIC podem coordenar a atividade da musculatura lisa (FARRAWAY, BALL e HUIZINGA, 1995).

Alguns autores sugerem que as CIC podem também ser mecanorreceptores, (THUNEBERG, 1992; FAUSSONE-PELLEGRINI, 1977, 1992), mas esta hipótese tem recebido pouca atenção. Com os avanços nas técnicas é possível agora explorar os papéis funcionais das CIC, e começar a entender as importantes contribuições destas células para a motilidade do TGI.

As CIC existem em inúmeras espécies estudadas, incluindo cão (CHRISTENSEN e RICK, 1987a; WARD, KELLER e SANDERS, 1991), gato (CHRISTENSEN e RICK, 1987a), camundongo (FAUSSONE-PELLEGRINI, 1985), rato (STACH, 1972), coelho (CHRISTENSEN e RICK, 1987a) e humanos (CHRISTENSEN e RICK, 1987a). Em algumas espécies existem diferenças em termos de número e densidade de CIC (CHRISTENSEN e RICK, 1987a). As CIC podem estar localizadas (1) entre as camadas musculares longitudinal e circular e definidas como CIC associadas com o Plexo Mientérico; (2) entre a camada mais interna e a camada mais externa da muscular circular do intestino delgado e definidas como CIC do Plexo Muscular Profundo; (3) entre a muscular circular e a submucosa do cólon e definidas como CIC do Plexo Submuscular e (4) localizadas nas próprias camadas musculares; na muscular longitudinal e na muscular circular na qual são juntas referidas como CIC Intramuscular (SANDERS, 1996).

As CIC contém filamentos contráteis e são ricas em organelas citoplasmáticas que podem promover espontânea atividade elétrica. THUNEBERG (1982), também discutiu similaridades nas características ultraestruturais de células musculares lisas e CIC.

IMAIZUMI e HAMA (1969) descreveram junções gap entre CIC e células musculares lisas e que estas Células de Cajal estavam intimamente associadas com células nervosas, assim fornecendo uma descrição inicial dos meios pelas quais os impulsos neurais podem ser transmitidos para as células musculares lisas (FAUSSONE-PELLEGRINI, CORTESINI E ROMAGNOLI, 1977). Da mesma maneira, THUNEBERG (1982), sugeriu que estas estruturas podem fornecer os meios para condução.

Na década de 70, vários laboratórios notaram a grande ligação entre a produção de energia e a atividade elétrica nos músculos do TGI (JOB, 1971; CONNOR, 1979). A

abundância de mitocôndrias em muitos tipos de CIC pode fornecer energia para muitas células ativas. (THUNEBERG, 1982).

As células de Cajal expressam c-kit e dependem do produto do seu gene, Kit, um receptor tirosina-quinase necessário para o desenvolvimento e manutenção do fenótipo (TORIHASHI et al, 1997; KLUPPEL et al, 1998). Kit é uma proteína transmembrana com uma região receptora extracelular e um domínio tirosina-quinase intracelular. A ligação de Kit ao Fator de Células Fonte (FCF), o ligante natural para Kit, ocorre a ativação da tirosina-quinase, causando autofosforilação de Kit que liga e ativa várias moléculas sinalizadoras secundárias (FANTL, JONHSON e WILLIANS, 1993).

Em trabalho realizado por MAEDA et al, 1992, tratamento de ratos neonatais com anticorpos neutralizantes para a proteína Kit, mostrou alterações na motilidade intestinal e não exibiu as contrações fásicas e regulares que são observadas em animais não tratados. Além disso, o intestino destes animais apresentou poucas Células de Cajal imunoreativas ao c-kit (TORIHASHI et al, 1995). Estudos com ratos W/W^v , no qual apresentam uma mutação que reduz, mas não interrompe o receptor de atividade da tirosina quinase de c-kit, sugerem o papel de CIC na geração do ritmo intestinal. O intestino de W/W^v possuem poucas CIC a nível do Plexo Mientérico, faltam contrações fásicas, e faltam as “ondas lentas”, eventos elétricos que modulam a ocorrência das contrações fásicas (MAEDA et al, 1992; WARD et al, 1994; HUIZINGA et al, 1995).

Em estudo recente, foi observado que no megacólon Chagásico, ocorre uma redução na densidade das Células de Cajal no plano muscular e que estas células estão ausentes na região submucosa, ambas regiões onde a atividade marcapasso ocorre. A deficiência das Células Intersticiais de Cajal no megacólon Chagásico deve contribuir para a motilidade anormal observada na patologia. (HAGGER et al, 2000).

Imunoistoquímica utilizando anticorpo c-kit revelou células expressando c-kit em Megacólon Chagásico, e estas foram principalmente mastócitos na qual estão distribuídas através da parede intestinal. No Megacólon Chagásico, nenhuma célula de Cajal pôde ser identificada em três seções teciduais. Em outras três seções, CIC estavam deficientes no plano intermuscular. A densidade de CIC estava muito reduzido em comparação ao tecido colônico normal na camada muscular longitudinal, plano intermuscular e camada muscular circular. Nenhuma CIC foi identificada na borda submucosa da camada muscular circular em Megacólon Chagásico. Reatividade a c-kit estava presente em seções teciduais de pacientes com Doença de Chagas, mas esta foi exclusivamente devido aos mastócitos, no qual estão presentes na mucosa, lâmina própria e muscular própria (HAGGER et al, 2000)

Alterações provocadas pela inflamação na rede das células de Cajal no intestino delgado associado com o Plexo de Auerbach leva a uma desorganização dos padrões motores. Devido a grande correlação temporal entre o dano à rede das Células de Cajal, desacoplamento elétrico, aparecimento de uma atividade marcapasso ectópica e a ocorrência de peristalse retrógrada, pode-se concluir que as Células de Cajal tem um papel importante nos distúrbios motores induzidos pela inflamação (DER et al, 2000).

Como resultado, o trânsito dos conteúdos no intestino proximal afetado é retardado. Conseqüentemente, a rede de Células de Cajal da musculatura é um alvo significativo primariamente dos processos inflamatórios da mucosa. RUMESSEN e THUNEBERG (1982) mostraram previamente as alterações ultraestruturais nas Células de Cajal na Colite Ulcerativa. Este relato, evidencia um papel importante para as Células de Cajal na fisiopatologia das alterações motoras nas doenças inflamatórias do intestino (DER et al, 2000).

Como visto, sabe-se que vários distúrbios da motilidade intestinal têm como substrato anátomo-patológico a presença de lesões ou ausência do plexo mientérico. Em muitos destes distúrbios existem associações com a diminuição da população das Células Intersticiais de Cajal. Não se sabe, no entanto, se a desnervação mientérica pode causar alterações na população das CIC, ou se a coexistência de alterações de plexo mientérico e de CiC ocorre como coincidência.

Este estudo foi designado para certificar as consequências da desnervação mientérica na distribuição e morfologia das CIC. Esperançosamente, este trabalho pode fornecer um útil modelo experimental para estudar a complexa relação entre CIC e SNE.

2. Justificativa

A literatura não define se a diminuição do número de células de Cajal em diversas doenças que se caracterizam por lesões de plexo mientérico ocorre como consequência ou coincidência. Este aspecto é importante para a elucidação da fisiopatologia destas doenças.

3. Objetivos

3.1 Avaliar as células neuronais e a morfometria da muscular do cólon descendente após diferentes períodos de desnervação neuronal gástrica.

3.2 Verificar se ocorrem alterações nas células de Cajal após a desnervação do cólon pelo CB.

4. Material e Métodos

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o experimento, foram utilizados 48 ratos machos, da linhagem Wistar, pesando cerca de 250 g, proveniente do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). Estes animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos experimentais: C – grupo controle de animais (n=6); CB 48h – composto de 6 animais que receberam CB e foram sacrificados 48h após aplicação; CB 7 dias – composto de 6 animais que receberam CB e foram sacrificados 7 dias após a aplicação; CB 15 dias - composto de 6 animais que receberam CB e foram sacrificados 15 dias após a aplicação e um grupo CB 60 dias – composto de 6 animais que receberam CB e foram sacrificados 60 dias após a aplicação.

Tempo de sacrifício após a cirurgia	Grupo CB	Grupo controle
48h	CB 1 (n=6)	C 1 (n=6)
7 dias	CB 2 (n=6)	C 2 (n=6)
15 dias	CB 3 (n=6)	C 3 (n=6)
60 dias	CB 4 (n=6)	C 4 (n=6)

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com o anestésico 2,2,3-Tribromoetanol GoldLab). Em seguida, os animais foram submetidos a uma laparotomia da linha média, com 3cm de extensão. Isolou-se um segmento do cólon distal de aproximadamente 4cm com o auxílio de pinças e uma gaze umedecida com uma solução de Cloreto de Benzalcônio (CB) (Sigma) a 0,3% (v/V) por 30 minutos, ou com soro fisiológico 0,9% para o grupo controle (Luck, WHITE e BASS, 1993). Após tal período,

toda a cavidade abdominal foi lavada com soro fisiológico 0,9%, para se evitar necrose em órgãos subjacentes, reconstruindo-se a parede abdominal em 2 planos (muscular e cutâneo). Após a cirurgia, os animais foram deixados em repouso, mantidos em gaiolas plásticas com 6 animais, em sala climatizada e luminosidade (ciclo de 12 horas-claro, 12 horas-escuro).

Os ratos foram sacrificados em câmara de CO₂ de acordo com o delineamento experimental, sendo os animais mortos submetidos imediatamente ao procedimento de laparotomia mediana, com cuidadoso isolamento e retirada do segmento colônico distal. A peça foi então aberta, sobreposta em tiras de papelão e fixada em formol tamponado.

Fragmentos de aproximadamente 2 cm de cólon distal foram incluídos em parafina e cortes longitudinais de 4µm de espessura foram realizados. Os cortes foram posteriormente corados com hematoxilina e eosina para a avaliação histopatológica e para a realização da análise morfométrica das camadas musculares.

Ilustração da Cirurgia dos Animais

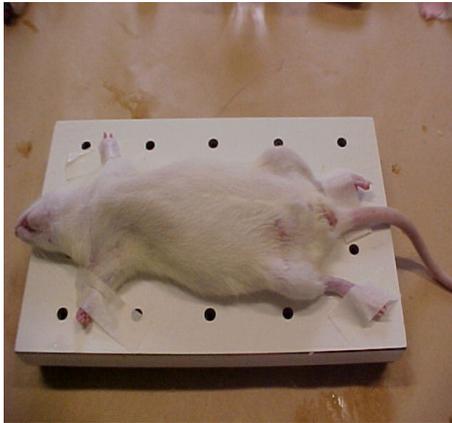


Fig. 1. Animal anestesiado com 2,2,3-Trimoetanol

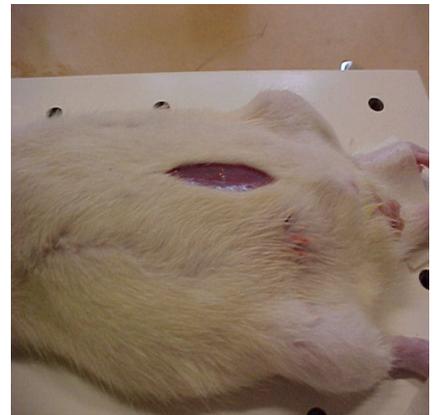


Fig.2. Laparotomia Mediana



Fig. 3. Animal fixado e com Laparotomia



Fig. 4. Isolamento do cólon com gaze



Fig. 5. Aplicação do Cloreto de Benzalcônio

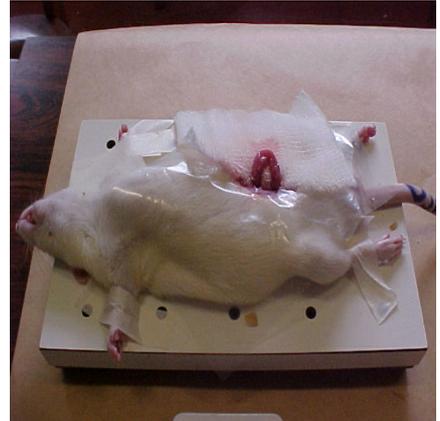


Fig. 6. Ação do Cloreto de Benzalcônio



Fig. 7. Sutura dos planos muscular e cutâneo

4.2 Avaliação Histopatológica

Cada peça foi cuidadosamente armazenada, fixadas em formol tamponado por 12 horas. O material foi então submetido a análise macrosópica e foram realizadas as colorações pela Hematoxilina (solução alcoólica de hematoxilina adicionada a alúmen de potássio e óxido de mercúrio vermelho) e Eosina (solução aquosa de stock de eosina y e floxina a 1% adicionada a ácido acético glacial e álcool a 95%) (HE) (MICHALANY, 1980) para a análise histopatológica e morfométrica da muscular.

4.3 Análise Morfométrica

A análise morfométrica foi realizada para determinar a distribuição e densidade das Células Intersticiais de Cajal positivas ao c-Kit em animais controle e tratados. As diferentes subpopulações das CIC descritas dentro do cólon foram divididas em três regiões anatômicas: (1) borda submucosa (BSM); (2) camada muscular circular (MC), que inclui a região do Plexo Mientérico; e a camada muscular longitudinal (ML). Em cada uma destas regiões, 20 áreas foram analisadas com a objetiva de 20x (TONG et al, 2004).

4.4 Avaliação das Células ganglionares mientérica e Células Intersticiais de Cajal

Todas as Células ganglionares mientéricas foram contadas, e o número de células ganglionares por mm de extensão do cólon foi determinado. No HE as células foram consideradas como ganglionares quando apresentaram grande núcleo vesicular com nucléolo proeminente ou abundante citoplasma granular eosinofílico.

A avaliação da densidade das CIC foi quantificada utilizando a quadranle-lattice settings lens. Em muitas regiões anatômicas três áreas selecionadas aleatoriamente no campo foram examinadas. O número de células coradas positivamente em cada área dentro do campo foi contada sob o aumento de 20 vezes. As contagens de cada área foram adicionados e o número médio foi calculado.

4.5 Imunoistoquímica

Para se avaliar o número de Células de Cajal existentes no cólon após a desnervação, foi utilizado o método imunohistoquímico anti-**C-kit**.

Foram selecionadas as lâminas coradas com H&E que tiveram os cortes mais expressivos da camada basal para imunohistoquímica. No total foram utilizados 24 animais do grupo controle, 6 animais do grupo de 48h, 6 animais do grupo de 7 dias, 6 animais para o grupo de 15 dias e 6 animais do grupo de 60 dias desnervados. Para a

realização da imunohistoquímica foram feitos cortes com 4µm de espessura utilizando o anticorpo anti-**C-kit** (Novocastra) .

Foram utilizados cortes emblocados em parafina, onde as lâminas foram desparafinizadas em três banhos de xilol cada uma por 15 minutos e logo em seguida passadas em três banhos, o primeiro de álcool absoluto, seguido de álcool 95% e 70% para retirar o excesso do xilol e hidratar. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e posteriormente mergulhadas em água destilada

Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica com calor, deixando em panela a vapor durante 40 minutos. Após resfriamento das lâminas, elas foram incubadas em água oxigenada por 20 minutos e lavadas 3 vezes em PBS. Em seguida as lâminas receberam soro normal de cavalo por 30 minutos e foram incubadas com anticorpos primários diluídos em PBS por 24 horas na câmara escura.

Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS para retirada do excesso do anticorpo primário, e incubadas com anticorpo secundário (Novocastra) por 1 hora a 37°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes no PBS e em seguida os cortes foram incubados na Streptovidina por 1 hora. Novamente lavadas 3 vezes em PBS , as lâminas receberam o DAB por 3 minutos para a revelação. Finalmente, foram lavadas em água corrente e contracoradas com Hematoxilina por 40 segundos.

4.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa GraphPad 4.0 (EUA). A verificação da distribuição normal das variáveis quantitativas foi feita pelo teste de D'Agostino and Pearson omnibus normality test. As variáveis contínuas que apresentaram distribuição normal foram expressas em média \pm desvio padrão. As variáveis que apresentaram distribuição normal e variância semelhante foram analisadas pelo teste "t" de student para comparação de dois grupos independentes. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

5. Resultados

5.1 Alterações macroscópicas

Dos 24 animais controles, todos apresentaram cólons macroscopicamente normais, com bolos fecais característicos.

Nos animais tratados com CB ocorreu dilatação do segmento com visível aumento na espessura da túnica muscular. Observou-se também um acúmulo de fezes no segmento tratado.

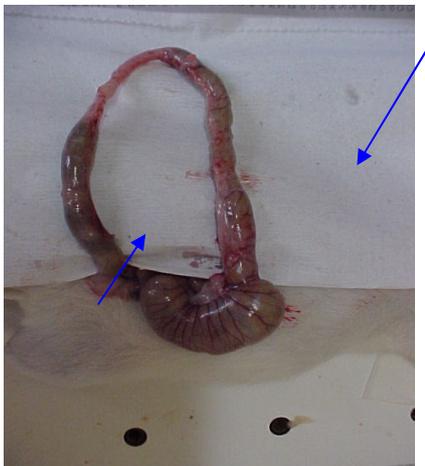


Fig 1. Megacólon em animal de tratado com CB 7 (dias)

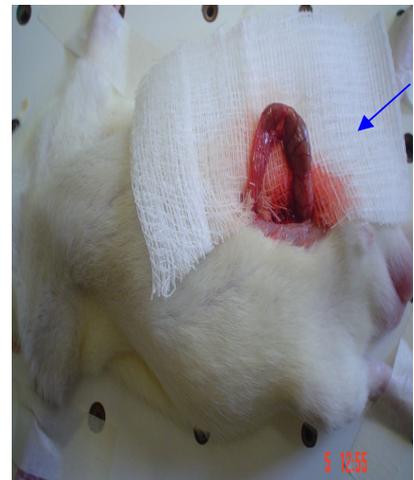


Fig.2. Cólon normal em animal controle

A taxa de mortalidade foi maior nos animais tratados com CB nos grupos de 15 e 60 dias. Nos animais controles e dos grupos de 2 e 7 dias a mortalidade foi pequena.

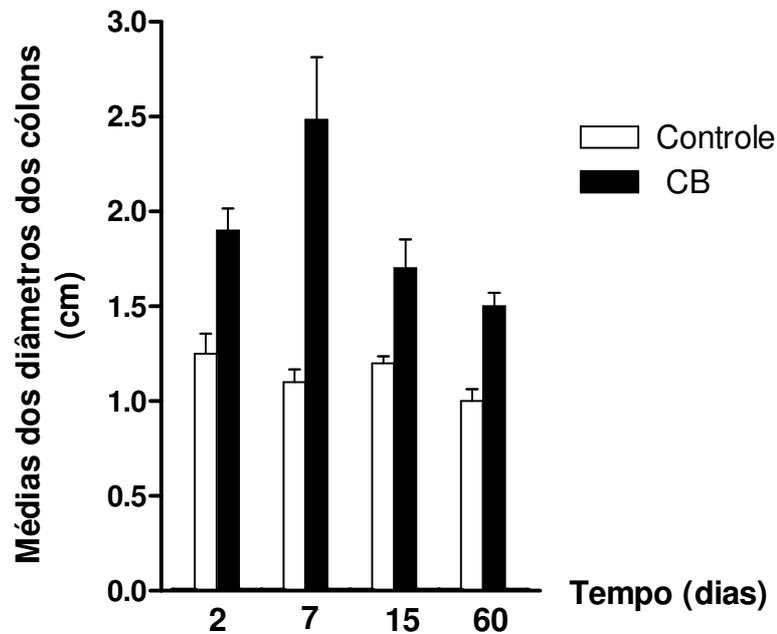
Tabela 1. Diâmetro médio dos cólons (cm)

	CB (n=6)	Controles (n=6)	p
grupo 2 dias	1.900±0.2828	1.250±0.2588	0.0137
grupo 7 dias	2.483±0.8085	1.100±0.1673	0.0060
grupo 15 dias	1.700±0.3742	1.200±0.08944	0.0105
grupo 60 dias	1.500±0.1789	1.000±0.1549	0.0005

* CB<C (p<0.05)

Houve uma diferença estaticamente significativa entre os grupos Controles e Tratados . Grupo de 2 dias (t de Student t=3.081; p=0.0137); Grupo de 7 dias (t de Student t=3.852; p=0.006); grupo de 15 dias (t de Student t=3.321; p=0.0105); e grupo de 60 dias (t de student t=6.847; p=0.0005).

Figura 1. Médias dos diâmetros dos cólons (cm)



5.2. Alterações microscópicas

5.2.a Análise Neuronal

Estimativa do número de neurônios

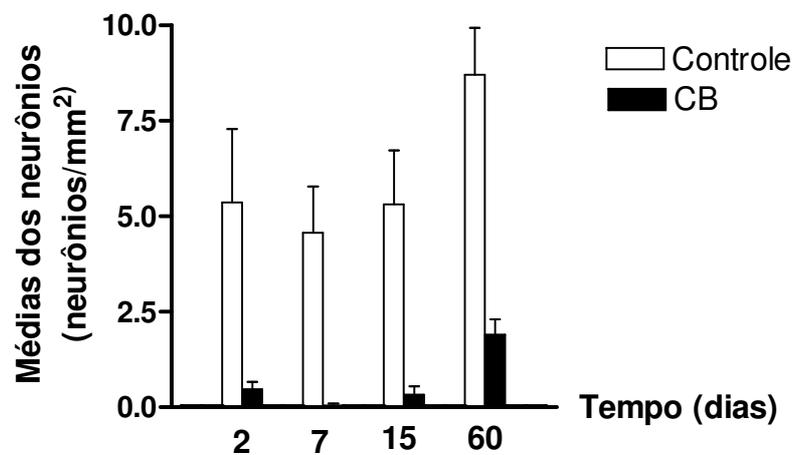
Houve redução significativa no número de neurônios nos grupos desnervados 2, 7 e 15 dias. A contagem neuronal através da técnica de rotina H&E demonstrou que a desnervação com CB reduziu o número de neurônios quando comparados aos respectivos grupos controles. No grupo desnervado crônico (60 dias), houve um significativo aumento no número de neurônios em relação ao grupo controle.

Tabela 2. Contagem Neuronal Mientérica (neurônio/mm²)

	CB (n=6)	Controles (n=6)	p
grupo 2 dias	4.7±0.49	5.4±0.47	0.036
grupo 7 dias	0.05±0.12	4.5±2.9	0.0065
grupo 15 dias	0.16±0.40	5.3±3.4	0.009
grupo 60 dias	1.900±0.9778	8.700±3.014	0.0027

* CB<C (p<0.05)

Houve uma diferença estatisticamente significante entre todos os grupos Controles e Tratados. Grupo de 2 dias (t de Student t=2.4; p=0.0326); grupo de 7 dias (t de Student t=3.774;p=0.0065); grupo de 15 dias (t de Student t=3.465;p=0.009); grupo de 60 dias (t de Student t=4.704;p=0.0027).

Figura 2. Médias dos neurônios (neurônio/mm²)

5.2.b Análise Morfométrica

Os animais tratados com CB apresentaram aumento na espessura da túnica muscular. Através da Técnica de rotina H&E, foi possível visualizar a hipertrofia das camadas musculares dos animais tratados com CB, diferentemente encontrada nos controles, onde a túnica muscular apresentou-se normal.

Não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupo controle e tratado pelo Cloreto de Benzalcônio no grupo de 2 dias (t de student $t=1.014$; $p=0.1786$). Nos demais grupos de 7, 15 e 60 dias, houve na estatística uma diferença

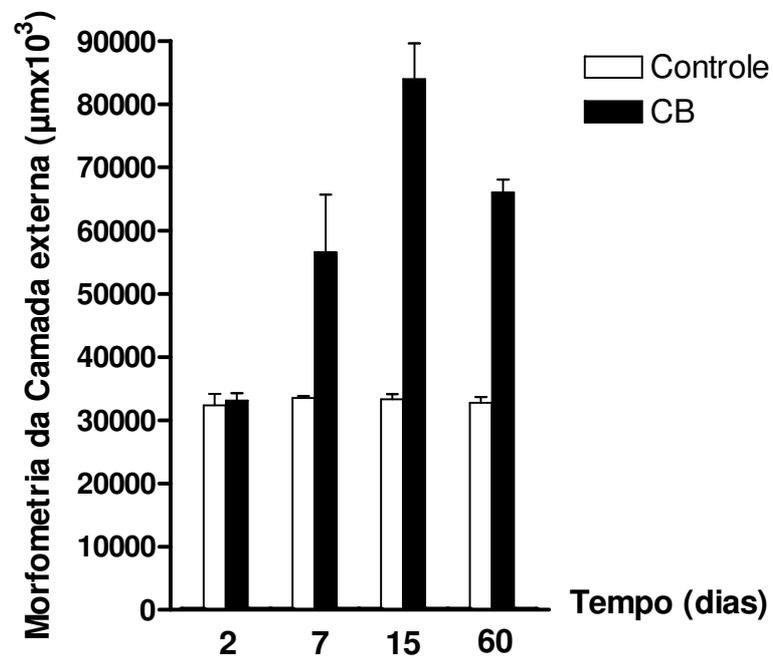
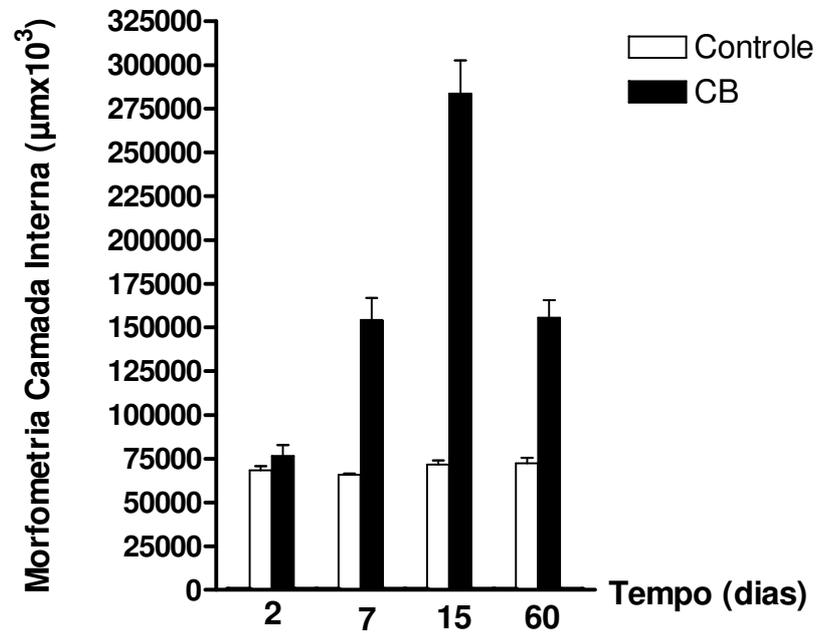
significante entre os grupos controles e tratados. Grupo de 7 dias (t de Student $t=4.589$; $p=0.0029$); no grupo de 15 dias (t de Student $t=12.81$; $p<0.0001$); e no grupo de 60 dias (t de Student $t=8.982$; $p=0.0001$).

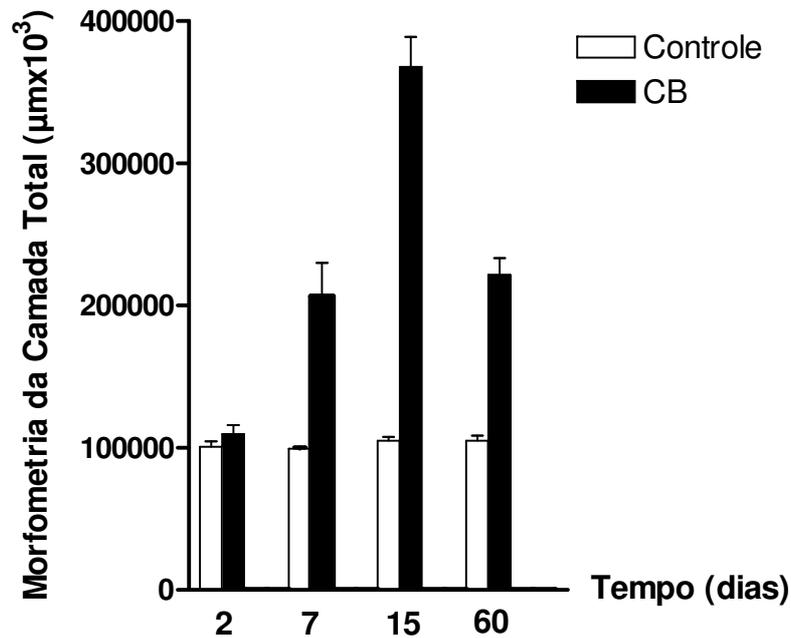
Tabela 3. Morfometria das Camadas Musculares do cólon

	CB (n=6)	Controles (n=6)	p
grupo 2 dias			
Camada interna	76.590±15.024	68.265±5.778	0.1542
Camada externa	33.115±2.844	32.375±4.351	0.3907
Camada total	109.705±15.499	100.640±9.694	0.1786
grupo 7 dias			
Camada interna	154.350±30.664	65.860±1.944	0.0004
Camada externa	56.61±22.31	33.49±0.8356	0.0245
Camada total	206.460±57.506	99.345±2.302	0.0029
grupo 15 dias			
Camada interna	283.605±46.316	71.595±5.821	$p<0.0001$
Camada externa	84.008±13787	33.300±1.986	0.0002
Camada total	367.780±51.620	104.985±7.151	$p<0.0001$
grupo 60 dias			
Camada interna	155.585±24.454	72.335±7.607	0.0003
Camada externa	66.045±4.902	32.745±2.302	$p<0.0001$
Camada total	221.630±28.891	105.080±8.954	0.0001

* CB<C ($p<0.05$)

Figura 3. Morfometria das Camadas Musculares





5.2.c. Análise das Células de Cajal

Estimativa do número das Células de Cajal

Através da técnica imunohistoquímica anti c-kit, foi possível visualizar uma redução na densidade das células de Cajal nos grupos desnervados em relação aos grupos controles.

Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados, exceto o grupo de 2 dias. Grupo de 2 dias (t de Student $t=0.2486$; $p=0.4068$); grupo de 7 dias (t de Student $t=4.024$; $p=0.0050$); grupo de 15 dias (t de Student $t=8.732$; $p=0.0002$) e grupo de 60 dias (t de Student $t=23.01$; $p<0.0001$).

Tabela 4. Densidade das Células de Cajal nas Camadas Musculares

2 dias	CB (n=6)	Controles (n=6)	p
Camada interna	0,1583±0,0813	0,170±0,0433	0.4011
Camada externa	0,4283±0,1876	0,3750±0,1218	0,3038
Camada total	0.2267±0.0776	0.2383±0.0566	0.4068
7 dias	CB (n=6)	Controles (n=6)	p
Camada interna	0,0700±0,03347	0,2300±0,08414	0,0072
Camada externa	0,2160±0,06269	0,3740±0,1067	0,0162
Camada total	0.103±0.037	0.278±0.084	0.0050
15 dias	CB (n=6)	Controle (n=6)	p
Camada interna	0,00800±0,01304	0,1900±0,05148	0,0008
Camada externa	0,0580±0,01304	0,4180±0,1173	0,0009
Camada total	0,0183±0,0132	0,278±0,0757	0,0002
60 dias	CB (n=6)	Controles (n=6)	p
Camada interna	0,001667±0,00408	0,2850±0,03209	P<0.0001
Camada externa	0,0560±0,0270	0,4600±0,1032	0,0002
Camada total	0,015±0,0104	0,335±0,0320	P<0.0001

* CB<C (p<0.05)

Figura 4. Densidade de Células de Cajal nas camadas musculares
(número de Células de Cajal por mm²)

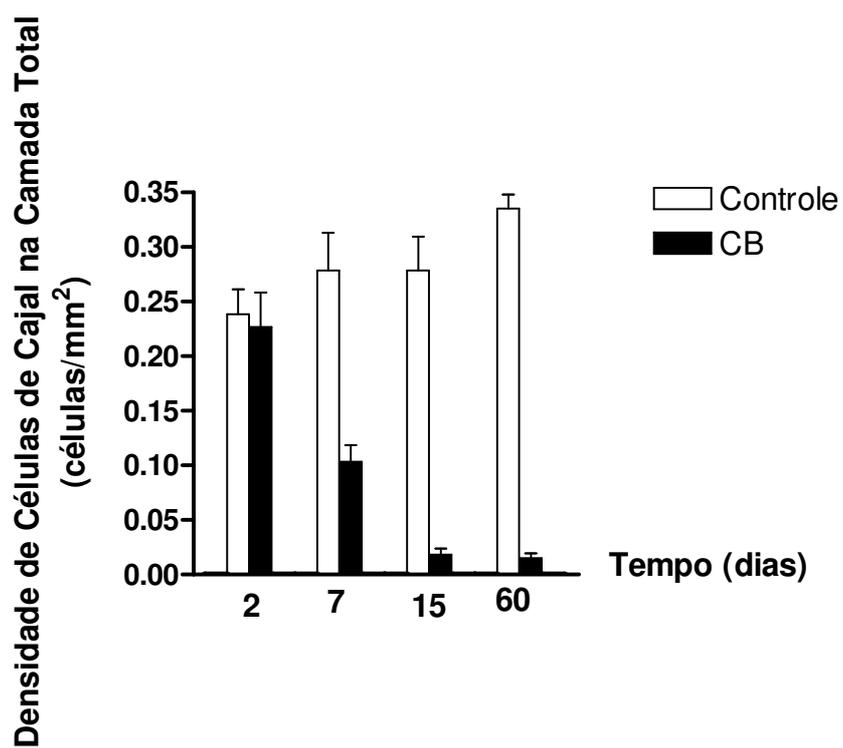
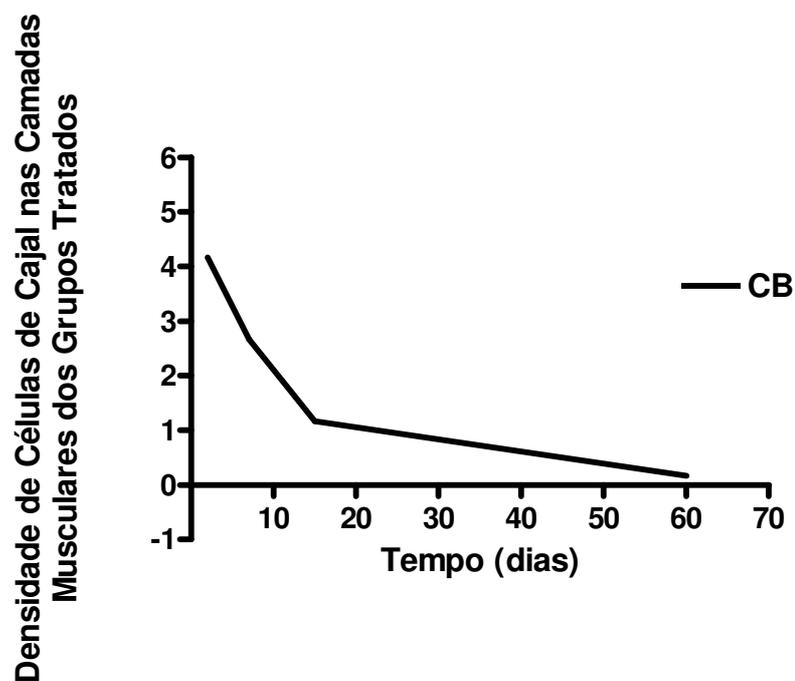


Fig. 5. Densidade de Células de Cajal nos grupos CB 2, 7,15 e 60 dias.



Houve uma redução estatisticamente significativa entre os grupos desnervados 2,7,15 e 60 dias, com $p < 0,0001$ e $F = 22,43$.



Fig. A. CIC circundando célula ganglionar mientérica em animal do grupo controle

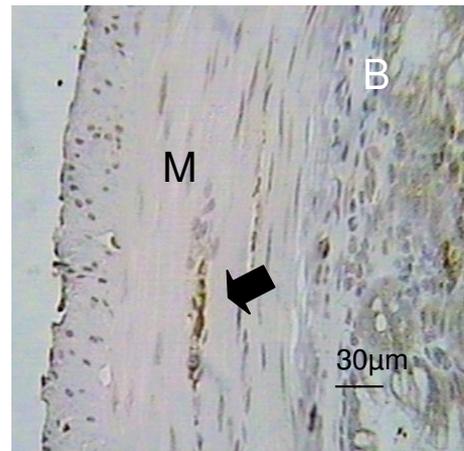


Fig. B. CIC na camada muscular interna do cólon em animal do grupo controle

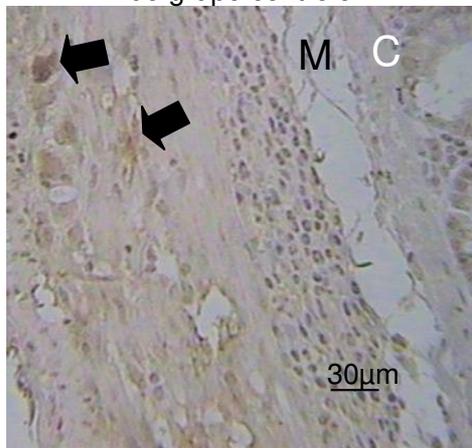


Fig. C. Necrose muscular com CIC fracamente marcadas em animal tratado com CB

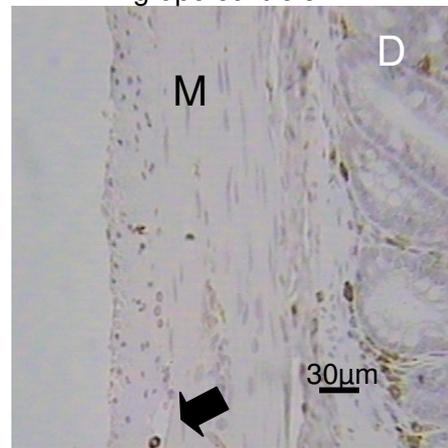


Fig. D. Núcleo picnótico de CIC de animal tratado com CB (7 dias)

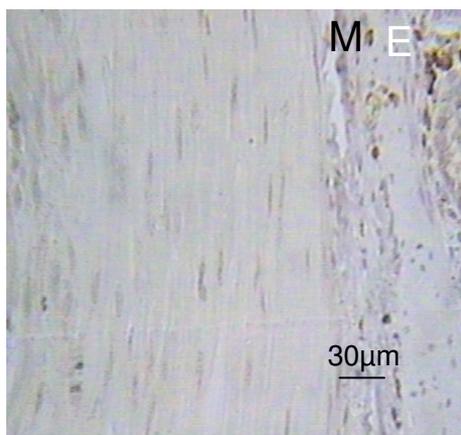


Fig. E. Ausência de CIC em animal tratado com CB (15 dias)

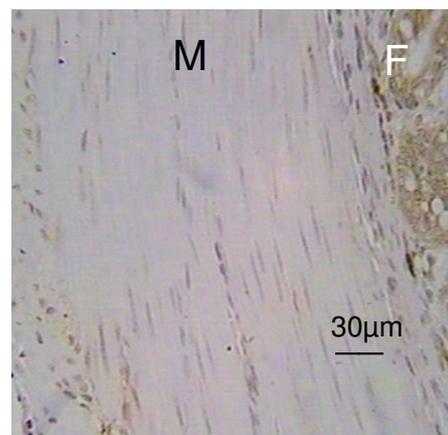


Fig. F. Ausência de CIC em animal tratado com CB (60 dias)

6. Discussão

Em nosso presente estudo a aplicação de 0,3% de CB significativamente reduziu o número de neurônios do Plexo Mientérico. Vários trabalhos têm demonstrado que a aplicação do CB na serosa intestinal provoca desnervação (SAKATA et al, 1979; FOX, MILLES e BASS, 1983; SEE et al, 1988, 1990; ZUCOLOTO et al, 1988, 1997; RAMALHO et al, 1993; CRACCO e FILOGAMO, 1997).

O número de neurônios no grupo desnervado cronicamente (60 dias após o tratamento) foi maior em comparação com os grupos desnervados de fase aguda (48h, 7 e 15 dias após o tratamento). Este fato está de acordo com os achados de RAMALHO et al, 1993, que propôs que o fenômeno de neuroplasticidade pode ser responsável pelo aumento crônico do número de neurônios no segmento jejunal desnervado.

Nossos resultados mostram que o espessamento da camada muscular foi aumentada nos grupos desnervados, como descrito por outros autores (ZUCOLOTO et al, 1997; HADJZIJAHIC et al, 1993). SAKATA et al, 1979 sugeriu que CB tem um efeito danoso à membrana celular, causando despolarização da membrana ou danificando o transporte ativo de sódio. Desde que a carga negativa é conhecida por ser maior no tecido nervoso do que em outros tecidos como a musculatura lisa, este pode explicar a ablação seletiva destas células. SEE et al, 1988 mostrou que a aplicação de Cloreto de Benzalcônio na serosa de jejuno induz alterações nos vários tempos após o tratamento com o detergente. Dentro de 12 horas, Cloreto de benzalcônio causou rompimento das camadas musculares e destruição do Plexo Mientérico. 24 horas após o tratamento, a camada muscular longitudinal e aproximadamente metade das células da camada muscular circular estavam em avançado estado de degeneração. Cinco dias após o tratamento com CB, ocorreu morte de células não específicas, resultando em uma seletiva ablação dos neurônios mientéricos. Isto foi devido ao fato de que o dano nas camadas

musculares foi reparável, mas o dano neuronal foi irreversível.

Foi proposto que o Cloreto de Benzalcônio provoca hiperplasia muscular, no qual pode ser explicada por um aumento na demanda funcional, sobrecarregando a musculatura lisa desnervada (SMITH, 1982; SEE et al, 1988). SEE et al, 1988 notou que uma hiperplasia não foi intensiva 120 dias após o tratamento com CB e este achado foi relacionado ao fenômeno de neuroplasticidade.

Finalmente, nós observamos uma marcante e contínua redução na densidade de Células de Cajal associadas a uma desnervação mientérica em todos os grupos experimentais. As Células de Cajal podem estar envolvidas com a fisiopatologia de alterações intestinais no qual apresentam um componente de dismotilidade. Anormalidades na distribuição foram relatadas em algumas alterações na motilidade intestinal assim como a Estenose Pilórica Hipertrófica Infantil (YAMATAKA, FUJIWARA e KATO, 1996; VANDERWINDEN, LIU e LAET, 1996), Doença de Hirschsprung's (YAMATAKA, KATO e TIBBOEL, 1995) e Pseudo-obstrução intestinal idiopática crônica (ISOZAKI, HIROTA e MIYAGAWA, 1997). Uma ausência ou deficiência de CIC em cólon Chagásico leva a uma atividade motora anormal nas camadas musculares levando ao desenvolvimento de megacólon e constipação (HAGGER et al, 2000).

De acordo com nossos achados não é possível explicar os mecanismos envolvidos na redução do número das CIC em relação a ablação dos Sistema Nervoso Entérico. Teoricamente, em nosso modelo experimental as CIC podem ter sofrido apoptose, necrose ou rediferenciação. Mais estudos serão necessários para investigar esta hipótese. TOHIIHASHI et al, 1999 observou que o bloqueio da sinalização Kit induz transdiferenciação das Células Intersticiais de Cajal para o fenótipo de célula muscular lisa. Estes autores observaram que, após o tratamento com anticorpo neutralizante, poucas células c-kit positivas foram observadas em regiões do intestino delgado e cólon

normamente populacionadas pelas CIC. Interessantemente, a morte celular, calculada pelo Método TUNEL para detectar produtos da apoptose, não pôde explicar a perda das Células positivas ao Kit. Estas observações sugerem que CIC podem rediferenciar-se quando a função Kit é perdida. Assim, o bloqueio de Kit causou a transformação de CIC para fenótipo de células musculares lisas. Alterações similares podem ocorrer em culturas no qual um apropriado microambiente para CIC não é reconstituído (SANDERS et al, 1999)

Mais estudos serão necessários para verificar se a rediferenciação das CIC em consequência da desnervação mientérica **possa** explicar nossos resultados.

Podemos sustentar em nosso modelo experimental que a redução da densidade das CIC pode ser devido a um processo inflamatório que foi observado principalmente nos animais sacrificados 2 e 7 dias após o tratamento. O processo inflamatório no qual destrói as células ganglionares pode afetar também CIC (HAGGER et al, 2000). Além do mais, foi relatado que CIC são danificadas e o número reduzido em modelos animais de inflamações (LU et al, 1997) Esta hipótese deve explicar o achado de que CIC estão marcadamente reduzidas em número nas camadas musculares longitudinal e circular, e que na ausência de CIC, elementos neurais estão presentes. Todavia, esta hipótese é enfraquecida pela observação de que o número de CIC está somente reduzido 15 dias após o tratamento, quando o processo inflamatório está reduzido ao mínimo. Além disso, CIC estão ainda reduzidas 60 dias após o tratamento e este período de resposta inflamatória não é mais observado.

Apesar de nossos resultados terem estabelecido uma relação entre a desnervação do SNE e a perda das CIC, certamente mais estudos serão necessários para refinar o entendimento dos mecanismos da relação e das possíveis consequências das fisiopatologias das disfunções intestinais. Este deve ser facilitado pelo novo modelo que

nós propusemos.

7. Conclusões

7.1 Ocorrem alterações nas Células de Cajal, de forma que os números destas células e sua densidade apresentaram-se reduzidas após a desnervação do cólon pelo Cloreto de Benzalcônio.

7.2 O cólon desnervado pelo CB apresenta megacólon em todos os períodos (2,7,15 e 60 dias) de desnervação mientérica.

7.3 As células neuronais apresentam-se muito reduzidas, juntamente com um nítido espessamento de suas camadas musculares após diferentes períodos de desnervação neuronal mientérica.

8. Referências Bibliográficas

ADAMSON WAD, AIRD I. Megacolon: evidence in favour of a neurogenic origin. **Br. J. Surg.**; Guilford, v.20, p.200-233, 1932.

CAJAL, S.R. Sur les ganglions et plexus nerveux de l'Intestin. **CR. Soc. Biol.**; Paris, v.45, p.217-223, 1893.

CAJAL, S.R. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Paris: Maloine, v.2, p.891-942, 1911.

CHRISTENSEN J; RICK, J.A. Intrinsic nerves in the mammalian colon: confirmation of a plexus at the circular muscle-submucosal interface. **J. Auton. Nerv. Syst.**; Amsterdam, v.21, p.223-231, 1987a.

CHRISTENSEN. J, RICK, G.A, SOLL DJ. Intramural nerves and interstitial cells revealed by the Champy-Maillet stain in the opossum esophagus. **J. Auton. Nerv. Syst.**; Amsterdam , v.19, p.137-151, 1987b.

CONNOR J. A. On exploring the basis for slow potential oscillations in the mammalian stomach and intestine. **J. Exp. Biol.**; London, v.81, p.153-173, 1979.

CRACCO, C; FILOGAMO, G. Neuronal and non-neuronal plasticity in the rat following myenteric denervation. **Adv. Exp. Med. Biol.**; New York, v.429, p.159-69, 1997.

DANIEL, E.E; POSEY-DANIEL, V. Neuromuscular structures in opossum esophagus: role of interstitial cells of Cajal. **Am. J. Physiol.**; Bethesda, v.246, p.G305-G315, 1984.

DANIEL, E.E; BEREZIN.I. Interstitial cells of Cajal: are they major players in control of gastrointestinal motility? **J. Gastrointest. Motil.**; v.4, p.1-24, 1992.

DER, TARA; BERCIK PREMYSIL, DONNELLY GRAEME; JACKSON TIM; BEREZIN, IRENE; COLLINS, STEPHEN M AND HUIZINGA, JAN D. Interstitial Cells Of cajal and

Inflammation-Induced Motor dysfunction in the Mouse Small Intestine. **Gastroenterology**; Philadelphia, v.119, p.1590-1599, 2000.

FANTL, W.J; JOHNSON, D.E, WILLIAMS, L.T. Signalling by receptor tyrosine kinases. **Annu. Rev. Biochem.**; Palo Alto, v.62, p.453-481, 1993.

FARRAWAY, L; BALL, A.K; HUIZINGA, J.D. Intercellular metabolic coupling in canine colon musculature. **Am. J. Physiol.**; Bethesda, v.286, p.C1492-C1502, 1995.

FAUSSONE-PELLEGRINI, M.S; CORTESINI C; ROMAGNOLI, P. Sull' ultrastruttura della tunica muscolare della porzione cardiaca dell' esofago e dello stomaco umano con particolare riferimento alle cosiddette cellule inerziali di Cajal. **Arch. Ital. Anat. Embriol.**; Firenze, v.82, p.157-177, 1977.

FAUSSONE-PELLEGRINI MS. Ultrastructural peculiarities of the inner portion of the circular layer of the colon. II. Research in the mouse. **Acta Anat.**; Basel, v.122, p.187-192, 1985.

FAUSSONE-PELLEGRINI, M.S. Histogenesis, structure, and relationships of interstitial cells of Cajal (ICC): from morphology to functional interpretation. **Eur. J. Morphol.**; Lisse, v.30, p.137-148, 1992.

FEHÉR E; PENZES L: Density of substance P, vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin-containing nerve fibers in the ageing small intestine of rats. **Gerontology**; Basel, v.33, p.341-348, 1987.

FERNANDES, M.I.M; ZUCOLOTO, S; COLLARES, E.F; FERRIOLI, F.F. Morphometric investigations of the colon mucosa in chronic *Trypanosoma cruzi* infected rats. **Virchows Arch. B. Cell. Pathol.**; v.60, p.119-122, 1991.

FOX, D.A.; MILES, L.E.; BASS, P. Surfactants selectively ablate enteric neurons of the rat jejunum. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**; Baltimore, v.227, p.538 – 544, 1983.

FOX, D.A.; BASS, P. Selective myenteric neuronal denervation of the jejunum – Differential Control of the propagation of migrating myoelectric complex and basic electric rhythm. **Gastroenterology**; Philadelphia, v.87, p.572-577, 1984.

FURNESS J.B, COSTA, M; BUFFA, R AND SAID S.I.M. Distribution of enteric nerve cell bodies and axons showing immunoreactivity for vasoactive intestinal polypeptide in the guinea-pig intestine. **Neuroscience**; Oxford, v.5, p.587-596, 1980.

FURNESS, J.B; COSTA, M. The enteric nervous system. Churchill Livingstone, New York, 1987.

GABELLA G: Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. **Gastroenterology**; Philadelphia, v.96, p.1487-1493, 1989.

HADZIJAHIC, N; RENEHAN, W.E; MA, K.C; ZHANG, X; FOGEL, R. Myenteric plexus destruction alters morphology of rat intestine. **Gastroenterology**; Philadelphia, v.4, p.1017 – 1028, 1993.

HAGGER, ROBERT, FINLAYSON, CAROLINE, KAHN, FIONA, OLIVEIRA R, CHIMELLI, LL, KUMAR, DEVINDER. A deficiency of interstitial cells of Cajal in Chagasic megacolon. **Journal of the Autonomic Nervous System**; Amsterdam, v.80; p.108-111, 2000.

HANANI, M; OREN LEDDER; VLADIMIR YUTKIN; RIBHI ABU-DALU; TIAN-YING HUANG; WOLFANG HÄRTIG; MARIA-GIUKIANA VANNUCHI AND MARIA FAUSSONE-PELLEGRINI. Regeneration of Myenteric Plexus in the Mouse colon after experimental Denervation with Benzalkonium Chloride. **The Journal of Comparative Neurology**; New York, v.462, p.315-327, 2003.

HERMAN JR, BASS P. Altered carbachol-induced contractile responses of rat jejunal smooth muscle following local myenteric plexus ablation. **Dig. Dis. Sci.**; New York, v.35,

p.1146-52, 1990.

HOLLE, G.E. Changes in the structure and regeneration mode of the rat small intestinal mucosa following benzalkonium chloride treatment. **Gastroenterology**; Philadelphia, v.101, p.1264-1273, 1991.

HOWARD, E.R; NIXON, H.H. Internal anal sphincter. Observations on development and mechanism of inhibitory responses in premature infants and children with Hirschprung's disease. **Arch. Dis. Child.**; v.43, p.569-578, 1968.

HUIZINGA, J.D; THUNEBERG, L; KLUPPEL, M; MALYSZ, J; MIKKELSEN, H.B; AND BERNSTEIN, A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. **Nature**; London, v.373, p.347-349, 1995.

IMAIZUMI M, HAMA K. An electron microscopic study on the interstitial cells of the gizzard in the love-bird (*Uroloncha domestica*). **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**; v.97, p.351-7, 1969.

ISOZAKI, K; HIROTA, S; MIYAGAWA, J.L. et al. Deficiency of c-kit⁺ cells in patientes with a myopathic form of chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction. **Am. J. Gastroenterol.**; New York, v.92, p.332-334, 1997.

JOB D.D. Effect of antibiotics and selective inhibitors of ATP on intestinal slow wavwe. **Am. J. Physiol.**; Bethesda, v.220, p.299-306, 1971.

JOHNSON, L.R. Physiology of the Gastrointestinal Tract, 2nd edn, Raven, New York, 1987

JOST, W.H; SCHIMRIGK, K. Cisapride treatment of constipation in Parkinson's disease. **Mov. Disorders**; New York, v.8, p.339-343, 1993.

KAYE, G.I; FENOGLIO, C.M; PASCAL, R.R. LANE, N. Comparative electron microscopic

features of normal, hiperplastic and adenomatous human colonic epithelium. **Gastroenterology**; Philadelphia, v.64, p.926:945, 1973.

KLUPPEL, M; HUIZINGA, J.D; MALYSZ, J; BERSTEIN, A. Development origin and kit-dependent development of the interstitial cells of Cajal in the mammalian small intestine. **Dev. Dyn.**; New York, v.211, p.60-71, 1998.

KNUSEL, B; JENDEN, D.J; LAURETZ, S.D. BOOTH, R.A; RICE, K.M; ROCH, M; WAITE, J.J. Global in vivo replacement of choline by N-aminodeanol. Testing a hypothesis about progressive degenerative dementia: I. Dynamics of choline replacement. **Pharmacol. Biochem. Behav.**; New York, v.37, p.799-809, 1990.

KÖBERLE, F. Enteromegaly and Cardiomegaly in Chaga's disease. **Gut**; London, v.4, p.399-405, 1963.

LINCOLN, J; BOKOR, J.T; CROWE, R. GRIFFITH, S.G; HAVEN, A.J; BURNSTOCK, G. Myenteric plexus in streptozotocin-treated rats. Neurochemical and histochemical evidence for diabetic neuropathy in the gut. **Gastroenterology**; Philadelphia, v.86, p.654-661, 1984.

LIU, L.W. C; LARS THUNEBERG, EDWIN E. DANIEL, AND JAN D. HUIZINGA. Selective accumulation of methylene blue by interstitial cells of Cajal in canine colon. **Am. J. Physiol.**; Bethesda, v.264, p.G64-G73; 1993.

LU, G; QIAN X; BEREZIN I; TELFORD, GL; HUIZINGA JD; SARNA, SK. Inflammation modulates in vitro colonic myoelectric and contractile activity and interstitial cells of Cajal. **Am. J. Physiol.**; Bethesda, v.G273, p.1233-45, 1997.

LUCK, M.S; WHITE, J.C; BASS, P. Gastrointestinal transit is not impaired by regional loss of myenteric neurons in rat jejunum. **Am. J. Physiol.**; Bethesda, v.265, p.G654-G659, 1993.

MAEDA, H; YAMAGATA, A; NISHIKAWA, S; YOSHINAGA, K; KOBAYASHI, S; NISHI, K; AND NISHIKAWA, S.I. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. **Development**; Cambridge, v.166, p.369-375, 1992.

MAGDALENA, J.S; BRIGNOLE, F; BRINGUIER, A. F; BAUCHET, A; FELDMAN, G; CHRISTOPHE, G.B. Effects of Benzalkonium Chloride on growth and survival of Chang Conjunctival cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**; Philadelphia, v.40, p.619-630, 1990.

MARTINS-CAMPOS, J.V; TAFURI, W.L. Chaga's enteropathy. **Gut**; London, v.14, p.910-919, 1973.

MENEZES, S; M. A. CAPPELA, AND L.R. CALDAS. Photodynamic action of methylene blue: repair and mutation in Escherichia coli. **J. Photochem. Photobiol. Biol.**; Lausanne, v.5, p.505-517, 1990.

MICHALANY, J. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica**. São Paulo: Pedagogia e Universitária

NEWGREEN, D, YOUNG, HM. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 2. **Pediatr. Dev. Pathol.**; v.5, p.329-49, 2002.

OLIVEIRA, J.S.M ; LLORACH – VELLUDO, M.A.S; SALE-NETO, V.N. Megacolon in rats . **Digestion**; Basel, v.45, p.166 – 171, 1990.

QUALMAN, S.J; HAUPT, H.M; YANG, P; HAMILTON, S.R. Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. **Gastroenterology**; Philadelphia, v.87, p.848-856, 1984.

RAMALHO, F.S. ; SANTOS , G.C. ; RAMLHO, L.N.Z. ; ZUCOLOTO, S. ; KAJIWARA, J.K.. Myenteric neuron number after acute and chronic denervation of the proximal jejunum induced by Benzalkonium chloride. **Neuroscience Letters**; Limerick, v.163, p.74 – 76, 1993.

RAMALHO, FERNANDO SILVA ; SANTOS, GILDA DA CUNHA ; RAMALHO, LEANDRA NÁIRA ZAMBELLI ; KAJIWARA, JOÃO KAZUYUKI E ZUCOLOTO, SÉRGIO. Dsnervação mioentérica jejunal induzida pelo cloreto de benzalcônio. **Arq.Gastroenterol.**; São Paulo, v.31, p.24-30, 1994.

ROHRMANN, C.A. JR; RICCI, M.T; KRISHNAMURTHY, S; SCHUFFLER, M.D. Radiologic and histologic differentiation of neuromuscular disorders of the gastrintestinal tract: visceral myopathies, visceral neuropathies and progressive systemic sclerosis. **Am. J. Roentgenol.**; v.143, p.993-941, 1984.

RUMESSEN J.J, THUNEBERG L. Plexus muscularis profundus and associated interstitial cells. I: Light microscopical studies of mouse small intestine. **Anat. Rec.**; New York, v.203, p.115-127, 1982.

SAKATA, K; KUNIEDA, T; FURUTA, T; SATO, A. Selective destruction of intestinal nervous elements by local application of benzalkonium chloride solution in the rat. **Experientia**; Basel, v.35, p.1611, 1979.

SANDERS KM, SMITH TK. Motoneurons of the submucous plexus regulate electrical activity of the circular muscle of canine proximal colon. **J. Physiol.**; Paris, v.380, p.293-310, 1986.

SANDERS, K.M. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. **Gastroenterol.**; Philadelphia, v.111, p.492-515, 1996.

SANDERS KM; T. ÖRDOG; SD KOH; TORIHASHI & SM WARD. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. **Neurogastroenterol. Motility.**; Oxford, v.11, p.311-338, 1999.

SATO, A; YAMAMOTO,M; IAMAMURA, K; KASHIKI,Y; KUNIEDA, T; SAKATA, K.

Pathophysiology of aganglionic colon anal anorectum: an experimental study of aganglionosis produced by a new method in the rat. **J. Pediatr. Surg.**; New York, v.13, p.399-405, 1978.

SEE , N.A. ; EPSTEIN , M.L ; SCHULTZ , E. ; PIENKOWSKI , T.P. ; BASS , P.. Hyperplasia of jejunal smooth muscle in the myenterically denervated rat. **Cell Tissue Res.**; Berlin, v.253, p.609- 617, 1988.

SEE, N.A, SINGARAM, C; EPSTEIN, M.L; DALH, J.L; BASS, P. Reinnervation of villi of rat jejun following severe mucosal damage. **Dig. Dis. Sci.**; New York, v.37, p.438-448, 1992.

SHANKLE, W.R; LANDING, B.H; ANG, S.M; CHUI, H; VILLARREAL-ENGELHARDT, G; ZAROW, C. Studies of the enteric nervous system in Alzheimer disease and other dementias or the elderly: enteric neurons in Alzheimer disease. **Mod. Pathol.**; Baltimore, v.6, p.10-14, 1993.

SMITH, S. The neuropathology of pseudo-obstruction of the intestine. **Scand. J. Gastroent.**; Oslo, v.17, p.104, 1982.

SQUIRE, L.R. Memory: Neuronal organization and behavior. In: Handbook of Physiology: **The Nervous System.**; Bethesda, v.5, Part 1 V.B Mountcastle, F. Plum, S.R. Geiger (Eds) Amer. Physiol. Soc; 1987.

STACH W. Der plexus entericus extremus des Dickdarmes und seine Beziehungen zu den interstitiellen Zellen (Cajal). **Z. Mikrosk. Anat. Forsch.**; Berlin, v.85,p.245-272, 1972.

TAXI, J. Cellules de Schwann et "cellules interstitielles de Cajal" au niveau des plexus nerveux de la musculature intestinale du Cobaye: retour aux définitions. **Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.**; v.41, p.281-304, 1952.

TAXI J. Contribution á l'étude des connexions des neurones moteurs du système nerveux autonome. **Ann. Sci. Nat. Zoo.I Bio.I Anim.**; v.7, p.413-674, 1965.

THUNEBERG, L. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? **Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.**; Berlin, v.71, p.1-130, 1982 .

THUNEBERG, L. Vital methylene blue (mB): (I) preservation of MB for electron microscopy; (II) selectivity for interstitial cells of Cajal (ICC); (III) selective accumulation of MB in the endoplasmic reticulum of ICC. **Gastroenterology** ; Philadelphia, v.103, p.1388, 1992.

TONG WD, LIU BH, ZHANG LY, ZHANG SB, LEI Y. Decreased interstitial cells of Cajal in the sigmoid colon of patients with slow transit constipation. **International Journal of Colorectal Disease**; Berlin, v.19, p.467-73, 2004.

TORIHASHI, SHIGEKO; WARD S.M; NISHIKAWA, S.I; NISHI, K; KOBAYASHI, S AND SANDERS, K.M. C-kit dependent development of interstitial cells and electrical activity in the murine gastrointestinal tract. **Cell Tissue Res.**; Berlin, v.280, p.97-111, 1995.

TORIHASHI, SHIGEKO; WARD M. S AND SANDERS, M.K. Development of C-Kit Positive Cells and the Onset of Electrical Rhythmicity in Murine Small Intestine. **Gastroenterology.**; Philadelphia, v.112, p.144-155, 1997.

TORIHASHI S, NISHI K, TOKUTOMI Y, NISHI T, WARD S, SANDERS KM. Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of cajal to a smooth muscle phenotype. **Gastroenterology**; Philadelphia, v.117, p.140-148, 1999.

VANDERWINDEN, J.M; LIU, H; DE LAET, M.H ET AL. Study of the Interstitial cells of Cajal in infantile hypertrophic pyloric stenosis. **Gastroenterology**; Philadelphia, v.111,

p.279-288, 1996.

WARD S.M, KELLER R, SANDERS K.M. Structure and organization of the electrical activity of the canine distal colon. **Am. J. Physiol.**; Bethesda, v.260, p.G724-G735, 1991.

WARD, S.M; BURNS, A.J; TORIHASHI, S; AND SANDERS, K.M. Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. **J. Physiol.**; Paris, v.480, p.91-97, 1994.

WARD, SEAN M. AND SANDERS, KENTON M. Interstitial cells of Cajal: primary targets of Enteric Motor Innervation. **Anat. Rec.**; New York, v.262, p.125-135, 2001.

YAMATAKA, A; FUJIWARA, T; KATO, Y. ET AL. A lack of intestinal pacemaker (c-kit-positive) cells in infantile hypertrophic pyloric stenosis. **J. Pediatr. Surg.**; New York, v.31, p.96-98, 1996.

YAMATAKA, A; KATO,Y; TIBBOEL, D. ET AL. A lack of intestinal pacemaker (c-kit) in aganglionic bowel of patients with Hirschsprung's disease. **J. Pediatr. Surg.**; New York, v.30, p.441-444, 1995.

YOUNG, H.M; CIAMPOLI, D; SOUTHWELL B.R AND NEWGREEN, D.R. Origin of Interstitial Cells of Cajal in the Mouse Intestine. **Developmental Biology**; New York, v.180, p.97-107, 1996.

ZUCOLOTO, S; DIAZ, J.A; OLIVEIRA, J.S.M; MUCCILO, G; SALES-NETO, V; KAJIWARA, J.K. Effect of chemical ablation of myenteric neurones on intestinal cell proliferation. **Cell. Tiss. Kinet.**; v.21, p.213-219, 1988.

ZUCOLOTO, S. ; SILVA, J.C; OLIVEIRA, J.S.M; MUCCILLO, G. The chronological relationship between the thickening of smooth muscle, epithelial cell proliferation and myenteric neural denervation in the rat jejunum. **Cell Prolif.**; Oxford, v.24, p.15-20, 1991.

ZUCOLOTO, SÉRGIO ; DEUS, DALILA ALMEIDA ; MARTINS, ALEX ABDO ; MUGLIA, VALDAIR FRANCISCO ; KAJIWARA, JOÃO KAZUYUKI ; GARCIA, SÉRGIO BRITTO. The relation between myenteric neuronal denervation , smooth muscle thickening and epithelial cell proliferation in the rat colon. **Res Exp Med.**; Berlim, v.197, p.117-124, 1997.

9.Anexos

Anexo 1. Médias obtidas dos 6 animais do grupo controle e 6 animais do grupo CB. (Neurônios/mm²)

48h	Controle	CB
R1	1,333	1,333
R2	3	0,666
R2	1,333	0,666
R4	8,333	0
R5	13,333	0
R6	5	0,333

15 DIAS	Controle	CB
R1	0,333	1
R2	7	0
R3	2	0
R4	9,333	1
R5	7	0
R6	6,333	0

7 DIAS	Controle	CB
R1	1,666	0
R2	8,666	0
R3	0,666	0
R4	6,666	0,333
R5	5,666	0
R6	4	0

60 DIAS	Controle	CB
R1	8,3333	1,6666
R3	14,3	0,6
R5	9,3	3
R6	6	1
R7	3,6	2,6
R8	8	2,6

Anexo 2. Diâmetro Médio dos cólons (cm)

2 Dias	CB	Controle
R1	2,2	1
R3	2	1
R3	2	1,3
R4	2,1	1,2
R5	1,6	1,3
R6	1,5	1,7

15 Dias	CB	Controle
R1	1,5	1,3
R2	2,3	1,2
R3	1,5	1,1
R4	1,3	1,1
R5	2	1,2
R6	1,6	1,3

7 Dias	CB	Controle
R1	2,7	0,9
R2	1,7	1
R3	3,7	1,1
R4	2,2	1,1
R5	3	1,1
R5	1,6	1,4

P8 60 dias	CB	Controle
R1	1,5	0,9
R2	1,7	0,9
R3	1,3	0,9
R4	1,7	1,2
R5	1,5	1,2
R6	1,3	0,9

Anexo 3. Morfometria da Camada Muscular (contadas em μm em objetiva de 16x)

	CB		Controle	
2 dias	camada externa	camada interna	camada externa	camada interna
R1	28	84	31	62
R2	30	65	25	60
R3	32	88	25	58
R4	33	60	28	56
R5	26	61	31	62
R6	30	56	35	71
7 dias	camada externa	camada interna	camada externa	camada interna
R1	58	138	30	59
R2	30	117	29	57
R3	63	161	30	62
R4	82	183	31	58
R5	35	118	30	60
R6	38	93	31	60
15 dias	camada externa	camada interna	camada externa	camada interna
R1	96	253	30	70
R2	68	310	29	68
R3	87	293	29	59
R4	65	216	31	63
R5	69	258	33	69
R6	70	203	28	58
60 dias	camada externa	camada interna	camada externa	camada interna
R1	54	121	32	73
R2	56	122	27	55
R3	57	128	30	66
R4	62	155	27	70
R5	65	177	30	59
R6	63	138	31	68

Anexo 4. Espessura das Camadas Musculares da Parede do cólon (μm^2)

CB			Controle			
2 dias	Camada Externa	Camada Interna	Camada Total	Camada Externa	Camada Interna	Camada Total
R1	31.080	93.240	124.320	34.410	68.820	103.230
R2	33.300	72.150	105.450	27.750	66.600	94.350
R3	35.520	97.680	133.200	27.750	64.380	92.130
R4	36.630	66.600	103.200	31.080	62.160	93.240
R5	28.860	67.710	96.570	34.410	68.820	103.230
R6	33.300	62.160	95.460	38.850	78.810	117.660
7 dias	Camada Externa	Camada Interna	Camada Total	Camada Externa	Camada Interna	Camada Total
R1	64.380	153.180	217.560	33.300	65.490	98.790
R2	33.300	129.870	163.170	32.190	63.270	95.460
R3	69.930	178.710	248.640	33.300	68.820	102.120
R4	91.020	203.130	294.150	34.410	64.380	98.790
R5	38.850	130.980	169.830	33.300	66.600	99.900
R6	42.180	103.230	145.410	34.410	66.600	101.010
15 dias	Camada externa	Camada Interna	Camada Total	Camada Externa	Camada Interna	Camada Total
R1	106.560	280.830	387.340	33.300	77.700	111.000
R2	75.480	344.100	419.580	32.190	75.480	107.670
R3	95.570	325.230	420.800	32.190	65.490	97.680
R4	72.150	239.760	311.910	34.410	69.930	104.340
R5	76.590	286.380	362.970	36.630	76.590	113.220
R6	77.700	225.330	303.030	31.080	64.380	95.460
60 dias	Camada Externa	Camada Interna	Camada Total	Camada Externa	Camada Interna	Camada Total
R1	59.940	134.310	194.250	35.520	81.030	116.550
R2	62.160	135.420	200.580	29.970	61.050	91.020
R3	63.270	142.080	205.350	33.300	73.260	106.560
R4	68.820	172.050	240.870	29.970	77.700	107.670
R5	72.150	196.470	268.620	33.300	65.490	98.790
R6	69.930	153.180	223.110	34.410	75.480	109.890

Anexo 5. Densidade de Células de Cajal na Muscular da Parede Colônica (número de células por mm²)

CB				Controle		
	C			C		
	C Externa	Interna	T	C Externa	Interna	T
2 dias						
R1	0.28	0.10	0.15	0.55	0.17	0.30
R2	0.24	0.08	0.13	0.28	0.21	0.25
R3	0.61	0.11	0.24	0.25	0.13	0.17
R4	0.49	0.27	0.34	0.38	0.16	0.23
R5	0.45	0.14	0.23	0.49	0.23	0.30
R6	0.30	0.25	0.27	0.30	0.12	0.18
7 dias						
R1	0.13	0.05	0.07	0.36	0.25	0.29
R2	0.24	0.05	0.09	0.43	0.37	0.39
R3	0.17	0.05	0.08	0.36	0.18	0.24
R4	0.14	0.05	0.08	0.40	0.21	0.28
R5	0.30	0.09	0.14	0.48	0.25	0.33
R6	0.23	0.13	0.16	0.20	0.12	0.14
15 dias						
R1	0.02	0.01	0.02	0.54	0.29	0.36
R2	0.06	0.01	0.02	0.37	0.17	0.23
R3	0.07	0	0.02	0.62	0.27	0.38
R4	0.04	0	0.00	0.37	0.18	0.24
R5	0.05	0	0.01	0.32	0.13	0.19
R6	0.07	0.03	0.04	0.41	0.20	0.27
60 dias						
R1	0.03	0	0.02	0.42	0.27	0.31
R2	0.03	0	0.00	0.40	0.32	0.35
R3	0.06	0	0.01	0.45	0.25	0.31
R4	0.10	0	0.03	0.63	0.27	0.37
R5	0.05	0.01	0.02	0.36	0.27	0.30
R6	0.04	0	0.01	0.46	0.33	0.37

Anexo 6. Número de Células de Cajal na Muscular da Parede Colônica (número de células por mm²)

CB				Controle				
2 dias	C Externa	C Interna	C SM	C Total	C Externa	C Interna	C SM	C Total
R1	9	7	3	19	19	8	4	31
R2	8	3	3	14	8	11	3	24
R3	22	7	4	33	7	6	3	16
R4	18	11	7	36	12	7	3	28
R5	33	6	4	23	17	11	5	31
R6	10	12	4	26	12	7	3	35

7 dias	C Externa	C Interna	C SM	C Total	C Externa	C Interna	C SM	C Total
R1	9	6	2	17	12	11	6	29
R2	8	4	3	15	14	16	8	38
R3	12	8	2	22	12	8	5	25
R4	13	8	3	24	14	9	5	28
R5	12	9	4	25	16	12	5	33
R6	10	12	2	24	7	5	3	15

15 dias	C Externa	C Interna	C SM	C Total	C Externa	C Interna	C SM	C Total
R1	3	2	3	8	18	15	8	41
R2	5	4	1	10	12	9	4	25
R3	7	2	1	10	20	11	7	38
R4	3	0	0	3	13	9	4	26
R5	4	2	0	6	12	6	4	22
R6	6	5	2	13	13	8	5	26

60 dias	C Externa	C Interna	C SM	C Total	C Externa	C Interna	C SM	C Total
R1	2	2	0	4	15	15	7	37
R2	2	0	0	2	12	13	7	32
R3	4	0	0	4	15	13	6	34
R4	7	0	1	8	19	13	8	40
R5	4	2	0	6	12	11	7	30
R6	3	0	0	3	16	20	5	41

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)