

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MICROINJEÇÕES INTRAMURAIS DE CLORETO DE
BENZALCÔNIO NA SÍNDROME DO INTESTINO CURTO EM
RATOS *WISTAR* APÓS ENTERECTOMIA EXTENSA**

**Juliana de Oliveira Ribeiro
Médica Veterinária**

2021

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MICROINJEÇÕES INTRAMURAIS DE CLORETO DE BENZALCÔNIO
NA SÍNDROME DO INTESTINO CURTO EM RATOS *WISTAR* APÓS
ENTERECTOMIA EXTENSA**

Juliana de Oliveira Ribeiro

Orientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutora em Cirurgia
Veterinária.**

2021

R484m Ribeiro, Juliana de Oliveira
Microinjeções intramurais de cloreto de benzalcônio na síndrome do intestino curto em ratos wistar após enterectomia extensa / Juliana de Oliveira Ribeiro. -- Jaboticabal, 2021
34 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Paola Castro Moraes
Coorientador: Sérgio Britto Garcia

1. células caliciformes. 2. células serotoninérgicas. 3. desnervação mientérica. 4. intestino delgado. 5. serotonina. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: MICROINJEÇÕES INTRAMURAIS DE CLORETO DE BENZALCÔNIO NA SÍNDROME DO INTESTINO CURTO EM RATOS WISTAR APÓS ENTERECTOMIA EXTENSA.

AUTORA: JULIANA DE OLIVEIRA RIBEIRO
ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES
COORIENTADOR: SÉRGIO BRITTO GARCIA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNESP / FCAV - Jaboticabal

Profa. Dra. ANNELESE CARLA CAMPESI DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Dr. OSCAR RODRIGO SIERRA MATIZ (Participação Virtual)
Universidad de La Salle / Bogotá/Colombia

Profa. Dra. MARILIA GABRIELE PRADO ALBUQUERQUE FERREIRA (Participação Virtual)
Universidade Federal do Vale do São Francisco / Petrolina/PE

Jaboticabal, 17 de junho de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Juliana de Oliveira Ribeiro, nasceu em São Paulo-SP, aos 28 de agosto de 1989. Kursou graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Campus Araçatuba, de março de 2009 a fevereiro de 2013. Realizou Residência em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP- Câmpus de Jaboticabal de maio de 2014 a maio de 2016. Realizou o Mestrado em Cirurgia Veterinária, sendo bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, sob orientação da Professora Doutora Paola Castro Moraes, no período de março de 2016 a julho de 2017. Em agosto de 2017, ingressou no programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, curso de doutorado, sendo bolsista da CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, sob orientação da Professora Doutora Paola Castro Moraes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Carlos e Sandra pelo amor incondicional, compreensão. Agradeço pelo incentivo profissional e apoio incansável, sempre dispostos a auxiliar no que for possível. Sem vocês nada disso seria possível.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Paola Castro Moraes por acreditar em mim desde o começo, ensinando, incentivando e me encorajando desde a residência. Me inspira de todas as formas. Agradeço pelo carinho, amizade e pela infinita compreensão. Tenho uma admiração imensa pela forma como você influencia a vida dos seus alunos e serei eternamente grata por tudo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia por ter proporcionado oportunidade única, de estudar este assunto de imensa importância, podendo ser alternativa para salvar vidas. Agradeço por ter aberto as portas do Departamento de Patologia da FMRP – USP para contribuir ainda mais com meu conhecimento além da medicina veterinária.

Ao Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi pela confiança, ensinamentos e oportunidade de participar do Serviço de Oncologia Veterinária da FCAV, contribuindo cada vez mais para o meu crescimento profissional e pessoal.

A Marília G. P. Albuquerque Ferreira pela ajuda incansável, paciência e ensinamentos, os quais fizeram esse trabalho acontecer. E aos amigos Gabriel Luiz Montanhim, Laise Yamashiro e Andréia Coutinho por me auxiliarem tanto na execução do experimento.

A Lívia Mello pelo companheirismo, compreensão e paciência nesses momentos. Por acreditar em mim e sempre me incentivar.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, aos Professores e ao Hospital Veterinário pela oportunidade de realização do curso e por terem participado ativamente na minha formação profissional e pessoal.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

Página

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Síndrome Do Intestino Curto	2
2.2 Sistema Nervoso do Trato Gastrointestinal	3
2.3 Células Neuroendócrinas	5
2.3.1 Células Caliciformes	5
2.3.2 Células Serotoninérgicas	6
2.4 Desnervação Mientérica com Cloreto de Benzalcônio (CB)	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Aspectos Éticos	10
3.2 Animais	10
3.3 Procedimento Anestésico	10
3.4 Procedimento Cirúrgico	11
3.4.1 Grupo Controle (GC) - Animais submetidos à microinjeções intramurais de solução salina estéril 0,9%	11
3.4.2 Grupo Enterectomia e enteroanastomose (GE) - Animais submetidos a enterectomia extensa e enteroanastomose.	12
3.4.3 Grupo Enterectomia e enteroanastomose com cloreto de benzalcônio 0,3% (GECB) - Animais submetidos a enterectomia extensa e enteroanastomose e microinjeções intramurais de CB.	14

3.5 Avaliação indireta do estado nutricional.....	15
3.6 Pós-operatório e Eutanásia	15
3.7 Coleta e processamento do material para análise microscópica.....	15
3.7.1 Avaliação Histopatológica	16
3.7.2 Avaliação Histoquímica	16
3.7.3 Avaliação Imunoistoquímica.....	16
3.7.4 Reações Imunoistoquímicas	16
3.8 Análise Estatística	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 Contagem de células caliciformes entre os diferentes grupos no jejuno e íleo.....	19
4.2 Contagem de células serotoninérgicas entre os diferentes grupos no jejuno e íleo.	23
5 CONCLUSÃO	26
6 REFERÊNCIAS	26

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

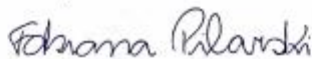


C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Efeito adaptativo da porção ileal de ratos submetidos ao tratamento com microinjeções intramurais de cloreto de benzalcônio após enterectomia extensa na síndrome do intestino curto", protocolo nº 016529/17, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 07 de dezembro de 2017.

Vigência do Projeto	02/11/2017 a 01/03/2018
Espécie / Linhagem	Rato heterogêneo / Wistar
Nº de animais	72
Peso / Idade	250g
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Jaboticabal, 07 de dezembro de 2017.


Profª Drª Fabiana Pilarski
 Coordenadora – CEUA

MICROINJEÇÕES INTRAMURAIS DE CLORETO DE BENZALCÔNIO NA SÍNDROME DO INTESTINO CURTO EM RATOS WISTAR APÓS ENTERECTOMIA EXTENSA

RESUMO – A síndrome do intestino curto (SIC) representa uma condição clínica grave, caracterizada pela deficiente absorção intestinal de nutrientes, causada pela perda extensa do intestino delgado, culminando em altas taxas de mortalidade tanto em pacientes humanos quanto veterinários. Os tratamentos disponíveis não possuem, até então, resultados satisfatórios para resolução desta importante afecção e consistem em terapias paliativas. Diversos estudos demonstraram que o método de desnervação intestinal intrínseca, com utilização do Cloreto de Benzalcônio (CB), consiste em promissora esperança na busca de terapias menos invasivas e eficazes no tratamento da SIC, permitindo melhora nas condições pós-cirúrgicas e prognóstico dos pacientes, por aumentar a área absorptiva do intestino. Objetivou-se, com esse trabalho, avaliar a população de células neuroendócrinas, calciformes e serotoninérgicas na Síndrome do Intestino Curto, a fim de compreender de que maneira a desnervação mientérica com Cloreto de Benzalcônio 0,3% no íleo poderia influenciar no tratamento de pacientes portadores de SIC. Foram utilizados 18 ratos, distribuídos em três grupos (GC - Grupo Controle; GE – Grupo Enterectomia-enteroanastomose e GECB - Grupo enterectomia-enteroanastomose com uso do CB) contendo seis animais cada. Os animais do GC receberam microinjeções intramurais de solução salina estéril 0,9%, os animais do GE foram submetidos à ressecção intestinal extensa e os animais do GECB foram submetidos também à ressecção intestinal extensa, porém, receberam microinjeções intramurais de CB. Posteriormente, foi realizada a análise histopatológica, histoquímica e imunoistoquímica, para avaliação da população de células neuroendócrinas no jejuno e íleo. Houve aumento significativo ($p < 0,05$) na contagem de células serotoninérgicas no GECB nos dois segmentos intestinais estudados e não houve alteração significativa na população de células calciformes nos diferentes grupos. Os resultados obtidos foram possíveis por meio da avaliação da marcação específica positiva para PAS na histoquímica para as células calciformes e Anticorpo anti-serotoninérgico na imunoistoquímica para as células serotoninérgicas. Nas condições em que este trabalho foi conduzido é possível concluir que o tratamento com microinjeções intramurais de CB 0,3% no íleo de ratos Wistar não foi suficiente para alterar a população de células calciformes nos segmentos jejunais e ileais. Conclui-se também que o CB foi capaz de promover aumento da população de células serotoninérgicas, o que por sua vez, pode auxiliar no aumento das funções promovidas pela serotonina no intestino, auxiliando no trânsito intestinal de pacientes com SIC.

Palavras-chave: células calciformes, células serotoninérgicas, desnervação mientérica, intestino delgado, serotonina.

INTRAMURAL MICROINJECTIONS OF BENZALCONIUM CHLORIDE IN SHORT BOWEL SYNDROME IN WISTAR RATS AFTER EXTENDED ENTERECTOMY

ABSTRACT – Short bowel syndrome (SBS) represents a serious clinical condition in medicine, characterized by deficient intestinal absorption of nutrients, caused by extensive loss of the small intestine, culminating in high mortality rates in both human and veterinary patients. The available treatments do not have, until then, satisfactory results for the resolution of this important condition and consist of palliative therapies. Several studies have shown that the intrinsic intestinal denervation method, with the use of Benzalconium Chloride (BC), consists of promising hope in the search for less invasive and effective therapies in the treatment of SBS, allowing improvement in the post-surgical conditions and prognosis of patients, by increasing the absorptive area of the intestine. The objective of this work was to evaluate the population of neuroendocrine, callic and serotonergic cells in SBS, in order to understand how myenteric destination with 0.3% BC in the ileum may influence the treatment of patients with SBS. 18 rats were divided into three groups (CG - Control Group; EG–Enterectomy-enteroanastomosis group and GEBC - Enterectomy/enteroanastomosis group using BC) containing six animals each. The animals of the CG received intramural microinjections of 0.9% sterile saline solution, the eg animals were submitted to extensive intestinal resection and the GEBC animals were also submitted to extensive intestinal resection, but received intramural microinjections of BC. Subsequently, histopathological, histochemistry and immunohistochemical analysis was performed to evaluate the population of neuroendocrine cells in the jejunum and ileus. There was a significant increase ($p < 0.05$) in the count of serotonergic cells in the GEBC in the two intestinal segments studied and there was no significant change in the population of goblet cells in the different groups. The results obtained were possible by evaluating the specific positive marking for SBP in histochemistry for the goblet cells and anti-serotonergic antibody in immunohistochemistry for serotonin cells. Under the conditions in which this study was conducted, it is possible to conclude that treatment with intramural microinjections of 0.3% BC in the ileum of Wistar rats was not sufficient to alter the population of goblet cells in the jejunal and ileasegments. It is also concluded that it was able to promote an increase in the population of serotonergic cells, which in turn can help in increasing the functions promoted by serotonin in the intestine, assisting in the intestinal transit of patients with SIC.

Keywords: goblet cells, myenteric denervation, serotonergic cells, serotonin, small intestine.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
μ	Micrômetro
CB	Cloreto de Benzalcônio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GC	Grupo Controle
GE	Grupo Enterectomia/enteroanastomose
GECB	Grupo enterectomia/enteroanastomose com uso do CB
IM	Intramuscular
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
mg/ mL	Miligramas por mililitro
PAS	Periodic Acidific Schiff
PBS	Phosphate Buffered Saline – Tampão Salina Fosfato
pH	Potencial Hidrogeniônico
SIC	Síndrome do Intestino Curto
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SP	São Paulo
TGI	Trato Gastrointestinal
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Peso corporal e ganho ponderal dos animais durante o período experimental. <i>Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2020.</i>	18
Tabela 2. Marcação da positividade do marcador PAS para células caliciformes nos segmentos jejunais e ileais de ratos Wistar nos diferentes grupos estudados. <i>Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2020.</i>	19
Tabela 3. Marcação da positividade do imunomarcador anticorpo anti-serotoninérgico para células serotoninérgicas nos segmentos jejunais e ileais de ratos Wistar nos diferentes grupos estudados. <i>Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2020.</i>	22

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Imagens de procedimento cirúrgico para realização de microinjeções intramurais de solução salina estéril 0,9% em ratos Wistar. Em A, exposição e exteriorização do segmento ileal (seta). Em B, microinjeções na camada muscular nos 5 cm aborais do segmento íleal (seta). <i>Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2018.</i>	12
Figura 2. Desenho esquemático das microinjeções intramurais aplicadas no segmento ileal de ratos no aspecto dorso-ventral. Realizadas dez microinjeções em formato de espinha de peixe, sendo estas distribuídas em cinco microinjeções na lateral direita e cinco na lateral esquerda do íleo, na borda antimesentérica em direção à borda mesentérica. Fonte: RIBEIRO et al. (2019).	12
Figura 3. Imagens de procedimento cirúrgico para realização de enterectomia de 80% do intestino delgado e enteroanastomose termino-terminal em ratos Wistar. Em A, exposição e exteriorização de todo o intestino delgado. Em B, ligadura da artéria mesentérica (seta). Em C, ressecção de 80% do segmento jejunal (seta). Em D, anastomose termino-terminal do jejuno remanescente com o íleo (seta). <i>Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2018.</i>	14
Figura 4. Imagens de procedimento cirúrgico de enterectomia de 80% do intestino delgado e enteroanastomose termino-terminal em ratos Wistar. Em A, anastomose termino-terminal do jejuno remanescente com o íleo (seta). Em B, microinjeções de CB 0,3% intramural no íleo. <i>Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2018.</i>	15

Figura 5.	Comparação da contagem caliciformes nos diferentes segmentos intestinais entre os diferentes grupos. Em A, comparação entre os grupos GC, GE e GECB no jejuno. Em B, comparação entre os grupos GC, GE e GECB no íleo. GC – Grupo Controle; GE – Grupo Enterectomia/Enteroanastomose; GECB - Grupo Enterectomia/Enteroanastomose com CB. <i>Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2018.</i>	Páginas 19
Figura 6.	Fotomicrografias histoquímica da porção intestinal estudada, aumento de 200x. Em A, C e E estudo dos segmentos jejunais e B, D e F estudo dos segmentos ileais. Em A (GC jejunal) observa-se moderada marcação de PAS nas células caliciformes (setas). Em B (GC ileal), em C (GE jejunal), em D (GE ileal), em E (GECB jejunal) e F (GECB ileal) observa-se padrões de marcação de PAS nas células caliciformes semelhantes entre si (setas). <i>Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2020.....</i>	21
Figura 7.	Comparação da contagem de células serotoninérgicas nos diferentes segmentos intestinais entre os diferentes grupos. Em A, comparação entre os grupos GC, GE e GECB no jejuno. Em B, comparação entre os grupos GC, GE e GECB no íleo. GC – Grupo Controle; GE – Grupo Enterectomia/Enteroanastomose; GECB - Grupo Enterectomia/Enteroanastomose com CB. <i>Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2018.</i>	23
Figura 8.	Fotomicrografias imuno-histoquímica da porção intestinal estudada, aumento de 200x. Em A, C e E estudo dos segmentos jejunais e B, D e F estudo dos segmentos ileais. Em A (GC jejunal) e B (GC ileal), observa-se discreta imunomarcacão citoplasmática de anticorpo anti-serotoninérgico nas células serotoninérgicas (setas). Em C (GE jejunal) e D (GE ileal) observa-se discreta a moderada	

Imunomarcacão citoplasmática de anticorpo anti-serotoninérgico nas células serotoninérgicas (setas). Em E (GEBC jejunal) e F (GECB ileal) observa-se intensa imunomarcacão citoplasmática de anticorpo anti-serotoninérgico nas células serotoninérgicas (setas). *Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2020.*

Páginas

24

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome do Intestino Curto (SIC) é uma condição grave que ocorre em pacientes humanos e veterinários, em consequência às ressecções extensas de intestino delgado, provocando diminuição da absorção de nutrientes, incapacidade de manter o equilíbrio proteína-energia, fluidos, eletrólitos ou micronutrientes, resultando na necessidade de suplementação parenteral para prevenir déficits nutricionais ou de hidratação, podendo levar o paciente ao óbito em pouco tempo. Na pediatria humana, esta condição pode estar associada a alterações congênitas ou adquiridas, já em pacientes veterinários a maior incidência ocorre ao longo da vida, principalmente devido à processos traumáticos ou obstrutivos, que podem ter como causa corpos estranhos, neoplasias, vólvulos ou intussuscepção.

Nesse contexto, são inúmeras as pesquisas que visam a minimizar ou extinguir esses efeitos, no intuito de instituir tratamentos não apenas paliativos, como é comumente realizado (Vernon e Gergeson, 2001), mas que possam curar esses pacientes. Há décadas, diversos pesquisadores buscam terapia cirúrgica eficaz, contudo, pôde-se observar alta taxa de insucesso e inúmeras complicações pós-operatórias decorrentes dos procedimentos realizados, impactando diretamente na sobrevida desses pacientes.

O cloreto de benzalcônio (CB), por provocar desnervação química intrínseca do intestino e, como consequência, aumentar a área absorptiva intestinal, surge como possibilidade de tratamento. Alguns estudos iniciais já mostram efeitos benéficos em ratos (Garcia et al., 1999; Carvalho et al., 2006; Ribeiro et al., 2019), porém, ainda há necessidade de novos estudos a fim de compreender totalmente o mecanismo envolvido nesse processo.

Diante disso, torna-se de suma importância o investimento em pesquisas que busquem possibilidades terapêuticas eficazes, devido à alta morbimortalidade que a SIC provoca na medicina veterinária e podendo chegar a taxas superiores a 80% na pediatria humana se não adequadamente tratada (Marchini, et al., 1994). Até o

presente momento, não existem terapias satisfatórias capazes de minimizar as complicações decorrentes da falha de absorção intestinal.

Os resultados obtidos nesse estudo apontam nova possibilidade na abordagem terapêutica de pacientes com SIC (na medicina humana e na veterinária). Portanto, objetiva-se com esse trabalho avaliar a população de células caliciformes e serotoninérgicas na Síndrome do Intestino Curto, a fim de compreender de que maneira a desneveação mientérica com Cloreto de Benzalcônio 0,3% no íleo poderá influenciar no tratamento de pacientes portadores de SIC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Síndrome Do Intestino Curto

A SIC compreende o conjunto de sinais e sintomas causados pela ressecção extensa de uma porção intestinal, geralmente associada a remoções de cerca de um quinto de intestino delgado (Werf et al., 2015), no qual a porção funcional restante é inadequada para digerir e absorver os nutrientes entéricos necessários para o crescimento e desenvolvimento normais (Carvalho et al., 2006), conduzindo à má absorção severa de nutrientes, secundária à redução da área de superfície (Figueroa et al., 1996). Representa condição clínica crítica, podendo levar ao óbito por desnutrição grave que, se não adequadamente tratada, repercute em taxas significativas de morbidade e mortalidade em crianças (Wales et al., 2004; Squires et al., 2012).

As causas desta síndrome em humanos incluem afecções congênitas e adquiridas que resultam em perda de grandes áreas de superfície de absorção intestinal (Tannuri, 2004; Werf et al., 2015), como em pacientes submetidos à correção cirúrgica de atresia intestinal e enterocolite necrosante (Werf et al., 2015). Na medicina veterinária, as causas mais associadas à SIC são trauma abdominal, isquemia mesentérica, obstruções intestinais seguidas de necrose de alça e carcinoma intestinal (Weser et al., 1976; Maegawa et al., 2005)

Segundo estudo epidemiológico realizado nos Estados Unidos da América por Pant et al. (2015), crianças portadoras da SIC apresentam elevado tempo de

permanência em leitos hospitalares e altos custos de hospitalização, sendo comum apresentarem complicações associadas, como infecções (62%), anemia (29%) e doença hepática (17%), colaborando para taxa de mortalidade superior a 80% se não adequadamente tratada (Marchini, et al., 1994).

De forma compensatória à extensa perda desta porção intestinal, o organismo é capaz de desenvolver meios adaptativos que consistem em aumentar a superfície absorptiva, por meio do aumento do comprimento e calibre da víscera (Figuerola et al., 1996; Bianchi, 1997; Tannuri, 2004; Carvalho et al., 2006). Estas alterações ocorrem devido à maior taxa proliferativa, bem como hiperplasia das camadas musculares do intestino delgado (Thompson e Edgar, 2001). No entanto, esta resposta adaptativa é insuficiente, resultando em desnutrição severa e perda de peso imensuráveis quando a ressecção abrange grandes extensões do intestino delgado (Vernon e Gergeson, 2001).

Pequenos segmentos remanescentes de intestino delgado, com extensão de 15 cm ou 20 cm, são passíveis de adaptação em longo prazo. Nas crianças com alguma extensão de intestino delgado remanescente, verifica-se que ocorre significativa dilatação deste intestino, como um fenômeno natural de adaptação funcional (Tannuri, 2004). Segundo Haymond (1935), as ressecções de até um terço de intestino a função deste mantinha-se normal. Com 50% de encurtamento do intestino seria o limite superior de segurança e as ressecções mais extensas que 50% levariam a desnutrição e morte.

Bianchi (1980) e Kim et al. (2003) descreveram técnicas cirúrgicas para alongar este segmento intestinal remanescente. No entanto, a prática mostra que estes procedimentos são complicados e ineficazes, pois não promovem aumento da área de superfície de absorção de nutrientes (Tannuri, 2004).

2.2 Sistema Nervoso do Trato Gastrointestinal

O controle do sistema nervoso do trato gastrointestinal (TGI) é complexo e a inervação é formada por um componente extrínseco e outro intrínseco. A inervação extrínseca é representada pelos nervos simpáticos e parassimpáticos do sistema nervoso autônomo (SNA) (Costa et al., 1980; Cisternas, 1999). A inervação intrínseca, também denominada sistema nervoso entérico (SNE) (Khen et al., 2004), é composta

por aproximadamente 5×10^8 neurônios. Esta compreende neurônios sensitivos, interneurônios e neurônios motores que são responsáveis pelo controle das funções do trato digestório (Costa et al., 1980; Rühl et al., 2004).

O SNE é totalmente independente do sistema nervoso central (SNC), uma vez que todos os elementos responsáveis pela motilidade intestinal, por exemplo, são exclusivos e pertencentes ao SNE (Furness et al., 2012). Este, já descrito como “cérebro do intestino”, coordena e regula as funções do trato gastrointestinal (Jain et al., 1987; Ramalho et al., 1993), atuando principalmente no controle da motilidade, absorção, secreção, e fluxo sanguíneo. Essas funções digestivas são reguladas por uma rede neural complexa, que se localiza na parede de todo o trato gastrointestinal (Furness, 2006; Alves et al., 2010).

As células do SNE estão agrupadas em dois plexos nervosos ganglionados: (1) o mientérico (Auerbach), localizado entre a camada circular interna e longitudinal externa, responsável pela regulação do músculo liso; (2) o submucoso (Meissner), situado na submucosa exercendo função de regulação do fluxo sanguíneo, além da liberação de secreções intestinais (Costa et al., 1980). Entretanto, Sanders e Smith (1986) e Herman e Bass (1990), por meio de estudos farmacológicos, demonstraram que o plexo submucoso também participa da inervação da camada muscular interna.

O SNE contém mais de 30 neurotransmissores potenciais que podem afetar as atividades dos neurônios entéricos, das camadas musculares e das células epiteliais. Esses neurotransmissores possuem atividade considerável sobre o sistema imunológico. Atuam também nas atividades do SNE por meio da secreção de vários tipos de substâncias, como por exemplo, a serotonina (Coura e Borges Pereira, 2012; Vedovato et al., 2014).

É possível identificar, por meio de análise histológica do íleo, a camada mucosa, submucosa, muscular e serosa (Zanoni et al., 1998; Seyfert, 2003; Guyton e Hall, 2006). Entre os estratos da camada muscular externa e interna, encontra-se o plexo mientérico, formado por gânglios de formatos triangulares, poligonais e alongados, além de feixes de fibras nervosas que os interconectam (Zanoni et al., 1997; 1998; Seyfert, 2003). Os neurônios do plexo mientérico, geralmente, apresentam-se formando gânglios, entretanto neurônios isolados também são observados em roedores (Gabella, 1987). Verifica-se também que os neurônios não

se encontram distribuídos de forma homogênea em torno da parede do órgão (Molinari et al.2002). No íleo, junto à porção mesentérica, verificou-se a maior densidade neuronal, em relação à porção antimesentérica (Miranda-neto et al., 2001).

Os principais efeitos do plexo mientérico quando estimulado são o aumento do tônus da parede intestinal, maior intensidade de contrações rítmicas, discreto aumento na frequência do ritmo de contração e maior velocidade de condução das ondas excitatórias ao longo da parede intestinal, resultando em movimentos mais rápidos nas ondas peristálticas (Guyton e Hall, 2006).

O plexo submucoso está relacionado, principalmente, com o controle da função no interior da parede de cada segmento do intestino. Sinais sensitivos originam-se do epitélio gastrointestinal e, a seguir, são integrados no plexo submucoso para ajudar a controlar a secreção intestinal local, absorção e contração da camada muscular interna (Guyton e Hall, 2006).

2.3 Células Neuroendócrinas

2.3.1 Células Caliciformes

A mucosa gastrointestinal é revestida por uma camada de muco, cujas principais funções são a proteção e lubrificação, mas atua também como barreira de difusão entre o lúmen e o epitélio (Peppas e Sallin, 1996; Edwards, 1997). A camada de muco formada desempenha também funções imunológicas, atuando na regulação de radicais livres e mantendo elevadas concentrações de IgA e lisozima na superfície epitelial (Atuma et al., 2001; Edsman e Hägerström, 2005).

As células caliciformes são responsáveis pela produção e manutenção dessa importante camada de muco e estão presentes por toda extensão do intestino delgado e grosso, variando em número nos diferentes segmentos, aumentando à medida que se progride em direção aos segmentos mais caudais (Specian e Oliver, 1991; Cao, 2002; Wang e Dubois, 2004; Mello et al., 2012). O número de células caliciformes, indiretamente, reflete a capacidade de secreção de muco e a atividade das glândulas intestinais (Glutzer et al., 1981; Keli et al., 1997).

Essas células sintetizam e secretam glicoproteínas de alto peso molecular, conhecidas como mucinas, além de lipídios, eletrólitos e água, sendo que esta última contribui em 95% para o peso total (Specian e Oliver, 1991; Atuma et al., 2001;

Accilli et al., 2004; Smart, 2005). As mucinas secretadas constituem parte significativa da proteção epitelial intestinal, formando um gel para manter a hidratação da superfície e reduzir o estresse mecânico (Allen e Flemstrom, 2005; Bevins e Salzman, 2011; Schneider et al., 2018).

Diferenças na quantidade de muco secretada, na proporção dos constituintes e na composição das glicoproteínas têm sido encontradas em diferentes regiões do trato gastrointestinal (Atuma et al., 2001; Accilli et al., 2004; Smart, 2005).

A avaliação da presença dessas células é possível por meio da marcação histoquímica de Periodic Acidific Schiff (PAS) (Elston e Ellis, 1998).

2.3.2 Células Serotoninérgicas

As células enteroendócrinas ou enterocromafins e os neurônios serotoninérgicos do sistema nervoso entérico são responsáveis pela produção de 95% da serotonina corporal (Gershon, 2000; Gershon, 2004; Gershon e Tack, 2007). Estas produzem e secretam muito mais serotonina em comparação aos neurônios serotoninérgicos centrais ou periféricos. Desta forma, a serotonina secretada pelas células enteroendócrinas podem ser liberadas para o lúmen gastrointestinal (Gronstard et al., 1985; Wingren et al., 1988) e para o sangue (Morrissey et al., 1977; Tamir et al., 1985; Chen, et al., 2001).

A serotonina ou 5-Hidroxitriptamina (5-HT), juntamente com as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina), compõe o grupo de neurotransmissores, sendo caracterizadas como moléculas sinalizadoras do TGI (Kim e Camilleri, 2000; Coates et al., 2006; Gershon e Tack, 2007). O SNE desempenha papel singular, podendo agir de maneira independente, mas também mantém sinapses com o SNC, por meio do nervo vago. Por meio do “eixo intestino-cérebro”, tanto o SNC, quanto o SNE podem influenciar na atividade um do outro. A 5-HT apresenta importante papel na interação entre esses dois sistemas, participando da iniciação e propagação dos reflexos entéricos, regulação da motilidade, secreção intestinal e também na ativação e condução da informação ao SNC (Gershon, 2000; Gershon, 2004; Vedovato et al., 2014).

No intestino, a serotonina é responsável por estimular as contrações peristálticas e secretórias pós-prandiais, além de ativar os nervos sensoriais

extrínsecos (Gersho e Tack, 2007). Está diretamente envolvida na regulação do TGI, porém sua participação na contração ou relaxamento muscular depende das condições existentes. Segundo Sikander (2009), a presença de serotonina correlaciona-se com melhorias no controle da motilidade intestinal.

Essa substância atua nos neurônios colinérgicos, estimulando a contração da musculatura lisa intestinal, ou, por meio da ativação de neurônios inibitórios, estimulando o relaxamento do músculo liso intestinal. Por ser uma molécula sinalizadora, quando há aumento da pressão intraluminal, as células neuroendócrinas liberam 5-HT, estimulando as fibras nervosas aferentes vagais e entéricas, iniciando assim o peristaltismo (Sikander, 2009).

2.4 Desnervação Mientérica com Cloreto de Benzalcônio (CB)

O CB é um potente detergente catiônico com propriedades bactericidas. É amplamente utilizado como antisséptico cirúrgico. Além disso, o CB é também surfactante, e possui capacidade de reduzir a tensão superficial da água (Gabella, 1989). A aplicação local do CB provoca desnervação intrínseca química do intestino (Garcia et al., 1999; Carvalho et al., 2006).

O método de desnervação intestinal consiste em promissora esperança neste sentido (Santer e Baker, 1988; Carvalho et al., 2006). Garcia et al. (1999), observaram que a desnervação ileal pelo CB 0,3%, por meio de aplicação local na serosa intestinal, provoca dilatação da alça, induzindo megaíleo com aumento da superfície absorptiva, permitindo com isso melhora nas condições pós-cirúrgicas e ganho de peso em ratos com SIC. Em estudo experimental com ratos conduzido por Carvalho et al. (2006), foi relatado que a desnervação jejunal associada à ressecção intestinal extensa mostrou-se eficaz em provocar resposta hiperplásica da mucosa, promovendo aumento da superfície de absorção e, conseqüentemente, do peso dos animais. O CB é uma substância seletiva para neurônios mientéricos, entretanto, os mecanismos pelos quais ele exerce essa seletividade são desconhecidos (Sakata et al., 1979; Fox et al., 1983).

Ramalho et al. (1994) observaram que a aplicação da solução de CB 0,3% no jejuno de ratos resultou em intensa desnervação do plexo mientérico em todos os segmentos intestinais tratados. Também foi observado por Sato et al. (1978) e Sakata

et al. (1979), que a exposição da serosa de reto e cólon de ratos à solução de CB destruíu os gânglios do plexo mientérico, não afetando o número de neurônios do plexo submucoso. Com estes achados, diversos trabalhos foram realizados com o objetivo de estudar as propriedades mecânicas da musculatura desnervada, hiperplasia epitelial, atividade mielétrica e proliferação da musculatura própria do intestino desnervado (Ramalho et al., 1994).

Ribeiro et al. (2019) sugeriram novo modelo experimental de desnervação intrínseca em íleo de ratos Wistar por meio de microinjeções intramurais de cloreto de benzalcônio 0,3% e concluíram que a técnica foi eficaz, promovendo lesão neuronal por estresse oxidativo com início em 24 horas e apoptose neuronal a partir de 48 horas após as aplicações.

A desnervação pelo CB também promove hipertrofia e hiperplasia da camada muscular lisa (Fox et al., 1983), bem como da mucosa intestinal, com um aumento significativo na taxa de produção das células das criptas (Zucoloto et al., 1991). Ainda, provoca alterações na proliferação de células epiteliais, no índice de marcação positiva para PCNA (Buttow et al., 2003) e aumento na quantidade de fibras colágenas e elásticas em modelo de megaíleo experimental (Borges et al., 2008).

A destruição dos neurônios mientéricos por ação do CB no jejuno de ratos rompe o ritmo elétrico básico, mas não a propagação do plexo mientérico, promovendo função moduladora na geração e propagação do ritmo elétrico básico (Fox e Bass, 1984).

A aplicação desta substância na serosa do cólon de ratos provoca aumento na espessura das camadas muscular longitudinal e circular, bem como do epitélio da mucosa, causada principalmente por hiperplasia e discreta hipertrofia celular (Oliveira e Velludo, 1990; Holle, 1991; Zucoloto et al., 1997). See et al. (1992), descrevem aumento de peso da mucosa intestinal, devido ao aumento dos vilos e criptas mais profundas, 45 dias após o tratamento com CB.

Carvalho et al. (2006), observaram que a desnervação mientérica do jejuno pelo CB associada à ressecção intestinal extensa acarreta melhora do ganho ponderal de peso dos animais, uma vez que ao final do período experimental os animais submetidos a ressecção intestinal e desnervação intrínseca do jejuno apresentaram peso corporal significativamente maior do que aqueles animais submetidos somente

a ressecção intestinal extensa. Este resultado ficou aquém do observado em trabalho anterior, quando desnervaram o íleo ao invés do jejuno em associação à ressecção intestinal extensa (Garcia et al., 1999). Não existe até o momento explicação definitiva sobre este aspecto, porém é possível que a resposta adaptativa do jejuno seja menor que do íleo do ponto de vista funcional, sendo necessários outros estudos para esclarecer esta possibilidade (Carvalho et al., 2006).

As soluções aquosas de CB em concentrações elevadas (10% ou mais) são irritantes para a pele, podendo provocar lesões cutâneas erosivas com necrose profunda. Concentrações baixas (0,1 a 0,5%) podem causar irritação em conjuntiva e em membranas mucosas (Gosselin et al., 1984; AMA, 1991; Rowe et al., 2009). Marks e De Leo (1992) relatam a necessidade de cautela ao utilizar esta substância em cavidades corporais. Fox, Epstein e Bass (1983) descrevem que baixas concentrações de CB não danificam a camada muscular lisa intestinal, enquanto que maiores concentrações podem romper as camadas musculares e causar inflamação e perfuração intestinal.

Gerardi-Filho et al. (2003) em estudo comparativo do efeito do CB, em diferentes solventes, aplicados sobre o cólon de ratos, observaram que o CB diluído em álcool a 70% é mais lesivo ao tecido entérico que quando diluído em solução salina 0,9%.

Complicações relacionadas ao uso do CB, por meio de aplicação local na serosa do intestino, podem ser observadas pela ocorrência de aderência de alças intestinais próximo ao local de aplicação (Gerardi-Filho et al., 2003).

Nesse contexto, muitos trabalhos têm demonstrado que a aplicação de CB provoca desnervação intrínseca do segmento tratado (Sakata et al., 1979; Fox et al., 1983; See et al., 1992; Ramalho et al., 1993; Cracco e Filogamo, 1997; Zucoloto et al., 1997; Carvalho et al., 2006; Ribeiro et al., 2019).

Mediante isso, a hipótese deste estudo é de que a desnervação com CB 0,3% intestinal pode promover alterações na população de células neuroendócrinas e, conseqüentemente, nos mecanismos referentes à manutenção fisiológica do trato gastrointestinal de pacientes portadores de SIC. A presença de células calciformes e serotoninérgicas em quantidade ideal são fundamentais para a manutenção das funções fisiológicas do intestino delgado.

Com base nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a população de células caliciformes e serotoninérgicas em pacientes portadores de SIC com e sem desnervação por microinjeções intramurais de CB 0,3% no íleo remanescente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Unesp - Câmpus de Jaboticabal - SP. Executado de acordo com as normas exigidas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Protocolo nº016529/17.

3.2 Animais

Foram utilizados 18 ratos Wistar (*Ratus norvegicus*, variação *albinus*), não isogênicos, machos, com peso vivo variando entre 350 e 450g, fisicamente hígidos, provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os animais foram mantidos em biotério da mesma instituição, em condições de temperatura ambiente constante e ciclo noite-dia de 12 horas, após período de adaptação. Foram alojados três animais por caixa, sendo estas de polipropileno com grade de aço cromado e cama de maravalha. Os animais foram alimentados com ração comercial apropriada para a espécie e água fresca e filtrada oferecidos à vontade.

Os 18 animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais, GC (Grupo Controle), GE (Grupo Enterectomia/enteroanastomose) e GECB (Grupo enterectomia/enteroanastomose com uso do CB), contendo seis animais cada.

3.3 Procedimento Anestésico

Os animais foram submetidos à jejum alimentar de seis horas antes do procedimento cirúrgico. O protocolo anestésico utilizado foi padronizado de forma a

utilizar os fármacos de mesma marca e lote em todos os grupos. Sendo este constituído por cetamina 100 mg/mL¹ (40 mg/kg/Intramuscular (IM)), xilazina 2%² (8 mg/kg/IM), acepromazina 1%³ (4 mg/kg/IM). No pós-operatório imediato foi realizada aplicação de dipirona 500 mg/ml⁴ (50 mg/kg/Subcutâneo (SC)).

3.4 Procedimento Cirúrgico

3.4.1 Grupo Controle (GC) - Animais submetidos à microinjeções intramurais de solução salina estéril 0,9%⁵

A técnica cirurgia adotada seguiu o protocolo proposto por Ribeiro et al. (2019). Após tricotomia e antissepsia da região abdominal, foi realizada laparotomia mediana ventral e posterior exposição e exteriorização do segmento ileal (Figura 1A). Após exteriorização do segmento ileal, os animais do grupo GC foram submetidos à microinjeções intramurais com utilização de seringa de 1 mL⁶ e agulha⁷ de dimensões 13 mm x 0,45 mm, em 5 cm de comprimento do segmento ileal, iniciando a partir da válvula íleo-ceco-cólica, com solução salina 0,9% (Figura 1B). As aplicações foram distribuídas em dez microinjeções em formato de espinha de peixe, sendo estas distribuídas em cinco microinjeções na lateral direita e cinco na lateral esquerda do íleo, na borda antimesentérica em direção à borda mesentérica (Figura 2). O procedimento de laparorráfia seguiu o proposto por Ribeiro et al. (2019).

¹ Cetamin 10% - Syntec, Hortolândia-SP

² Xilazina 2% - Syntec, Hortolândia-SP

² Acepram 1% - Vetnil, Louveira-SP

³ Analgex – Agener, São Paulo-SP

⁵ Solução Salina Estéril 0,9% - Eurofarma, São Paulo-SP

⁶ Seringa SR 1 mL – Saldanha Rodrigues – Manaus, AM

⁷ Agulha SR – Saldanha Rodrigues – Manaus, AM

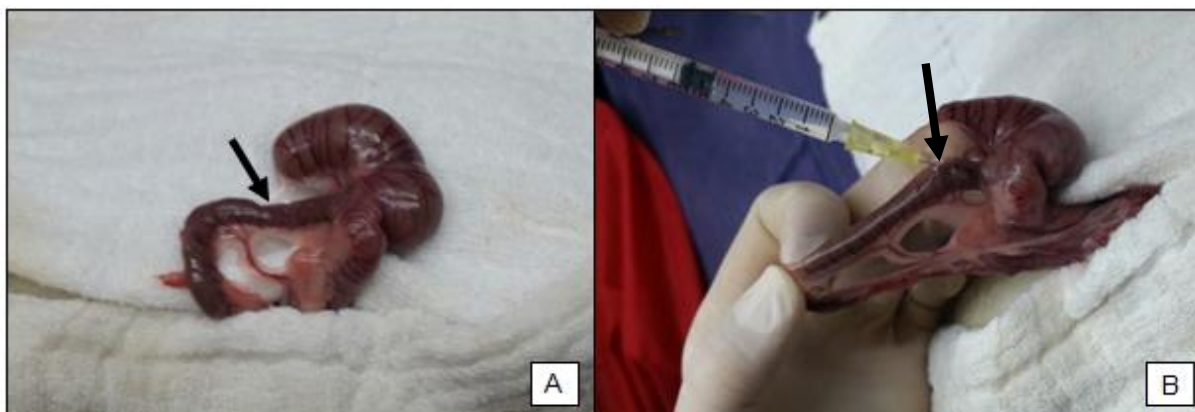


Figura 1. Imagens de procedimento cirúrgico para realização de microinjeções intramurais de solução salina estéril 0,9% em ratos Wistar. Em A, exposição e exteriorização do segmento ileal (seta). Em B, microinjeções na camada muscular nos 5 cm aborais do segmento íleal (seta). Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2018. Fonte: Ribeiro et al. (2019).

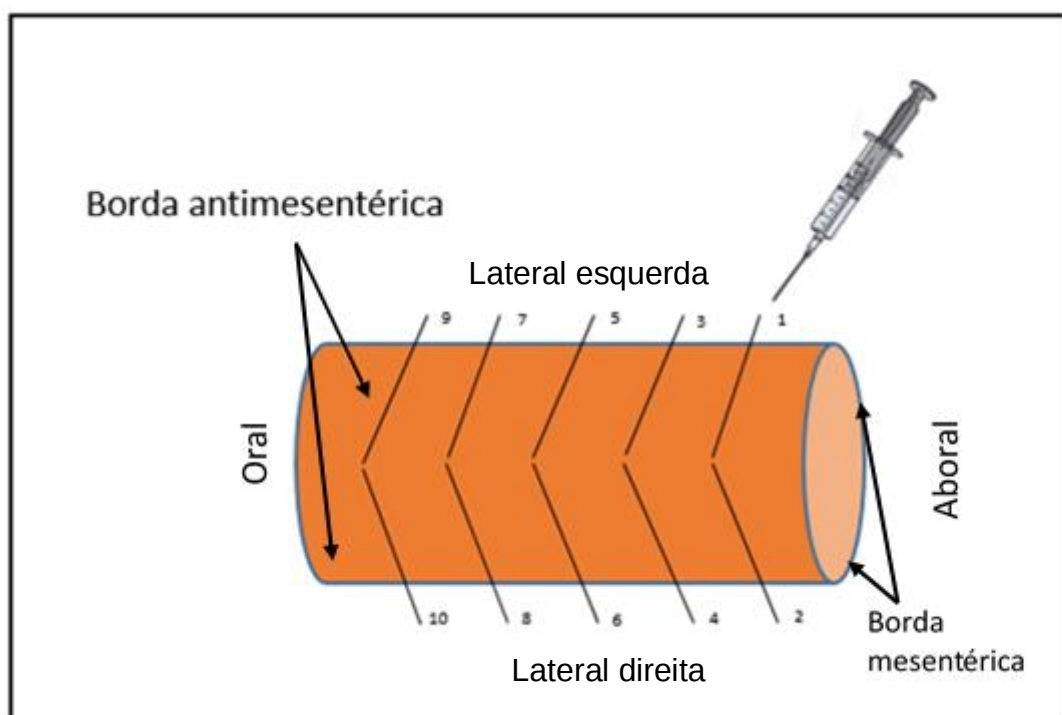
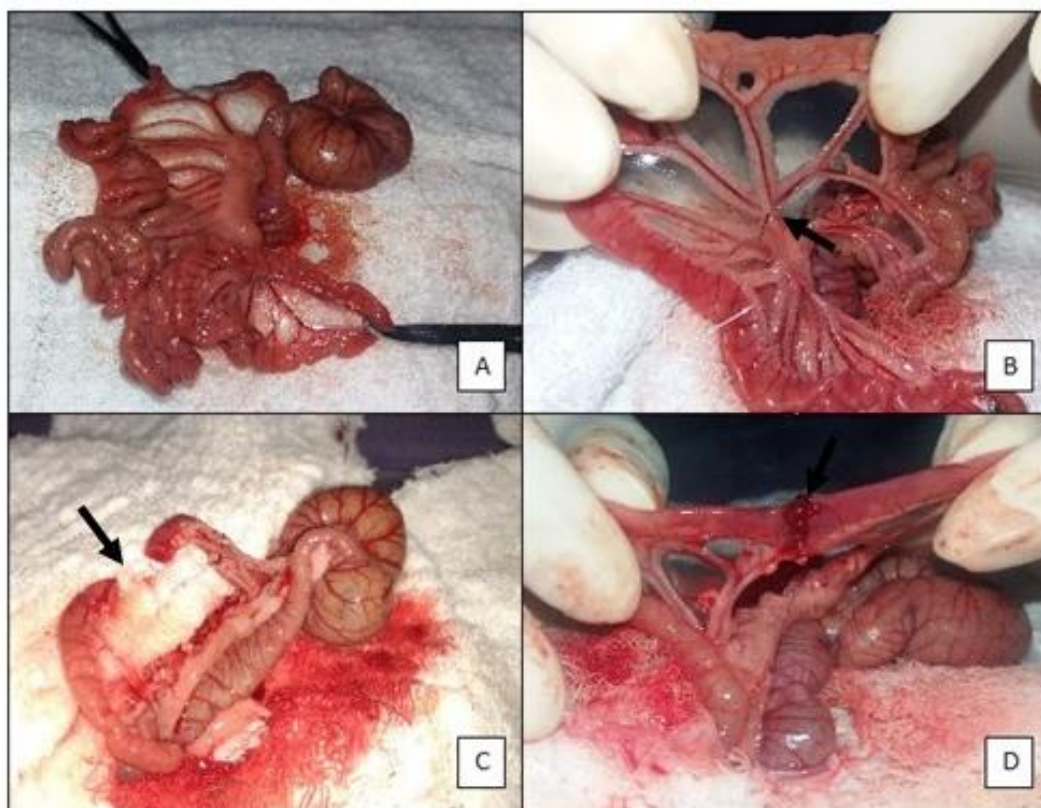


Figura 2. Desenho esquemático das microinjeções intramurais aplicadas no segmento ileal de ratos no aspecto dorso-ventral. Realizadas dez microinjeções em formato de espinha de peixe, sendo estas distribuídas em cinco microinjeções na lateral direita e cinco na lateral esquerda do íleo, na borda antimesentérica em direção à borda mesentérica. RIBEIRO et al. (2019).

3.4.2 Grupo Enterectomia e enteroanastomose (GE) - Animais submetidos a enterectomia extensa e enteroanastomose.

Após tricotomia e antissepsia da região abdominal, foi realizada laparotomia mediana ventral e posterior exposição e exteriorização dos segmentos intestinais: duodeno, jejuno e íleo (Figura 3A). Ato contínuo, foi realizada ligadura das artérias mesentéricas com nylon 5-0 da área ser removida (Figura 3B). Posteriormente, realizou-se a enterectomia de 80% do intestino delgado, ressecando o segmento jejunal (Figura 3C), com auxílio de clamps intestinais para evitar o extravasamento de conteúdo fecal. Em seguida, foi realizada a enteroanastomose termino-terminal do jejuno remanente ao íleo por meio de sutura simples contínua, abrangendo todas as camadas da parede intestinal, em um único plano, realizado em cada borda lateral do seguimento a ser suturado (Figura 3D). Para isso, foi utilizado fio nylon 6-0. O teste de integridade da sutura foi realizado para garantir o não extravasamento de conteúdo. Após, foi realizada lavagem abundante do sítio cirúrgico com solução fisiológica 0,9% e omentalização da enteroanastomose. A laparorrafia foi realizada com nylon 4-0⁸, padrão de sutura “Sultan” na musculatura. Para o subcutâneo foi utilizado nylon 4-0, padrão de sutura simples contínua e para síntese da pele utilizou-se nylon 4-0, padrão ponto simples separado.



⁸ Nylon 4-0 – Shalon, Goiânia-GO

Figura 3. Imagens de procedimento cirúrgico para realização de enterectomia de 80% do intestino delgado e enteroanastomose termino-terminal em ratos Wistar. Em A, exposição e exteriorização de todo o intestino delgado. Em B, ligadura da artéria mesentérica (seta). Em C, ressecção de 80% do segmento jejunal (seta). Em D, anastomose termino-terminal do jejuno remanescente com o íleo (seta). Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2018.

3.4.3 Grupo Enterectomia e enteroanastomose com cloreto de benzalcônio 0,3%⁹ (GECB) - Animais submetidos a enterectomia extensa e enteroanastomose e microinjeções intramurais de CB.

Os animais do GECB foram submetidos ao mesmo procedimento do GE, exceto pela aplicação por microinjeções de CB 0,3% nos 5 cm de comprimento do segmento ileal, iniciando a partir da válvula íleo-ceco-cólica, após a realização da enteroanastomose (Figuras 4A e 4B). A aplicação de CB seguiu os princípios e técnica utilizada por Ribeiro et al. (2019). A solução de CB foi previamente preparada e diluída em concentração 0,3% no dia do procedimento e armazenada em recipiente estéril e aplicada da mesma maneira que no GC. Após este procedimento, este segmento ileal foi submetido à lavagem com aplicação profusa de solução salina 0,9%, com auxílio de uma seringa de 10 mL¹⁰ e reposicionado em seu local anatômico. A laparorrafia foi realizada da mesma maneira que no GC e GE.

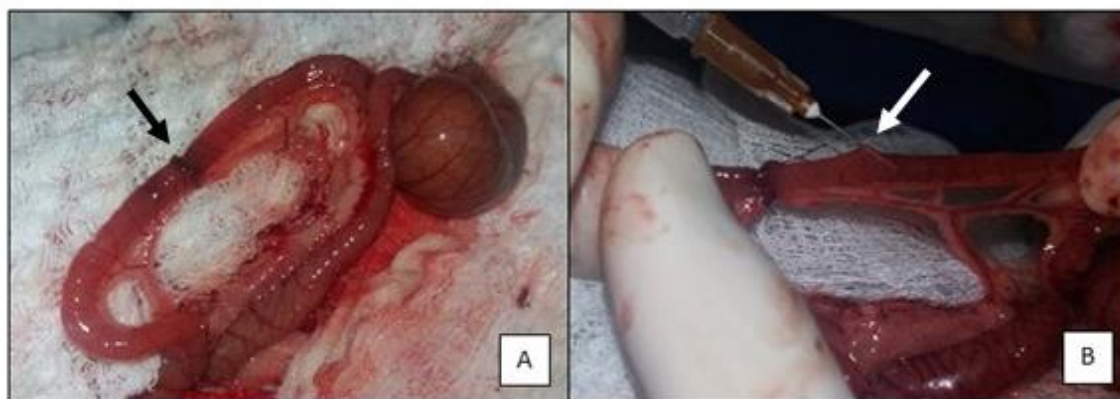


Figura 4. Imagens de procedimento cirúrgico de enterectomia de 80% do intestino delgado e enteroanastomose termino-terminal em ratos Wistar. Em A, anastomose término-terminal do jejuno remanescente com o íleo (seta). Em B, microinjeções de CB 0,3% intramural no íleo. Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2018.

⁹ Cloreto de Benzalcônio - Sigma-Aldrich Brasil Ltda. – São Paulo, SP

¹⁰ Seringa SR 10 mL – Saldanha Rodrigues – Manaus, AM

3.5 Avaliação indireta do estado nutricional

Para avaliação indireta do estado nutricional, os pesos dos animais foram verificados no dia do procedimento cirúrgico e ao final do experimento, com 30 dias de pós-operatório.

3.6 Pós-operatório e Eutanásia

O manejo pós-operatório foi realizado da mesma forma tanto para os animais do GC, quanto para os animais do GE E GEBC, com o objetivo de mantê-los nas mesmas condições de manejo e estresse, visando minimizar ao máximo as variáveis ambientais.

No pós-operatório todos os animais receberam dipirona e enrofloxacina, ambos a cada 12 horas, pela via subcutânea, nas doses de 50mg/kg e 5mg/kg, respectivamente. Foram alojados em suas respectivas gaiolas, três animais por caixa, devidamente forradas com maravalha. Alimento e água foram oferecidos à vontade, após jejum de seis horas no pós-operatório imediato. Os animais foram observados e mantidos em tais condições até a eutanásia programada, com 30 dias de pós-operatório. Os roedores foram colocados um a um em caixa transparente, hermeticamente fechada, contendo algodão embebido com isofluorano em sobredose. A movimentação dos animais foi observada e, a seguir, pela ausência de reflexo corneal e batimentos cardíacos foi confirmado o óbito.

Após o óbito, iniciou-se a coleta de material para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica.

3.7 Coleta e processamento do material para análise microscópica

Após eutanásia foi realizada necropsia de todos os animais. Foram coletadas amostras do jejuno e íleo. Essas estruturas foram localizadas, exteriorizadas, removidas e cuidadosamente estendidas em uma placa de vidro para realização dos cortes transversais em anéis. As amostras foram então armazenadas em cassetes, previamente identificados, que foram imediatamente imersos em solução de formol a 10% para fixação do material por um período de 48 horas. Depois de fixadas foram submetidas à desidratação através de submersão em crescentes concentrações de

álcoois. Os materiais foram, então, submetidos a banhos de xilol 100% para que ocorresse sua diafanização. As amostras processadas foram incluídas em parafina para a realização dos cortes histológicos para confecção das lâminas. Através de um micrótomo rotativo, os blocos de parafina contendo as amostras de jejuno e íleo foram cortados a uma espessura de 4 µm (micrômetros), aderidos às lâminas silanizadas e levados à estufa aquecida a 60°C para otimização da adesão do material na lâmina. As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas anteriormente à técnica de imunohistoquímica ou coloração PAS para análise histoquímica ou H&E para análise histopatológica, PAS para morfometria das células caliciformes, e anticorpo anti-serotoninérgicos para avaliação das células serotoninérgicas.

3.7.1 Avaliação Histopatológica

Após processamento das lâminas, coradas por H&E, foi realizada avaliação histológica da parede do jejuno e do íleo e descartar presença de lesões teciduais.

3.7.2 Avaliação Histoquímica

Após processamento das lâminas, coradas com PAS /Alcian Blue, foi realizada a avaliação quantitativa das células caliciformes. A contagem celular foi realizada sempre pelo mesmo patologista.

3.7.3 Avaliação Imunohistoquímica

Após processamento das lâminas, foi realizado o estudo quantitativo das células neuroendócrinas serotoninérgicas por imunomarcção predominantemente citoplasmática de anticorpo-antiserotoninérgico. A contagem celular foi realizada sempre pelo mesmo patologista.

3.7.4 Reações Imunohistoquímicas

Para processamento da técnica, foram realizados cortes transversais histológicos dos segmentos de jejuno e íleo. Para a marcação dos cortes histológicos, estes foram aderidos em lâminas silanizadas, desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol até água. A recuperação antigênica foi

realizada em tampão citrato pH 6,0 (em panela de vapor) por 20 minutos. Para inibir reações com peroxidases teciduais, peróxido de hidrogênio a 3% foi adicionado sobre as lâminas. Para a realização do bloqueio de ligações teciduais inespecíficas – o que poderia causar marcação inespecífica, utilizou-se soro normal de cavalo diluído em solução-tampão de fosfato (PBS) pH 7,4 (PBS), em uma concentração de 10%. Entre cada etapa as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS para evitar formação de precipitados.

A incubação dos cortes com o anticorpo primário, anti-serotonina, Novocastra (NCL-SEROTp, Rabbit Polyclonal), foi realizada em câmara úmida e escura, “*overnight*”, na diluição 1/100. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado durante 30 minutos e, após nova lavagem, foram incubadas com polímero conjugado também por 30 minutos. Para revelação, as lâminas receberam solução reagente contendo o cromógeno DAB (3,3'- diaminobenzidina), durante 1 a 3 minutos, até o aparecimento de precipitado de coloração marrom – atribuída à redução do DAB pela reação. Todos os reagentes são disponibilizados com PicTure™ Max PolymerDetection Kit (Invitrogen). As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris diluída por cerca de 1 minuto e desidratadas e diafanizadas novamente. Para montagem das lâminas, utilizou-se Entelan.

3.8 Análise Estatística

Foi utilizado o programa GraphPad PRISM® 6 para Windows, Versão 6.01. Os resultados das contagens de células caliciformes e serotoninérgicas serão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. A comparação da média amostral foi feita entre os grupos GC, GE e GEBC nos segmentos jejunal e ileal. Para isso, foi realizado o teste ANOVA não paramétrico, com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$. A comparação dos pesos dos animais foi feita entre os grupos GC, GE e GEBC por meio de teste não paramétrico Mann Whitney, com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitos estudos demonstram que a aplicação de CB provoca desnervação intrínseca do segmento tratado (Sakata et al., 1979; Fox et al., 1983; See et al., 1992; Ramalho et al., 1993; Cracco e Filogamo, 1997; Zucoloto et al., 1997; Carvalho et al., 2006; Ribeiro et al., 2019), podendo promover alterações na população de células neuroendócrinas e, conseqüentemente, nos mecanismos referentes à manutenção fisiológica do trato gastrointestinal.

Mediante isso, a hipótese deste estudo é de que a desnervação com CB 0,3% intestinal possa promover alterações na população de células neuroendócrinas e, conseqüentemente, nos mecanismos referentes à manutenção fisiológica do trato gastrointestinal de pacientes portadores de SIC. Com base nesse contexto, apresentamos o estudo da população de células caliciformes e serotoninérgicas em pacientes portadores de SIC experimental com e sem desnervação por microinjeções intramurais de CB 0,3% no íleo remanescente.

4.1 Avaliação do estado nutricional

Os animais dos grupos GC e GECB ao final do experimento, observou-se ganho ponderal semelhante, havendo manutenção do peso desses animais. Porém, o GE apresentou perda de peso estatisticamente significativa quando comparado aos grupos GC e GECB (Tabela 1).

Tabela 1. Peso corporal e ganho ponderal dos animais durante o período experimental. *Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2020.*

	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Ganho Ponderal (g)
GC	308 ± 22	330 ± 18	22 ± 4
GE	312 ± 13	271 ± 69 **	-41 ± 56
GECB	311 ± 26	329 ± 37 *	18 ± 11

GC – Grupo Controle; GE – Grupo Enterectomia/Enteroanastomose; GECB – Grupo Enterectomia/Enteroanastomose com CB.

* O teste estatístico de Mann Whitney resultou em $p < 0,01$ (estatisticamente significativo), quando comparado o GECB ao GE.

** O teste estatístico de Mann Whitney resultou em $p < 0,01$ (estatisticamente significativo), quando comparado o GE aos demais grupos.

Os animais do grupo GE apresentaram perda de peso após 30 dias de pós-operatório, demonstrando os efeitos da má absorção intestinal causada pela síndrome do intestino curto. No grupo GEGB foi possível observar que a desnervação mientérica com CB 0,3% no íleo teve impacto no peso final dos animais quando comparado com o grupo GE. Entretanto, quando comparados os grupos GC ao GEGB não houve diferença estatisticamente significativa. Com esses achados, pode-se evidenciar que a ação do CB 0,3% pode favorecer os pacientes submetidos à extensa ressecção intestinal (GEGB), porém, não foi suficiente para aumentar o ganho de peso e propiciar reversão completa do quadro de síndrome do intestino curto. Estes dados ficaram aquém daqueles observados por Garcia et al., (1999) e por Carvalho et al., (2006) na desnervação do jejuno, ao invés do íleo.

Segundo Garcia et al., (1999), a desnervação mientérica provoca aumento da área das camadas mucosa e muscular, bem como do diâmetro do jejuno. Trata-se, portanto, de uma acentuação da resposta hiperplásica da mucosa jejunal como consequência da ressecção intestinal, resposta semelhante à da parede ileal foi observada por Carvalho et al., (2006).

4.2 Contagem de células caliciformes entre os diferentes grupos no jejuno e íleo.

Para contagem de células caliciformes, foi utilizada a coloração histoquímica de PAS, nos segmentos jejunais e ileais entre os diferentes grupos: GC, GE e GEGB. Tal método de quantificação é sugerido também por Elston e Ellis (1998).

A média do número de células caliciformes não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos GC, GE e GEGB tanto no jejuno, quanto no íleo (Tabela 1 e Figura 6). Observa-se que os animais do GEGB apresentaram diminuição no número dessas células nos dois segmentos intestinais estudados, porém, não apresentaram diferença significativa (Tabela 2 e Figuras 5, 6E e 6F).

Tabela 2. Células caliciformes coradas pelo marcador histoquímico PAS nos segmentos jejunais e ileais de ratos Wistar nos diferentes grupos estudados. Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2020.

Média / Desvio Padrão				
Células Caliciformes				
	GC	GE	GECB	Significância (p=)
Jejuno	12,67 ± 0,82	13,00 ± 1,10	8,17 ± 1,17	0,732
Íleo	5,50 ± 1,22	6,67 ± 1,63	3,50 ± 1,05	0,622

GC – Grupo Controle; GE – Grupo Enterectomia/Enteroanastomose; GECB – Grupo Enterectomia/Enteroanastomose com CB.

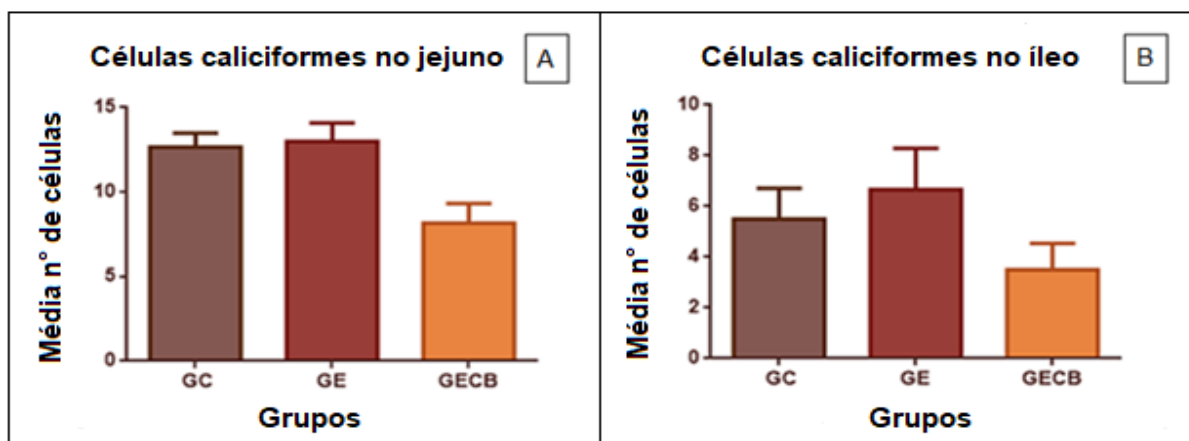


Figura 5. Comparação da contagem caliciformes nos diferentes segmentos intestinais entre os diferentes grupos. Em A, comparação entre os grupos GC, GE e GECB no jejuno. Em B, comparação entre os grupos GC, GE e GECB no íleo. GC – Grupo Controle; GE – Grupo Enterectomia/Enteroanastomose; GECB – Grupo Enterectomia/Enteroanastomose com CB. Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2020.

O número de células caliciformes, indiretamente, reflete a capacidade de secreção de muco e a atividade das glândulas intestinais (Glutzer et al., 1981; Keli et al., 1997). As células caliciformes são responsáveis também pela produção e manutenção da camada de muco e estão presentes por toda extensão do intestino delgado e grosso. (Specian e Oliver, 1991; Cao, 2002; Wang e Dubois, 2004; Mello et

al., 2012). São fundamentais para proteção, lubrificação e desempenho de funções imunológicas da superfície epitelial intestinal (Peppas e Sallin, 1996; Edwards, 1997; Atuma et al., 2001; Edsman e Hägerström, 2005).

O muco possui, ainda, propriedades bactericidas, pois reduz a população bacteriana em contato direto com a superfície epitelial, dificultando a translocação para o meio interno (Corfield et al., 2000; Finnie et al., 1995; Gaudier et al., 2009; Hoebler et al., 2006). Anormalidades na secreção, composição e padrão de distribuição das mucinas nas criptas intestinais vêm sendo demonstradas em diversas doenças inflamatórias que acometem o intestino (Filipe, 1969).

Nesse contexto, a preservação das células caliciformes e a qualidade da produção de muco, são fatores essenciais para a manutenção de suas funções no trato intestinal.

No presente estudo, a desnervação ileal por CB 0,3% não foi suficiente para provocar alteração estatisticamente significativa na população dessas células em nenhum dos grupos estudados. Tal resultado sugere que o método é seguro no que tange a não destruição de células fundamentais para manutenção das funções intestinais.

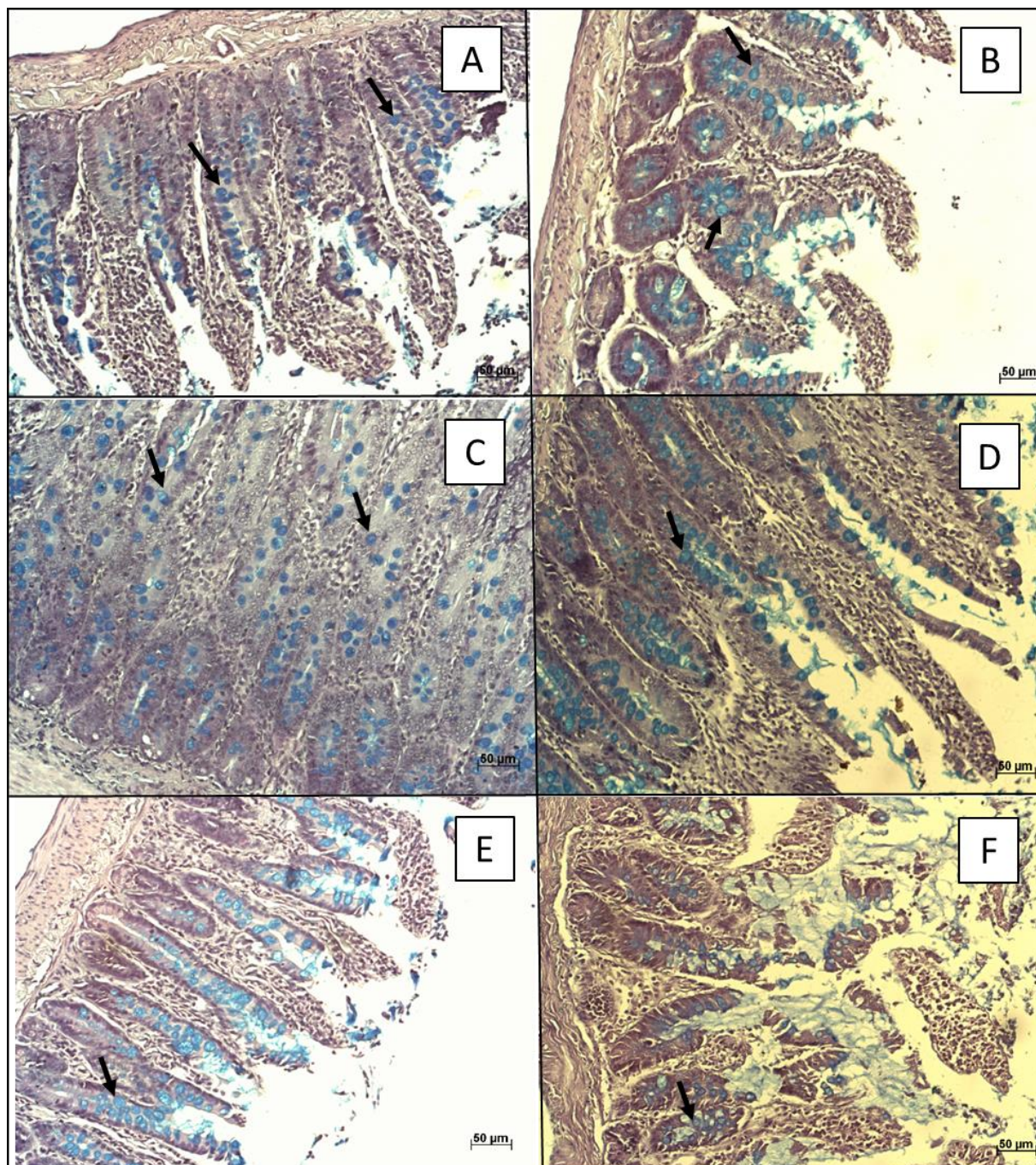


Figura 6. Fotomicrografias histoquímica da porção intestinal estudada, aumento de 200x. Em A, C e E estudo dos segmentos jejunais e B, D e F estudo dos segmentos ileais. Em A (GC jejunal) observa-se moderada marcação de PAS nas células caliciformes (setas). Em B (GC ileal), em C (GE jejunal), em D (GE ileal), em E (GEBC jejunal) e F (GECB ileal) observa-se padrões de marcação de PAS nas células caliciformes semelhantes entre si (setas). Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2020.

4.3 Contagem de células serotoninérgicas entre os diferentes grupos no jejuno e íleo.

Para contagem das células serotoninérgicas, foi realizada análise quantitativa por meio da imunomarcacão com anticorpo anti-serotoninérgico nos segmentos jejunais e ileais entre os diferentes grupos: GC, GE e GECB.

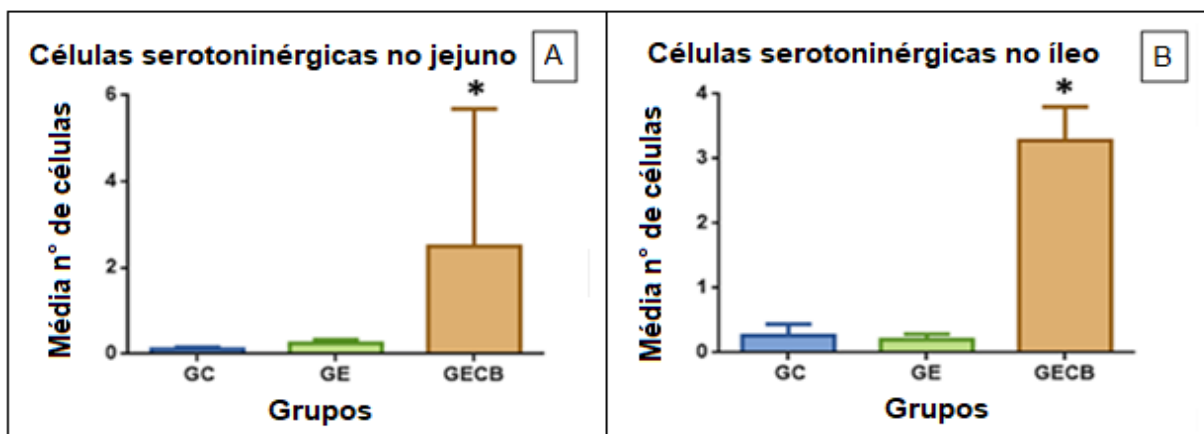
Os GC e GE apresentaram baixa marcação positiva para serotonina na mucosa do jejuno e íleo. Em contrapartida, o GECB apresentou intensa marcação positiva para serotonina, demonstrando aumento das células serotoninérgicas no tecido após ressecção intestinal extensa e desnervação do íleo com CB. (Tabela 3 e Figuras 7, 8E e 8F).

Tabela 3. Imunomarcacão do anticorpo anti-serotoninérgico nas células serotoninérgicas dos segmentos jejunais e ileais de ratos Wistar nos diferentes grupos estudados. *Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2020.*

Média / Desvio Padrão				
Células Serotoninérgicas				
	GC	GE	GECB	Significância (p=)
Jejuno	0,12 ± 0,04	0,25 ± 0,08	1,20 ± 0,20	<0,0001 *
Íleo	0,27 ± 0,18	0,20 ± 0,09	3,28 ± 0,52	<0,0016 *

* Nível de significância $p < 0,05$

GC – Grupo Controle; GE – Grupo Enterectomia/Enteroanastomose; GECB – Grupo Enterectomia/Enteroanastomose com CB.



* Nível de significância $p < 0,05$.

Figura 7. Comparação da contagem de células serotoninérgicas nos diferentes segmentos intestinais entre os diferentes grupos. Em A, comparação entre os grupos GC, GE e GECB no jejuno. Em B, comparação entre os grupos GC, GE e GECB no íleo. GC – Grupo Controle; GE – Grupo Enterectomia/Enteroanastomose; GECB - Grupo Enterectomia/Enteroanastomose com CB. Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2020.

A serotonina apresenta-se como importante neurotransmissor envolvido na interação entre o SNE o SNC, essencial na regulação da sensação de motilidade e secreção intestinal e também atua na ativação e condução da informação ao SNC (Gershon, 2000; Gershon, 2004; Vedovato et al., 2014).

Essa substância atua nos neurônios colinérgicos, estimulando a contração da musculatura lisa intestinal, ou, por meio da ativação de neurônios inibitórios, estimulando o relaxamento do músculo liso intestinal. Por ser uma molécula sinalizadora, quando há aumento da pressão intraluminal, as células neuroendócrinas liberam 5-HT, estimulando as fibras nervosas aferentes vagais e entéricas, iniciando assim o peristaltismo (Sikander, 2009), sendo este mecanismo essencial para o funcionamento saudável do trato gastrointestinal.

Pacientes portadores de SIC podem apresentar redução importante do segmento intestinal e, conseqüentemente, em suas funções (Figuerola et al., 1996; Carvalho et al., 2006; Werf et al., 2015). No presente estudo, foi observado aumento significativo das células serotoninérgicas após desnervação ileal com CB 0,3%. Sugere-se que, com o aumento da população dessas células, poderá ocorrer aumento da serotonina na mucosa intestinal, portanto, podendo auxiliar nas funções

promovidas por elas, favorecendo o peristaltismo intestinal. Esse fato, corrobora Sikander (2009), o qual aponta que a presença de serotonina se correlaciona com melhorias no controle da motilidade intestinal.

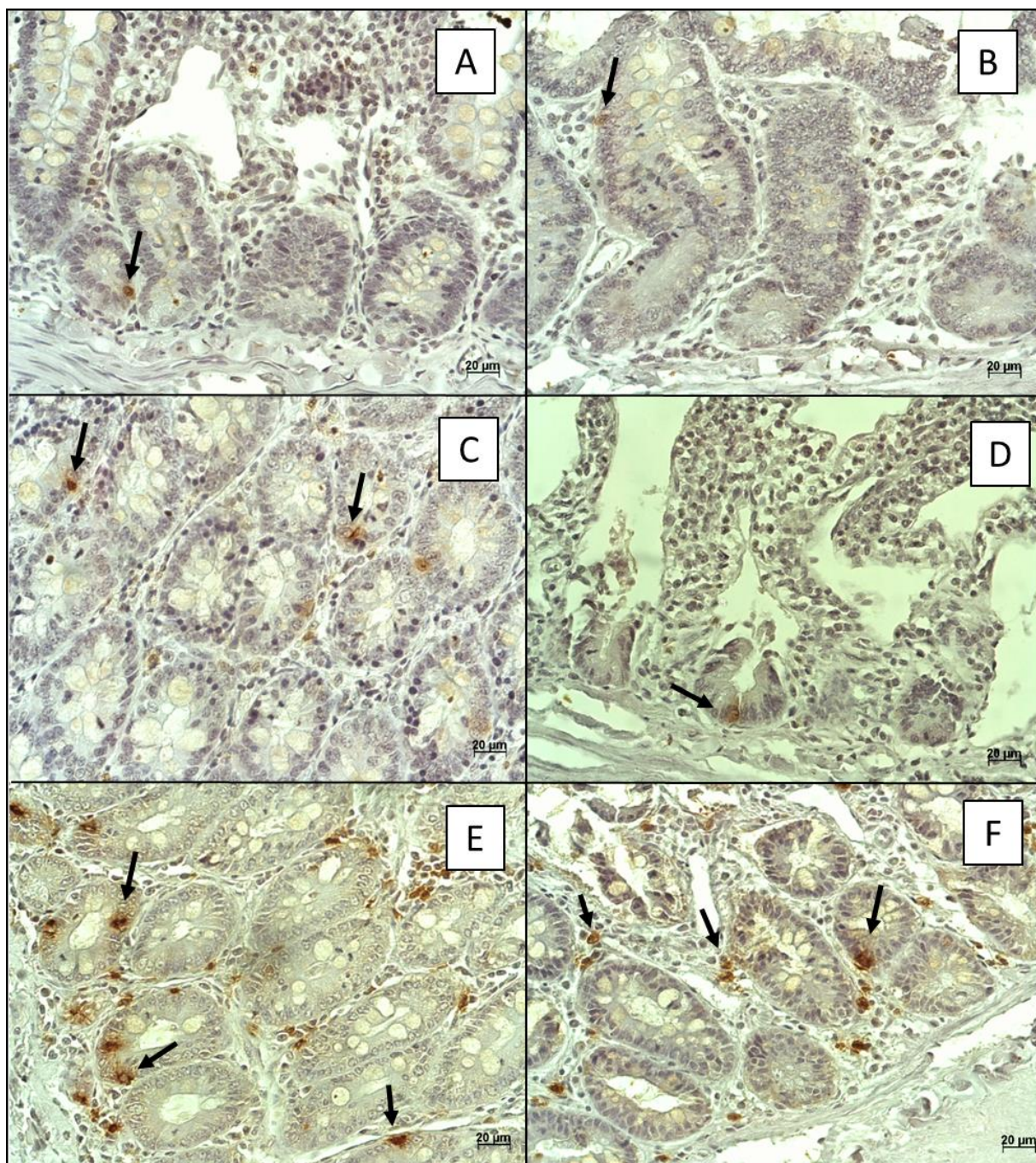


Figura 8. Fotomicrografias imuno-histoquímica da porção intestinal estudada, aumento de 200x. Em A, C e E estudo dos segmentos jejunais e B, D e F estudo dos segmentos ileais. Em A (GC jejunal) e B (GC ileal), observa-se discreta imunomarcção citoplasmática do anticorpo anti-serotoninérgico em células serotoninérgicas (setas). Em C (GE jejunal) e D (GE ileal) observa-se discreta a moderada imunomarcção citoplasmática do anticorpo anti-serotoninérgico em células serotoninérgicas (setas). Em E (GECB jejunal) e F (GECB ileal) observa-se intensa

imunomarcção citoplasmática do anticorpo anti-serotoninérgico em células serotoninérgicas (setas). Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP – FMRP, 2020.

5 CONCLUSÃO

Nas condições em que este trabalho fora conduzido é possível concluir que o tratamento com microinjeções intramurais de CB 0,3% no íleo de ratos Wistar acarreta manutenção do peso dos animais submetidos a ressecção intestinal extensa. Conclui-se também que a desnervação não é suficiente para alterar a população de células caliciformes nos segmentos jejunais e ileais. Entretanto, foi capaz de promover aumento da população de células serotoninérgicas, o que por sua vez, pode auxiliar no aumento das funções promovidas pela serotonina no intestino, auxiliando no trânsito intestinal de pacientes com SIC.

6 REFERÊNCIAS

ACCILLI, D.; MENGHI, G.; BONACUCINA, G.; DI MARTINO, P.; PALMIERI, G.F. Mucoadhesion dependence of pharmaceutical polymers on mucosa characteristics. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.22, p.225-234, 2004.

ALLEN, A.; FLEMSTROM, G. Barreira de bicarbonato de muco gastroduodenal: proteção contra ácido e pepsina. **Sou. J. Physiol Cell Physiol.** V. 288, p.1-19 2005.

ALVES, E. P. B. Immunohistochemical study of vasoactive intestinal peptide (VIP) enteric neurons in diabetic rats supplemented with L-glutamine. **Nutritional Neuroscience**, London, v. 13, n. 1, p. 43-51, 2010.

AMA: American Medical Association. Drug Evaluations Annual: **American Medical Association**, Chicago, p. 1440, 1991.

ATUMA, C.; STRUGALA, V.; ALLEN, A.; HOLM, L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.280, p.922-929, 2001.

BEVINS, C.L.; SALZMAN. Células NH Paneth, peptídeos antimicrobianos e manutenção da homeostase intestinal. **Nat. Rev. Microbiol.** V.9, p.356-368, 2011.

BIANCHI, A. Intestinal loop lengthening: a technique for increasing small intestinal length. **Journal of Pediatric Surgery**, Philadelphia, v. 15, n. 2, p. 145-151, 1980.

BIANCHI, A. Longitudinal intestinal lengthening and tailoring: results in 20 children. **Journal of the Royal Society of Medicine**, London, v. 90, n. 8, p. 429-432, 1997.

BORGES, L. F.; CALDINI, E. G.; BATTLHENER, C. N.; GARCIA, S. B.; ZUCOLOTO, S.; MONTES, G. S.; TABOGA, S. R. Differential distribution of some extracellular matrix fibers in an experimentally denervated rat megaileum. **Micron**, Amsterdam, v. 39, n. 4, p. 397-404, 2008.

BUTTOW, N. C.; ZUCOLOTO, S.; ESPREAFICO, E. M.; GAMA, P.; ALVARES, E. P. Substance P enhances neuronal area and epithelial cell proliferation after colon denervation in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, Dordrecht, v. 49, n. 10, p. 2069-2076, 2003.

CAO, Y.; PRESCOTT, S. M. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. **Journal of Cell Physiology**, v.190, n.3, p.279-286, 2002.

CARVALHO, C. E. V.; BASILE, F. V. A.; VESPÚCIO, M. V. O.; IGLESIAS, A. C. G.; GAVA, N. F.; GARCIA, S. B. Efeitos da desnervação intrínseca do jejuno após enterectomia extensa na síndrome do intestino curto em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, n. 1, 2006.

CHEN, J. J.; LI Z.; PAN, H.; MURPHY, D.L.; TAMIR, H.; KOEPESELL, H.; GERSHON, M.D. Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter (SERT): Abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. **J. Neurosci.** v. 21, p. 6348-6361, 2001.

CISTERNAS, J. R. Fisiologia do estômago. In: DOUGLAS, C. R. **Tratado de Fisiologia Aplicada à Ciência da Saúde**. 4. ed. São Paulo: 1999.

COATES, M. D.; JOHNSON, B.; GREENWOOD-VAN MEERVELD.; MAWE, G.M. Effects of serotonin transporter inhibition on gastrointestinal motility and colonic sensitivity in the mouse. **Neurogastroenterol. Motil.** v. 18, p. 464- 471, 2006.

CORFIELD, A.P. MYERSCOUGH, N. LONGMAN, R. SYLVESTER, P. ARUL, S. PIGNATELLI, M. Mucins mucosal protection in the gastrointestinal tract: **new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease**. V.47(4), p.589-94., 2000.

COSTA, M.; FURNESS J. B.; BUFFA, R.; SAID, S. I. Distribution of enteric nerve cell bodies and axons showing immunoreactivity for vasoactive intestinal polypeptide in the guinea-pig intestine. **Neuroscience**, Oxford, v .05, n. 3, p. 587-596, 1980.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasília, v. 45, n. 3, p. 286 - 296, 2012.

CRACCO, C.; FILOGAMO, G. Neuronal and non-neuronal plasticity in the rat following myenteric denervation. **Advances in experimental medicine and biology**, New York, v. 429, p. 159-169, 1997.

EDSMAN, K.; HÄGERSTRÖM, H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.57, p.3-22, 2005.

EDWARDS, C. Physiology of the colorectal barrier. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.28, n.2, p.173-190, 1997.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histological grade. **Systemic Pathology—the Breast**. 3rd. ed. London: Churchill and Livingstone, p. 365– 384, 1998.

FIGUEROA, C. R.; HARRIS, P. R.; BIRDSOING, E.; FRANKLIN, F. A.; GEORGESON, K. E. Impact of the intestinal lengthening on the nutritional outcome for children with the short bowel syndrome. **Journal of pediatric surgery**, Philadelphia, v. 31, n. 7, p. 912-916, 1996.

FILIPE, M.I. Value of histochemical reactions for mucosubstances in the diagnosis of certain pathological conditions of the colon and rectum. *Gut*, v.10(7), p.577-86. 1969.

FINNIE, I.A. DWARAKANATH, A.D. TAYLOR, B.A. RHODES, J.M. Colonic mucins synthesis is increased by sodium butyrate. **Gut**, v.36(1), p.93-9, 1995.

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, n. 3, p. 572-577, 1984.

FOX, D. A.; EPSTEIN, M. L.; BASS, P. A. U.L. Surfactants selectively ablate enteric neurons of the rat jejunum. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 227, n. 2, p. 538 – 544, 1983.

FURNESS, J. B.; HIND, A. J.; NGUI, K.; ROBBINS, H. L.; CLERC, N.; MERROT, T.; POOLE, D. P. The distribution of PKC isoforms in enteric neurons, muscle and interstitial cells of the human intestine. **Histochemistry and cell biology**, Berlin, v. 126, n. 5, p. 537-548, 2006.

FURNESS, J.; RIVERA, L.; THACKER, M.; PONTELL, L.; FRUGIER, T. Effects of ischemia/reperfusion on the enteric nervous system and intestine. **Neurogastroenterology & Motility**, U.S.A., v. 24, p. 8, 2012.

GABELLA G. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 96, n. 6, p. 1487-1493, 1989.

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

GARCIA, S. B.; KAWASAKY, M. C.; SILVA, J. C. F.; GARCIA, R. A. C.; BOVO, T. J.; IGLESIAS, A. C.; ZUCOLOTO, S. Intrinsic myenteric denervation: a new model to increase the intestinal absorptive surface in short-bowel syndrome. **Journal of Surgical Research**, New York, v. 85, n. 2, p. 200-203, 1999.

GAUDIER, E. RIVAL, M. BUISINE, M.P. ROBINEAU, I. HOEBLER, C. Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. **Physiol Res**. V. 58(1), p.111-9, 2009.

GERARDI-FILHO, V. A. **Estudo comparativo do efeito do cloreto de benzalcônio, em diferentes solventes, aplicados sobre o cólon de ratos**. 2003. Dissertação (Doutorado em Medicina) - Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2003.

GERSHON, M. D. 5-HT (serotonin) physiology and related drugs. **Curr. Opin. Gastroenterol**. v. 16, p. 113-120, 2000.

GERSHON, M. D. Review article: serotonin receptors and transporters – roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 3-14, 2004.

GERSHON, M. D.; TACK, J. The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders. **Gastroenterology**, v. 132, p. 397-414, 2007.

GLOTZER, D.J.; GLICK, M.E.; GOLDMAN, H. Proctitis and colitis following diversion of fecal stream. **Gastroenterology**. v. 80, n.3, p. 438-41, 1981.

GOSSELIN, R. E.; SMITH, R. P.; HODGE, H. C. **Clinical toxicology of commercial products**. Williams and Wilkins, 1984.

GRONSTAD, K. O. , DEMAGISTRIS, L.; DAHLSTRÖM, A., NILSSON, O., PRICE, B.; ZINNER, M.J.; JAFFE, B.M.; AHLMAN , H. The effects of vagal nerve stimulation on endoluminal release of serotonin and substance P into the feline small intestine. **Scand. J. Gastroenterol**. v. 20, p. 163-169, 1985.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Metabolismo dos Lipídios. **Tratado de Fisiologia Médica: Elsevier**. 11. ed. Rio de Janeiro: Tempo, 2006. cap 68, p. 861-74.

HERMAN, J. R.; BASS P. Altered carbachol-induced contractile responses of rat jejunal smooth muscle following local myenteric plexus ablation. **Digestive diseases and sciences**, New York, v. 35, n. 9, p. 1146-1152, 1990.

HAYMOND, H.E. Massive resection of the small intestine. *Surg Gynecol Obstetr.* 61:693-705, 1935.

HOEBLER, C. GAUDIER, E. DE COPPET, P. RIVAL, M. CHERBUT, C. MUC genes are differently expressed during onset, maintenance of inflammation in dextran sodium sulfate-treated mice. **Dig Dis Sci.** v.51(2), p.381-9, 2006.

HOLLE, G. E. Changes in the structure and regeneration mode of the rat small intestinal mucosa following benzalkonium chloride treatment. **Gastroenterology**; Philadelphia, v. 101, n. 5, p. 1264-1273, 1991.

JAIN, R.; EIKENBURG, E.; JOHNSON, L.R. Stimulation of ornithine decarboxylase activity in digestive tract mucosa. **American Journal of physiology - gastrointestinal and liver physiology**, New York, v. 253, n.3, 1987.

KELI, E.; BOUCHOUCHA, M.; DEVROEDE, G.; CARNOT, F.; OHRANT, T.; CUGNENC, P.H. Diversion-related experimental colitis in rats. **Dis Colon Rectum.** v. 40, n.2, p.222-28, 1997.

KHEN, N.; JAUBERT, F.; SAUVAT, F.; FOURCADE, L.; JAN, D.; MARTINOVIC, J.; VEKEMANS, M.; LANDAIS, P.; BROUSSE, N.; LEBORGNE, M.; NIHOUL-FÉKÉTÉ, C.; CERF-BENSUSSAN, N.; SARNACKI, S. Group for the study of intestinal atresia. Fetal intestinal obstruction induces alteration of enteric nervous system development in human intestinal atresia. **Pediatric Research**, Hagertown, v. 56, n. 6, p. 975-980, 2004.

KIM, D. Y.; CAMILLERI, M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am. J. Gastroenterol.* v. 95, p. 2698- 2709, 2000.

KIM, H. B.; FAUZA, D.; GARZA, J.; OH, J.; NURKO, S.; JAKSIC, T. Serial transverse enteroplasty (STEP): A novel bowel lengthening procedure. **Journal pediatric surgery**, Philadelphia, v. 38, n. 3, p. 425-9, 2003.

MAEGAWA, F. A. B.; SOUZA, J.; ARAÚJO E. J.; KOH I.; D'ACAMPORA, A. J.; FARIAS, D. C.; MENGARDA, J.; VOLPATO, D.; SILVA, L. G. F.; CÓRDOVA, C. S. Reconstituição da válvula ileocecal em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 55-63, 2005.

MARCHINI, J. S.; UNAMUNO, M. R. D. L.; LEMOS NETO, P. A.; CARNEIRO, J. J.; OLIVEIRA, J. E.; DUTRA DE; IGLESIAS, A. C.; VANNUCCHI, H. Síndrome do

intestino curto: aspectos fisiopatológicos, clínicos e suporte nutricional de longa duração. **Medicina (Ribeirão Preto)**, Ribeirão Preto, p. 310-9, 1994.

MARKS, J.G.; DELEO V. A. Contact and Occupational Dermatology, **Mosby Year Book**, Sant Louis, p. 30-49, 1992.

MELLO, R.O.; SILVA, C.M.; FONTE, F.P.; SILVA, D.L.F.; PEREIRA, J.A.; MARGARIDO, N.F.; MARTINEZ, C.A.R.; Avaliação do número de células caliciformes nas criptas da mucosa colônica com e sem trânsito intestinal. **Revista Colégio Brasileiro de Cirurgia**. p.39, v. 2, 2012.

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

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

MORRISSEY, J. J.; WALKER, M. N.; LOVENBERG, W. The absence of tryptophan hydroxylase activity in blood platelets. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 154, p. 496-499, 1977.

OLIVEIRA, J. S. M.; LLORACH – VELLUDO, M. A. S.; SALE-NETO, V. N.; Megacolon in rats. **Digestion**, Basel, v. 45, n. 3, p. 166 – 171, 1990.

PANT, C.; SFERRA, T.; FISCHER, R.; OLYAEE, M.; GILROY, R. Epidemiology and Healthcare Resource Utilization Associated With Children With Short Bowel Syndrome in the United States - **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Baltimore, v. 20, n. 10, 2015.

PEPPAS, N.A.; SALLIN, J.J. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials. **A review. Biomaterials**, v.17, p.1553-1561, 1996.

RAMALHO, F. S.; SANTOS, G. C.; RAMALHO, L. N. Z.; KAJIWARA, J. K.; ZUCOLOTO, S. Desnervação mioentérica jejunal induzida pelo cloreto de benzalcônio. **Arquivos de gastroenterologia**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 24-29, 1994.

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, n. 1, p. 74– 76, 1993.

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, n. 1, p. 74– 76, 1993.

RIBEIRO, J.O.; FERREIRA, M.G.P.A.; MARQUES, I.C.S.; ALVARENGA, C. DE NARDI, A.B.; GARCIA, S.B.; MONTANHIM, G.L.; MORAES, P.C. A new experimental model of intrinsic denervation in ileum from wistar rats through intramural microinjections of benzalkonium chloride. **Brazilian Journal of Veterinary Research**. V.39(4), p.263-270, 2019.

ROWE, R.C., SHESKEY, P.J., QUINN, M.E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients** 6th ed. Pharmaceutical Press, London, p. 285, 2009.

RÜHL, A.; NASSER, Y.; SHARKEY, K. A. Enteric glia. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, Seoul, n. 16. p.44-49, 2004.

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.

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 K. M.; SMITH T. K. Motoneurons of the submucous plexus regulate electrical activity of the circular muscle of canine proximal colon. **Journal of physiology**, Paris, v. 380, p. 293- 310, 1986.

SANTER, R. M.; BAKER, D. M. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. **Journal of the autonomic nervous system**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 59-67, 1988.

SATO, A.; YAMAMOTO, M.; IAMAMURA, K.; KASHIKI, Y.; KUNIEDA, T.; SAKATA, K. 70 Pathophysiology of aganglionic colon anal anorectum: na experimental study of aganglionosis produced by a new method in the rat. **Journal of pediatric surgery**, New York, v. 13, n. 4, p. 399-405, 1978.

SCHNEIDER, H., PELASEYED, T., SVENSSON, F. ET AL. Estudo da renovação da mucina no intestino delgado por marcação in vivo. **Sci Rep**. v. 8, p. 5760, 2018.

SEE, N. A.; SINGARAM, C.; EPSTEIN, M. L.; DALH, J. L.; BASS, P. Reinnervation of villi of rat jejun following severe mucosal damage. **Digestive diseases and sciences**, New York, v. 37, n. 3, p. 438-448, 1992.

SEYFERT, C. E. Densidade e área do perfil celular dos neurônios mioentéricos reativos a acetilcolinesterase, NADH e NADPH-diaforase positivos do ceco de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos. 2003. 69 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – **Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2003.

SIKANDER, A.; RANA, S. V.; PRASAD, K. K. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clin. Chim. Acta*, v. 403, 2009.

SMART, J.D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.57, p.1556-1568, 2005.

SPECIAN, R. D.; OLIVER, M.G. Functional biology of intestinal goblet cells. Department of Cellular Biology and Anatomy, Louisiana State University Medical Center, Shreveport, Louisiana 71130, 1991.

SQUIRES, R. H.; DUGGAN, C.; TEITELBAUM, D. H.; WALES, P. W.; BALINT, J.; VENICK, R.; RHEE, S.; SUDAN, D.; MERCER, D.; MARTINEZ, J. A.; CARTER, B. A.; SODEN, J.; HORSLEN, S.; RUDOLPH, J. A.; KOCOSHIS, S.; SUPERINA, R.; LAWLOR, S.; HALLER, T.; KURS-LASKY, M.; BELLE, S. H. Natural history of pediatric intestinal failure: initial report from the Pediatric Intestinal Failure Consortium. **The Journal of pediatrics**, New York, v. 161, n. 4, p. 723-728, e2, 2012.

TAMIR, H. PAYETTE, R.F.; HUANG, Y.L.; LIU, K.P.; GERSHON, M.D. Human serotonectin: a blood glycoprotein that binds serotonin and is associated with platelets and white blood cells. **J. Cell Sci.** v. 73, p. 187-206, 1985.

TANNURI U. Trabalho realizado no Serviço de Cirurgia Pediátrica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da FMUSP e na clínica particular do autor, São Paulo, SP. síndrome do intestino curto na criança - tratamento com nutrição parenteral domiciliar. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 50, n. 3, p. 330-7, 2004.

THOMPSON, J. S.; EDGAR, J. Poth Memorial Lecture. Surgical aspects of short-bowel syndrome. **American journal of surgery**, New York, v. 170, n. 6, p. 532-6, 1995.

VEDOVATO, K.; TREVIZAN, A. R.; ZUCOLOTO, C. N.; BERNARDI, M. D. L.; ZANONI, J. N.; MARTINS, J. V. C. P. O eixo intestino-cérebro e o papel da serotonina. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v. 18 n. 1, p. 33-42, jan./abr. 2014.

VERNON, A. H.; GEORGESON, K. E. Surgical options for short bowel syndrome. In: **Seminars in pediatric surgery. WB Saunders.** p. 91-98, 2001.

WALES, P. W.; SILVA, N.; KIM, J.; LECCE, L.; TO, T.; MOORE, A. Neonatal short bowel syndrome: population-based estimates of incidence and mortality rates. **Journal pediatric surgery**, Philadelphia, v. 39, n. 5, p. 690-695, 2004.

WANG, W.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase 2 derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United State of America**, v.101, n. 2, p. 415-416, 2004.

WERF, C. S. V. D.; HALIM, D.; JOKE, B. G. M.; VERHEI, J.; ALVES, M. M.; HOFSTRA, R. M. W. Congentail Short Bowel Syndrome: from clinical and genetic diagnosis to the molecular mechanisms involved in intestinal elongation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, Amsterdam, v. 1852, n. 11, p. 2352 – 2361, 2015.

WESER, E. The management of patients after small bowel resection. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 71, n. 1, p. 146-150, 1976.

WINGREN, U. et al. Endoluminal secretin of serotonin and histamine into the small intestine of normal and nematodeinfected rats. **Biogenic Amines**, v. 5, p. 297-306, 1988.

ZANONI, J. N.; MIRANDA-NETO, M. H. D.; BAZOTTE, R. B.; SOUZA, R. R. D. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin-induced diabetic rats. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, São Paulo, v. 55, n. 4, p. 696-702, 1997.

ZANONI, J. N.; MIRANDA-NETO, M.H.D.; ROMANO, E. B. Estudo morfológico da parede do ceco de ratos wistar. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 2, n. 1, 1998.

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 Proliferation**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 15-20, 1991.