

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS NEURÔNIOS DA CURVATURA GÁSTRICA MAIOR GLANDULAR DE RATOS INDUZIDOS AO ALCOOLISMO

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF GASTRIC NEURONS OF THE GREATER CURVATURE GLANDULAR OF RATS INDUCED TO ALCOHOLISM

Marilucia SANTORUM¹, Mayarha Patrícia Dequigiovani BAGGIO¹, Alesandra ORIENTE², Sonia Aparecida de MELLO³, Fábio José BIANCHI⁴ e Larissa Renata de OLIVEIRA⁵

RESUMO

Objetivo: analisar os efeitos do álcool sobre a morfometria dos neurônios do plexo mioentérico da curvatura gástrica maior glandular de ratos submetidos à ingestão crônica de álcool. **Método:** utilizados 14 ratos Wistar, com 90 dias, distribuídos em: Controle (GC, n=7) e Experimental (GE, n=7). O GC recebeu durante 120 dias ração para roedores e água ad libitum, enquanto o GE recebeu ração e aguardente de cana ad libitum, diluída em água em concentrações crescentes de 5% até 30%. A curvatura maior do estômago glandular foi submetida à realização de preparados de membrana de acordo com o método de Giemsa. Foram mensurados 40 campos microscópicos de cada animal. Os cálculos estatísticos realizados utilizando-se o software Prisma 2.0, por meio do teste T de Student com nível de significância de 5%. **Resultados:** verificou-se que média da área dos neurônios no GC foi de $43,56 \pm 2,69 \mu\text{m}^2$ e no GE de $56,03 \pm 2,16 \mu\text{m}^2$. Quando comparados os pesos finais dos dois grupos observamos que os animais experimentais tiveram uma redução de peso corporal de 18,94% em relação aos controles, com $p=0.0002$. **Conclusão:** a ingestão crônica de álcool em ratos aumentou a área neuronal da curvatura maior do estômago glandular.

Descritores: plexo mientérico, álcool, pericário.

INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal ou canal alimentar é um tubo que se estende desde a boca até o ânus, por meio da cavidade ventral do corpo.¹ Ele, juntamente com seus órgãos acessórios, têm como funções prover a digestão e absorção de nutrientes que são essenciais à sobrevivência de um animal.² O estômago é um aumento do trato gastrointestinal, possuindo normalmente a forma de um J, e se localiza logo abaixo do diafragma¹, armazena os alimentos, temporariamente, e os digere quimicamente;

sua estrutura é determinada pelo tipo de vida e alimentação das várias espécies de animais.³ Assim, o carnívoro apresenta um estômago revestido, totalmente, por uma mucosa glandular e coberta por uma única camada de epitélio cilíndrico; já nas espécies de ruminantes, suíno e equino é encontrado na primeira parte do estômago uma mucosa desprovida de glândulas e revestidas por epitélio estratificado pavimentoso.³ O rato possui um estômago que apresenta semelhança morfológica externa com o estômago humano, mas, internamente, observa-se na

¹ Graduandas do PEBIC/ Fundação Araucária UNIPAR-Cascavel, Bióloga pela Unipar- Cascavel

² Bióloga pela Unipar- Cascavel

³ Docente da Universidade Paranaense

⁴ Docente UNIOESTE, PhD In Histologia e Embriologia

⁵ Orientadora do PEBIC/ Fundação Araucária UNIPAR-Cascavel. Mestre em Anatomia Humana.

superfície da mucosa de ambas as faces do estômago uma prega, denominada de “prega limitante”, a qual separa o estômago do rato em duas regiões distintas, uma região glandular e outra região aglandular. A região aglandular do estômago possui a presença de um epitélio pavimentoso estratificado e queratinizado⁴, já a região glandular localiza-se abaixo da prega limitante, formando a maior parte do estômago, possui uma túnica muscular, formada por fibras dispostas nos sentidos longitudinal e circular, agrupadas e formam dois estratos bem definidos, um externo e outro interno, onde se percebe a presença de gânglios do plexo mientérico.⁵

Este plexo compõe o sistema nervoso entérico (SNE), que é constituído por diferentes elementos nervosos distribuídos na parede das vísceras, estendendo-se por todo o trato gastrintestinal.⁶ É independente de integração e processamento neural, atuando assim de maneira independente do sistema nervoso central, tornando-se o segundo cérebro ou “cérebro intestinal”.⁷ Divide-se em dois plexos, o mientérico que está disposto entre as camadas circular e longitudinal de músculo liso e o submucoso entre a muscular da mucosa e a camada circular de músculo liso.⁸

Mudanças ocorridas com a dieta podem provocar alterações adaptativas com o sistema digestório assim acarretando em influências na atividade dos neurônios do plexo mientérico; um exemplo é o uso de substâncias como etanol.

O alcoolismo se destaca como um dos mais graves problemas de saúde pública por complicações vindas no plano somático, psíquico e de grande repercussão no meio social⁹. O etanol, sendo uma molécula simples, é absorvido rapidamente pelo trato gastrintestinal¹⁰; seu uso excessivo e prolongado causa uma variedade de anormalidades clínicas, bioquímicas e fisiológicas. Quanto ao trato gastrintestinal, seus efeitos são evidentes, talvez por ser o primeiro segmento corpóreo a receber elevadas concentrações de etanol; por ser uma substância energética, gera a sensação de saciedade e que leva à inapetência juntamente com distúrbios gastrintestinais, acarretando má absorção de nutrientes^{11,12}. Esta multiplicidade de ações tóxicas vinda do uso dessa substância sobre órgãos e tecidos geram variados mecanismos lesionais associados a doenças que justificam a importância de estudar os seus efeitos no organismo¹⁰; no estômago, um dos efeitos relacionados ao álcool é sobre a vascularização da mucosa, realizado pelos neurônios dos plexos mientérico e submucoso.¹³

OBJETIVO

Analisar os efeitos do álcool (etanol) sobre a

morfometria dos neurônios do plexo mientérico da curvatura gástrica maior do estômago glandular de ratos submetidos a ingestão crônica de álcool.

MÉTODO

Estudo experimental descritivo. Os procedimentos praticados realizaram-se no Laboratório de Parasitologia e Patologia geral da Universidade Paranaense-Campus Cascavel e estão de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal (CEPEEA) da Universidade Paranaense-UNIPAR Protocolo nº 15244/2009.

Obtenção dos grupos experimentais, manutenção, eutanásia e coleta de materiais biológicos para análise

Pesquisa realizada utilizando-se o *Rattus norvegicus* (Wistar), como modelo experimental para avaliar os efeitos do alcoolismo causadas na morfometria de neurônios do plexo mientérico do estômago glandular.

Foram utilizados ratos adultos com 90 dias de idade (+/- 280g) e mantidos em gaiolas individuais, com temperatura constante e alternância de ciclos claro-escuro de 12 horas. Os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo controle GC – 7 animais machos, com 90 dias de idade, que durante 12 semanas receberam ad libitum a ração para roedores comercializada pela NUVITAL (recomendada pelo National Research Council & National Institute of Health-USA) e água.

Grupo experimental GE – 7 animais machos, com 90 dias de idade, que durante 12 semanas receberam dieta ad libitum e ração para roedores comercializada pela NUVITAL; (recomendada pelo National Research Council & National Institute of Health-USA) e aguardente de cana (marca “51”, 39° GL., Indústria Muller, Pirassununga, SP, Brasil), diluída a 30° Gay Lussac (30° v/v). Para a indução do alcoolismo foram administradas as doses crescentes de etanol na escala de diluição: 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30%. Estas diluições alcoólicas tiveram duração de duas semanas, até a diluição de 30% ser alcançada. A administração gradativa de etanol teve como objetivo adaptação dos animais ao modelo experimental denominado como semivoluntário, no qual o etanol foi fornecido como único alimento líquido disponível para os animais.

Acompanhamento da ingestão líquida

Para avaliarmos a quantidade de ingestão da aguardente de cana, foi quantificado durante todo o experimento três

vezes por semana, a quantidade em ml ingerida por animal.

Acompanhamento do crescimento dos animais

Os animais foram pesados durante todo o experimento, três vezes por semana e medidos - distância focinho-ânus - a cada trinta dias de observação.

Área do estômago

Foram mensurados o comprimento e a largura do estômago de cada animal, utilizando-se uma régua milimetrada. A partir destas medidas foi calculada a área do órgão.

Obtenção dos preparados de membrana do estômago evidenciando o plexo mioentérico corado com azul de metileno

Amostras do estômago de 5 animais de cada grupo foram submetidos à realização de preparados de membrana de acordo com o método de Giemsa.¹⁴

Análise morfológica

Os neurônios da curvatura gástrica maior da região glandular dos animais foram mensurados em 40 campos microscópicos, equivalentes a uma área de 8,96 mm², com auxílio de um microscópio de luz (MOTIC plus) com objetiva de 40 vezes de filtro azul. As imagens foram documentadas utilizando-se o software Motic Images Plus 2.0.

Análise estatística

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

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 mostram diferença estatística significativa ao compararmos (p=0.0002).

Ao analisarmos o peso médio em gramas dos estômagos dos animais verificamos que os animais do grupo controle apresentaram em média 2,5± 0,40 gramas,

e os animais do grupo experimental, em média 3,07± 1,39 gramas, diferença esta não significativa (p= 0, 1855).

Ao compararmos a quantidade média em gramas de ração consumida, semanalmente, pelos animais, verificamos que o grupo controle ingeriu 117,3±3,13 gramas/semana, enquanto o experimental consumiu 82,2±6,87 grama/semana, apresentando uma diferença significativa com p= 0,0001.

Em relação a morfometria dos neurônios do plexo mioentérico da curvatura gástrica maior do estômago glandular, verificamos que houve diferença estatisticamente significativa (p=0,0047), onde a média da área dos neurônios dos animais controle foi de 43,56±2,69 μm² e nos animais experimentais a média da área foi de 56,03± 2,16 μm².

DISCUSSÃO

Quando comparamos os pesos finais dos dois grupos, observamos que os animais experimentais tiveram uma redução de peso corporal de 18,94% em relação aos controles, com p=0.0002.

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%¹⁵ e 37,9%.¹⁶ Esses dados, também, estão, de acordo com Mello et al. (2004)¹⁷, que relatou animais desnutridos (GE) com peso inferior aos animais controle (suplementados com vitamina B), e semelhantes com os encontrados por Azevedo et al. (2007)¹⁸ ao submeterem ratos a intensa carência de proteínas, onde ocorreu redução do peso corporal e comprimento da parede intestinal do íleo.

Uma significativa redução do peso corpóreo foi observado por Dees Skelley (1990)¹⁹ no início da puberdade de fêmeas de rato após administração de álcool etílico; corroborando com esses resultados Faustino & Stipp (2003)⁹ evidenciaram uma considerável perda de massa corpórea dos animais alcoolizados. Possivelmente isso se da ao fato de que o álcool é uma substância altamente energética (7,1 kcal/g) que tem capacidade de suprir as necessidades calóricas corporais por um período curto de tempo. Em alcoolistas crônicos o uso da substância inibe a fome, temporariamente, porém, suas calorias são consideradas “vazias” por não serem constituídas de vitaminas e sais minerais, o que promoveria um estado de desnutrição em um período de uso crônico.^{20,21}

Embora os animais do grupo experimental apresentassem um ganho de 12,28% de peso no estômago, esta diferença não é significativa estatisticamente.

Parâmetros de peso e de perfil estomacal não apresentando diferença significativa, também, foi encontrado por Fregonesi et al. (2004)²² ao submeterem ratos a diabetes crônica.

Os animais experimentais consumiram em média 29,9% a menos de ração por semana do que os animais controle, apresentando uma diferença significativa com $p=0,0001$, possivelmente, em virtude da aguardente de cana apresentar valor calórico, inibiu também a necessidade de ingerir alimento. De acordo com Maio (2000)²³ foi verificado em sua pesquisa um maior consumo de ração pelos animais do grupo controle em relação aos alcoólicos.

As calorias do álcool levam a uma menor ingestão de alimento e, conseqüentemente, a um quadro de desnutrição.²⁴ Provavelmente a ingestão de maior quantidade de ração pelos animais controle possibilitou um aumento no comprimento do focinho-ânus destes animais quando comparados com os experimentais, com diferença significativa ($p=0,0015$).

Na morfometria dos neurônios de estômago corados pela técnica Giemsa, os efeitos do álcool são pouco conhecidos. Nesta pesquisa verificou-se diferença,

estatisticamente, significativa onde a média da área dos neurônios do grupo experimental foi maior que a do grupo controle, fato esse, estar relacionado ao suprimento energético que as células neuronais necessitam para desempenhar seu papel. Como o alcoolismo crônico leva a uma desnutrição, os neurônios compensaram a falta de nutrientes, possivelmente tornando-se mais esparsos e com área neuronal maior.

Em técnicas semelhantes à empregada nesta pesquisa, em colo descendente de ratos, observaram maior densidade neuronal para o grupo desnutrido²⁵; conforme trabalhos de Oriente et al.(2009)²⁶ o álcool não provocou alteração na densidade neuronal da curvatura gástrica menor do estômago aglandular.

CONCLUSÃO

Ao analisarmos e compararmos os neurônios mientéricos da curvatura gástrica maior do estômago glandular de animais controles e de animais submetidos ao alcoolismo crônico, conclui-se que os animais experimentais apresentaram uma área neuronal maior que os animais controle.

SUMMARY

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF GASTRIC NEURONS OF THE GREATER CURVATURE OF STOMACH GLANDULAR RATS INDUCED TO ALCOHOLISM

Marilucia SANTORUM, Mayarha Patrícia Dequigiovani BAGGIO, Alesandra ORIENTE, Sonia Aparecida de MELLO, Fábio José BIANCHI e Larissa Renata de OLIVEIRA.

Objective: to analyze the alcohol effects on the neurons' morphology in the myenteric plexus of the greater gastric curvature of rats' glandular stomach subjected to chronic alcohol ingestion. **Method:** 14 Wistar rats with 90 days were used, distributed into two groups: Control Group (CG n=7) and Experimental Group (EG n = 7). CG animals received food and water ad libitum during 120 days, while EG animals received food and sugar cane brandy ad libitum diluted in water at increasing concentrations from 5% to 30%. The greater gastric curvature of rats, glandular stomach was subjected to implementation of membrane preparations according to the Giemsa's method. 40 microscopic fields were measured for each animal. Statistical calculations were performed using Prism 2.0 software and t-Student test with significance level of 5%. **Results:** it was identified that neurons' average area in CG was $43,56 \pm 2,69 \mu\text{m}^2$ and $56,03 \pm 2,16 \mu\text{m}^2$ in EG. When comparing both groups' final weights it was observed that experimental animals had a reduction of body weight of 18.94% when compared to the control group, $p = 0.0002$. **Conclusion:** chronic alcohol ingestion in rats increased greater gastric curvature neurons of glandular stomach.

Key Words: myenteric plexus, alcohol, perikaryon.

REFERÊNCIAS

1. Tortora, GJ; Grabowski, SR. Princípios de anatomia e Fisiologia. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002.
2. Reece, OW. Fisiologia dos animais domésticos. 12ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006.
3. Getty, R. Anatomia dos animais domésticos. 5ª ed. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 1986.
4. Luciano, L; Reale, E. The “limiting ridge” of the rat stomach. Arch. Histol. Cytol.1992, 55: 131-138.
5. Oliveira, LR; Molinari, SL; Pereira, MAS; Miranda-Neto MH; Sant’ana; DMG. Localização dos neurônios mientéricos no estômago aglandular e glandular de ratos (*Rattus norvegicus*). Arq. Ciênc. Saúde Unipar. 200, 4(3): 215-220.
6. Gartner, LP; Hiatt, JL. Tratado de histologia em cores. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.
7. Gershon, MD. O Segundo cérebro. Rio de Janeiro: Campus, 2000.
8. Cingolani, HE; Houssay, AB. Fisiologia Humana de Houssay. 7ªed. Porto Alegre: Artmed, p.181-786. 2004.
9. Faustino, SES; Stipp, ACM. Efeitos do alcoolismo crônico e da desintoxicação alcoólica sobre a glândula submandibular de ratos. Estudo morfométrico. J. Appl. Oral Sci. 2003, 11(1), 26-9.
10. Jerônimo, MS; Filho NTP; Júnior MRM. Efeitos da exposição pré- natal e pós-natal ao etanol no córtex cerebral de ratos: um estudo do neurópilo. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2008, 44(1): 59-64.
11. Bandejas, JA. Effects of chronic ethanol consumption on the rat parotid gland. Arch. Oral. Biol. 1992, 37(1): 69- 72.
12. Lieber,CS. Hepatic, matabolic and toxic effects of ethanol. Alcohol. Clin. Exp. Res. 1991; 66 (11): 573-92
13. Irwin, DA. The anatomy of Auerbach’s plexus. Am. J. Anat. 1931, 49(1): 141– 165.
14. Barbosa, AJA. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados Espessos. Rev. Bras. Pesqui. Méd. Biol. 1978, 11(2-3): 95-97.
15. Zanim, STM et al. Neuronios NADH-Diaforese positivo de jejuno de ratos adultos (*Rattus Norvegicus*) desnutridos. Arq. Neuropsiquiatr. 2003, 61(3): 650-3.
16. Fiorini, A et al. Quantitative morphological analysis of the myenteric neurons of the ileum in rats under experimental desnutrition. Acta Scientiarum. 1999, 21: 409-413.
17. Mello, ST; Liberti, EA; Sant’ana, DMG; Molinari, SL; Miranda-Neto, MH. Estudo morfoquantitativo do plexo mioentérico do duodeno de ratos submetidos a carência de proteínas e vitaminas do complexo B. Acta Scientiarum. Biological Sciences. 2004, 26(2): 251-256.
18. Azevedo, JF; Hermes, C; Manzano, M A; Araújo, EJA; Sant’ana, DMG. Análise morfométrica da parede intestinal do íleo de ratos submetidos a intensa carência de proteínas. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR. 2007, 10(2): 85-89.
19. Dees, WL; Skelley, CW. Effects of ethanol during the onset of female puberty. Neuroendocrinology, 1990, 51(1):64-9.
20. Amanvermez, R. et al. Effect of chronic high – dose alcohol consumption on the general biochemical parameters. Türk Biyokimya Dergisi - Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem. 2009, 34(3): 113–120.
21. Silva, VA. Ambiente e desenvolvimento: Efeitos do álcool etílico e da desnutrição. Mundo & Vida. 2000, 2(1): 22-26.
22. Fregonesi, CEPT; Molinari, SL; Miranda-Neto, M H. Avaliação da população de neurônios mientéricos NADPH-diafoarase positivos do corpo do estômago de ratos com diabetes crônico induzido pela estreptozoocina. Acta Scientiarum. Biological Sciences. 2004, 26(1): 107-112.
23. Maio, R; Dichi, JB; Burini, RC. Consequências nutricionais das alterações metabólicas dos macronutrientes na doença hepática crônica. Arq Gastroenterol 2000, 37(11): 156-65.
24. Pereira, MAS; Orsi, AM; Molinari, SL; Gracia, PJ. Alcohol effects on the principal and clear of the caput epididymis of albino rats. Anat. Histol. Embryo. 2003, (32): 17-23.
25. Araújo, EJA. et al. Effect of protein and vitamin B deficiency on the morpho-quantitative aspects of the myenteric plexus of the descending colon of adult rats. Arq. Neuropsiquiatr. 2003, 61: 226-233.
26. Oriente, A; Bianchi FJ; Oliveira-Biachi, LR. Análise da população neuronal mientérica da curvatura gástrica menor do estômago aglandular de ratos submetidos ao alcoolismo crônico. Biology & Health Journal, 2009, 3(2): 12-17.

Endereço para correspondência

Larissa Renata de Oliveira

Rua Itagiba Fortunato, 414 – Santa Cruz

85806065 Cascavel/PR

E-mail: larissa@unipar.br

Recebido em 21.03.2011 – Aprovado em 23.03.2011