

DENSIDADE POPULACIONAL DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS DA CURVATURA GÁSTRICA MAIOR DO ESTÔMAGO GLANDULAR DE RATOS INDUZIDOS AO ALCOOLISMO CRÔNICO

Alexandre Cezário dos Santos

Discente do curso de Ciências Biológicas e participante de Projeto de Iniciação Científica na Universidade Paranaense - UNIPAR. E-mail: alexandresantos.bio@gmail.com

Lucas Henrique Ladoninsky

Discente do curso de Ciências Biológicas e participante de Projeto de Iniciação Científica na Universidade Paranaense - UNIPAR. E-mail: lukas_cbl@hotmail.com

Luana Rosa Anger Tochetto

Discente do curso de Ciências Biológicas e participante de Projeto de Iniciação Científica na Universidade Paranaense - UNIPAR. E-mail: lullytochetto@hotmail.com

Joana Paula Carneiro

Discente do curso de Ciências Biológicas e participante de Projeto de Iniciação Científica na Universidade Paranaense - UNIPAR. E-mail: joana_nany@hotmail.com

Alessandra Oriente

Discente do curso de Ciências Biológicas na Universidade Paranaense - UNIPAR; Bolsista do Programa Externo de Bolsas de Iniciação Científica - PEBIC/Fundação Araucária. E-mail: aleorient1@hotmail.com

Fábio José Bianchi

Docente Doutor da Universidade Paranaense - UNIPAR. E-mail: bianchi@unipar.br

Larissa Renata de Oliveira-Bianchi

Docente Mestre de Anatomia Humana da Universidade Paranaense - UNIPAR. E-mail: larissa@unipar.br

RESUMO: O alcoolismo é uma doença grave que acomete diversos órgãos em função dos efeitos nocivos que causa; dentre os mais atingidos estão: fígado, estômago, pâncreas, boca, rins e também o aparelho vestibular. O estômago é o segmento do tubo digestório mais alargado e formado por uma espécie de bolsa, localizada na cavidade abdominal voltada para o lado esquerdo do corpo. Realiza digestão química e mecânica e possui a função de absorção de algumas substâncias como álcool e alguns medicamentos. O sistema nervoso entérico funciona como um cérebro localizado no trato gastrointestinal (TGI), sendo uma forma eficiente de deslocamento do controle visceral do sistema nervoso central para o sistema nervoso entérico. Geralmente em mamíferos o plexo mientérico localiza-se na túnica muscular entre o estrato muscular circular e longitudinal ou levemente deslocado para o interior de um destes estratos. Este estudo teve como objetivo analisar o efeito do álcool sobre a densidade populacional neuronal mioentérica do estômago glandular da curvatura gástrica maior e menor de ratos submetido ao alcoolismo crônico. Utilizou-se 14 ratos com 90 dias de vida, divididos em 2 grupos: grupo controle (7 animais) que receberam durante 120 dias água e ração e o grupo experimental (7 animais) durante 120 dias receberam ração e aguardente de cana. Após este período, os animais foram eutanasiados e os estômagos retirados. Em seguida, realizamos a coloração de Giemsa para análise quantitativa dos neurônios. Para análise quantificamos 40 campos para cada animal. Os dados foram analisados pelo teste t de Student, com significância 5%. Após o período de 120 dias de tratamento verificamos que os animais experimentais ganharam menos peso e ingeriram 7% menos ração que os animais controle. Os neurônios dos animais alcoolizados apresentaram na curvatura gástrica menor em média 29,85 neurônios e na curvatura gástrica maior 41,7. E os animais controle apresentaram na curvatura gástrica menor em média 35,38 neurônios e na curvatura gástrica maior 38,42 neurônios. Com este estudo conclui-se que, na curvatura gástrica maior do estômago de ratos alcoólicos, houve maior densidade neuronal do que na curvatura gástrica menor.

PALAVRAS-CHAVE: Neurônios Entéricos; Estômago; Alcoolismo; Plexo Mientérico.

POPULATION DENSITY OF MYOENTERIC NEURONS OF THE GLANDULAR STOMACH'S GREATER GASTRIC CURVATURE OF CHRONIC ALCOHOLISM-INDUCED RATS

ABSTRACT: Alcoholism is a serious disease that affects several organs such as liver, stomach, pancreas, mouth, kidneys, and also the vestibular system. The stomach, the largest segment of the digestive tract, is formed by a kind of pouch located at the left side of the abdominal cavity. Since it carries out chemical and mechanical digestion, it absorbs some substances such as alcohol and drugs. The enteric nervous system functions as a brain located in the

gastrointestinal tract (TGI) and shifts the control of the visceral nervous system to the enteric nervous one. In mammals, the myoenteric plexus is located in the muscular wall between the longitudinal and circular muscle layer or slightly shifted to the inside of one of these strata. Current research analyzes the effect of alcohol on the population density of glandular stomach myoenteric neurons of the greater and lesser gastric curvature of rats with chronic alcoholism. Fourteen 90-day-old rats were divided into two groups: control group (seven animals) received water and food during 120 days and the experimental group (seven animals) received a diet of sugarcane liquor during the same period. The animals were then killed and their stomachs removed. Giemsa staining was undertaken for quantitative analysis of neurons and 40 sites of each animal were analyzed. Data were analyzed by Student's t test, with 5% significance. Experimental animals gained less weight and consumed 7% less food than control animals after a period of 120 days of treatment. The neurons of the alcoholic animals had a lower (29.85%) and a higher (41.7%) mean number of neurons respectively in the lesser and greater gastric curvatures of the alcoholic rats' stomach. Results show that high neuronal density existed in alcoholic rats' gastric greater curvature than in their lesser gastric curvature.

KEYWORDS: Enteric Neurons; Stomach; Alcoholism; Myoenteric Plexus.

INTRODUÇÃO

O estômago é uma porção dilatada do canal alimentar, onde os alimentos, após a alimentação, são armazenados e então digeridos quimicamente (OLIVEIRA, 2000). Sua estrutura é determinada pela alimentação dos seres vivos, por isso as características morfofisiológicas, não só do estômago, mas de todo o tubo digestório variam entre as diferentes espécies (MOLINARI et al., 1994). Porém, sabe-se que o estômago do rato apresenta uma semelhança morfológica externa quando comparado ao estômago do homem, por este motivo é o animal mais prático para este tipo de estudo. Apesar da semelhança externa, internamente, na superfície de ambas as faces do estômago do rato, evidencia-se uma prega denominada "prega limitante" (LUCIANO; REALE, 1992). Esta prega divide o estômago do rato em duas regiões gástricas distintas, uma região glandular e outra aglandular. A região glandular apresenta uma túnica serosa delgada e uma túnica muscular bem desenvolvida, formada por uma camada circular evidente e uma camada longitudinal delgada (MOLINARI et al., 1994) que induz a mistura mecânica e a quebra dos alimentos (CLEBIS et al., 2004). Afirma ainda que a região aglandular possui epitélio de revestimento do tipo escamoso estratificado queratinizado, semelhante ao epitélio esofágico, sendo-lhe atribuída as funções de maceração inicial dos alimentos, armazenamento e absorção de íons por meio de atividade mecânica.

O sistema nervoso entérico é formado por uma rede de neurônios, situados nas paredes das vísceras, estendendo-se desde o esôfago até a porção final do intestino grosso. Divide-se em dois plexos: um externo situado entre as camadas

circular interna e longitudinal externa denominado plexo mientérico ou plexo de Auerbach, que controla os movimentos gastrointestinais, e um plexo interno denominado plexo de Meissner, localizado na submucosa, responsável pelo controle do fluxo sanguíneo e secreção epitelial local (CINGOLANI; HOUSAY, 2004; NATALI; MIRANDA-NETO, 1996).

O álcool exerce efeitos principalmente sobre o sistema nervoso central levando a alterações degenerativas sistêmicas, podendo, inclusive, induzir a alterações hepáticas e gástricas, neste caso, gastrite aguda e úlceras (MOLINARI, 1991). Esta multiplicidade de ações tóxicas sobre órgãos e tecidos que desencadeiam mecanismos lesionais associados a diferentes enfermidades justificam o interesse em se estudar os efeitos do álcool no organismo (JERÔNIMO; PONTES FILHO; MELO JUNIOR, 2008).

Sabe-se que sua absorção efetua-se principalmente através da mucosa do tubo digestivo, e pelo fato de ser uma molécula simples, isso ocorre de maneira muito rápida, sendo 10% eliminado pelos pulmões e rins e o restante oxidado pelo corpo. Por ser hidrossolúvel, distribui-se praticamente por todos os tecidos intra e extracelularmente, variando apenas de acordo com a composição química destes (OLIVEIRA, 2000; GILMARTIN, 1989 apud JERÔNIMO; PONTES FILHO; MELO JUNIOR, 2008). Oxidado no citosol ou no retículo endoplasmático das células, o etanol produz grande quantidade de acetaldeído e de radicais livres derivados do álcool (radicais hidróxi-etil) e do oxigênio, aumentando o estresse oxidativo na célula, causando assim alterações morfológicas e funcionais nos tecidos e órgãos.

No estômago, as alterações que surgem imediatamente após a ingestão são relacionadas com os efeitos do álcool sobre a vascularização da mucosa (MOLINARI, 1991), que é realizada pelos neurônios dos plexos submucoso e mientérico (IRWIN, 1931; GABELLA, 1969; STERNINI, 1988).

A presença de alterações na mucosa do estômago indica que o plexo mientérico do estômago está sujeito a lesões diretas ou indiretas pelo alcoolismo crônico. Objetivou-se quantificar os neurônios mientéricos da curvatura gástrica maior e menor do estômago glandular de ratos submetidos ao alcoolismo crônico por 120 dias.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais deste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal (CEPEEA) da Universidade Paranaense (Protocolo n. 15196).

Para a execução deste trabalho foram utilizados 14 *Rattus norvegicus* (Wistar) como modelo experimental. Utilizamos ratos machos adultos com 90 dias de idade procedentes do Biotério da Universidade Paranaense, campus Umuarama. Cada animal foi mantido em gaiola individual sob temperatura constante e alternância de ciclos de luminosidade. Os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo controle - 7 animais (n=7) receberam ração *ad libitum*, ração para roedores comercializada pela NUVITAL (recomendada pela *National Research Council & National Health*

Institute - USA) e água.

Grupo experimental - 7 animais (n=7), receberam *ad libitum*, ração para roedores comercializada pela NUVITAL (recomendada pela National Research Council & National Health Institute - USA) e aguardente de cana (marca "51", 39° GL., Industria Muller, Pirassununga, SP, Brasil), diluída a 30° Gay Lussac (30° v/v). Para indução ao estado de alcoolismo crônico foram administradas doses crescentes de etanol na escala de diluição: 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, com duração de 2 semanas em cada concentração, até a diluição de 30% ser alcançada. A administração gradativa de etanol tem como objetivo a adaptação dos animais ao modelo experimental denominado como semivoluntário, no qual o etanol é o único alimento líquido disponível aos animais.

Para se avaliar a quantidade de ingestão de aguardente, foram quantificados semanalmente a quantidade ingerida por cada animal, bem como pesos e o crescimento do animal.

Após 120 dias, os animais foram submetidos à eutanásia por administração intramuscular de Acepran - 1% (1,26ml/kg) + Ketamina - 10% (1,26 ml/kg) + Xilazina - 2% (0,42 ml/kg) e Atropina - 1% (0,22 ml/kg) por injeção intramuscular na face medial da coxa (PACHALY et al., 2003).

Foram realizadas laparotomias com incisão mediana em todos os animais para a retirada do estômago. Os mesmos foram pesados e a área mensurada através do sistema computadorizado de análise de imagens (MOTIC IMAGES PLUS 2.0).

Amostras do estômago dos animais de cada grupo foram submetidas à fixação em formol acético e, posteriormente, dissecadas sob estereomicroscópico para retirada da túnica mucosa e tela submucosa. Os preparados totais foram corados com azul de metileno conforme técnica de Giemsa (BARBOSA, 1978).

Para a quantificação dos neurônios mientéricos foi realizada a contagem por amostragem. Foi contado número total de neurônios de 40 campos microscópicos, com objetiva de 40x, das curvaturas gástricas maior e menor do estômago glandular de cada um dos estômagos obtidos, com auxílio de microscópio óptico (MOTIC PLUS) Para contagem será utilizado microscópio fotônico com objetiva de 40X. A área do campo microscópio foi de 0,21 mm².

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o software Prisma por meio do teste t de Student com nível de significância de 5% e expressos como média ± desvio padrão da média.

A documentação fotográfica foi realizada com auxílio de máquina digital SONY 7.2 mega pixels e microscópio de luz MOTIC com aumento de 400x.

3 RESULTADOS

O grupo controle (GC) apresentou aos 90 dias de idade um peso médio de 436±28,08 gramas, já no dia da eutanásia pesaram em média 491±35,07 gramas.

Aos 210 dias, o grupo controle (GC) apresentou peso corporal de 491±35,07 gramas, enquanto que os animais do grupo experimental (GE) apresentaram peso de 439±25,87. Esses dados apresentam diferença estatística significativa ao compa-

ramos (p=0.0002).

Em relação à quantidade de líquido ingerido semanalmente pelos animais, constatamos que o grupo controle (284,87±16,07 ml/semana) ingeriu 6,86% mais de líquido que os animais experimentais (284,87±16,07 ml/semana), sendo que esta diferença foi estatisticamente significativa com (p=0.0001).

Ao compararmos a quantia média de ração ingerida semanalmente por cada um dos grupos, verificamos que o controle ingeriu 7.02% mais ração (117.3±3.13 g/semana) quando comparado aos do grupo experimental (82,2±3,13 g/semana), apresentando uma diferença significativa com p= 0.0001.

Em relação ao comprimento focinho-ânus, obtivemos diferença significativa entre os grupos com p= 0.0151, sendo que o GC apresentou comprimento maior que GE.

Ao verificarmos o número de neurônios das curvaturas gástricas maior e menor, constatou-se que em ambas as regiões o número de neurônios mientéricos são equivalentes, com p=0,51. Já os animais experimentais apresentaram diferença significativa estatisticamente, a curvatura gástrica maior apresentou em média 41,7±12,97 neurônios enquanto a curvatura gástrica menor houve em média 29,85±5,4 neurônios com p=0,04.

4 DISCUSSÃO

O desenvolvimento dos ratos dos 90 aos 210 dias recebendo ração e aguardente de cana possibilitou uma perda de peso de 12,6%, enquanto os ratos que receberam ração e água ganharam 10% de peso corporal. Verificou-se que o peso corporal dos ratos submetidos à dieta alcoólica foi 8,93% menor do que os do grupo controle. Dados de perda de peso experimentais foram constatados em ratos submetidos à desnutrição protéica, onde o peso corporal inferior aos dos grupos controles foi de 44,2% (ZANIN et al., 2003) e 37,9% (FIORINI et al., 1999).

Ao se realizar estudos quantitativos de neurônios do plexo mioentérico, tem sido recomendada observância das possíveis diferenças existentes entre os diferentes segmentos do sistema digestório (IRWIN, 1971; MIRANDA-NETO et al., 2001; ZANIN et al., 2003) ou, até mesmo, diferenças regionais em um mesmo segmento (SANT'ANA et al., 1997; MIRANDA-NETO et al., 2001; FREGONESI; MIRANDA-NETO; MOLINARI, 1998).

Em todos os animais, foram quantificados os neurônios corados pela Técnica de Giemsa, em igual número de campos, das regiões da curvatura gástrica maior e menor do estômago glandular, o que permite uma comparação mais segura entre os dois grupos.

Em relação às quantificações neuronais, podemos observar um significante aumento na densidade neuronal na curvatura gástrica maior dos animais alcoolizados em relação aos neurônios da curvatura gástrica menor. Entre as regiões estudadas os animais controle apresentarem densidades equivalentes. Outros autores também observaram aumento significativo nos neurônios no corpo do estômago (FREGONESI; MOLINARI; MIRANDA-NETO, 2004), no íleo (ZANONI et al., 2003)

em animais desnutridos.

O efeito indireto da ingestão crônica do etanol é a inevitável ação sobre o estado nutricional. Segundo Brody (1998), desenvolvem deficiências nutricionais, sendo mais susceptíveis à deficiência em folatos, tiamina, riboflavina, vitamina B6 e magnésio. Nesses casos, é fator determinante de maior importância a anorexia induzida pelo etanol (ACHORD, 1998; PALENCIA et al., 1994).

Palencia e colaboradores (1994) tentando reproduzir as condições reais de alcoolismo e desnutrição típica de populações de baixa renda do México; desenvolveram um experimento com ratos jovens submetidos a uma dieta hipoprotéica (tortilla) e a ingestão de bebida fermentada e destilada (brandy) contendo 38% de etanol. Os resultados obtidos levaram os autores a concluir que os danos induzidos pelo alcoolismo e desnutrição isoladamente eram similares quanto à distribuição dos neurônios, peso do órgão e peso do animal.

Há uma escassez de artigos relacionando alcoolismo e neurônios mioentéricos de estômago de ratos, o que nos permite inferir que provavelmente animais induzidos ao alcoolismo, por nós estudados, apresentaram uma maior densidade neuronal na curvatura gástrica maior por essa região apresentar-se em menor contato com o álcool ingerido, sofrendo menos interferências quantitativas se comparados com a região da curvatura menor do estômago glandular.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base neste estudo inferimos que a densidade neuronal das curvaturas gástricas maior e menor do estômago glandular não são diferentes estatisticamente nos animais controle; entretanto, nos animais induzidos ao alcoolismo a curvatura gástrica maior apresentou uma maior densidade neuronal do que a curvatura gástrica menor.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Paranaense, pelo financiamento desta Pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ACHORD, J. L. Nutrition, alcohol and liver. *Amer. J. Gastroenterol*, v. 83, p. 224-248, 1998.
- BARBOSA, A. J. A. Técnica histológica para gânglios intramurais em preparados espessos. *Rev. Bras. Pesqui. Méd. Biol.*, v. 11, n. 2-3, p. 95-97, 1978.
- BRODY, T. Alcohol. In: BRODY, T. *Nutritional biochemistry*. 9. ed. London: Academic Press, 1998. cap. 4. p. 201-220.
- CINGOLANI, H. E.; HOUSSAY, A. B. *Fisiologia Humana de Houssay*. 7. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2004.
- CLEBIS, N. K. et al. Avaliação quantitativa e morfométrica dos neurônios mioentéricos da região aglandular do estômago de ratos com diabetes melitus induzido por estreptozotocina e suplementados com ácido ascórbico. *Arq. Cien. Saúde, Umuarama*, p. 87-93, maio/ago. 2004.
- FLORINI, A. et al. Quantitative morphological analysis of the myenteric neurons of the ileum in rats under experimental desnutrition. *Acta Scientiarum*, v. 21, p. 409-413, 1999.
- FREGONESI, C. E. P. T.; MOLINARI, S. L.; MIRANDA-NETO, M. H. Avaliação da população de neurônios mioentéricos NADPH-diafoarase positivos do corpo do estômago de ratos com diabetes crônico induzido pela estreptozotocina. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, v. 26, n. 1, p. 107-112, 2004.
- FREGONESI, C. E. P. T.; MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L. Estudo morfológico e quantitativo dos neurônios do plexo mioentérico do corpo do estômago de *Rattus norvegicus*. *Acta Scientiarum*, v. 20, p. 221-224, 1998.
- GABELLA, G. Detection of nerve cells by histochemical technique. *Experientia*, v. 23, n. 52, p. 218-219, 1969.
- IRWIN, D. A. The anatomy of Auerbach's plexus. *Am. J. Anat.*, v. 49, p. 141-166, 1931.
- JERÔNIMO, M. S.; PONTES FILHO, N. T. P.; MELO JÚNIOR, M. R. M. Efeitos da exposição pré-natal ao etanol no córtex cerebral de ratos: um estudo do neurópilo. *J. Bras. Patol. Méd. Lab.*, v. 44, n. 1, p. 59-64, fev. 2008.
- LUCIANO, L.; REALE, E. The limiting ridge of the rat stomach. *Arch. Histol. Cytol.*, v. 55, p. 131-138, 1992.
- MIRANDA-NETO, M. H. et al. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats. *Arq. Neuropsiquiatr*, v. 59, p. 54-59, 2001.
- MOLINARI, S. L. et al. Estudo morfológico do plexo mioentérico do estômago glandular do pato (*Anas sp*). *Revista Unimar*, v. 16, n. 2, p. 419-426, 1994.
- MOLINARI, S. L. *Álcool etílico*. Patologia estrutural. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 1991.
- 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, n. 2, p. 273-279, jun. 1996.
- OLIVEIRA, L. R. Densidade neuronal e localização dos neurônios mioentéricos NADH-diafoarase positivo do estômago aglandular de ratos (*Rattus norvegicus*) submetidos ao alcoolismo. Maringá, PR: UEM, 2000. (Relatório final de Iniciação Científica).

PACHALY, J. R. et al. Anesthesia of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with allometrically scaled doses of ketamine Xylazine Acepromazine and Atropine-preliminary report. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.**, v. 6, n. 2, p. 195, 2003.

PALENCIA, G. et al. Detrimental effects of malnutrition on the damage induced by alcoholism: A study of animal models that simulate chronic alcoholism and malnutrition of large human groups. **J. Stud. Alcohol**, v. 55, p. 113-120, SANT'ANA, D. M. G. et al. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon rats subjected to proteic desnutrition. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 55, p. 687-695, 1997.

STERNINI, C. Structural chemical organization of the myenteric plexus. **Amn. Rev. Physiologi.**, v. 50, p. 81-93, mar. 1988.

ZANIN, S. T. M. et al. Neurônios NADH-diaforase positivos do jejuno de ratos adultos (*Rattus norvegicus*) desnutridos: aspectos quantitativos. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 61, n. 3A, p. 650-653, Sept. 2003.

ZANONI, J. N. et al. 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. **Auton Neurosci**, v. 104, p. 32-38, 2003.

Recebido em: 18 Maio 2010

Aceito em: 10 Agosto 2010