

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E DA ATIVIDADE DA
ACETILCOLINESTERASE E DA NADPH DIAFORASE DO PLEXO MIENTÉRICO
NO INTESTINO DE *Chinchilla lanigera* (RODENTIA: CHINCHILLIDAE) SOB
CÓLICA TIMPÂNICA EXPERIMENTAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RAPHAELA DA CUNHA FRANCESCHI

PORTO ALEGRE

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E DA ATIVIDADE DA
ACETILCOLINESTERASE E DA NADPH DIAFORASE DO PLEXO MIENTÉRICO
NO INTESTINO DE *Chinchilla lanigera* (RODENTIA: CHINCHILLIDAE) SOB
CÓLICA TIMPÂNICA EXPERIMENTAL**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
NEUROCIÊNCIAS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL, COMO REQUISITO PARCIAL
PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE.

RAPHAELA DA CUNHA FRANCESCHI

ORIENTADORA: DRA. DENISE MARIA ZANCAN

PORTO ALEGRE

2011

*"Escolho meus amigos não pela pele ou outro arquétipo qualquer, mas pela pupila.
Tem que ter brilho questionador e tonalidade inquietante.
A mim não interessam os bons de espírito nem os maus de hábitos.
Fico com aqueles que fazem de mim louco e santo.
Deles não quero resposta, quero meu aresso.
Que me tragam dívidas e angústias e agüentem o que há de pior em mim.
Para isso, só sendo louco.
Quero-os santos, para que não duvidem das diferenças e pesem perdão pelas injustiças.
Escolho meus amigos pela cara lavada e pela alma exposta.
Não quero só o ombro ou o colo, quero também sua maior alegria.
Amigo que não ri junto não sabe sofrer junto.
Meus amigos são todos assim: metade bobeira, metade seriedade.
Não quero risos previsíveis nem choros piedosos.
Quero amigos sérios, daqueles que fazem da realidade sua fonte de aprendizagem, mas lutam para
que a fantasia não desapareça.
Não quero amigos adultos nem chatos.
Quero-os metade infância e outra metade velhice.
Crianças, para que não esqueçam o valor do vento no rosto; e velhos, para que
nunca tenham pressa. Tenho amigos para saber quem eu sou.
Pois os vendo loucos e santos, bobos e sérios, crianças e velhos, nunca me esquecerei de que
normalidade é uma ilusão imbecil e estéril."*

Oscar Wilde

*"A ciência não se aprende, a ciência apreende a ciência em si... A ciência não se ensina, a
ciência insemina a ciência em si... A ciência não avança a ciência alcança a ciência em si!"*

(A Ciência em Si, composição de Arnaldo Antunes e Gilberto Gil)

*Dedico à minha mãe Débora, por todo o orgulho
E privilégio que sinto de ser sua filha. Ao meu
Pai Cirio, que aposta e confia em minhas escolhas.
E à mana Franthiela, meu elo fundamental.*

AGRADECIMENTOS

UFRGS

A realização deste trabalho se deve em grande parte à colaboração e apoio de diversas pessoas às quais quero transmitir meus sinceros agradecimentos:

Prof^a. Denise Zancan, pela orientação, ensinamentos, paciência e coragem ao se aventurar em uma linha nova de pesquisa, o mundo das chinchilas.

Prof^a. Wania Partata pelos ensinamentos, colaboração com o projeto e permanente disposição.

Malcon Martinez, antigo orientador, hoje colega e amigo, presente nas várias fases de execução deste trabalho. Presente também em vários momentos da minha vida acadêmica e pessoal.

Amigas Bárbara Paranhos e Márcia Peiter, que tornaram os dias de laboratório muito mais significativos e, como poucas, me cativaram completamente. Recebam minha admiração sempre.

Gustavo Fünkler, um anjo que apareceu em nosso laboratório tornando-se um amigo especial, além de fundamental no desenvolvimento de várias etapas do mestrado. Renan Gaparetto, pela ajuda e cuidados com as chinchilas. Sem a dedicação e paciência de vocês esse trabalho não teria dado certo.

Colegas e amigas de laboratório: Andréa Horst, Aline Gonçalves, Bica Rigon, Carol Kolberg, Clarice, Cris Bilibio, Feer, Maira Moraes, Naédia Fogaça e Taína Scheid. Que sempre estiveram dispostas a ajudar mesmo que isso exigisse passar os finais de semana trabalhando no laboratório.

Colegas e amigos do ICBS: Cami Lazzaretti, Caren Bernardi, Carol Zanotto, Carol Robinson, Charles Ferreira, Eve Stolz, Fabi Santana, Fernando Camelier, Jana Espinosa, Jose Rojas, Jú Dalbor e Pri Senna. À convivência, troca de experiências, risadas e angústias compartilhadas ao longo do mestrado.

Cabanha Chillacenter pela doação dos animais para o projeto, principalmente à colaboração e disponibilidade do Médico Veterinário Rogério Oliveira. E é claro, às chinchilas, fundamentais.

A todos os professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, que estiveram envolvidos de uma forma ou outra nesta etapa, especialmente a Andréia Ferreira e o pessoal do ratário.

Por fim, à CAPES pelo auxílio financeiro.

ESPECIALS

Agradeço à minha mãe, Débora Cunha, por sempre ter apoiado meu lado cientista. Pela confiança, admiração, paciência e pelos puxões de orelha sempre que necessários.

Ao meu pai, Círio Franceschi, por ter sido meu porto seguro desde o início dessa jornada.

À mana Franthiela e à dinda Marlene, mulheres de extremo significado e importância em minha vida. Sem o apoio de vocês tudo seria mais difícil.

Aos familiares que sempre estiveram vibrando junto: Tio Elomar, Tia Lalaine, Kika, Louise, Dinda Lísie.

Aos amigos, que na maioria não fazem parte deste mundo de laboratórios e cobaias, mas que compreendem as ausências e apoiam incondicionalmente: Fabi Bergmann, Fafrício

Rapaki, Karol Vargas, Lú Roig, Mariel Füll, Mary Vargas, Mity Schlesener, Paty Ferreira, Rachel Raymundi, Régis Araújo, Rica Ayala, Rosalva Schilling, Sarah Ahumada e Ti Castro.

Por fim, porém não menos importantes, aos recentes amigos e parceiros de chimarrão e risadas: Aline, Betta, Diego, Fernanda, Leandro, Pablo, Patrícia, Saulo, Taíse e principalmente ao Gui.

*"A central lesson of science is that to understand
Complex issues (or even simple ones), we must try
To free our minds of dogma and to guarantee the
Freedom to publish, to contradict, and to experiment.
Arguments from authority are unacceptable."*

Carl Sagan

Sumário

RELAÇÃO DAS FIGURAS E TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
<i>Chinchilla lanigera</i> : Importância científica e econômica.....	1
Sistema Nervoso Entérico.....	3
Cólica Timpânica	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL & MÉTODOS	14
Animais.....	14
Procedimentos experimentais.....	14
Indução da cólica timpânica	14
Técnica Histoquímica AChE.....	16
Técnica Histoquímica NADPH-d.....	16
Análise dos Resultados	16
4. RESULTADOS	18
Artigo	18
5. CONCLUSÕES.....	55
6. PERSPECTIVAS	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

RELAÇÃO DAS FIGURAS & TABELAS

- Figura 1.** Esquema da topografia, arquitetura e nomenclatura (descrição original em parêntesis) dos plexos ganglionares e aganglionares que constituem o SNE em preparados de membrana ao longo do TGI (de Krammer *et al.*, 1997).....5
- Figura 2.** Morfologia dos neurônios NADPH-d-positivos no PM de *C. lanigera*, conforme a classificação de Stach (1988). **a.** Tipo I (uniaxonal, radial multidendrítico, dendritos curtos e lamelares, com projeção axonal principalmente oral). **b.** Tipo II (pseudo-uniaxonal ou multiaxonal, ausência de dendritos, com projeção axonal oral, caudal, circular e vertical). **c.** Tipo III (uniaxonal, multidendrítico radial, longo, dendritos ramificados e projeção axonal principalmente caudal). **d.** Tipo IV (uniaxonal, multidendrítico polar, com projeção axonal vertical). **e.** Tipo V (uniaxonal, multidendrítico polar, com projeção axonal principalmente caudal). **f.** Tipo VI (uniaxonal, axodendrítico, projeção axonal principalmente caudal). Escala: 100 μm9
- Figura 3.** Linha do tempo de realização dos procedimentos. O período de aclimação foi realizado entre os dias (D) D0 e D4, quando foi realizado o primeiro exame clínico. O período de CT cursou entre D4 e D11, dividido em duas fases: indução da doença (D4 a D11) e manutenção da doença (D11 a D18), e exames clínicos e teste de sensibilização abdominal foram realizados os nos dias D11 e D18. Os animais timpânicos e dois controles foram mortos no D18. O período de tratamento foi dividido em duas etapas: administração do medicamento (realizado de D18 a D23, Cetofen 1% a 2 mg/kg/dia, i.m.) e pós-tratamento (de D23 a D38, totalizando 15 dias). Em D23 e D38 foram realizados testes de Von Frey. Os animais recuperados e três controles foram mortos no D38. Um asterisco indica o exame clínico, enquanto que dois indicam o exame clínico associado ao teste de Von Frey15
- Figura 4.** Esquema da técnica de microdissecação para confecção de preparados de membrana da túnica muscular do TGI. **a.** A túnica mucosa é retirada por meio de raspagem. **b.** Com o auxílio de pinças oftálmicas retirou-se a submucosa. **c.** As túnicas musculares circular e longitudinal foram separadas, mantendo-se a lâmina conjuntiva onde encontra-se o PM (de Krammer *et al.*, 1997).....17
- ARTIGO**
- Figura 1.** Já descrito na Figura 3 do material e métodos48
- Figura 2.** Vista ventral da cavidade abdominal de *C. lanigera*. **a.** animal controle, **b.** animal timpânico, **c.** animal recuperado. Nesta vista estão demonstradas as observações macroscópicas de necrose..... 49
- Figura 3.** Fotomicrografias do PM na junção íleo-cecal (a, b, c), porções sacular (d, e, f), intercecal (g, h, i) e tubular (j, k, l) do ceco nos grupos experimentais em *C. lanigera* corados com a técnica de histoquímica para AChE.....50

Figura 4. Fotomicrografias do PM no cólon ascendente (a, b, c), transverso (d, e, f) e descendente (g, h, i) nos três grupos experimentais em <i>C. lanigera</i> corados com a técnica de histoquímica para AChE.....	51
Figura 5. Morfometria e distribuição ganglionar no PM nas regiões analisadas do TGI entre os grupos experimentais em <i>C. lanigera</i>	52
Figura 6. Morfologia dos neurônios NADPH-d-positivos no PM de <i>C. lanigera</i> , conforme a classificação de Stach (1988).....	53
Figura 7. Números totais de neurônios NADPH-d-positivos no PM nas diferentes regiões analisadas do TGI entre os três grupos experimentais em <i>C. lanigera</i>	54
Tabela 1. Médias dos valores da área ganglionar total (μm^2) com atividade AChE em diferentes regiões do plexo mientérico em <i>C. lanigera</i>	41
Tabela 2. Médias do número de gânglios AChE-positivos nas diferentes regiões do plexo mientérico de <i>C. lanigera</i>	42
Tabela 3. Números dos gânglios de diferentes tamanhos AChE-positivo nas diferentes regiões do plexo mientérico de <i>C. lanigera</i>	43
Tabela 4. Valores médios do número dos tipos neuronais NADPH-d-positivos no PM de <i>C. lanigera</i> . O número de neurônios foi calculado em uma área de 320 x 320 μm	44
Tabela 5. Valores médios do número de tipos neuronais NADPH-d-positivos nas diferentes regiões do PM de <i>C. lanigera</i> . O número de neurônios foi calculado em uma área de 320 x 320 μm	45
Tabela 6. Distribuição dos tipos neuronais NADPHd-positivos nas diferentes regiões do PM de <i>C. lanigera</i> . Densidade neuronal mensurada em área de 320 x 320 μm	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina
AChE: acetilcolinesterase
CT: cólica timpânica
DC: cólon descendente
DS: digestive system
ENS: enteric nervous system
GIT: gastrointestinal tract
NADPH-d: dihidronicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintase
PBS: tampão fosfato salino
PBS-T: Triton X-100 diluído em PBS
PM: plexo mientérico
SD: sistema digestório
SNA: sistema nervoso autônomo
SNC: sistema nervoso central
SNE: sistema nervoso entérico
SP: parte sacular do ceco
TC: tympanic colic
TGI: trato gastrointestinal
TM: tampão Tris-Maleato 0,1M pH 6,0
VIP: polipeptídeo vasoativo intestinal
 β -NADPH: b-nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato reduzida

RESUMO

FRANCESCHI, R. C. **Avaliação das alterações morfológicas e da atividade da acetilcolinesterase e da NADPH diaforase do plexo mientérico no intestino de *Chinchilla lanigera* (rodentia: chinchillidae) sob cólica timpânica experimental.** Porto Alegre, 2011. 87p. Dissertação de Mestrado: Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Neurociências – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As chinchilas (*Chinchilla lanigera*) despertam grande interesse na comercialização de peles e como animais de estimação. Entretanto, existem poucas informações sobre a fisiologia, inclusive do trato gastrointestinal (TGI) e as enfermidades a este associadas. O TGI destes animais é longo e apresenta complexidade similar a dos lagomorfos: ceco com uma porção sacular espiralada, seguida de uma porção tubular que se continua em um cólon ascendente longo. Estas características, em associação com o fornecimento de uma dieta rica em grãos e leguminosas, são condições que permitem o fácil acometimento de cólica timpânica (CT), que se caracteriza pela distensão acentuada da parede do ceco, devido ao acúmulo dos gases produzidos em excesso durante a digestão fermentativa. Considerando que o acometimento de uma enfermidade promova alterações morfológicas e funcionais do sistema nervoso entérico (SNE), o roedor *C. lanigera* foi utilizado para avaliar as alterações *in situ* da atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e diaforase da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH-d) dos neurônios do plexo mientérico (PM) em um modelo experimental de CT provocado por alteração da dieta. Após as duas semanas de timpanismo, um grupo de animais voltou a receber dieta balanceada por 20 dias associado a um antiinflamatório (cetoprofeno) no primeiros 5 dias do período de dieta normal. O timpanismo foi confirmado pela análise dos sintomas e por meio do teste de von Frey. Verificou-se maior sensibilidade abdominal nos animais do grupo timpânico e recuperado (dieta de indução até D18 e, após, a mesma dieta do grupo controle associada ao medicamento cetoprofeno) durante o período da doença (11° ao 18° dia após início da dieta alterada). O tratamento medicamentoso e normalização da dieta (D23), o grupo recuperado mostrou uma sensibilidade abdominal semelhante a do grupo controle. A necrópsia revelou um aumento de volume no ceco e cólon ascendente dos animais timpânicos e isquemia nas junções jejuno-ileal, ileocecal e no cólon ascendente, com infarto nos vasos sanguíneos mesentéricos ao longo do intestino. Nos animais recuperados não foi observado infarto nos vasos sanguíneos mesentéricos. O PM da *C. lanigera* normal constitui-se de uma extensa rede ganglionar de formato retangular e uniforme, cujos gânglios se dispõem no sentido dos feixes de fibras da camada muscular longitudinal e estão conectados entre si por ramos nervosos calibrosos. O PM divide-se em três redes distintas: o plexo primário (formado por gânglios médios e grandes e feixes de fibras nervosas de primeira ordem), secundário (constituído por gânglios pequenos e feixes de segunda ordem) e terciário (somente feixes de fibras de terceira ordem, que seguem paralelamente às fibras musculares longitudinais). Os gânglios possuem aspecto polimórfico em todas as porções analisadas do TGI. A CT resultou na distensão da parede visceral e, conseqüentemente, do plexo, tornando a rede menos densa, os gânglios alongados e as conexões mais finas entre as células adjacentes. O tratamento recuperou o aspecto controle do PM. As mensurações da área e do número de gânglios com atividade AChE obtida nos três grupos experimentais, mostrou um aumento significativo na área ganglionar total dos animais timpanizados em relação ao grupo controle. Não foi observada diferença significativa no número total de gânglios e nas médias das áreas dos

diferentes tamanhos ganglionares entre os três grupos. Entretanto, no cólon ascendente houve uma diferença significativa entre o número de gânglios entre os grupos timpânico e recuperado. Os resultados permitem inferir que a CT provoca alteração no metabolismo colinérgico dos gânglios mientéricos. Os seis diferentes tipos morfológicos de neurônio, segundo classificação de Stach, mostraram atividade NADPH-d. O número de neurônios com atividade NADPH-d mostraram redução diferenciada entre as diferentes partes do intestino e de forma específica para alguns dos seis tipos celulares. Estas diferenças são discutidas de acordo com o papel funcional dos tipos neuronais propostos na literatura. De uma maneira geral, a diminuição da atividade NADPH-d dos tipos celulares propostos em outros animais como motoneurônios indicou que a CT afeta a principal função exercida pelo PM, de motilidade, especialmente das porções sacular do ceco e do cólon transversal. A diminuição do tipo neuronal II, considerado sensorial, afetado significativamente em todas as porções do cólon, coincide com a maior distensão observada neste na CT. As alterações observadas só não se mostraram reversíveis na porção sacular do ceco e no cólon ascendente, contudo foram reversíveis nas demais porções analisadas.

ABSTRACT

FRANCESCHI, R. C. **Evaluation of morphological changes and acetylcholinesterase and NADPH-diaphorase activity in the myenteric plexus of the intestine of *Chinchilla lanigera* (Rodentia: chinchillidae) under experimental tympanic colic.** Porto Alegre, 2011. 87p. Master Thesis: Graduate Program in Biological Sciences: Neuroscience - Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul.

The chinchilla (*Chinchilla lanigera*) evokes great interest in fur commercialization and as pets. However, there are few informations about its physiology, especially the gastrointestinal tract (GIT) and its diseases. The GIT of these animals is long and has a complexity similar to lagomorphs: cecum with a coiled saccular portion, followed by a tubular portion which continues in a long ascending colon. These characteristics in association with a diet rich in grains and legumes facilitates the onset of tympanic colic (TC), which is characterized by marked distension of the cecum wall due to excessive accumulation of gases produced by fermentative digestion. Considering the onset of an illness can cause morphological and functional modifications of the enteric nervous system (ENS), the rodent *C. lanigera* was used to assess *in situ* modifications on the activity of the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and diaphorase nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH-d) in myenteric plexus (MP) neurons, using an experimental model of TC induced by dietary alterations. After two weeks of receiving the tympanism-inducing diet, the same diet of the control group was given to the recovery group, along with an anti-inflammatory drug (ketoprofen) for five days. The tympanism was confirmed by symptom analyses and by the Von Frey test. The tympanic and recovery groups showed an increase of abdominal sensibility after the onset of the disease (between the 11th and 18th days of the period in which the tympanism-inducing diet was given). With the drug treatment and the re-establishment of the diet (at day 23) the recovery group showed an abdominal sensibility similar to the control group. The necropsy revealed an increase of the cecum and ascending colon volumes in the tympanic animals, in addition to ischemia in the jejunoileal and ileocecal junctions and in the ascending colon, with mesenteric blood vessels infarction. In the recovery animals mesenteric blood vessels infarction was not present. The MP of a healthy *C. lanigera* is formed by an extensive ganglionic network of rectangular and uniform shape, and the ganglia are arranged in the same direction of the fiber bundles of the longitudinal muscle layer and are connected to each other by thick nerve branches. The MP is divided in three distinct networks: the primary plexus (formed by medium and large ganglia and bundles of nerve fibers of the first order); the secondary plexus (formed by small ganglia and bundles of second order); and the tertiary plexus (only bundles of third order fibers, which run parallel to the longitudinal muscle fibers). The ganglia showed a polymorphic aspect in all analyzed portions of the GIT. The TC resulted in distension of the gut wall and, therefore, the plexus, making the network less dense, the ganglia elongated and thinner connections between adjacent cells. The treatment restored the aspect of the MP to normal. Measurements of area and number of ganglia obtained with AChE activity in the three experimental groups revealed a significant increase in total ganglia area in the tympanic animals compared to the control group. There was no significant difference in the total number of ganglia and the mean of the areas of different ganglia sizes between the three groups. However, in the ascending colon there was a significant difference between the number of ganglia of the tympanic and recovery groups. These results demonstrate that the TC alters the cholinergic metabolism of myenteric ganglia. The six different morphological types of neurons,

according to Stach's classification, had NADPH-d activity. The neurons with NADPH-d activity showed a differential reduction between different intestinal portions and between the six cell types. These differences are discussed according with the functional role of the neuronal types proposed by the literature. The decreased activity of NADPH-d in cell types proposed as motoneurons in other animals indicated that the TC affects the main function performed by the MP, which is the motility, especially in the sacular portions of the cecum and transverse colon. The decrease in type II cells, which are considered sensory neurons and were significantly affected in all portions of the colon, coincides with the largest distension of this portion observed in the TC. The changes observed were not reversible only in the sacular portion of the cecum and in the ascending colon, being reversible in the other analyzed portions.

1. INTRODUÇÃO

***Chinchilla lanigera*: Importância científica e econômica**

A ordem Rodentia Bowdich (1821) inclui uma série de mamíferos conhecidos como roedores, os quais representam aproximadamente 40% de todas as espécies de mamíferos descritos (BISHOP, 1993). Dentre estes, alguns têm apresentado grande interesse na criação comercial, como a *Chinchilla lanigera*, pertencente à subordem Hystricomorpha, família Chinchillidae (CARLETON & MUSSER 2005). Estes roedores adultos pesam 400 g, ainda que as fêmeas possam atingir 800 g e os machos 600 g, em ambiente doméstico. A *Chinchilla lanigera* caracteriza-se por possuir uma longa cauda, grossa, que forma uma porção distal mais ouriçada (GRAU, 1986; SPOTORNO *et al.*, 2004).

A caça comercial teve início em 1828, tornando-se uma atividade comum e generalizada no norte do Chile (JIMÉNEZ, 1996) até o final do século XIX. A espécie foi considerada extinta até a década de 70 (JIMÉNEZ, 1994; SPOTORNO *et al.*, 2004a). Atualmente a população de chinchilas vem decrescendo no seu habitat natural, mesmo com a criação da *Chinchilla National Reserve*, no norte do Chile (CORTÉS *et al.*, 2002). A criação em cativeiro só teve início no século XX, motivada pelas características ímpares da pelagem (cerca de 30 vezes mais macia que o cabelo humano e muito densa (pelo longo de 2 a 4 cm, 50-75 fios emergindo de um único folículo da pele, com cerca de 20.000 pelos/cm²). No Brasil, a criação está concentrada principalmente no Rio Grande do Sul, sendo o maior exportador de peles de chinchila. A domesticação desses animais teve como objetivo inicial a comercialização das peles, entretanto, atualmente esses roedores são amplamente utilizados como animais de estimação, por serem considerados limpos, sem cheiro e amigáveis e, como animais de laboratório, visto que podem ser mantidos facilmente em cativeiro e treinados (OZDEMIR *et al.*, 2008 a,b).

Entretanto, apesar de amplamente difundida no ambiente urbano, não existem informações científicas detalhadas sobre os hábitos e enfermidades que acometem esta espécie. Grande parte destas informações está baseada em comunicação oral ou em relatos de casos por parte de médicos veterinários ou criadores, divulgadas na Internet. Os poucos estudos anatômicos referentes à *C. lanigera* descrevem a anatomia de alguns territórios vasculares (CASTRO *et al.* 2007; DE ARAUJO & CAMPOS, 2009); arterial cardíaco (OZDEMIR *et al.*

2008), do plexo braquial (GAMBA *et al.*, 2007) e do aparelho digestório (CASTRO *et al.*, 2010; CEVIK-DEMIRKAN *et al.*, 2007). Alguns estudos buscam a descrição de aspectos reprodutivos destes animais em cativeiro, buscando melhores índices de produtividade (BEKYÜREK *et al.*, 2002; BUSO *et al.*, 2005 a,b; BUSO *et al.*, 2007a-b; LEAL & FRANÇA, 2008; 2009). Também foram estudados alguns aspectos da fisiologia geral tais como, regulação do metabolismo hídrico (CORTÉS *et al.*, 2000a), a termorregulação (CORTÉS *et al.* 2000b) e hábitos alimentares (CORTÉS *et al.* 2001). As chinchilas são utilizadas também como modelo experimental para estudos sobre audição, pois possuem o ouvido médio bem desenvolvido, o que permite o fácil acesso de eletrodos de registro na cóclea, através da orelha média (SPOTORNO *et al.*, 2004a). Têm sido realizados estudos sobre a sensibilidade auditiva (NELSON & KIESTER, 1978) e percepção sonora por meio de condicionamento (SHOFNER, 2002). Outros estudos descreveram as áreas do sistema nervoso central (SNC) envolvidas na percepção auditiva (HAREL *et al.*, 2000; LANGNER *et al.*, 2002; PIENKOWSKI & HARRISON, 2005a-b), como também no mapeamento do sistema vestibular nesses animais (HULLAR & WILLIAMS, 2006). Estudos mostram que as chinchilas possuem uma curva de audibilidade semelhante à dos seres humanos (HEFFNER & HEFFNER, 1991), já tendo sido demonstrada maior sensibilidade destes animais a baixas frequências sonoras, comparados a outras espécies de roedores (ROSOWSKI *et al.*, 2006).

Dentre as patologias mais estudadas nestes animais são destacadas algumas de origem bacteriana (DOERNING *et al.*, 1993; AULL *et al.*, 1998; NAGLIĆ *et al.*, 2003; KIMPE *et al.*, 2004; FORBES *et al.*, 2008; BAKALETZ, 2009), algumas viroses (WOHLSEIN *et al.* 2002; WHITBY & STULL, 2004; MORTON *et al.* 2004; BUCHINSKY *et al.*, 2007), micotoxicoses associadas a dietas inadequadas (GONZÁLEZ PEREYRA *et al.*, 2008) e endoparasitoses (HOLMBERG *et al.* 2007; STAEBLER, *et al.* 2007).

Com relação ao trato digestório, há estudos referentes à digestão e absorção de carboidratos (KRISHNAMURTI *et al.*, 1974), bem como de problemas dentários (CROSSLEY *et al.*, 1997). Estudos anatômicos descrevem o trato gastrintestinal (TGI) destes animais como sendo longo e com a complexidade encontrada em lagomorfos. O ceco apresenta uma porção sacular espiralada, seguida de uma porção tubular que se continua em um cólon ascendente longo (CASTRO *et al.*, 2010), sendo nesses animais responsável pela retenção de teor maior de matéria seca do conteúdo do intestino grosso, quando comparados a coelhos e porcos-da-índia (HILLYER *et al.*, 1997). Esta organização macroscópica permite inferir que

seja necessário um sistema de controle nervoso complexo, para que ocorra o seu pleno funcionamento.

As informações sobre os hábitos alimentares destes roedores baseiam-se, em sua maioria, na análise da dieta no habitat natural (MOHLIS, 1983; CÓRTEZ *et al.*, 2002). Existe, no entanto, uma carência de estudos mais específicos sobre a dieta ideal desses animais em cativeiro. Há rações comerciais disponíveis para chinchilas, entretanto são baseadas em misturas de rações de coelhos, porquinhos-da-índia e de outros roedores, fornecidas com um suplemento de vitamina C, sendo a fórmula mais aceita numa proporção de 10-20% de proteínas, 2-5% de gordura e 15-35% de fibras (WEBB, 1994; HILLYER *et al.*, 1997). Ainda, sabe-se que alterações na dieta devem ser graduais, pois mudanças dietéticas bruscas podem resultar em doenças graves como a sufocação e a cólica timpânica (SPOTORNO *et al.*, 2004a), a qual tem se mostrado elevada em chinchilas cabanhas (HILLYER & QUESENBERRY, 1997).

Sistema Nervoso Entérico

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) ou também chamado, Neurovisceral, consiste em um sistema de neurônios que controlam a atividade visceral e efeitores cutâneos, ajustando a atividade de tecidos e órgãos para o funcionamento coordenado do organismo, e está intimamente relacionado ao sistema endócrino com o qual atua sinergicamente (FURNESS, 2006). Entretanto, a descoberta de circuitos reflexos na parede do intestino e a identificação de neurônios primários aferentes nestes circuitos promoveram a inclusão ou consideração das vias aferentes viscerais na constituição do SNA (SAPER, 2002; JÄNIG, 2006). O componente eferente do SNA constitui-se de três sistemas: simpático, parassimpático e entérico (SNE) (LANGLEY, 1921), esta divisão é baseada em critérios morfológicos e funcionais (FURNESS, 2006). A separação entre o componente simpático e parassimpático vem sendo discutida. Isto se deve a presença de gânglios mistos, constituídos de neurônios pós-ganglionares simpáticos e parassimpáticos, que recebem aferências de ambos os sistemas (FURNESS, 2006). Por esta razão, pesquisas recentes referem-se aos neurônios simpáticos, parassimpáticos e entéricos como neurônios autonômicos (JÄNIG, 2006).

Ao longo do século passado, foi observado um número crescente de trabalhos que tiveram por objetivo contribuir na elucidação de questões pertinentes ao Sistema Nervoso Entérico, assim denominado primeiramente por Langley (1921). As primeiras descrições de

gânglios microscópicos, organizados na forma de uma rede e localizados entre as camadas da parede das vísceras, foram de Remak (1852) e desde então esta organização nervosa tem levado os pesquisadores a repensar conceitos e teorias sobre a forma de controle do Sistema Digestório (SD). O funcionamento gastrointestinal normal ocorre sem a inervação extrínseca, sugerindo a capacidade de autonomia do SNE caso ocorra a perda desta inervação (YUNKER & GALLIGAN 1998). Como os neurônios entéricos não necessitam de um controle extrínseco para manter o funcionamento do TGI, o SNE exerce um amplo controle sobre a coordenação das atividades básicas do SD, como a motilidade, absorção e secreção de nutrientes e regulação do fluxo sanguíneo (KRAMMER *et al.*, 1997). Além disso, muitos estudos comprovam que o SNE exerce influência direta e indireta sobre as respostas endócrinas, parácrinas e imunológicas no SD (COSTA *et al.*, 1987; WOOD, 1987; KRAMMER *et al.*, 1997; HANSEN, 2003a-b; ALTAF & SOOD, 2008) e que, além dos neurônios entéricos, as células enterogliais e as células intersticiais de Cajal participam na modulação destas funções (LYFORD *et al.*, 2002; BECKETT *et al.*, 2005; MILNE *et al.*, 2005; RÜHL, 2005; BASSOTTI *et al.*, 2007a-b; CEULAER *et al.*, 2007; SAND *et al.*, 2008).

O SNE constitui-se de neurônios aferentes e eferentes que formam circuitos complexos entre as túnicas que formam a parede das vísceras digestórias, desde o esôfago até o ânus, incluindo a inervação de órgãos anexos como glândulas salivares, pâncreas e vesícula biliar (HANSEN, 2003a-b; JÄNIG, 2006). Este conjunto nervoso compõe-se do plexo mientérico (muscular superficial e profundo), do plexo submucoso externo e interno, do plexo muscular da mucosa, do plexo mucoso e do plexo perivascular (Figura 1). Destes, somente os plexos mientérico, submucoso interno e externo apresentam gânglios organizados interligados por feixes de fibras nervosas de diferentes calibres. Os gânglios são constituídos por neurônios sensoriais, motores, secretomotores e interneurônios, que variam entre 70 a 100 milhões de células, além de um suporte organizado de células gliais (STACH, 1988; HANSEN, 2003a; JÄNIG, 2006; ALTAF & SOOD, 2008). Além destes, existe um sistema de redes aganglionares que exercem funções secundárias dentro do sistema (COSTA *et al.*, 1987; WOOD, 1987). Ainda, foram descritos plexos pertencentes ao ducto cístico, hepático comum e à vesícula biliar (KRAMMER *et al.*, 1997). No seu conjunto, estes plexos agrupam um número de neurônios que se aproxima ao da medula espinhal. Destes, aproximadamente 70% são eferentes do trato digestório (STACH, 1988), o que demonstra claramente a sua independência em relação ao Sistema Nervoso Central (SNC) (COSTA *et al.*, 1987; WOOD, 1987; KRAMMER *et al.*, 1997;

HANSEN, 2003a-b; FURNESS, 2006; ALTAF & SOOD, 2008). Assim, o controle nervoso do TGI é exercido por diferentes mecanismos, que podem ser considerados isoladamente ou em conjunto para que se compreenda a complexidade de ações que ocorrem no funcionamento normal do intestino. No mesmo sentido, é de se esperar que o acometimento de uma enfermidade promova alterações na atuação destes componentes.

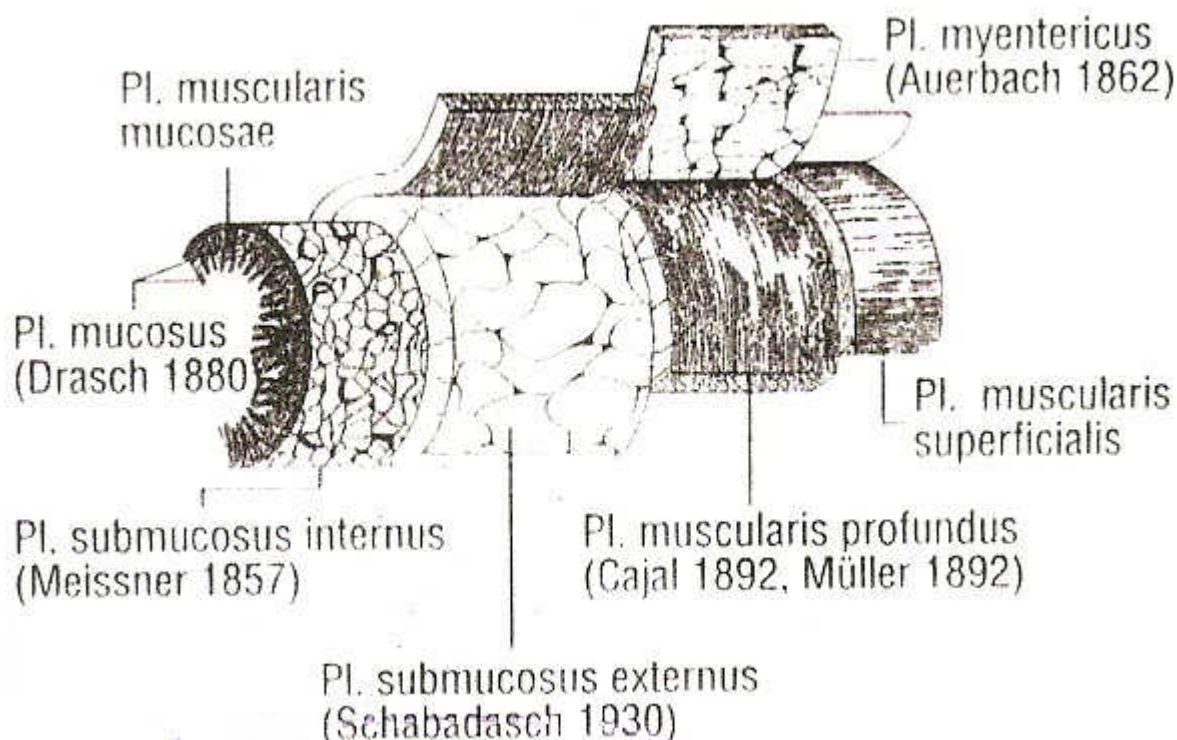


Figura 1. Esquema da topografia, arquitetura e nomenclatura (descrição original em parêntesis) dos plexos ganglionares e aganglionares que constituem o SNE em preparados de membrana ao longo do TGI (de Krammer *et al.*, 1997).

Entre algumas patologias relacionadas com a alteração do plexo mientérico pode-se citar a acalasia esofágica (HAU *et al.*, 1997), estenose esofágica (SINGARAM *et al.*, 1995) em humanos, megacólon em gatos (VIVES, 2005). A maioria dos estudos sobre os distúrbios advindos do mau funcionamento deste SNE é realizada especialmente na espécie humana. Além disso, foram encontradas alterações morfológicas e quantitativas no plexo mientérico de ratos submetidos à colostomia (FONTES *et al.*, 2004), com colite (SANOVIC, 1999; BOYER *et al.*, 2005.), infectados por *Trypanosoma cruzi* (MAIFRINO *et al.*, 2005) e sob outras inflamações

intestinais (DAVIS *et al.*, 1998; LIPMAN *et al.*, 1998). Ainda, em pacientes com constipação crônica foi observada uma perda relativa de neurônios mientéricos, principalmente aqueles que expressam a enzima colina acetiltransferase, assim como, acompanhado da diminuição da expressão de óxido nítrico por outros neurônios mientéricos, além de alterações na morfologia geral do plexo mientérico (GOMES *et al.*, 1997; HANANI *et al.*, 2004; BERNARD *et al.*, 2009; BOURAS & TANGALOS, 2009).

As descrições de distúrbios de patologias, como a Doença de Hirschsprung, a Doença de Crohn e a colite ulcerativa, por exemplo, tanto em modelos animais quanto em humanos, referem-se principalmente àqueles relacionados às hipoganglionoses e aganglionoses, que ocasionam graves doenças, fundamentalmente de caráter crônico. Essas patologias intestinais têm suas etiologias relacionadas a distúrbios morfológicos ou funcionais das vias nervosas aferentes e eferentes do TGI (COTTRELL *et al.*, 1998; MILNE *et al.*, 2005; KIMBALL *et al.*, 2006; COFRÉ *et al.*, 2008; DUNCAN *et al.*, 2008). As vias aferentes primárias estão envolvidas na ativação de mediadores inflamatórios ou não inflamatórios, resultando em hiperregulação ou hiporegulação da estimulação nervosa (BUENO & FIORAMONTI, 2002; BARBARA *et al.*, 2002) em diversas patologias.

Já está bem estabelecido que inflamações no TGI causam mudanças tanto estruturais quanto funcionais no SNE. As respostas no SNE variam de acordo com o tipo e extensão do processo inflamatório, que por consequência depende da natureza do estímulo. Trabalhos com pacientes e modelos animais indicam que as inflamações alteram a neuroquímica de algumas classes de neurônios entéricos. As principais mudanças verificadas atualmente incluem: alterações no número e na neuroquímica dos neurônios entéricos; mudanças mediadas nos padrões da motilidade intestinal; defeitos no controle neural das células epiteliais em resposta a uma variedade de estímulos secretores, aumento da excitabilidade dos neurônios entéricos e alterações na transmissão sináptica em microcircuitos entéricos (COLLINS, 1996; SHARKEY & KROESE, 2001; LOMAX *et al.*, 2005).

O SNE tem sido mapeado quanto a natureza dos mediadores químicos. Geralmente, estas substâncias são expressas nos neurônios entéricos através da combinação de diferentes neurotransmissores, evento este denominado codificação química. O código químico é dependente de vários fatores, como o tipo neuronal, a espécie e o segmento intestinal, sendo a função de um neurônio dependente da codificação química, a qual já se demonstrou pronunciada plasticidade sob condições patológicas (HANSEN, 2003b). Nos casos

que envolvem distúrbios de motilidade, indícios apontam para a participação de substâncias neuroquímicas como a Substância P (SP), o peptídeo vasoativo intestinal (VIP) e o óxido nítrico (NO) (COFRÉ *et al.*, 2008). A alteração da concentração destes e de outros mediadores, bem como de suas enzimas de síntese ou de degradação, também podem estar relacionados com algumas patologias gastrointestinais (LIPMAN *et al.*, 1998; ROGAWSKI *et al.*, 1978; WESTER *et al.*, 1998). Um dos sintomas específicos frequentes das enfermidades inflamatórias do TGI é a retenção de gás no interior de segmentos do intestino, acarretando a distensão da parede do órgão e hipersensibilidade visceral, envolvendo vias nervosas aferentes e eferentes, indicando a participação de receptores para opióides endógenos, neurocininas e serotonina (5-HT) ao longo deste processo (MALAGELADA, 2002). Em outras situações como, por exemplo, em pacientes com megacólon chagásico apresentaram diminuição de imunorreatividade à *Protein Gene Product 9.5* (PGP 9.5), associada à perda de neurônios entéricos (SILVEIRA *et al.*, 2007). Além da alteração do número de neurônios, diversas patologias do TGI estão associadas com alterações neuroquímicas. O aumento da imunorreatividade de neurônios entéricos VIP-imunoreativos foi demonstrado em biópsias realizadas em pacientes com doença de Crohn, em isquemia experimental em ratos e em estudos de colite experimental em porquinhos da índia (VASINA *et al.*, 2006; LOMAX *et al.*, 2006, SAND *et al.*, 2008).

Dogiel (1899) foi o primeiro pesquisador a sugerir uma correlação entre as características estruturais e funcionais dos neurônios entéricos. Apesar dele ser favorável ao conceito reticular, sua classificação baseou-se na possibilidade de distinção entre os processos neuronais como os dendritos e os axônios. Ele considerava como processos dendríticos aqueles que se ramificam dentro do gânglio de origem, enquanto que os axônios não, embora tenha classificado de dendritos os processos que emanam do axônios, como os colaterais axonais. Os principais critérios de Dogiel para distinguir os diferentes tipos neuronais foram os comprimentos e formas dos dendritos (Tipo I, neurônio motor com dendritos curtos que seguem feixes de fibras da musculatura externa; Tipo II, neurônio sensorio com ramificações longas e finas, com ramos ocasionalmente projetando-se ao plexo submucoso; e Tipo III, sem função sugerida, ramificando-se por distâncias consideráveis dentro do próprio gânglio de origem, terminando no mesmo, sem sair do plexo). Além disso, Dogiel mencionou os tamanhos dos corpos de células nervosas, a sua localização dentro dos gânglios e as posições dos núcleos. Seu conceito era de que

diferentes formas de soma e dendritos correlacionam-se com funções diferentes, uma ligação que estaria relacionada à projeção axonal. Após Dogiel, surgiu a possibilidade de uma classificação morfológica dos neurônios entéricos, com um significado geral e funcional como um todo, ou seja, avaliando não apenas a forma geral do neurônio, mas separadamente a forma do soma e dos dendritos, as projeções axonais, a distribuição regional entre outras características. Esta nova possibilidade foi negada por investigadores por quase todo o século XX. O argumento mais importante para os defensores da possibilidade da classificação morfológica é a presença de vários processos longos nos neurônios do tipo II e de apenas um processo longo e vários curtos em outros neurônios. A validade desta distinção foi suficiente para muitos autores e resultou no denominado "colapso das classificações" (BREHMER *et al.*, 1999). Na década de 1980, Stach (1988) introduziu uma classificação morfológica utilizando a impregnação por prata no SNE de porcos. Esta classificação está longe de ser conclusiva: a definição de novos critérios para distinguir, por exemplo, diferentes subpopulações de neurônios do tipo III, tem sido avaliada (BREHMER *et al.*, 1999).

Assim, para uma análise mais detalhada da variedade dos tipos morfológicos neuronais, opta-se por utilizar a classificação de Stach (1988), que se sobressai à classificação de Dogiel (1896), por distinguir os tipos neuronais não apenas pela forma do soma, dos dendritos, como também pela projeção axonal, relações entre as células, sua localização no gânglio, além da distribuição nos plexos e ao longo da extensão do intestino (KRAMMER, *et al.*, 1997). Segundo esta classificação os neurônios podem ser diferenciados em seis tipos, que vão do tipo I ao VI: Tipo I (uniaxonal, radial multidendrítico, dendritos curtos e lamelares, com projeção axonal principalmente oral), Tipo II (pseudo-uniaxonal ou multiaxonal, ausência de dendritos, com projeção axonal oral, caudal, circular e vertical), Tipo III (uniaxonal, multidendrítico radial, longo, dendritos ramificados e projeção axonal principalmente caudal), Tipo IV (uniaxonal, multidendrítico polar, com projeção axonal vertical), Tipo V (uniaxonal, multidendrítico polar, com projeção axonal principalmente caudal) e Tipo VI (uniaxonal, axodendrítico, projeção axonal principalmente caudal) (Figura 2). Ainda, além dos tipos maiores de neurônios que podem ser distinguidos uns dos outros mais ou menos claramente por critérios de forma, parecem existir muitos neurônios menores que possam diferir em função dos maiores em cobaias e porcos. Eles eram chamados "neurônios pequenos com poucos processos", "minineurônios" ou "neurônios simples", sendo

provavelmente diferentes tipos funcionais. Postula-se que os seis tipos descritos de neurônios maiores representem, no mínimo, 20% de toda a população do PM (BREHMER *et al.*, 1999).

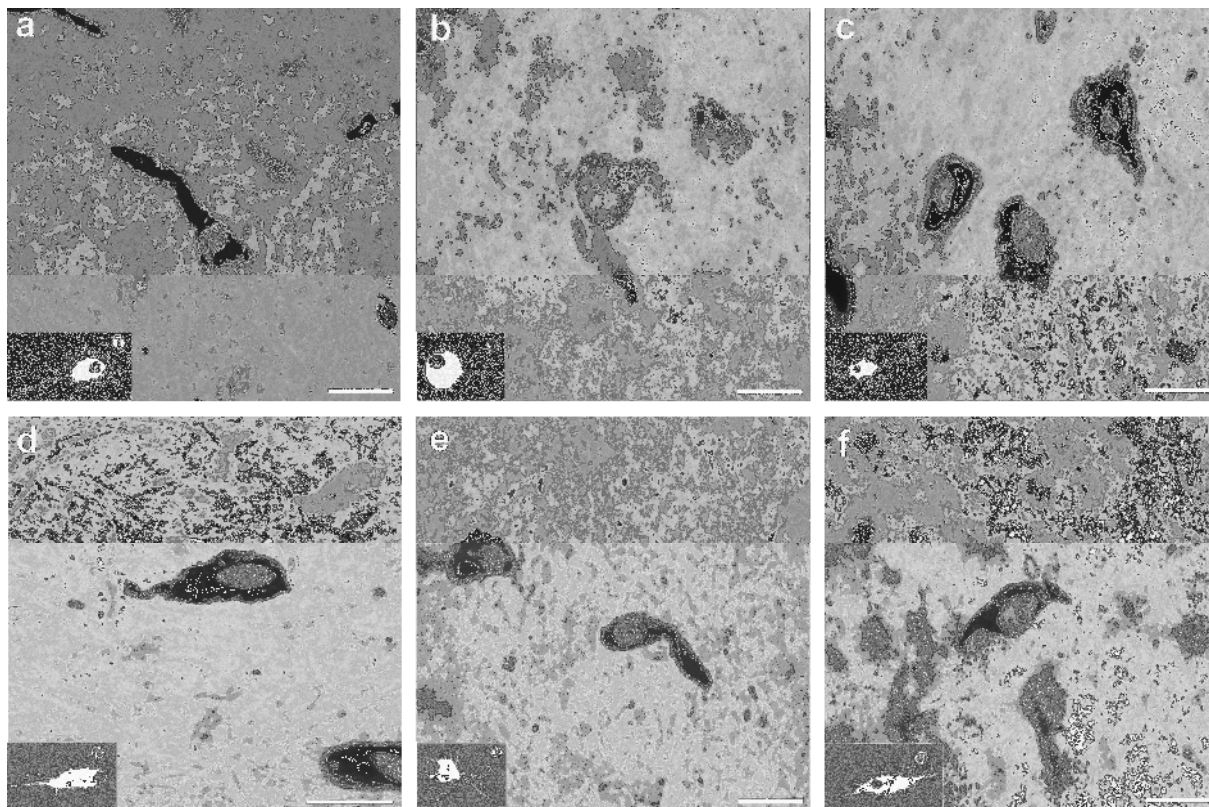


Figura 2. Morfologia dos neurônios NADPH-d-positivos no PM de *C. lanigera*, conforme a classificação de Stach (1988). **a.** Tipo I (uniaxonal, radial multidendrítico, dendritos curtos e lamelares, com projeção axonal principalmente oral). **b.** Tipo II (pseudo-uniaxonal ou multiaxonal, ausência de dendritos, com projeção axonal oral, caudal, circular e vertical). **c.** Tipo III (uniaxonal, multidendrítico radial, longo, dendritos ramificados e projeção axonal principalmente caudal). **d.** Tipo IV (uniaxonal, multidendrítico polar, com projeção axonal vertical). **e.** Tipo V (uniaxonal, multidendrítico polar, com projeção axonal principalmente caudal). **f.** Tipo VI (uniaxonal, axodendrítico, projeção axonal principalmente caudal). Escala: 100 μ m.

A atividade de enzimas, como a acetilcolinesterase (AChE) ou a diaforase da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH-d), tem sido amplamente utilizadas para descrever a distribuição do PM, em função da sua coloração consistente tanto para somas neuronais como para fibras axonais (COSTA *et al.*, 1987).

A NADPH-d é considerada um marcador para a presença da enzima óxido nítrico sintase (NOS), flavoproteínas que requerem nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato e tetrahidrobiopterina como cofatores, produzindo NO, liberado em alguns neurônios de gânglios simpáticos (DAWSON *et al.*, 1991; HOPE *et al.*, 1991). Existem três isoformas da enzima NOS: nNOS, eNOS e iNOS. As nNOS e eNOS encontram-se em neurônios e células do endotélio, respectivamente, e são dependentes da elevação do Ca^{2+} intracelular. A iNOS, óxido nítrico sintase induzida, diferentemente das outras duas isoformas, é independente da elevação do Ca^{2+} intracelular e sua expressão é induzida por lipopolissacarídeos bacterianos e por citocinas (JUKIĆ *et al.*, 2002), principalmente em situações de inflamação. Para determinação da enzima citossólica NADPH-d, o NADPH é utilizado como substrato em uma reação que libera elétrons e atua sobre o azul de nitrotetrazólio (*nitro blue tetrazolium*, NBT), resultando em um precipitado azul escuro insolúvel, o formazam, obtido pela liberação de elétrons do NADPH. Em função da coloração homogênea, a técnica NADPH-d evidencia facilmente as diferenças morfológicas entre os corpos celulares dos gânglios que formam o plexo mientérico. Muitos trabalhos têm utilizado esta técnica de coloração para caracterizar e quantificar neurônios do plexo mientérico (KRAMMER *et al.*, 1994; RIDER & WEYNS, 1994; WILHELM *et al.*, 1998; YUNKER & GALLIGAN 1998; FONTES *et al.*, 2004; GOMES, *et al.*, 2006;) e em diversas patologias que afetam o TGI (PEREIRA *et al.*, 2003; MAIFRINO *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2008.).

A AChE é uma esterase presente em neurônios que participam de sinapses colinérgicas, atuando na degradação do neurotransmissor acetilcolina, principal neurotransmissor de neurônios simpáticos pré-ganglionares e neurônios parassimpáticos pós-ganglionares. As colinesterases catalisam a hidrólise dos ésteres de colina e se classificam como: acetilcolinesterases (AChE), butirilcolinesterases (BuChE) ou pseudocolinesterases (TAYLOR & BROWN, 1999). A atividade AChE é detectada na membrana ou nas suas proximidades de neurônios envolvidos com o neurotransmissor acetilcolina. A ACh é uma glicoproteína e pode ser classificada quanto a sua estrutura em: assimétrica ou globular. A maior parte da AChE encontrada no sistema periférico autônomo nervoso é do tipo globular (TAYLOR & BROWN, 1999). Para técnicas histoquímicas de marcação da AChE utilizam-se substratos que, apesar de não serem específicos, são hidrolisados mais rapidamente do que a acetilcolina, como é o caso da acetiltiocolina (AThCh), um tioéster da colina. Além disso, o meio de incubação contém também sulfato

cúprico e ferricianeto de potássio. A hidrólise da acetilcolina, por meio da AChE, libera a tiocolina que reduz os íons de ferricianeto à ferrocianeto. O ferrocianeto precipita como um sal de cobre insolúvel, o ferrocianeto cúprico, que possui uma coloração marrom avermelhada, permitindo assim, a sua observação (KARNOVSKY & ROOTS, 1964).

Mais de 25 substâncias têm sido sugeridas no envolvimento da neurotransmissão no TGI. Todos os neurônios pré-ganglionares são colinérgicos e usam a ACh como neurotransmissor (JÄNIG, 2006). Considera-se a ACh o principal neurotransmissor excitatório no SNE, e pode ser encontrado tanto em motoneurônios excitatórios quanto em interneurônios (DAVIS *et al.*, 1998; FREYTAG *et al.*, 2008). Com base nisso, inúmeros trabalhos buscam quantificar e caracterizar neurônios do plexo mientérico através desta técnica, além de analisar a atividade da AChE em diferentes doenças inflamatórias do TGI em variados modelos animais (KOBAYASHI, *et al.*, 1995; DAVIS *et al.*, 1998; NEUNLIST *et al.*, 2003; FURLANI *et al.*, 2008; KNOWLES, *et al.*, 2009).

Neste sentido, considerando a variedade de substâncias químicas que atuam na transmissão nervosa extrínseca e intrínseca do TGI é pertinente estudar como algumas destas substâncias se comportam no acometimento e na recuperação de uma patologia que influencia aspectos motores, secretores e a dinâmica de gases no intestino grosso, como em uma situação de cólica timpânica. Não encontramos nenhuma publicação sobre morfologia geral do SNE de *Chinchilla lanigera*, ou dos efeitos da cólica timpânica sobre o TGI de *C. lanigera*.

Cólica Timpânica

Dentre as enfermidades mais frequentemente relatadas por criadores de chinchila, destaca-se a cólica timpânica ou meteorismo. Trata-se de uma doença metabólica de origem dietética caracterizada, nestes animais, pela distensão acentuada da parede do ceco, devido ao acúmulo ou à incapacidade de expulsar os gases produzidos em excesso por mecanismos fisiológicos durante a digestão fermentativa, acarretando dificuldade respiratória e circulatória, com asfixia e morte (EMBRAPA, 2008).

A fisiopatologia da cólica timpânica apresenta duas formas de quadro clínico, uma metabólica e outra mecânica. A cólica primária (metabólica) tem sua etiologia relacionada ao aumento na tensão superficial do líquido intestinal ou de sua viscosidade, fato

relacionado à presença de saponinas e pectinas, particularmente nas leguminosas (alfafa, trevo-branco, etc.). O excesso destas proteínas pode permitir que as bactérias e protozoários intestinais aumentem a produção de secreção viscosa, que irá ligar-se ao gás produzido durante o metabolismo normal destes microorganismos e, desta forma, impedir sua eliminação (HIRONAKA & FREEZE, 1992). Por outro lado, quando há dificuldades físicas à eructação, paralisia intestinal e/ou não eliminação dos gases intestinais, que podem ser determinados por obstrução ou por lesão nas vias nervosas responsáveis por estes processos, é diagnosticada a cólica secundária (espasmódica). Outras enfermidades como o tétano (BLOOD & HENDERSON, 1978) ou a administração oral de antibióticos ou sulfas, nos mamíferos domésticos pode alterar a microflora intestinal levando a uma predominância de bactérias gasogênicas, podendo determinar um quadro de cólica (JENSEN & MACKEY, 1974). Contudo, essas descrições são baseadas em estudos realizados principalmente em bovinos e equinos (BLOOD & HENDERSON, 1978). Este fato resulta na aplicação de procedimentos pouco eficazes ou equivocados na determinação do diagnóstico e durante o atendimento destes animais por Médicos Veterinários (HILLYER & QUESENBERRY, 1997).

As características anatômicas do TGI dos roedores herbívoros, como a *Chinchilla lanigera*, contribuem para o desenvolvimento desta patologia, tais como o trato muito longo, o ceco volumoso e o trânsito intestinal lento em associação com o fornecimento de uma dieta rica em grãos e leguminosas, são condições que permitem o fácil acometimento de cólica timpânica, com rápido agravamento do quadro (QUINTON, 2005). Como ressaltado anteriormente, os hábitos alimentares desses roedores em cativeiro são pouco estudados (HILLYER *et al.*, 1997). Acredita-se que, em função deste desconhecimento, a frequência da cólica timpânica em animais de cabanhas e de estimação seja elevada (WEBB, 1994; HILLYER *et al.*, 1997; portais na Internet sobre chinchilas).

2. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Descrição do plexo mientérico do roedor *Chinchilla lanigera* normais.

Investigar as possíveis alterações morfológicas e neuroquímicas no PM do intestino de *C. lanigera* acometidas de cólica timpânica experimental.

Desenvolver um protocolo de cólica timpânica para esta espécie, seguido de processo de recuperação para avaliação das possíveis alterações também após o tratamento (dieta balanceada por vinte dias associado a cinco dias de antiinflamatório cetoprofeno).

Objetivos Específicos

Caracterizar e quantificar os tipos neuronais do PM de *C. lanigera*, quanto à morfologia, por meio da detecção da atividade da enzima nicotinamida adenina nucleotídeo diaforase (NADPH-d) por procedimento histoquímico e quantificar o número e tamanho dos gânglios do PM através da detecção histoquímica da enzima acetilcolinesterase (AChE), em situação de cólica timpânica e após a recuperação desta enfermidade.

3. MATERIAL & MÉTODOS

Animais:

Para este trabalho foram utilizados 15 chinchilas adultas (13 fêmeas e 2 machos) oriundos da Cabanha Chillacenter (Porto Alegre, RS, Brazil). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no Laboratório de Neurobiologia Comparada, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, com temperatura (16-24°C) e ciclo fotoperiódico (12 h luz : 12 h escuro) controlados. Os animais foram aclimatados durante três dias nessas condições e foram alimentados com ração comercial (Supra chinchilas, Alisul Alimentos SA, Brasil) e água *ad libitum* durante este período. Após o período de aclimação, os animais foram divididos em três grupos: controle (5 animais), timpânico (5 animais) e recuperado (5 animais). O protocolo usado para cólica timpânica foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFRGs (processo nº 2008148).

Procedimentos experimentais:

Indução da cólica timpânica: Para a indução da cólica timpânica (CT) nas chinchilas foram realizadas adaptações nos protocolos de abdomen agudo ou cólica em equinos (Moore 2006, Weiss *et al* 1998). Uma dieta rica em carboidratos, pobre em fibras e proteínas e com excesso de oferta de alfafa (*Medicago sativa*) foi utilizada. O grupo controle foi alimentado diariamente com 30 g de ração comercial, recebendo suplementação uma vez por semana com 10 g de alfafa. Os grupos timpânico e recuperado (definidos abaixo) foram alimentados diariamente com a seguinte dieta: 15 g de ração comercial, 40 g de grãos de milho (*Zea mays*), 20 g de cenoura (*Daucus carota*), 5 g de sementes de girassol (*Helianthus annuus*) e 10 g de alfafa. Após o diagnóstico de CT, o grupo recuperado foi alimentado com a mesma dieta do grupo controle. O diagnóstico clínico foi estabelecido através de exames clínicos, que constou de palpação, auscultação, percussão abdominal e análise da sensibilização abdominal por meio de um transdutor de força mecânica (von Frey digital, Insight, Brasil). Os exames clínicos foram realizados nos seguintes períodos: no momento da chegada dos animais ao laboratório (Dia zero; D0), após o período de aclimação (D4); durante a dieta de indução da cólica e a confirmação do início da doença (D11 e D18),

durante o o período de recuperação do grupo recuperado (D23), e antes dos animais serem mortos (D18 e D38).

Duas semanas após o início da dieta de indução (D18), o grupo recuperado começou a receber a mesma dieta do grupo controle, sendo medicado com 1% cetoprofeno (2 mg/kg, IM, Merial, Brasil) uma vez por dia, durante cinco dias, e foram examinados após este período (D23). O grupo timpânico foi morto 14 dias após o início da dieta (D18) e o grupo recuperado foi morto 15 dias após o fim do tratamento com cetoprofeno (D38). Dois animais do grupo controle foram mortos, ao mesmo tempo que o grupo do timpânico, e os outros três animais foram mortos junto com o grupo recuperado. Os animais foram mortos com injeção intramuscular de ketamina (90 mg / kg, Pfizer, Brasil) e xilazina (10 mg / kg, Pfizer, Brasil). A linha de tempo dos procedimentos experimentais encontra-se representada na Figura 3. Alterações anatômicas decorrentes da indução da cólica timpânica foram confirmadas por necropsia.

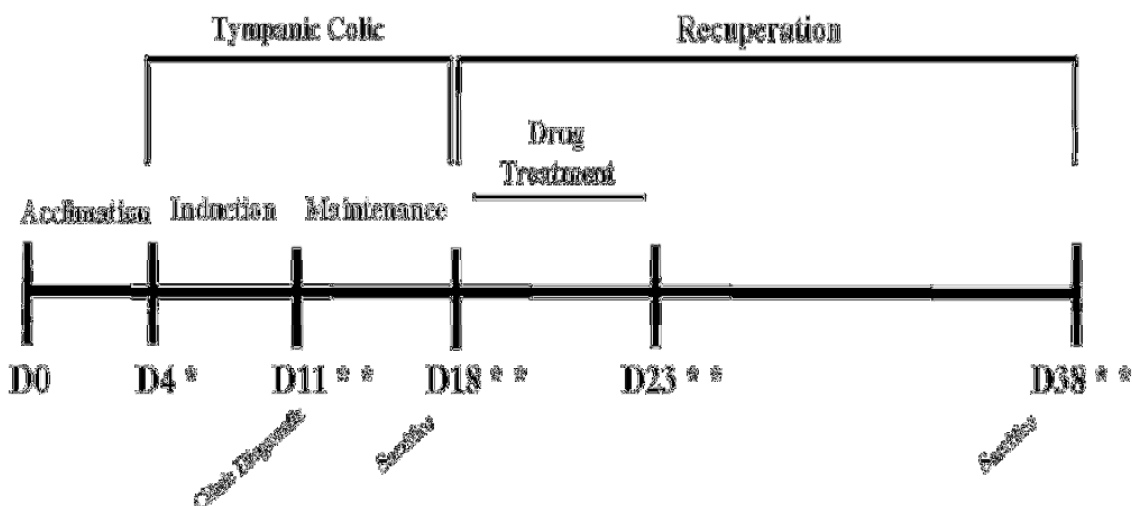


Figura 3. Linha do tempo de realização dos procedimentos. O período de aclimação foi realizado entre os dias (D) D0 e D4, sendo realizado o primeiro exame clínico. O período de cólica timpânica (CT) cursou entre os dias D4 e D18, sendo dividido em duas fases: indução da doença (D4 a D11) e manutenção da doença (D11 a D18), sendo realizados exames clínicos e teste de sensibilização abdominal nos dias D11 e D18. Os animais timpânicos e dois controles foram mortos no D18. O período de tratamento foi dividido em duas etapas: administração do medicamento (realizado entre o D18 e D23, Cetofen 1%, 2 mg / kg / 24:24 h, IM) e pós-tratamento (entre D23 e D38, totalizando 15 dias). Em D23 e D38 foi realizado o teste de Von Frey. Os animais recuperados e três controles foram mortos no D38. Um asterisco indica o exame clínico, enquanto que dois indicam o exame clínico associado ao teste de Von Frey.

Técnica Histoquímica AChE: Foi utilizado o método de Karnovsky e Roots (1964) para detecção de atividade AChE em porções (preparado de membrana) das regiões do ceco (ileocecal, intercecal, sacular e tubular) e cólon (ascendente, transverso e descendente), visando determinar o formato e o tamanho dos gânglios mientéricos. Os preparados de membrana foram lavados com tampão Tris-maleato 0.1 M, pH 6.0 (TM) e colocados no meio de incubação contendo: 2.1 mM iodeto de acetiltiocolina (Sigma), citrato de sódio 0.1 M, sulfato cúprico 30 mM e ferricianeto de potássio 5 mM em tampão TM (12h a temperatura ambiente) protegidos de luz. Após a incubação, os preparados de membrana foram lavados em TM. O material foi dissecado em microscópio cirúrgico (DF Vasconcellos, São Paulo, Brasil) onde todas as camadas entéricas foram rebatidas e retiradas, restando apenas a túnica muscular longitudinal com o plexo mientérico. Após, as regiões com a camada de interesse foram transferidas para lâminas gelatinizadas e com Aquatex (Merck).

Técnica Histoquímica NADPH-d (Weinberg *et al.* 1996): As regiões anteriormente especificadas foram lavadas em tampão fosfato-salino (PBS) e incubadas em solução NADPH-d (0.5 mg/ml de azul de nitrotetrazólio (Sigma) em 0,2% Triton X-100 em PBS + 0.1 mg/ml (PBS-T) β -Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (β -NADPH, forma reduzida, Sigma) por 24 horas a 37°C. Após a incubação, os preparados foram lavados em PBS, dissecados e montados da mesma forma como anteriormente descrito.

Análise dos Resultados: Os preparados de membrana, obtidos em cada técnica, foram observados em microscópio óptico (Nikon Optipoth-2) e fotodocumentados (câmera digital Sony Cybershot DSC-N2). Para a descrição do formato e mensuração da área de superfície ganglionar as imagens foram obtidas em objetiva de 10 x e as áreas ganglionares mensuradas por meio do software Image J versão 1.37. As porções coletadas e submetidas à técnica histoquímica de NADPH-d foram utilizadas para contagem e classificação neuronal, segundo os critérios propostos por Stach (1988). As imagens foram capturadas em magnificação de 20 x e analisadas utilizando o software Image J versão 1.37. Cada campo (imagem adquirida) foi dividido em quatro quadrantes, onde foi aplicada uma área de interesse de 320 μ m x 320 μ m, sendo considerada como margens de exclusão a borda superior e lateral direita da área de interesse. Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados utilizando o software SigmaStat 3.5, adotando nível de significância: $p < 0,05$.

Para a comparação entre os grupos experimentais foi utilizado análise de variância (ANOVA) de duas vias e o teste de Student-Newman-Keuls para determinar a significância. Os testes não-paramétricos foram obtidos por ANOVA de uma via e a significância via teste Kruskal-Wallis, sendo expressos em mediana e intervalos interquartis.

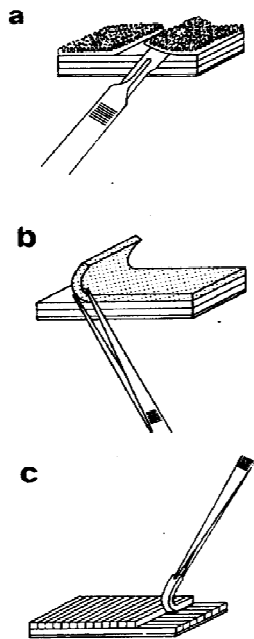


Figura 4. Esquema da técnica de microdissecação para confecção de preparados de membrana da túnica muscular do trato gastrointestinal. **a.** A túnica mucosa é retirada por meio de raspagem. **b.** Com o auxílio de pinças oftálmicas retira-se a submucosa. **c.** As túnicas musculares circulares e longitudinais são separadas, mantendo-se a lâmina conjuntiva onde encontra-se o plexo mientérico (de Krammer *et al.*, 1997).

4. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em formato de artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*.

ARTIGO: Avaliação das alterações morfológicas e da atividade da acetilcolinesterase e da nadph diaforase do plexo mientérico no intestino de *Chinchilla lanigera* (RODENTIA: CHINCHILLIDAE) sob cólica timpânica experimental

Raphaela da Cunha Franceschi^{1,2}; Malcon Andrei Martinez-Pereira^{1,2}; Bárbara Paranhos Coelho^{2,3}; Gustavo da Rosa Fünkler²; Denise M. Zancan^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Neurociências; ²Laboratório de Neurobiologia Comparada, Departamento de Fisiologia; ³Programa de Pós-Graduação em Bioquímica; Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

***Correspondência: Denise M. Zancan**, Laboratório de Neurobiologia Comparada, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500. Porto Alegre, RS, 90050-170. E-mail: zancan@ufrgs.br.

Número de páginas do manuscrito (incluindo figuras): 36

Número de figuras: 07

Resumo

As chinchilas (*Chinchilla lanigera*) possuem o trato gastrointestinal longo que em associação com uma dieta rica em grãos e leguminosas são condições que permitem o fácil acometimento da cólica timpânica (CT). Visto que o funcionamento normal do intestino depende do controle exercido pelo sistema nervoso entérico, através dos plexos mientérico (PM) e submucoso, espera-se que o acometimento de uma enfermidade promova alterações do PM. Nesse sentido foi utilizado um modelo experimental de CT para analisar a atividade da acetilcolinesterase (AChE) e diaforase da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH-d) no PM de chinchilas timpanizadas e recuperadas pós-timpanismo. Foi observado um aumento significativo generalizado na área gânglionar total dos animais timpanizados em relação ao grupo controle, com diferença significativa na porção ascendente entre os grupos timpânico e recuperado. Houve diminuição do número de neurônios mientéricos NADPH-d positivos nos animais com CT e recuperação pós-timpanismo deste número. Os tipos de neurônios mientéricos I, III, IV e VI NADPH-d diminuíram significativamente nos animais timpânicos, nas porções intercecal e tubular do ceco e nos cólons transverso e descendente. Assim, a CT provoca alteração no metabolismo colinérgico de forma generalizada no ceco e cólon dos animais doentes, e diminuição do número de neurônios NADPH-d-positivos, principalmente dos motoneurônios, indicando que a CT afeta a motilidade, especialmente das porções sacular do ceco e do cólon transverso, e a sensibilidade do PM do cólon, o qual sofre maior distensão.

Introdução

As chinchilas (*Chinchilla lanigera*) apresentam grande interesse na comercialização das peles e também como animais de estimação e de laboratório. Entretanto, apesar de amplamente difundida no ambiente urbano, não existem informações detalhadas sobre os hábitos e enfermidades que acometem a espécie.

O sistema nervoso entérico (SNE) exerce um amplo controle sobre a coordenação das atividades básicas do sistema digestório como a motilidade, absorção e secreção de nutrientes e regulação do fluxo sanguíneo (Krammer *et al.*, 1997) através dos plexos mientérico e submucoso. No seu conjunto, estes plexos agrupam um número de neurônios que se aproxima ao da medula espinhal. Destes, aproximadamente 70% são eferentes do trato digestório (Stach, 1988). Alterações morfológicas e funcionais do SNE tem sido frequentemente documentadas em situações de enfermidade do TGI (Collins, 1996; Furness, 2008).

A cólica timpânica (CT) é uma doença metabólica de origem dietética caracterizada pela distensão acentuada da parede do ceco, devido à incapacidade de expulsar os gases produzidos em excesso durante a digestão fermentativa, acarretando dificuldade respiratória e circulatória, até a asfixia e a morte. A CT apresenta duas formas de quadro clínico, uma metabólica e outra mecânica. A cólica primária (metabólica) tem sua etiologia relacionada ao aumento na tensão superficial do líquido intestinal ou de sua viscosidade, fato relacionado à presença de saponinas e pectinas, particularmente de leguminosas, que, em excesso pode permitir que bactérias e protozoários intestinais aumentem a produção de secreção viscosa, que combinada ao gás produzido pelo metabolismo normal destes microorganismos e impede sua eliminação (Hironaka e Freeze, 1992). As características do TGI dos roedores herbívoros, como a *C. lanigera*, com ceco volumoso que se continua em um cólon ascendente longo (Castro *et al.*, 2010), associado ao fornecimento de uma dieta rica em grãos e leguminosas, são condições que permitem o fácil acometimento de CT, com rápido agravamento do quadro (Quinton, 2005). As informações sobre os hábitos alimentares destes roedores no habitat natural tem sido estudadas (Mohlis, 1983; Córtes *et al.*, 2002), mas há uma carência de estudos sobre a dieta ideal desses animais em cativeiro, o que deve justificar a frequência da cólica timpânica em animais de cabanhas e de estimação se apresenta elevada (Hillyer e Quesenberry, 1997).

A atividade de enzimas acetilcolinesterase (AChE) e diaforase da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH-d), foram utilizadas para descrever a distribuição do PM. A alteração destes marcadores enzimáticos tem sido relatada em diversas patologias do TGI. (Cracco e Filogamo, 1994; De Ridder e Weyns, 1994; Collins, 1996; Maifrino, *et al.*, 1999; Sharkey e Kroese, 2001; Santos *et al.*, 2008). O objetivo do presente trabalho foi analisar possíveis alterações dos neurônios com atividade NADPH-d e AChE do plexo mientérico do ceco e cólon de *Chinchilla lanígera* submetidas à cólica timpânica experimental e se estas alterações são reversíveis após a recuperação do timpanismo.

Material e Métodos

Animais: Foram utilizados 15 chinchilas (13 fêmeas e 2 machos) oriundos da Cabanha Chillacenter, (Porto Alegre, RS, Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no Laboratório de Neurobiologia Comparada, Instituto de Ciências Básicas da Saúde UFRGS, com temperatura (16-24°C) e ciclo fotoperiódico (12 h luz : 12 h escuro) controlados. Os animais foram aclimatados durante três dias e alimentados com ração comercial (Supra chinchilas, Alisul Alimentos SA, Brasil) e água *ad libitum*. Após o período de aclimação, os animais foram divididos em três grupos: controle (n = 5), timpânico (n = 5) e recuperado (n = 5). O protocolo usado para cólica timpânica foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFRGS (processo n° 2008148).

Procedimentos experimentais:

Indução da cólica timpânica: Para a indução da cólica timpânica (CT) nas chinchilas foram realizadas adaptações nos protocolos de abomen agudo ou cólica em equinos (Moore 2006, Weiss *et al* 1998). O grupo controle foi alimentado diariamente com 30 g de ração comercial, recebendo suplementação uma vez por semana com 10 g de alfafa (*Medicago sativa*). Os grupos timpânico e recuperado foram alimentados diariamente com a seguinte dieta: 15 g de

ração comercial, 40 g de grãos de milho (*Zea mays*), 20 g de cenoura (*Daucus carota*), 5 g de sementes de girassol (*Helianthus annuus*) e 10 g de alfafa. O diagnóstico foi estabelecido através de exames clínicos (palpação, auscultação e percussão abdominal) e análise da sensibilização abdominal por meio do teste de von Frey (Transdutor digital de força mecânica, Insight, Brasil). Os exames clínicos foram realizados: na chegada dos animais ao laboratório (Dia zero; D0), após a aclimatação (D4); durante a dieta de indução da cólica e a confirmação do início da doença (D11 e D18), durante o período de recuperação (D23), e antes dos animais serem mortos (D18 e D38) (Figura 1). Duas semanas após o início da dieta de indução (D18), o grupo recuperado recebeu a mesma dieta do grupo controle e cetoprofeno 1% (2 mg / kg / 24 h, IM, Merial, Brasil) durante cinco dias, sendo examinados após este período (D23). O grupo timpânico foi morto 14 dias após o início da dieta (D18) e o grupo recuperado 15 dias após o fim do tratamento (D38). Os animais foram mortos com injeção intracardíaca de cetamina (90 mg / kg, IM, Pfizer, Brasil) e xilazina (10 mg / kg, IM, Pfizer, Brasil). Alterações anatômicas decorrentes da indução da cólica timpânica foram confirmadas por necropsia. As porções do TGI foram isoladas e fixadas em paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4, para posterior processamentos das técnicas histoquímicas da atividade AChE e NADPHd.

Técnica Histoquímica AChE (Karnovsky e Roots, 1964): A detecção da atividade AChE foi feita em preparados de membrana de porções do ceco (ileocecal, intercecal, sacular e tubular) e cólon ascendente, transverso e descendente, visando determinar o formato e o tamanho dos gânglios mientéricos com atividade AChE. Os preparados de membrana foram lavados com tampão Tris-maleato 0.1 M, pH 6.0 (TM) e colocados no meio de incubação contendo: 2.1 mM iodeto de acetilticolina (Sigma, USA), citrato de sódio 0.1 M, sulfato cúprico 30 mM e ferricianeto de potássio 5 mM em tampão Tris-maleato (12 h a temperatura ambiente) protegidos de luz. Após a incubação, os tecidos foram lavados em TM e dissecados

em microscópio cirúrgico (DF Vasconcellos, São Paulo, Brasil), para obtenção da túnica muscular longitudinal com o PM. Estes preparados de membrana foram transferidos para lâminas e montados com Aquatex (Merck, Darmstadt, Germany).

Técnica Histoquímica NADPH-d (Weinberg *et al.* 1996): As mesmas regiões acima especificadas foram incubadas em solução NADPH-d (0.5 mg/ml de azul de nitrotetrazólio (Sigma) em 0,2% Triton X-100 em PBS + 0.1 mg/ml β -Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (β -NADPH, forma reduzida, Sigma) por 24 horas a 37°C. Após a incubação, os preparados, lavados em PBS, foram dissecados e montados da mesma forma descrita anteriormente.

Análise dos Resultados: Os preparados de membrana, obtidos em cada técnica, foram observados em microscópio óptico (Nikon Optipoth-2, Nikon Corporation, Belmont, California) e, a partir da imagem capturada (câmera digital Sony Cybershot DSC-N2, Sony Corporation Info, Tokyo, Japan) foi medida a área de superfície ganglionar por meio do software Image J 1.37. Em função da uniformidade da coloração obtida no citoplasma dos neurônios com atividade NADPH-d, foi possível utilizar estes resultados para identificar e contar os tipos neuronais, segundo Stach (1988). As imagens capturadas foram analisadas com o software Image J versão 1.37. Para cada imagem capturada, quatro áreas de interesse (320 μ m x 320 μ m), uma em cada quadrante, foram analisadas (margens de exclusão da área de interesse: borda superior e lateral direita). Para a comparação entre os grupos experimentais foi utilizado análise de variância de uma via (ANOVA) e teste Student-Newman-Keuls para análise entre as médias dos grupos. Os testes não-paramétricos foram obtidos pelo teste de Kruskal-Wallis, sendo expressos em mediana e intervalos interquartis. Os dados são mostrados como média \pm erro padrão da média. O critério de significância foi assumido como $P < 0,05$.

Resultados

Macroscópicos: Os animais não apresentaram alterações clínicas em D0 e D4, enquanto no D11 (sete dias após a dieta de indução), os animais timpanizados apresentaram uma maior tensão abdominal, diminuíram o consumo de alfafa e defecaram menos. O teste de von Frey revelou uma sensibilidade abdominal aumentada nos animais do grupo timpânico em D18, indicando o estabelecimento da doença (Figura 1b). Em D18, estes sintomas persistiram nos animais timpânicos e outros sintomas também passaram a ser detectados: aumento dos sons na percussão abdominal, dor abdominal durante a palpação, afagia e aumento do volume cecal e do flanco esquerdo. Após o início do tratamento (medicamento mais dieta controle; D23), os animais recuperados não apresentaram os sintomas descritos anteriormente, recuperando o apetite e defecando normalmente e com sensibilidade abdominal semelhante a do grupo controle. Durante a necrópsia, os animais timpânicos apresentaram um aumento de volume do ceco, cólon inter-cecal e cólon ascendente (Figura 2). Focos de isquemia foram observados nas junções jejuno-ileo, ileocecal e no cólon ascendente, com infarto nos vasos sanguíneos mesentéricos de todo o intestino. Os cólons transversos e descendentes apresentaram acúmulo de fezes, enquanto o reto, não. Os animais recuperados também apresentaram um aumento no volume do ceco, inter-cecal e cólon ascendente, mas não houve infarto nos vasos sanguíneos mesentéricos.

Morfologia do plexo: O PM da *C. lanigera* apresenta uma organização ganglionar regular; os gânglios seguem o sentido dos feixes de fibras da camada muscular longitudinal e são conectados por ramos calibrosos, formando uma extensa rede gangliônica de formato retangular e uniforme (Figuras 3 e 4). O PM apresenta-se dividido em três redes distintas (Figura 3h): o plexo primário (formado por gânglios de médio e grande tamanho e feixes de fibras nervosas de primeira ordem); secundário (constituído por gânglios de pequeno tamanho e feixes de segunda ordem) e terciário (somente feixes de fibras de terceira ordem, que

seguem paralelamente as fibras musculares longitudinais). A coloração uniforme resultante da ampla atividade AChE da rede ganglionar do PM permitiu a descrição do padrão de organização dos gânglios e das fibras. Os gânglios mostram-se polimórficos, apresentando as formas oval, esferóide, poliédrico e estrelada em todas as porções analisadas do TGI. Nos animais do grupo timpânico a rede de gânglios mostra-se alterada pela distensão da parede visceral, resultante do acúmulo de gases, tornando a rede menos densa, os gânglios alongados e as conexões mais finas entre as células adjacentes (Figuras 3 e 4). Essas mudanças são revertidas ao padrão do PM controle no grupo recuperado (Figuras 3 e 4).

Morfometria ganglionar: Foram feitas mensurações da área e do número de gânglios nos três grupos experimentais por meio da técnica de histoquímica para AChE. A média da área ganglionar total (considerando a totalidade dos gânglios das regiões do ceco e dos cólon) aumentou significativamente ($p < 0,05$) no grupo timpânico ($1376,02 \pm 143,30 \mu\text{m}^2$) em relação ao controle ($1023,88 \pm 50,90 \mu\text{m}^2$) e recuperado ($984,20 \pm 53,33 \mu\text{m}^2$) (Figura 5a), ainda que ao analisar as áreas ganglionares nas diferentes regiões do ceco (ileocecal, sacular, intercecal e tubular) e do cólon (ascendente, transverso e descendente) não tenham sido observadas diferenças significativas entre os três grupos (Tabela 1).

Para a contagem do número de gânglios, estes foram classificados em três grupos, de acordo com o tamanho: pequenos (até $500 \mu\text{m}^2$), médios (de 501 a $1000 \mu\text{m}^2$) e grandes (acima de $1000 \mu\text{m}^2$) (Figura 5b). O número total de gânglios com atividade AChE também não apresentou variação significativa entre o grupo controle ($1768,40 \pm 471,02$), timpânico ($1649,40 \pm 624,24$) e recuperado ($2453,60 \pm 909,97$) (Figura 5c).

O número de gânglios mensurados no ceco não mostra diferença significativa nas diferentes regiões do órgão, entretanto no cólon, somente na porção ascendente há uma diferença significativa ($p = 0,019$) entre os grupos (Tabela 2).

A média do número de gânglios entre os três tamanhos analisados não mostra variação significativa entre os grupos controle, timpânico e recuperado (Tabela 3; Figura 5c e 5d). Entretanto, mesmo que não significativo ($p=0,06$), observou-se uma diminuição de 40% a 82% dos gânglios de pequeno e médio tamanho nas regiões do cólon dos timpânicos em relação aos controles e um aumento de 33% a 80% dos gânglios de grande tamanho nas regiões do ceco do grupo timpânico em comparação com os animais controle (Tabela 3).

Classificação e distribuição neuronal: Como os neurônios dos seis tipos neuronais, segundo Stach (1988), mostraram atividade NADPH-d, foi analisado o número total de neurônios (sem diferenciação por tipo) com atividade NADPH-d entre os três grupos (controle, timpânico e recuperado) para cada porção do TGI, como também o número de neurônios para cada um dos seis diferentes tipos de neurônios (Figura 6), entre os grupos experimentais. Neste estudo os animais do grupo timpânico apresentaram número significativamente menor de neurônios mientéricos NADPH-d positivos (cerca de 50% menor) em relação ao grupo controle. O número de neurônios não diferiu entre recuperados e controles ($p<0,01$, Figura 7). Quanto aos diferentes tipos neuronais, observou-se uma redução significativa de neurônios NADPH-d no TGI em geral de neurônios tipo I ($p<0,05$), tipo III ($p<0,01$), tipo IV ($p<0,01$) e tipo VI ($p\leq 0,01$) nos animais timpânicos (Tabela 4). As porções intercecal e tubular do ceco e os cólons transversos e descendentes mostram diminuição do número de neurônios NADPH-d positivos com recuperação da população destes neurônios aos valores similares aos controles. Entretanto, as porções íleo-cecal e sacular do ceco e no cólon ascendente mostraram uma tendência à diminuição de neurônios NADPH-d positivos, e posterior recuperação, ainda que não significativa entre os grupos (Tabela 5). Em relação à diminuição dos tipos neuronais por regiões do TGI (Tabela 6), houve reduções significativas dos neurônios NADPH-d positivos nos timpânicos em relação ao controle e ao recuperado para os tipos neuronais: tipo I nas porções sacular, intercecal e cólon transversos ($p<0,05$); tipo II no cólon ascendente ($p<0,05$),

transverso ($p < 0,05$) e descendente ($p < 0,01$); tipo III porções sacular e tubular ($p < 0,01$), intercecal ($p < 0,01$), cólons ascendente, transverso e descendente ($p \leq 0,01$); Tipo IV, região sacular e tubular ($p \leq 0,01$), intercecal ($p < 0,05$), cólon transverso e descendente ($p < 0,05$); tipo V na região tubular e intercecal ($p < 0,05$); e tipo VI nas regiões sacular, tubular e intercecal ($p \leq 0,01$), cólons ascendente, transverso e cólon descendente ($p < 0,05$).

Discussão

Os estudos em diferentes mamíferos demonstraram que os plexos entéricos apresentam-se diferenciados, permitindo estabelecer comparações quanto a citoarquitetura geral dos plexos entéricos entre indivíduos da mesma espécie e em diferentes porções do intestino, indicando a existência de mecanismos que regulam de forma dinâmica a morfogênese do SNE (Gabella, 1987). A espécie *C. lanigera* apresenta o ceco bastante desenvolvido em comparação a outros roedores, o que torna seu trato macroscopicamente mais semelhante ao dos lagomorfos (coelhos, lebres e pikas). Comparado a trabalhos anteriores com roedores, a morfologia do PM da espécie *C. lanigera* é muito semelhante ao descrito para o porquinho-da-índia. O PM do porquinho-da-índia apresenta a mesma densidade celular encontrada no rato, entretanto, com disposição mais geométrica que no rato e com gânglios mais alongados, predominantemente paralelos à musculatura longitudinal. O plexo do rato apresenta suas fibras mais finas, formando uma rede menos regular que na cobaia (Wilhelm *et al.*, 1998). O PM do coelho, entretanto, é constituído por poucas células ganglionares e sem apresentar fibras nervosas no plexo terciário (Gabella, 1987), características estas opostas às encontradas nas chinchilas.

Uma comparação sobre as variações nas formas dos gânglios do PM de mamíferos de grande porte com animais de pequeno porte revelou que nos primeiros os gânglios possuem formas mais variadas, enquanto que nos segundos os gânglios são mais alongados e com

formatos mais uniformes (Freytag *et al.*, 2008). Contudo, neste estudo, nas chinchilas do grupo controle foram observados uniformidade do padrão de distribuição ganglionar em todos os segmentos intestinais, mas apresentando vários formatos. Os gânglios apresentavam-se alongados apenas no grupo timpânico, provavelmente devido à distensão visceral provocada pela doença.

Em relação às três faixas de tamanhos ganglionares não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais de chinchilas. Porém, o número de gânglios AChE positivos do grupo timpânico apresentou uma tendência à diminuição entre os de pequeno e médio tamanho e um aumento nos de grande tamanho em comparação aos animais controle. O aumento do lúmen intestinal produz um efeito de distensão sobre a parede do trato que poderia levar a uma redução de gânglios em uma área, conforme descrito em ratos com obstrução intestinal prolongada, nos quais houve diminuição significativa no número de gânglios entre animais doentes e os controle e/ou sham (Moore *et al.*, 2003). O aumento verificado no número de gânglios grandes AChE positivos nos timpanizados, ainda que não confirmado com a análise estatística, poderia indicar uma tendência ao desenvolvimento de hipertrofia dos gânglios AChE-positivos dos animais timpânicos e uma posterior recuperação nos animais recuperados. Por outro lado, houve um aumento significativo da média da área ganglionar total (considerando os gânglios AChE positivos) nos animais timpanizados em relação aos outros grupos, que pode apoiar a hipótese de hipertrofia de elementos neurais e/ou a aumento do número de mastócitos, associado à extensão da infiltração inflamatória, como tem sido relatado em colites e na doença de Crohn, ou ainda, à alterações nas células gliais (hiperplasia) (Vasina *et al.*, 2006). Como o aumento da área ganglionar apresentou-se generalizado nos segmentos intestinais das chinchilas timpanizadas, não podemos afirmar se uma área específica foi mais afetada durante a doença em relação às outras, considerando apenas os gânglios com atividade AChE. Contudo, tem sido descrito que ocorre um aumento

da atividade AChE na camada muscular do cólon na aganglionose que ocorre na doença de Hirschsprung (Meier-Ruge *et al.*, 1972; Santos *et al.*, 2008).

As alterações funcionais na inervação intestinal, tais como liberação alterada de neurotransmissores, são um aspecto importante e prevalente de inflamação intestinal. Em relação ao número total de gânglios AChE-positivos, não foi encontrado variação significativa entre os grupos experimentais de chinchilas, mesmo com uma diminuição de 40 a 60% no número de gânglios AChE-positivos no grupo timpânico. Este dado difere do observado na doença diverticular do cólon de pacientes, onde o número de gânglios diminuiu por área de plexo (Deduchovas *et al.*, 2008). Entretanto no cólon ascendente do grupo recuperado de *C. lanigera* houve um aumento significativo no número de gânglios AChE-positivos em relação aos demais grupos, indicando uma possível alteração no metabolismo colinérgico durante um período após a diminuição do timpanismo, talvez visando suprir algum déficit como compensação do tempo de motilidade comprometida no timpanismo.

Estudos sobre a descrição celular normal do PM (Ward *et al.*, 1992; Brehmer e Beleites, 1996; Wester *et al.*, 1998; Wilhelm *et al.*, 1998; Nemeth *et al.*, 2000), ou utilizando protocolos de doenças que afetem o SNE (Pereira *et al.*, 2003; Fontes *et al.*, 2004) ou, ainda, induzindo nutrição deficiente (Moreira *et al.*, 2008) tem empregado a técnica de histoquímica para NADPH-d para descrever e avaliar as mudanças no TGI, através da densidade populacional neuronal. Em nosso estudo observamos diminuição significativa de neurônios com atividade enzimática NADPH-d no grupo timpânico (mais de 50%) comparado ao grupo controle e uma posterior recuperação dos neurônios NADPH-d-positivos do grupo recuperado (mais de 80%). Contudo, em modelos em ratos de colite e doença de Crohn, demonstraram perda significativa e irreversível de neurônios nos grupos doentes, sem posterior recuperação neuronal nos grupos recuperados, sugerindo que os processos inflamatórios seriam os responsáveis pela perda de neurônios nos plexo submucoso e mientérico (Sanovic, 1999;

Gonçalves *et al.*, 2008; Boyer *et al.*, 2005). Nestes trabalhos não foram observados uma diminuição do número de gânglios no PM, havendo perda parcial ganglionar no plexo submucoso. Os métodos utilizados nas induções da colite e da doença de Crohn (Morris *et al.*, 1989) devem provocar uma lesão mais grave que a obtida com a indução da cólica timpânica, na qual uma dieta desbalanceada resulta no acúmulo de gases, havendo aumento de bactérias gasogênicas e não a entrada de um agente luminal (que provoca o modelo da doença de Crohn) em contato com o TGI. É muito provável que a cólica timpânica não chegue a induzir morte celular da mesma forma que a colite, visto que o grupo recuperado não apresentou no número de neurônios NADPH-d em relação aos controles.

No presente estudo foi utilizada a classificação de Stach (1988) para uma análise mais detalhada da variedade dos tipos morfológicos neuronais. Nas chinchilas, por meio da atividade NADPH-d foram identificados os seis tipos neuronais, resultado este que difere ao já descrito para intestino de porcos, onde o tipo II não é evidenciado pela mesma técnica (Timmermans *et al.*, 1994). Os resultados sugerem que as células nervosas na chinchila apresentam características similares ao rato, com presença de motoneurônios (tipo I, III, IV), interneurônios (tipo VI) e neurônios sensoriais (tipo II e V), estes últimos não aparecem com atividade NADPH-d em porquinho-da-índia (Gábrriel *et al.*, 1997), o que aproxima a chinchila do rato mais do que do porquinho-da-índia no que diz respeito às diversidades dos tipos neuronais encontrados. Os neurônios menores, chamados "minineurônios", que já foram encontrados em cobaias e porcos em trabalhos anteriores, não foram identificados no PM das chinchilas, utilizando o marcador NADPH-d.

Assim como no protocolo de cólica timpânica em chinchilas, Timmermans e colaboradores (1994) observaram uma diminuição na atividade dos neurônios NADPH-d-positivos após quadro de miectomia em porcos. Neste estudo também foi observado maior acometimento da lesão sobre os neurônios de projeção caudal (Tipos II, III, V e VI). Este resultado difere em

parte do obtido para PM das chinchilas, no qual a lesão alterou significativamente o número de neurônios NADPH-d-positivos dos tipos IV, III, VI e I por ordem decrescente do número de neurônios afetados em um número maior de regiões. Estes neurônios exercem papéis diferentes no PM, os tipos I, III e IV são classificados como motores, sendo esperado que o aumento de volume luminal e isquemia resultante da cólica timpânica os afetasse, semelhante ao observado em períodos de isquemia/reperfusão em porquinho-da-índia (Rivera *et al.*, 2011). A cólica timpânica não mostrou alteração no número geral ou total de neurônios NADPH-d-positivos dos tipos sensitivos (II e V), indicando que a mesma afeta a principal função exercida pelo PM, de motilidade.

Quanto às porções do TGI afetadas, observa-se que não há recuperação neuronal (o número de neurônios NADPH-d não retorna ao valor controle nos recuperados) no ceco sacular e no colon ascendente, cujas áreas mostraram-se macroscopicamente mais afetadas, aumentando de volume e com pontos de isquemia durante o quadro de cólica timpânica. Essas assertivas indicam a diminuição da atividade neuronal durante a doença nessas regiões, semelhante ao descrito na doença de Chagas crônica, onde o cólon é o segmento do TGI mais frequentemente afetado (Maifrino *et al.*, 1999) e que as porções que sofrem maior dilatação no quadro da doença são as que apresentam maior perda neuronal (Silveira *et al.*, 2008).

Analisando especificamente o número de neurônios NADPH-d-positivos nas diferentes partes do ceco e cólon, verificou-se que os tipos I, III e IV diminuíram significativamente nas porções sacular do ceco e no cólon transversal. Isso pode indicar que essas regiões são as mais afetadas quanto à motilidade. Cada um desses três tipos neuronais NADPH-d-positivos também aparecem eventualmente em número menor nas demais regiões intestinais, com exceção da porção íleo-cecal. Quanto ao neurônio tipo II, há evidências na literatura que esse esteja relacionado à iniciação dos reflexos no cólon (Furness, 2008), bem como sendo capaz de responder à distensão da parede do intestino, provavelmente por atuarem como receptores

de tensão, detectando atividade contrátil do músculo liso (Brookes, 2001), sendo classificados como neurônios sensoriais (Brehmer *et al.*, 2004). No presente estudo o tipo II neuronal foi afetado significativamente em todas as porções do cólon, o que confere com a observação na necrópsia de que essa região sofreu maior distensão durante o acometimento da cólica timpânica. Outro tipo neuronal afetado pela cólica timpânica no cólon é o interneurônio Tipo VI, que diminuiu significativamente em todas as porções colônicas. Seu papel funcional, entretanto, ainda não está bem estabelecido, mas, de qualquer modo, este tipo neuronal parece estar sendo mais afetado pela distensão da parede do cólon observada nas chinchilas timpanizadas.

Ao concluir o presente trabalho fica evidente que a sensibilidade abdominal observada nas chinchilas do grupo timpânico ao longo do protocolo (D4-18) e posterior diminuição com o tratamento (D23) no grupo recuperado apoiam a ideia de que a cólica timpânica provoque inflamação e desconforto abdominal nos animais, afetando o SNE que, quando não tratada, pode levar a consequências sérias, ou irreversíveis ao TGI dos animais como, por exemplo, diminuição na atividade ganglionar sem posterior recuperação nos segmentos intestinais mais afetados pela inflamação ou isquemia intestinal. As alterações intestinais, como a CT provocada experimentalmente, interferem na atividade enzimática da NADPH-d e da AChE de neurônios do SNE de *Chinchilla lanigera*. A possível alteração de atividade de alguns tipos neuronais mientéricos parecem ser reversíveis para a maior parte do ceco e cólon, considerando a duração de duas semanas da cólica timpânica empregada neste trabalho, evidenciando uma recuperação bem sucedida dos sintomas do timpanismo nas chinchilas, quando se reintroduz a dieta balanceada associada a utilização de um período curto de anti-inflamatório.

Referências

- Altaf MA, Sood MR. 2008. The Nervous system and gastrointestinal function. *Developmental Disabilities Research Reviews* 14: 87-95.
- Barnes PRH, Lennard-Jones JE, Hawley PR, Todd IP. 1986. Hirschsprung's disease and idiopathic megacolon in adults and adolescents. *Gut*, 27: 534-541.
- Boyer L, Ghoreishi M, Templeman V, Vallance BA, Buchan AM, Jevon G, Jacobson GK. 2005. Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 117: 41– 53.
- Brehmer A, Beleites B. 1996. Myenteric neurons with different projections have different dendritic tree patterns: a morphometric study in pig ileum. *Journal of the autonomic system*, 61: 43-50.
- Brehmer A, Croner R, Dimmler A, Papadopoulos T, Schrödl F, Neuhuber W. 2004. Immunohistochemical characterization of putative primary afferent (sensory) myenteric neurons in human small intestine. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 112: 49-59.
- Brookes SJH. 2001. Classes of Enteric Nerve Cells in the Guinea-Pig Small Intestine. *The Anatomical Record*, 262: 58–70.
- Castro TF, Dummer RJ, Rickes EM, Pereira MAM. 2010. Aspectos morfológicos, morfométricos e topográficos do aparelho digestório de *Chinchilla lanigera*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 47: 86-94.
- Cofré PL, Germain PF, Medina LL, Orellana GH, Suárez MJ, Vergara AT. 2008. Manejo de la constipación crônica del adulto: Actualización. *Revista Médica de Chile*, 138: 507-16.
- Collins SM. 1996. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology*, 111: 1683-1699.
- Costa M, Furnes JB, Lewellyn-Smith IJ. Histochemistry of the Enteric Nervous System. In: *Physiology of the Gastrointestinal tract*. 2. ed. New York: Raven Press, 1987. Cap.1, p.1-40.
- Cottrell DF, McGorum BC, Pearson GT. 1999. The neurology and enterology of equine grass sickness: a review of basic mechanisms. *Neurogastroenterology Motility*, 11: 79-92.
- Cracco C, Filogamo G. 1994. Quantitative study of the NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons of the rat ileum. *Neuroscience*, 61(2): 351-359.
- Davis KAM, Masella J, Blennerhassett MG. 1998, Acetylcholine metabolism in the inflamed rat intestine. *Experimental Neurology*, 152: 251-58.

- Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. 1991. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Neurobiology*, 88: 7797-7801.
- Deduchovas O, Saladzinskas Z, Tamelis A, Pavalkis D, Pauziene N, Pauza DH. 2008. Morphologic pattern of myenteric neural plexus in colonic diverticular disease. A whole-mount study employing histochemical staining for acetylcholinesterase. *Annals of Anatomy* 190: 525—530.
- De Ridder E, Weyns A. 1994. Classification of the enteric nerve cells of the porcine small intestine into two subpopulations using enzyme histochemical techniques. *Microscopy research and technique*, 29: 103-111.
- Duncan M, Moihate A, Mackie K, Keenan CM, Buckley NE, Davison JS, Patel KD, Pittman QJ, Sharkey KA. 2008. Cannabinoid CB2 receptors in the enteric nervous system modulate gastrointestinal contractility in lipopolysaccharide-treated rats. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295: G78-G87.
- Fontes RBV, Froes LB, Omar ED, Liberti EA. 2004. The myenteric plexus of the rat colon after fecal stream diversion: a morpho-quantitative study. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 114: 39-46.
- Freytag C, Seeger J, Siegemund T, Grosche J, Grosche A, Freeman DE, Schusser GF, Härtig W. 2008. Immunohistochemical characterization and quantitative analysis of neurons in the myenteric plexus of the equine intestine. *Brain Research*, 1244: 53-64.
- Furness JB. 2006. The organization of the autonomic nervous system: Peripheral connections. *Journal Autonomic Neuroscience*, 130: 1-5.
- Furness JB. 2008. The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroenterology Motility*, 20(1): 32-38.
- Gabella G. 1987. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience*, 22(2): 737-752.
- Gábríel R, Pásztor I, Dénes V. 1997. Some neurohistochemical properties of nerve elements in myenteric plexus of rabbit ileum: similarities and dissimilarities to the rodent pattern. *Cell Tissue Research*, 292: 283-291.
- Gonçalves CCM, Hernandez L, Oliveira NLB, Natali MRM. 2008 Alternativas terapêuticas em modelos experimentais de doença inflamatória intestinal. *Ciência, Cuidado e Saúde*, 7(1): 107-111.

- Hansen MB. 2003a. The enteric nervous system II: Gastrointestinal functions. *Pharmacology and Toxicology*, 92: 105-113.
- Hansen MB. 2003b. The enteric nervous system I: Organization and classification. *Pharmacology and Toxicology*, 92: 249-57.
- Hillyer E, Quesenberry KE, Donnelly TM. 1997. *Ferrets, rabbits and rodents: Clinical Medicine and Surgery*. Philadelphia: WB Saunders Co. 432p.
- Hironaka R, Freeze B. *Feedlot finishing of cattle*. 1992. Ottawa: Minister of Supply and Services. Canadá, 57p.
- Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR. 1991. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Neurobiology*, 88: 2811-2814.
- Karnovsky MJ, Roots L. 1964. A "direct-coloring" method for cholinesterase. *Journal Histochemistry and Cytochemistry*, 12: 219-221.
- Kimball ES, Schneider CR, Wallace NH, Hornby PJ. 2006. Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by dextran sulphate sodium. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291: G364-G371.
- Krammer HJ, Wedel TH, Brehmer A, Stach W, Kuhnel W, Singer MV. 1997. The Enteric Nervous System. What can we learn from morphology? *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 2: 5-13.
- Maifrino LBM, Liberti EA, Watanabe I-S, De-Souza RR. 1999. Morphometry and acetylcholinesterase activity of the myenteric neurons of the mouse colon in the chronic phase of experimental *Tripanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60 (5): 721-725.
- Meier-Ruge W, Lutterbeck PM, Herzog B. 1972. Acetylcholinesterase activity in suction biopsies of the rectum in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery*, 7: 11-17.
- Milne EM, Fintl C, Hudson NPH, Pearson GT, Mayhew IG, Hahn CN. 2005. Observation on the interstitial cells of Cajal and neurons in a recovered case of equine Dysautonomia (Grass Sickness). *Journal of Comparative Pathology*, 133: 33-40.
- Mohlis C. 1983. Información preliminar sobre la conservación y manejo de la chinchilla silvestre en Chile. *Boletín Técnico*, (3): 1-41. Corporación Nacional Forestal, Santiago, Chile.

- Moore RM. 2006. Diagnosis and treatment of selected diseases of the cecum and colon in horses, p.165-170. In: Proceedings of the North American Veterinary Conference. Large animal edition. January 7-11, 2006, Orlando, USA. Vol 20.
- Moore SW, Laing D, Melis J, Cywes S. 1993. Secondary effects of prolonged Intestinal obstruction on the enteric nervous system in the rat. *Journal of Pediatric Surgery*, 28(9): 1196-1199.
- Moreira NM, Hermes C, Almeida CSL, Santana EC, Sant'Ana DMG, Araújo EJA. 2008. Quantitative analysis of the neurons from the myenteric plexus in the ileum of rats submitted to severe protein deficiency. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 66: 242-245.
- Morris GP, Bech PL, Herridge MS, Szewczuk MR, Wallace JL. 1989 Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 96: 795-803.
- Nemeth L, Fourcade L, Puri P. 2000. Marked morphological differences in the myenteric plexus between the mesenteric and antimesenteric sides of small bowel in premature infants. *Journal of Pediatric Surgery*, 35(5): 748-752.
- Pereira MAS, Molinari SL, André FCOE, Neto MHM. 2003. Density and morphometry of myenteric neurons of the ileum of rats subjected to chronic alcoholism. *International Journal of Morphology*, 21(3): 245-250.
- Quinton J-F. *Novos animais de estimação: pequenos mamíferos*. São Paulo: Roca, 2005. 263p.
- Rivera LR, Thacker M, Pontell L, Cho H, Furness JB. 2011. Deleterious effects of intestinal ischemia/reperfusion injury in the mouse enteric nervous system are associated with protein nitrosylation. *Cell and Tissue Research*. Online First™, 8 February 2011.
- Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG. 1999. Damage to the Enteric Nervous System in Experimental Colitis. *American Journal of Pathology*, 155(4): 1051-57.
- Santos MM, Tannuri U, Coelho MCM. 2008. Study of acetylcholinesterase activity in rectal suction biopsy for diagnosis of intestinal dysganglionoses: 17-year experience of a single Center. *Journal of Pediatric Surgery Internacional*, 24: 715-719.
- Sharkey K, Kroese ABA. 2001. Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators. *The Anatomical Record*, 262: 79-90.
- Silveira ABM, Lemos EM, Adad SJ, Correia-Oliveira R, Furness JB, Reis DDA. 2008. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves and glial cells. *Human Pathology*, 38: 1256-64.
- Smith B. 1970. Disorders of the myenteric plexus. *Gut*, 1: 271-274.

- Stach W. 1988. A revised morphological classification of neurons in the enteric nervous system. *In: Singer, M.V. and Goebel, H. Nerves and the gastrointestinal tract.* MTP Press Limited 1988. Chapter 3, p. 29 – 45.
- Timmermans J, Barbies M, Scheuermann DW, Stach W, Adriaensen D, Mayer B, DE Groodt-Lasseel MHA. 1994. Distribution pattern, neurochemical features and projections of nitrenergic neurons in the pig small intestine. *Annals of Anatomy*, 176: 515-525.
- Vasina V, Barbara G, Talamonti L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Tonini M, De Ponti F, De Giorgio R. 2006. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Autonomic Neuroscience*, 126-127: 264-72.
- Ward SM, Xue C, Shuttleworth CW, Brecht DS, Snyder SH, Sanders KM. 1992. NADPH diaphorase and nitric oxide synthase colocalization in enteric neurons of canine proximal colon. *American Physiological Society*, 263: G277-G284.
- Weimberg RJ, Valtschanoff JG, Schimidt HHHW. 1996. The NADPH diaphorase histochemical stain. *In: Feelisch, M.; Stamler, J. S. Methods in Nitric Oxide Research.* John Willey and Sons Ltd., cap. 16, p. 237-248.
- Weiss DJ, Evason AO, McClenahan D, Fagliari JJ, Dunnwiddie CT, Wells RE. 1998. Effect of a competitive inhibitor of platelet aggregation on experimentally induced laminitis in ponies. *American Journal of Veterinary Research*, 59: 814-817.
- Wester T, O'Brian S, Puri P. 1998. Morphometric aspects of the submucosus plexus in whole-mount preparations of normal human distal colon *Journal of Pediatric Surgery*, 33(4): 619-622.
- Wilhelm M, Batóri Z, Pásztor I, Gábriel R. 1998. NADH-Diaphorase positive myenteric neurons in the ileum of guinea-pig, rat, rabbit and cat: a comparative study. *European Journal of Morphology*, 36(3): 143-152.
- Wood JD. 1987. Physiology of the Enteric Nervous System. *In.: Physiology of the Gastrointestinal tract.* 2. ed. New York: Raven Press, p.67-109.

Legenda das Figuras

Fig. 1. a. Linha do tempo de realização dos procedimentos. O período de aclimatação foi realizado entre D0 e D4, sendo realizado o primeiro exame clínico. O período de indução da CT cursou entre os dias D4 e D11, sendo dividido em duas fases: indução da doença (D4 a D11) e manutenção da doença (D11 a D18), sendo realizados exames clínicos e teste de sensibilização abdominal nos dias D11 e D18. Os animais timpânicos e dois controles foram mortos no D18. O período de tratamento foi dividido em duas etapas: administração do medicamento (realizado entre o D18 e D23, Cetofen 1%, 2 mg / kg / 24:24 h, IM) e pós-tratamento (entre D23 e D38, totalizando 15 dias). Em D23 e D38 foram realizados testes de Von Frey. Os animais recuperados e três controles foram mortos no D38. Um asterisco indica o exame clínico, enquanto que dois indicam o exame clínico associado ao teste de Von Frey.

b. Resposta abdominal ao teste de sensibilização mecânica pelo teste de Von Frey em *C. lanigera*. Em cada animal foi considerada a média da força, em milli-Newtons (mN), de três medidas necessária para evocar a resposta. Os testes foram realizados nos dias D11, D18, D23 e D38. Os dados são representados em média \pm erro padrão ($n = 5$ / grupo), sendo os resultados submetidos à ANOVA de uma via e a significância testada com *Student-Newman-Keuls* (D11 e D18) e teste t (D23 e D38). # $p = 0,020$ entre os grupos timpânico e recuperado em relação ao grupo controle.

Fig. 2. Vista ventral da cavidade abdominal de *C. lanigera*. **a.** animal controle, **b.** animal timpânico, **c.** animal recuperado. Nesta vista estão demonstradas as observações macroscópicas de necrose: **b.** O animal timpânico apresentou um aumento no volume do ceco, inter-cecal e cólon ascendente. As víceras abdominais foram deslocadas devido ao aumento do volume do ceco **c.** Após o tratamento com antiinflamatório não esteróide, o volume do ceco retornou ao observado nos animais controle. **d.** Focos de isquemia e infarto nos vasos sanguíneos mesentéricos (cabeças de seta) foram observados nos animais timpânicos, quando

comparados aos animais controle e recuperado. Siglas indicam: fígado (l), estomago (s), duodeno (d), jejuno (j), porção sacular (sp) e porção tubular (t) do ceco, cólon ascendente (aC), cólon descendente (dC), cólon transverso (tC) e mesentérico (m). Bar: 2 cm.

Fig. 3. Morfologia do PM na junção íleo-cecal (a, b, c), porções sacular (d, e, f), inter-cecal (g, h, i) e tubular (j, k, l) do ceco nos grupos experimentais em *C. lanigera* submetidas à CT corados com a técnica de histoquímica para AChE. **a, d, g, j.** Os animais controle apresentam os gânglios e feixes de fibras nervosas acompanhando o sentido das fibras da camada muscular longitudinal, formando uma extensa rede gangliônica de formato retangular e uniforme. **b, e, h, k.** Distensão da parede visceral e do PM pelo acúmulo de gases, tornando a malha menos densa, os gânglios alongados e as conexões mais finas entre as células adjacentes nos animais tímpanicos. **c, f, i, l.** No grupo recuperado, após o tratamento, o PM retorna à sua conformação original. São indicados: gânglios (G); paragânglios (setas brancas); feixes de fibras nervosas de primeira (cabeças de seta brancas); segunda (setas pretas) e terceira ordem (cabeças de seta pretas); plexos primário (1, gânglios de médio e grande tamanho e feixes de fibras nervosas de primeira ordem), secundário (2, gânglios de pequeno tamanho e feixes de segunda ordem) e terciário (3, feixes de fibras de terceira ordem dispostos paralelamente as fibras musculares longitudinais). Escala: 100 µm.

Fig. 4. Morfologia do PM no cólon ascendente (a, b, c), transverso (d, e, f) e descendente (g, h, i) nos três grupos experimentais em *C. lanigera* corados com a técnica de histoquímica para AChE. **a, d, g.** Os animais controle apresentam os gânglios e feixes de fibras nervosas acompanhando o sentido das fibras da camada muscular longitudinal, formando uma extensa rede gangliônica de formato retangular e uniforme. **b, e, h.** Distensão da parede visceral e do PM pelo acúmulo de gases, tornando a malha menos densa, os gânglios alongados e as conexões mais finas entre as células adjacentes nos animais tímpanicos. **c, f, i.** No grupo recuperado, após o tratamento, o PM retorna à sua conformação original. São indicados:

gânglios (G); paragânglios (setas brancas); feixes de fibras nervosas de primeira (cabeças de seta brancas); segunda (setas pretas) e terceira ordem (cabeças de seta pretas); plexos primário (1, gânglios de médio e grande tamanho e feixes de fibras nervosas de primeira ordem), secundário (2, gânglios de pequeno tamanho e feixes de segunda ordem) e terciário (3, feixes de fibras de terceira ordem dispostos paralelamente as fibras musculares longitudinais). Escala: 100 μ m.

Fig. 5. Morfometria e distribuição ganglionar no PM nas regiões analisadas do TGI entre os grupos experimentais em *C. lanigera*. **a.** Área ganglionar total. **b.** Distribuição da área ganglionar entre os gânglios de pequeno (até 500 μ m), médio (500 – 1000 μ m) e grande tamanho (acima de 1000 μ m). **c.** Número total de gânglios. **d.** Distribuição do número de gânglios por tamanho. Valores expressos em média \pm erro padrão. **S** (gânglios de pequeno tamanho); **M** (gânglios de médio tamanho); **L** (gânglios de grande tamanho).

Fig. 6. Morfologia dos neurônios NADPH-d-positivos no PM de *C. lanigera*, conforme a classificação de Stach (1988). **a.** Tipo I (uniaxonal, radial multidendrítico, dendritos curtos e lamelares, com projeção axonal principalmente oral). **b.** Tipo II (pseudo-uniaxonal ou multiaxonal, ausência de dendritos, com projeção axonal oral, caudal, circular e vertical). **c.** Tipo III (uniaxonal, multidendrítico radial, longo, dendritos ramificados e projeção axonal principalmente caudal). **d.** Tipo IV (uniaxonal, multidendrítico polar, com projeção axonal vertical). **e.** Tipo V (uniaxonal, multidendrítico polar, com projeção axonal principalmente caudal). **f.** Tipo VI (uniaxonal, axodendrítico, projeção axonal principalmente caudal). Escala: 100 μ m.

Fig. 7. Número total de neurônios NADPH-d-positivos no PM nas diferentes regiões analisadas do TGI entre os três grupos experimentais em *C. lanigera*. Valores expressos em média \pm erro padrão. Asterisco indica diferença estatística significativa entre o grupo tímpanico para com os grupos controle e recuperado ($p = 0,007$).

Tabela 1. Média dos valores da área ganglionar total (μm^2) com atividade AChE em diferentes regiões do plexo mientérico em *C. lanigera*. Valores expressam média \pm erro padrão.

Regiões	Grupos		
	Controle	Timpânico	Recuperado
Ileocecal	1019,55 \pm 62,59	1290,36 \pm 167,29	1000,6 \pm 102,5
Sacular	1184,8 \pm 114,74	1424,68 \pm 161,97	1083,89 \pm 92,94
Intercecal	1200,67 \pm 132,44	1529,83 \pm 165,35	1119,87 \pm 98,71
Tubular	1096,78 \pm 77,91	2287,09 \pm 662,11	979,49 \pm 80,42
Ascendente	989,96 \pm 88,77	1132,74 \pm 58,54	1019,05 \pm 74,69
Transverso	976,8 \pm 87,52	955,51 \pm 34,77	868,31 \pm 65,5
Descendente	989,96 \pm 88,77	928,84 \pm 23,7	829,66 \pm 17,76

Tabela 2. Média do número de gânglios AChE-positivos nas diferentes regiões do plexo mientérico de *C. lanigera*. Valores expressos em média \pm erro padrão.

Regiões	Grupos		
	Controle	Timpânico	Recuperado
Ileocecal	74,5 \pm 25,66	79 \pm 30,93	104 \pm 23,06
Sacular	58,25 \pm 13,78	86,93 \pm 27,48	54,6 \pm 8,34
Intercecal	32,33 \pm 7,05	117,16 \pm 55,5	123,33 \pm 41,03
Tubular	48,33 \pm 10,08	133,41 \pm 60,83	60,33 \pm 12,89
Ascendente	115,4 \pm 31,87	67,46 \pm 15,72	178,6 \pm 29,7*
Transverso	158,35 \pm 51,71	61,46 \pm 13,49	135,2 \pm 42,41
Descendente	152,33 \pm 28,71	86,06 \pm 22,12	203,4 \pm 78,1

*diferença do recuperado em relação ao controle e timpânico, $p < 0,05$

Tabela 3. Número de diferentes tamanhos dos gânglios AChE positivos nas diferentes regiões do plexo mientérico de *C. lanigera*.

		Tamanho Gânglios		
		Pequeno	Médio	Grande
Regiões				
Controle		74 ± 50,06	56,75 ± 36,32	92,75 ± 56,6
Timpânico	Ileocecal	46,66 ± 3379	44,667 ± 26,07	145,667 ± 79,54
Recuperado		105 ± 56,08	108 ± 51,15	99 ± 24,55
Controle		38,5 ± 12,38	34 ± 9,37	102,25 ± 29,61
Timpânico	Sacular	47,6 ± 37,65	47,4 ± 31,19	165,8 ± 56,63
Recuperado		49,6 ± 5,91	36,8 ± 5,52	77,4 ± 21,21
Controle		21,75 ± 9,42	21,25 ± 7,56	56,75 ± 7,33
Timpânico	Intercecal	64 ± 54,56	47,33 ± 36,7	321,33 ± 187,39
Recuperado		88,8 ± 39,39	87 ± 4,47	194,2 ± 110,74
Controle		34 ± 10,71	38,2 ± 15,05	72,8 ± 22,33
Timpânico	Tubular	65,66 ± 53,86	62 ± 36,83	287,5 ± 160,58
Recuperado		66,8 ± 35,24	45,6 ± 9,37	68,6 ± 18,3
Control		137,4 ± 70,71	76,8 ± 34,7	132 ± 62,43
Timpânico	Ascendente	25,8 ± 6,91	45 ± 13,78	131,6 ± 27,72
Recuperado		141,4 ± 41,36	147,2 ± 30,71	247,2 ± 69,64
Control		205,8 ± 138,29	142,4 ± 65,32	119 ± 3,36
Timpânico	Transverso	36,4 ± 8,41	50,8 ± 10,71	97,2 ± 34,93
Recuperado		242,8 ± 108,14	119 ± 44,77	43,8 ± 11,9*
Control		188,8 ± 71,56	162,4 ± 36,14	105,8 ± 36,44
Timpânico	Descendente	56,2 ± 25,67	79,4 ± 29,3	122,6 ± 55,26
Recuperado		341,2 ± 208,48	190,8 ± 106,22	78,2 ± 24,56

Tamanhos P (até 500µm), M (500 - 1000µm) e G (acima de 1000µm). * diferença significativa do grupo recuperado em relação ao grupo controle (p=0,019). Valores expressos em média ± erro padrão.

Tabela 4. Valores médios do número dos tipos neuronais NADPH-d-positivos no PM de *C. lanigera*. O número de neurônios foi calculado em uma área de 320 x 320 μm (média \pm erro padrão).

Tipos	Grupos		
	Controle	Timpânico	Recuperado
I	150-211-265,25**	69- 75-118,5** ^a	169,75-196-213,75**
II	614,8 \pm 154,25	342,2 \pm 47,3	620,4 \pm 72,9
III	61,6 \pm 11,57	17,4 \pm 3,01 ^b	47,2 \pm 5,12
IV	632,2 \pm 72,1	300 \pm 46,07 ^b	522,8 \pm 61,45
V	173,6 \pm 44,53	89,6 \pm 16,84	44,19 \pm 19,76
VI	459,8 \pm 95,59	146 \pm 25,73 ^a	284,4 \pm 29,39

(a) Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) do grupo timpânico apenas em relação ao grupo controle. (b) Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) do grupo timpânico em relação ao grupo controle e também ao grupo recuperado. (**) Valores expressos em 25% - mediana - 75%.

Tabela 5. Valores médios do número de tipos neuronais NADPH-d-positivos nas diferentes regiões do PM de *C. lanigera*. O número de neurônios foi calculado em uma área de 320 x 320 μm (média \pm erro padrão).

Regiões	Grupos		
	Controle	Timpânico	Recuperado
Ileocecal	268 \pm 36,47	134 \pm 47,69	289,4 \pm 61,51
Sacular	665,8 \pm 66,05	346 \pm 92,35	277,2 \pm 45,32
Intercecal	450,75 \pm 65,98	127,25 \pm 58,93 ^c	238,8 \pm 31,29
Tubular	378 \pm 71,99	140 \pm 26,77 ^b	288,6 \pm 25,41
Ascendente	196,4 \pm 45,54	115 \pm 15,27	252,2 \pm 37,99
Transverso	209 \pm 38,25	77,2 \pm 5,61 ^b	226,2 \pm 39,27
Descendente	169,6 \pm 36,43	101,4 \pm 18,58 ^a	228,8 \pm 26,88

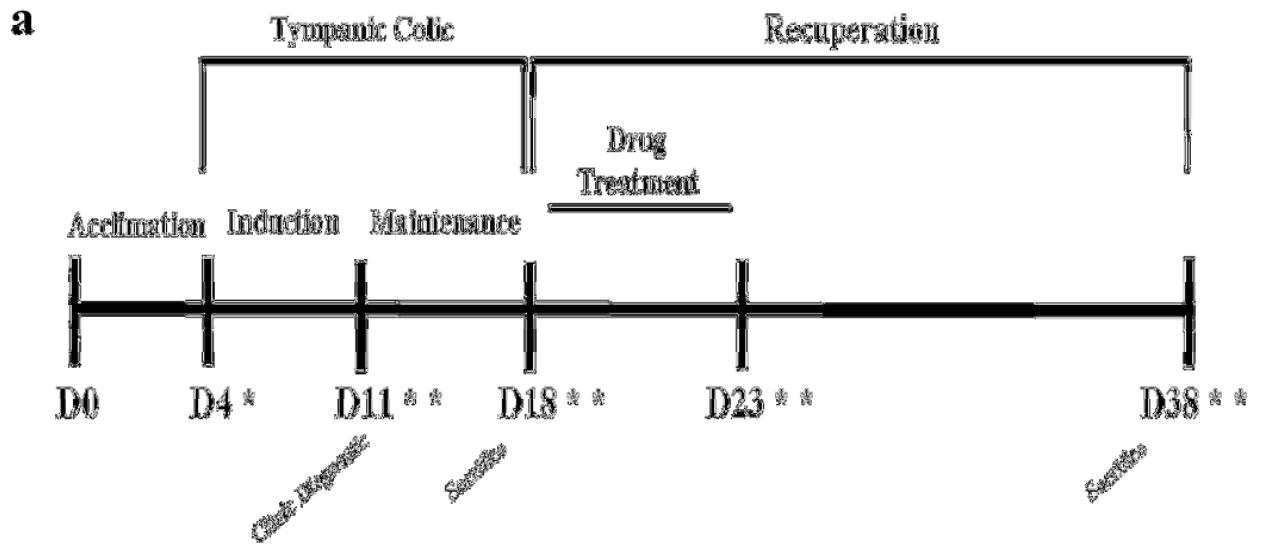
(a) Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) do grupo timpânico apenas em relação ao grupo controle. (b) Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) do grupo timpânico em relação ao grupo controle e também ao grupo recuperado. (c) Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) do grupo timpânico em relação ao grupo controle e do grupo controle em relação ao grupo recuperado.

Tabela 6: Distribuição dos tipos neuronais NADPHd-positivos nas diferentes regiões do PM de *C. lanigera*. Densidade neuronal mensurada em área de 320 x 320 μm (média \pm erro padrão).

	Ceco				Colon		
	Ileocecal	Sacular	Intercecal	Tubular	Ascendente	Transverso	Descendente
Tipo I							
Controle	17,8 \pm 6,18	50 \pm 7,67	35,6 \pm 12,03	34 \pm 7,67	25,6 \pm 8,31	25 \pm 10,05	22 \pm 6,54
Timpânico	7,6 \pm 3,12	29,8 \pm 7,29	7,8 \pm 3,55 ^b	18 \pm 3,64	12,6 \pm 2,97	8,2 \pm 0,86 ^b	9,4 \pm 1,83
Recuperado	34,2 \pm 9,52	21,4 \pm 4,33 ^c	39,2 \pm 5,15	26,6 \pm 2,18	22,2 \pm 2,08	27,4 \pm 4,30	22,2 \pm 3,41
Tipo II							
Controle	68 \pm 17,48	195,8 \pm 54,03	106,6 \pm 43,67	105,4 \pm 32,67	54 \pm 11,55	40,6 \pm 16,64	44,4 \pm 9,29
Timpânico	40,2 \pm 17,13	118 \pm 31,39	40,8 \pm 20,70	48 \pm 9,60	35 \pm 3,76 ^b	25,2 \pm 2,95 ^b	35 \pm 7,87 ^f
Recuperado	105 \pm 18,45	102,4 \pm 19,07	68,4 \pm 9,73	103,4 \pm 16,89	86 \pm 19,09	72 \pm 12,84	83,2 \pm 11,17
Tipo III							
Controle	7,6 \pm 3,05	14 \pm 1,3	10,6 \pm 2,82	11 \pm 1,04	6,8 \pm 1,15	5 \pm 1,81	6,6 \pm 3,6
Timpânico	3 \pm 0,57	6 \pm 1,41 ^g	2,66 \pm 1,76 ^f	3,6 \pm 1,02 ^f	1,8 \pm 0,86 ^g	1,5 \pm 0,28 ^b	1,75 \pm 0,25 ^e
Recuperado	8,8 \pm 2,57	5,2 \pm 1,15	7,6 \pm 1,20	6,2 \pm 0,8	7,4 \pm 0,87	6,8 \pm 0,96	5,2 \pm 0,37
Tipo IV							
Controle	64,6 \pm 22,58	217 \pm 19,07	105,4 \pm 37,56	105,6 \pm 21,4	42,8 \pm 12,74	47 \pm 14,94	49,8 \pm 11,2
Timpânico	35 \pm 14,50	105,8 \pm 36,1 ^f	27,8 \pm 15,71 ^a	34,4 \pm 6,63 ^b	40,2 \pm 10,99	25,4 \pm 3,17 ^b	31,4 \pm 3,45 ^a
Recuperado	80,2 \pm 17,24	86,8 \pm 11,46	71,4 \pm 13,08	80 \pm 10,83	73,2 \pm 12,51	66 \pm 14,96	65,2 \pm 8,27
Tipo V							
Controle	11,4 \pm 4,22	52 \pm 12,98	25,6 \pm 7,91	35,2 \pm 8,42	23,6 \pm 12,46	13 \pm 5,85	12,8 \pm 3,10
Timpânico	12,33 \pm 1,76	27,4 \pm 1,80	14 \pm 2,88 ^a	15,2 \pm 5,31 ^d	12,2 \pm 2,51	7,4 \pm 1,12	11,6 \pm 3,89
Recuperado	22,4 \pm 5,91	22,8 \pm 4,75	20,4 \pm 2,37	18,2 \pm 2,05	20,6 \pm 6,93	15 \pm 2,54	13,8 \pm 1,93
Tipo VI							
Controle	45 \pm 16,14	137 \pm 27,14	76,8 \pm 23,08	86,8 \pm 16,22	43,6 \pm 11,02	36,6 \pm 11,84	34 \pm 12,62
Timpânico	15,02 \pm 8,05	59 \pm 20,18 ^d	25,66 \pm 11,72 ^f	20,8 \pm 4,88 ^h	13,2 \pm 1,93 ^g	9,8 \pm 1,74 ^e	12,6 \pm 4,4 ^e
Recuperado	38,8 \pm 10,07	38,6 \pm 10,17	31,8 \pm 3,89	54,2 \pm 6,62	42,8 \pm 6,11	39 \pm 6,08	39,2 \pm 8,14

(a) Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) do grupo timpânico apenas em relação ao grupo controle. (b) Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) do grupo timpânico em relação ao grupo controle e também ao grupo recuperado. (c) Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) do grupo recuperado em relação ao grupo controle. (d) Valor estatisticamente significativo ($p < 0,05$) do grupo timpânico em relação ao grupo controle e do grupo controle em relação ao grupo recuperado. (e) Valor estatisticamente significativo ($p < 0,01$) do grupo timpânico em relação ao grupo controle e também ao grupo recuperado. (f) Valor estatisticamente significativo ($p < 0,01$) do grupo timpânico em relação ao grupo controle e do grupo controle em relação ao grupo recuperado. (g) Valor estatisticamente significativo ($p = 0,01$) do grupo timpânico em relação ao grupo controle e também ao grupo recuperado. (h) Valor estatisticamente significativo ($p < 0,01$) entre os três grupos quando comparados um com outro.

Figura 1



b

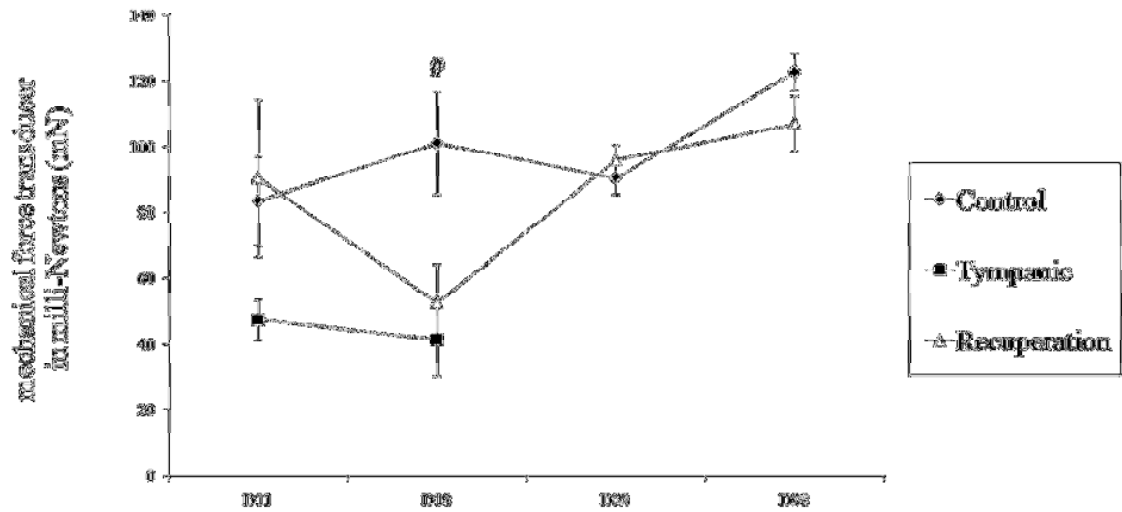


Figura 2

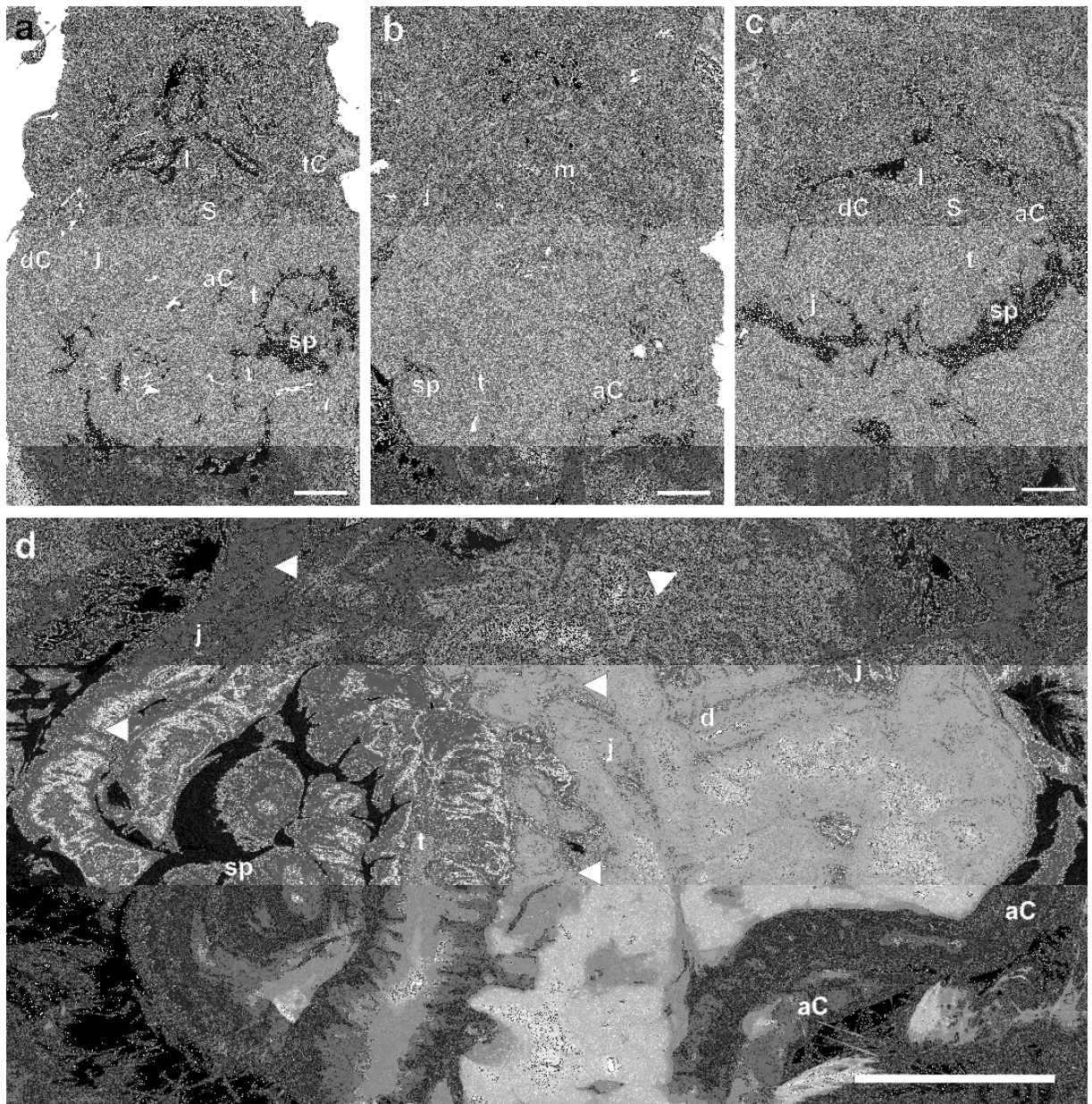


Figura 3

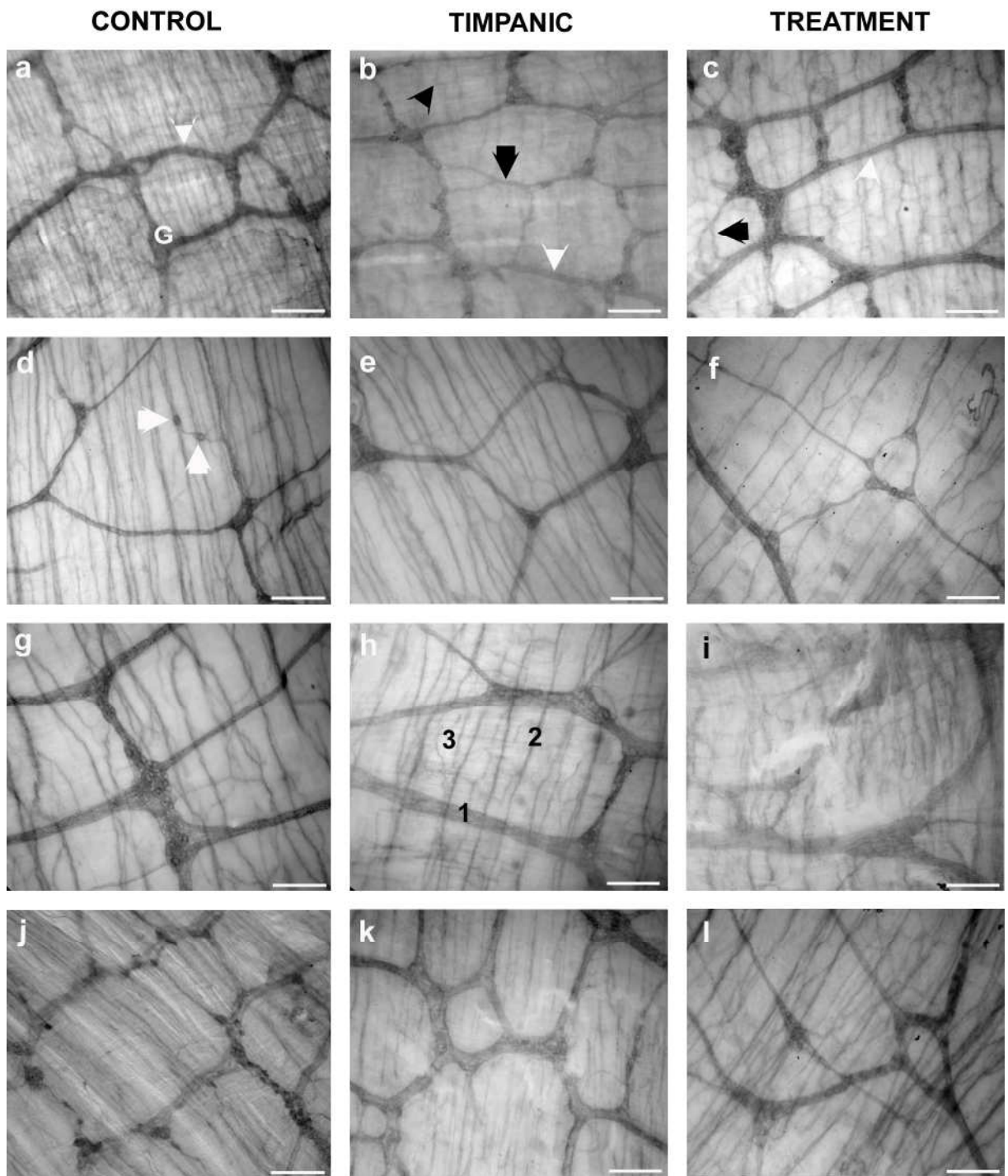


Figura 4

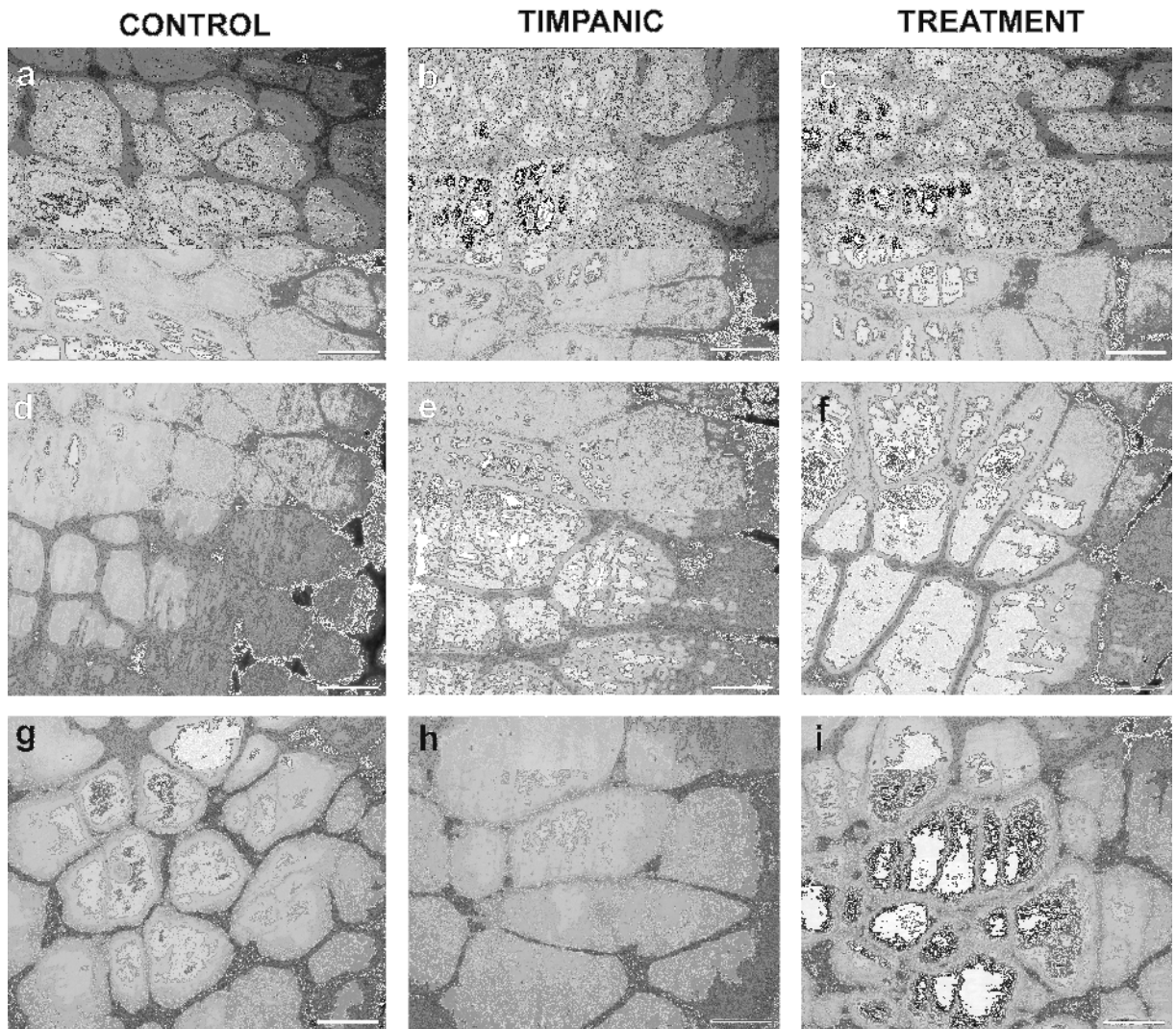


Figura 5

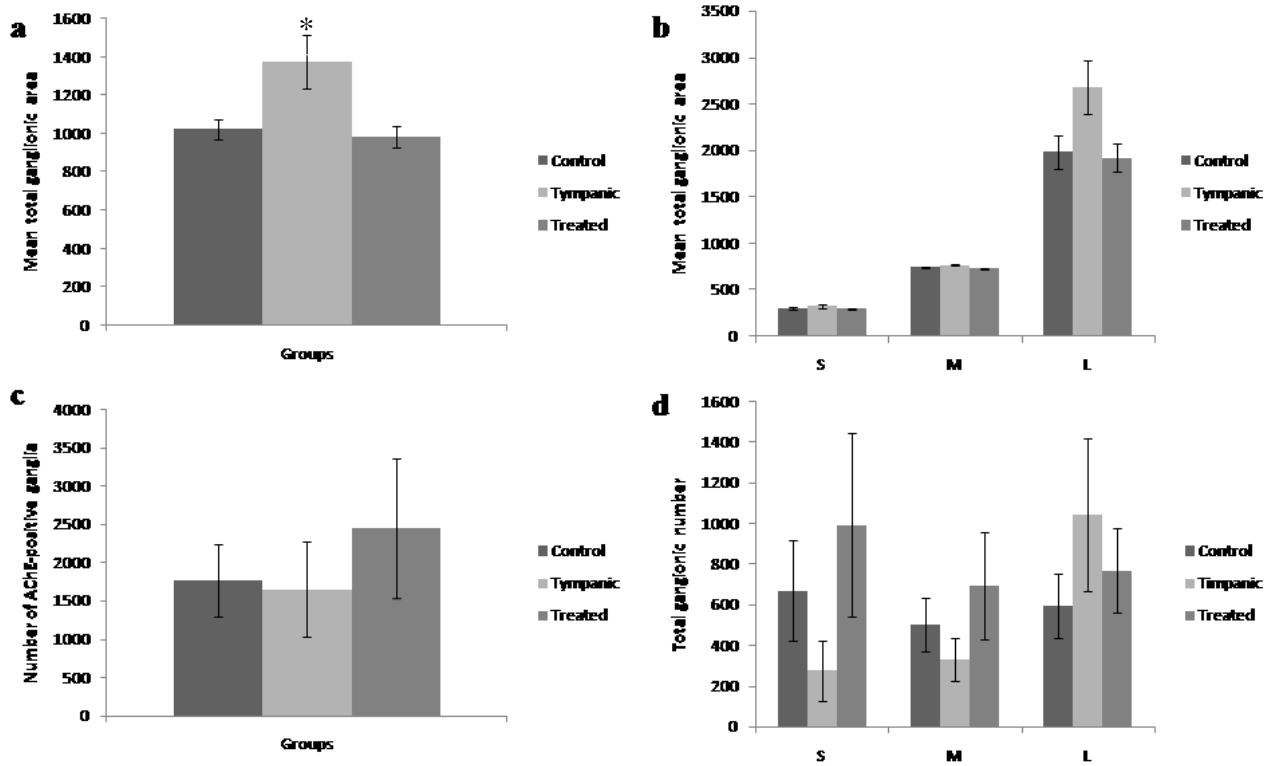


Figura 6

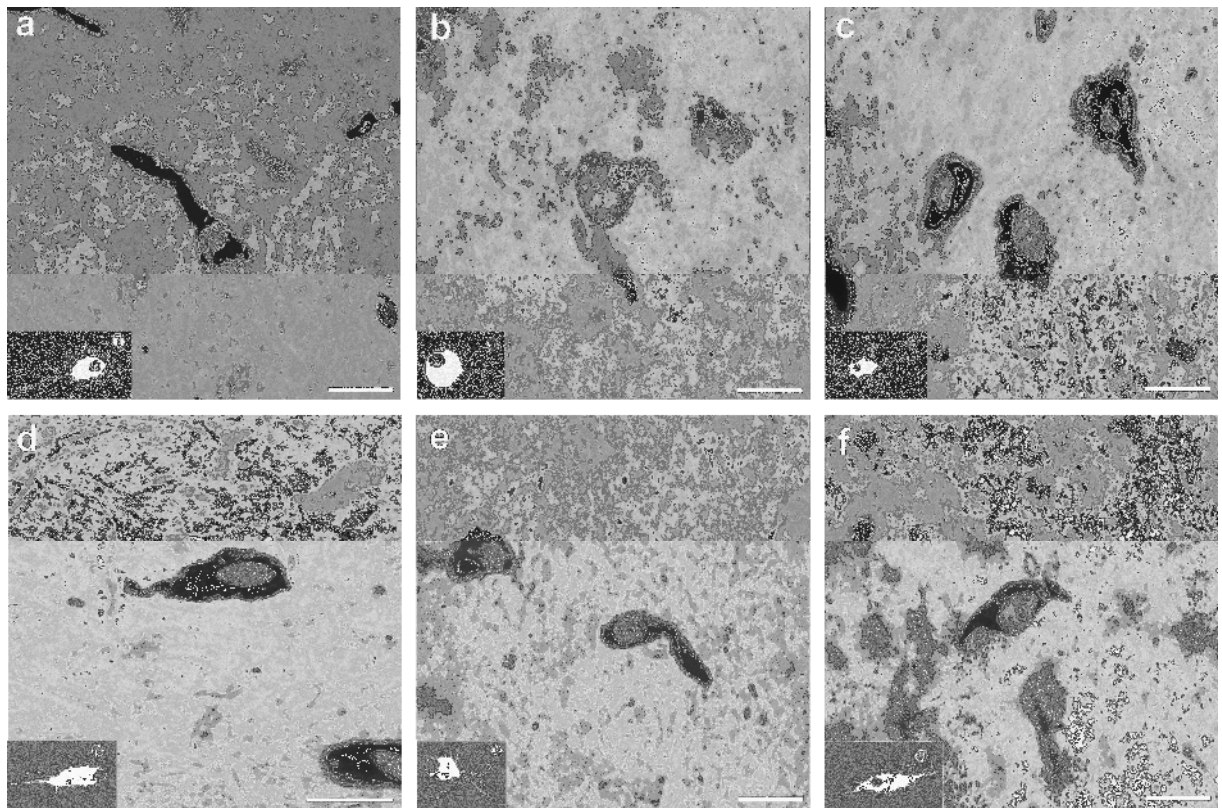
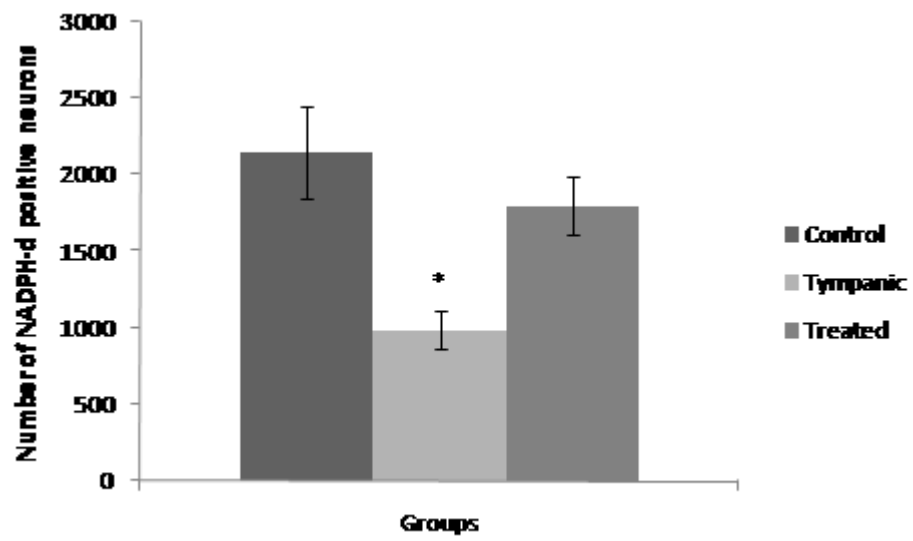


Figura 7



5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos quanto à alteração do número de neurônios com atividade NADPH-d e AChE no plexo mientérico nas diferentes porções intestinais de *Chinchilla lanigera*, submetidas a um protocolo de cólica timpânica experimental, podemos concluir que:

1. O protocolo com dieta alterada é eficiente na indução da cólica timpânica nas chinchilas. O acometimento e desenvolvimento da doença foi confirmado nesses animais por meio de exames clínicos (palpação, auscultação e percussão abdominal), por análise da sensibilização abdominal (testes de Von Frey) e autópsia.

2. Alterações gastrointestinais, como a cólica timpânica induzida experimentalmente, podem interferir na atividade das enzimas NADPH diaforase e AChE dos neurônios e demais elementos dos gânglios do plexo mientérico no ceco (porções íleo-cecal, sacular, inter-cecal e tubular) e cólon ascendente, transverso e descendente na *Chinchilla lanigera*.

3. O aumento do número de gânglios acetilcolinesterásicos positivos na região do cólon ascendente, nos animais recuperados, propõe um papel preponderante, talvez de natureza colinérgica, desta porção intestinal no controle das atividades gastrointestinais do trato digestório, supostamente a área mais afetada pelo timpanismo.

4. O aumento da área ganglionar total com atividade AChE nos animais timpânicos, pode indicar uma hipertrofia de elementos neurais ganglionares ou um resultado da resposta inflamatória ou, ainda, uma hiperplasia glial. Estudos ultra-estruturais ou com marcadores específicos para elementos neurais, gliais ou inflamatórios podem esclarecer esta hipótese.

5. Na chinchila os seis tipos neuronais de Stach (1988) mostram atividade NADPH-d. A diminuição de neurônios considerados, por esta classificação, como motoneurônios nos segmentos intestinais pode supor que a doença afete a função motora do plexo mientérico

nesses animais. Entretanto, a recuperação no número de neurônios NADPH-d positivos, principalmente na região do ceco nos animais recuperados, pode sugerir uma maior resistência desses neurônios para os processos deletérios decorrentes da inflamação nessa região da chinchila.

6. Houve recuperação dos sintomas e aspectos histológicos analisados, demonstrando que se a cólica timpânica for identificada e tratada até duas semanas, os efeitos observados são reversíveis. O tratamento, através da mudança na dieta, associado à aplicação de antiinflamatório não esteróide, reverte o quadro de cólica.

6. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos no presente estudo referentes aos efeitos da cólica timpânica experimental sobre a atividade das enzimas NADPH-d e AChE nos neurônios do plexo mientérico de *Chinchilla lanigera*, novas hipóteses foram formuladas, possibilitando a continuidade de estudos com este modelo experimental:

1. Investigação do acometimento das células enterogliais durante a cólica timpânica em chinchilas.

2. Investigação de outros parâmetros neuroquímicos, como substância P, ácido gama amino butírico (GABA) e serotonina, que podem estar afetados no SNE das chinchilas em decorrência da doença.

3. Investigação das alterações celulares decorrentes do processo inflamatório buscando determinar os mecanismos que possam resultar em apoptose ou necrose no SNE desses animais para períodos de cólica timpânica mais prolongada.

4. Visto que a cólica timpânica promove alterações celulares, é importante investigar parâmetros de estresse oxidativo que são indicativos de dano celular, tanto local quanto sistêmico, já que o protocolo desenvolvido promove alterações na dieta dos animais.

5. Observar os efeitos da recuperação da cólica timpânica em animais submetidos apenas à dieta controle, sem intervenção farmacológica, em relação aos animais recuperados com o anti-inflamatório.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTAF MA, SOOD MR. 2008. The Nervous system and gastrointestinal function. *Developmental Disabilities Research Reviews* 14: 87-95.
- AUL JJ, ANDERSON KW, WADOWSKY RM, DOYLE WJ, KINGSLEY LA, POST JC, EHRLICH GD. 1998. Comparative evaluation of culture and PCR for the detection and determination of persistence of bacterial strains and DNAs in the *Chinchilla laniger* model of otitis media. *Annals of Otology Rhinology and Laryngology*, 107(6): 508-13.
- BAKALETZ LO. 2009 Chinchilla as a robust, reproducible and polymicrobial model of otitis media and its prevention. *Expert Review of Vaccines* 8(8): 1063-82.
- BALEMBA OB, MORTENSEN K, SEMUGURUKA WD, HAY-SCHMIDT A, JOHANSEN MV, DANTZER V. 2002. Neuronal nitric oxide synthase activity is increased during granulomatous inflammation in the colon and caecum of pigs infected with *Schistosoma japonicum*. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 99: 1 – 12.
- BARNES PRH, LENNARD-JONES JE, HAWLEY PR, TODD IP. 1986. Hirschsprung's disease and idiopathic megacolon in adults and adolescents. *Gut*, 27: 534-541.
- BASSOTTI G, VILLANACCI V, ANTONELLI E, MORELLI A, SALERNI B. 2007a. Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? *Laboratory Investigation* 87: 628-32.
- BASSOTTI G, VILLANACCI V, FISOGNI S, ROSSI E, BARONIO P, CLERICE C, MAURER CA, CATHOMAS G, ANTONELLI E. 2007b. Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: Introducing the neuro-gliopathies. *World Journal Gastroenterology* 13(30): 4035-41.
- BARBARA G, DE GIORGIO R, STANGHELLINI V, CREMON C, CORINALDESI R. 2002. A role for inflammation in irritable bowel syndrome? *Gut*, 51(1): i41- i44.
- BECKETT EAH, TAKEDA Y, YANASE H, SANDERS KM, WARD SM. 2005. Synaptic specializations exist between enteric motor nerves and interstitial cells of Cajal in the murine stomach. *Journal of Comparative Neurology*, 493: 193-206.
- BEKYÜREK T, LIMAN N, BAYRAM G. 2002. Diagnosis of sexual cycle by means of vaginal smear method in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Laboratory Animals*, 36(1): 51-60.
- BERNARD CE, GIBBONS SJ, GOMEZ-PINILLA PJ, LURKEN MS, SCHMALZ PF, ROEDER JL, LINDEN D, CIMA RR, DOZOIS EJ, LARSON DW, CAMILLERI M, ZINSMEISTER AR, POZO MJ, HICKS

- GA, FARRUGIA G. 2009. Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. *Neurogastroenterology and Motility*, 21: 746–53.
- BISHOP IR. 1993. Other Cavy-like Rodents. *In: MacDonald, D. (Ed.) The Encyclopedia of Mammals. Facts on File: 700-703.*
- BLOOD DC, HENDERSON JA. 1978. *Medicina veterinária. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 871p.*
- BOYER L, GHOREISHI M, TEMPLEMAN V, VALLANCE BA, BUCHAN AM, JEVON G, JACOBSON GK. 2005. Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 117: 41– 53.
- BOURAS EP, TANGALOS EG. 2009. Chronic constipation in the elderly. *Gastroenterology Clinics of North America*, 38(3): 463-480.
- BREHMER A, BELEITES B. 1996. Myenteric neurons with different projections have different dendritic tree patterns: a morphometric study in pig ileum. *Journal of the autonomic system*, 61: 43-50.
- BREHMER A, SCHRÖDL F, NEUHUBER W. 1999. Morphological classifications of enteric neurons – 100 years after Dogiel. *Anatomy Histologic Embryology*, 200: 125-135.
- BREHMER A, CRONER R, DIMMLER A, PAPADOPOULOS T, SCHRÖDL F, NEUHUBER W. 2004. Immunohistochemical characterization of putative primary afferent (sensory) myenteric neurons in human small intestine. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 112: 49-59.
- BROOKES SJH. 2001. Classes of Enteric Nerve Cells in the Guinea-Pig Small Intestine. *The Anatomical Record*, 262: 58–70.
- BUCHINSKY FJ, FORBES ML, HAYES JD, SHEN K, EZZO S, COMPLIMENT J, HOGG J, HILLER NL, HU FZ, POST JC, EHRLICH GD. 2007. Virulence phenotypes of low-passage clinical isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae* assessed using the *chinchilla laniger* model of otitis media. *BioMed Central Microbiology*, 14: 7-56.
- BUENO L, FIORAMONTI J. 2002. Visceral perception: inflammatory and non-inflammatory mediators. *Gut* 51(1): i19-i23.
- BURNS GA, CUMMINGS JF. 1991. Equine myenteric plexus with special reference to the pelvic flexure pacemaker. *Anatomical Record*, 230(3): 417-24.

- BUSSO JM, PONZIO MF, CHIARAVIGLIO M, FIOLE DE CUNEO M, RUIZ RD. 2005a. Electroejaculation in the Chinchilla (*Chinchilla lanigera*): effects of anesthesia on seminal characteristics. *Research in Veterinary Science*, 78(1): 93-97.
- BUSSO JM, PONZIO MF, CUNEO MF, RUIZ RD. 2005b. Year-round testicular volume and sêmen quality evaluations in captive *Chinchilla lanigera*. *Animal Reproduction Science*, 90: 127-134.
- BUSSO JM, PONZIO MF, CUNEO MF, RUIZ RD, 2007a. Noninvasive monitoring of ovarian endocrine activity in the chinchilla *Chinchilla lanigera*. *General and Comparative Endocrinology*, 150: 288-297.
- BUSSO JM, PONZIO MF, DABBENE V, DE CUNEO MF, RUIZ RD. 2007b. Assessment of urine and fecal testosterone metabolite excretion in *Chinchilla lanigera* males. *Animal Reproduction Science*, 86(3-4): 339-51.
- CARLETON MD, MUSSER GG. 2005. Order Rodentia. In: WILSON DE and REEDER DM (Eds.). *Mammal species of the World: A taxonomic and geographic reference*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 312-529p.
- CASTRO TF, DUMMER RJ, RICKES EM, PEREIRA MAM. 2010. Aspectos morfológicos, morfométricos e topográficos do aparelho digestório de *Chinchilla lanigera*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 47: 86-94.
- CASTRO TF, PEREIRA PCG, PEREIRA MAM, BOMBONATO PP, RICKES EM. 2007. Formação do sistema venoso portal em *Chinchilla lanigera*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 44(1): 44-48.
- CEULAER KMG, VANGINNEKEN CJD, PHILIPS WA, WEYNS A. 2007. Intercial cells of Cajal and their role in veterinary gastrointestinal pathologies. *Anatomy Histologic Embryology* 36: 300-310.
- CEVIK-DEMIRKAN A, OZDEMIR V, DEMIRKAN I, TÜRKMEENOGLU I. 2007. Groos morphological features of plexus brachialis in the chinchila (*Chinchila lanigera*). *Journal of the South African Veterinary Association*, 78: 21-24.
- COFRÉ PL, GERMAIN PF, MEDINA LL, ORELLANA GH, SUÁREZ MJ, VERGARA AT. 2008. Manejo de la constipación crônica del adulto: Actualización. *Revista Médica de Chile*, 138: 507-16.
- COLLINS SM. 1996. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology*, 111: 1683-1699.

- CORTÉS A, MIRANDA E, JIMÉNEZ JE. 2002. Seasonal food habits of the endangered long-tailed chinchilla (*Chinchilla lanigera*): the effect of precipitation. *Mammalian Biology*, 67: 167-175.
- CORTÉS A, ROSENMANN M, BOZINOVIC F. 2000a. Water economy in rodents: evaporative water loss and metabolic water production. *Revista Chilena de Historia Natural*, 73(2): 311-321.
- CORTÉS A, ROSENMANN M, BOZINOVIC F. 2000b. Relación costo-beneficio em La termoregulacion of *Chinchilla lanigera*. *Revista Chilena de Historia Natural*, 73(2): 351-57.
- COSTA M, FURNES JB, LLEWELLYN-SMITH IJ. Histochemistry of the Enteric Nervous System. In: *Physiology of the Gastrointestinal tract*. 2. ed. New York: Raven Press, 1987. Cap.1, p.1-40.
- COTTRELL DF, MCGORUM BC, PEARSON GT. 1999. The neurology and enterology of equine grass sickness: a review of basic mechanisms. *Neurogastroenterology Motility*, 11: 79-92.
- CRACCO C, FILOGAMO G. 1994. Quantitative study of the NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons of the rat ileum. *Neuroscience*, 61(2): 351-359.
- CROSSLEY DA, DUBIELZIG RR, BENSON KG. 1997. Caries and odontoclastic resorptive lesions in a chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Veterinary Record*, 141(13): 337-39.
- DA SILVEIRA ABM, FREITAS MAR, DE OLIVEIRA EC, NETO SG, LUQUETTI AO, FURNESS5 JB, CORREA-OLIVEIRA R, D'AVILA REIS D. 2008. Neuronal plasticity of the enteric nervous system is correlated with chagasic megacolon development. *Parasitology*, 135: 1337-342.
- DAVIS KAM, MASELLA J, BLENNERHASSETT MG. 1998. Acetylcholine metabolism in the inflamed rat intestine. *Experimental Neurology*, 152: 251-58.
- DAWSON TM, BREDT DS, FOTUHI M, HWANG PM, SNYDER SH. 1991. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Neurobiology*, 88: 7797-7801.
- DE ARAUJO AC, CAMPOS R. 2009. Systematization, distribution and territory of the middle cerebral artery on the brain surface in chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 38: 12-17.
- DEDUCHOVAS O, SALADZINSKAS Z, TAMELIS A, PAVALKIS D, PAUZIENE N, PAUZA DH. 2008. Morphologic pattern of myenteric neural plexus in colonic diverticular disease. A whole-

- mount study employing histochemical staining for acetylcholinesterase. *Annals of Anatomy* 190: 525—530.
- DE GIORGIO R, GUERRINI S, BARBARA G, STANGHELLINI V, DE PONTI F, CORINALDESI R, MOSES PL, SHARKEY KA, MAWE GM. 2004. Inflammatory Neuropathies of the Enteric Nervous System. *Gastroenterology*, 126(7): 1872–1883.
- DE RIDDER E, WEYNS A. 1994. Classification of the enteric nerve cells of the porcine small intestine into two subpopulations using enzyme histochemical techniques. *Microscopy research and technique*, 29: 103-111.
- DOCKRAY GJ. 1987. Physiology of enteric neuropeptides. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. 2ª ed. New York: Raven Press. Cap. 2, p. 41 – 66.
- DOERNING BJ, BRAMMER DW, RUSH HG. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* infection in a *Chinchilla lanigera*. *Laboratory Animals*, 27(2): 131-33.
- DOGIEL AS. 1896. Zwei arten sympathischer nervenzellen. *Anatomischer Anzeiger*, 11: 679-87.
- DUNCAN M, MOIHATE A, MACKIE K, KEENAN CM, BUCKLEY NE, DAVISON JS, PATEL KD, PITTMAN QJ, SHARKEY KA. 2008. Cannabinoid CB2 receptors in the enteric nervous system modulate gastrointestinal contractility in lipopolysaccharide-treated rats. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295: G78-G87.
- EMBRAPA: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc65/timpanismo.htm> (acessado em 22 de outubro de 2008).
- FONTES RBV, FROES LB, OMAR ED, LIBERTI EA. 2004. The myenteric plexus of the rat colon after fecal stream diversion: a morpho-quantitative study. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 114: 39-46.
- FORBES ML, HORSEY E, HILLER NL, BUCHINSKY FJ, HAYES JD, COMPLIMENT JM, HILLMAN T, EZZO S, SHEN K, KEEFE R, BARBADORA K, POST JC, HU FZ, EHRLICH GD. 2008. Strain-specific virulence phenotypes of *Streptococcus pneumoniae* assessed using the *Chinchilla laniger* model of otitis media. *PLoS One*, 3(4): e1969.
- FREYTAG C, SEEGER J, SIEGEMUND T, GROSCHE J, GROSCHE A, FREEMAN DE, SCHUSSER GF, HÄRTIG W. 2008. Immunohistochemical characterization and quantitative analysis of neurons in the myenteric plexus of the equine intestine. *Brain Research*, 1244: 53-64.
- FURLANI CG, HABACUQUE TS, SOUZA RR, LIBERTI EA. 2008. Morphological and quantitative study of ganglionated plexus of *Calomys callosus* trachea. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 144: 30-35.

- FURNESS JB. 2006. The organization of the autonomic nervous system: Peripheral connections. *Journal Autonomic Neuroscience*, 130: 1-5.
- FURNESS JB. 2008. The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. *Neurogastroenterology Motility*, 20(1): 32-38.
- GABELLA G. 1987. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience*, 22(2): 737-752.
- GÁBRIEL R, PÁSZTOR I, DÉNES V. 1997. Some neurohistochemical properties of nerve elements in myenteric plexus of rabbit ileum: similarities and dissimilarities to the rodent pattern. *Cell Tissue Research*, 292: 283-291.
- GAMBA CO, CASTRO TF, RICKES EM, PEREIRA MAM. 2007. Sistematização dos territórios nervosos do plexo braquial em Chinchila (*Chinchilla lanigera*). *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*, 44(4): 283-289.
- GOMES OA, CASTELUCCI P, FONTES RBV, LIBERTI EA. 2006. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: A quantitative morphological study. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, (126– 127): 277-284.
- GOMES OA, DE SOUZA RR, LIBERTI EA. 1997. A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. *Gerontology*, 43(4): 210-17.
- GONÇALVES CCM, HERNANDES L, OLIVEIRA NLB, NATALI MRM. 2008. Alternativas terapêuticas em modelos experimentais de doença inflamatória intestinal. *Ciência, Cuidado e Saúde*, 7(1): 107-111.
- GONZÁLEZ-PEREYRA ML, CARVALHO EC, TISSERA JL, KELLER KM, MAGNOLI CE, ROSA CA, DALCERO AM, CAVAGLIERI LR. 2008. An outbreak of acute aflatoxicosis on a chinchilla (*Chinchilla lanigera*) farm in Argentina. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20: 853-56.
- GRAU J. 1986. *La chinchilla, su crianza en todos los climas*. 3rd edn. El Ateneo, Buenos Aires.
- HANANI M, FELLIG Y, UDASSIN R, FREUND HR. 2004. Age-related changes in the morphology of the myenteric plexus of the human colon. *Autonomic Neuroscience*, 113(1–2): 71–78.
- HANSEN MB. 2003a. The enteric nervous system II: Gastrointestinal functions. *Pharmacology and Toxicology*, 92: 105-113.

- HANSEN MB. 2003b. The enteric nervous system I: Organization and classification. *Pharmacology and Toxicology*, 92: 249-57.
- HARRIS RH, WILK D, BEVINS CL, MUNSON-JR RS. 2004. Identification and characterization of a mucosal antimicrobial peptid expressed by the Chinchilla (*Chinchilla lanigera*) airway. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(19): 20250-20256.
- HAREL N, MORI N, SAWADA S, MOUNT RJ, HARRISON RV. 2000. Three distinct auditory areas of cortex (AI, AII, and AAF) defined by optical imaging of intrinsic signals. *Neuroimage*, 11(4): 302-12.
- HAU L, VANDERWINDER JM, PING J, DE LAET MH. 1997. Nitric oxide synthase distribution in the enteric nervous system of children with cardiac achalasia. *Chinese Medical Journal*, 110(5): 358-361.
- HEFFNER RS, HEFFNER HE. 1991. Behavioral hearing range of the chinchilla. *Hearing Research*, 52: 13-16.
- HILLYER E, QUESENBERRY KE, DONNELLY TM. 1997. *Ferrets, rabbits and rodents: Clinical Medicine and Surgery*. Philadelphia: WB Saunders Co. 432p.
- HIRONAKA R, FREEZE B. *Feedlot finishing of cattle*. 1992. Ottawa: Minister of Supply and Services. Canadá, 57p.
- HOLMBERG BJ, HOLLINGSWORTH SR, OSOFKY A, TELL LA. 2007. *Taenia coenurus* in the orbit of a chinchilla. *Veterinary Ophthalmology*, 10(1): 53-59.
- HOPE BT, MICHAEL GJ, KNIGGE KM, VINCENT SR, 1991. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Neurobiology*, 88: 2811-2814.
- HULLAR TE, WILLIAMS CD. 2006. Geometry of the semicircular canals of the chinchilla (*Chinchilla laniger*). *Hearing Research*. 213(1-2): 17-24.
- JÄNIG W. 2006. *The integrative action of the autonomic nervous system: Neurobiology of homeostasis*. Cambridge University Press, Cambridge. 620p.
- JENSEN R, MACKEY DR. 1974. *Diseases of feedlot cattle*. Philadelphia: Lea & Febiger, 377p.
- JIMÉNEZ JE. 1994. Overuse and endangerment of wildlife: the case of Chilean mammals. *Medio ambiente (Chile)*, 12: 102-110.
- JIMÉNEZ JE. 1996. The extirpation and current status of wild chinchillas *Chinchilla lanigera* and *C. brevicaudata*. *Biological Conservation*, 77: 1-6.

- JUKIĆ S, TALAN-HRANILOVIĆ J, BUKOVIĆ D, MILETIĆ I, NEZIRI E. 2002. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Diaphorase (NADPH-d) histochemistry detecting NOS in healthy and chronically inflamed pulp. *Collegium Antropologicum*, 26(2): 681-688.
- KARAOŞMANOĞLU, T.; MUFTUOĞLU, S.; DAGDEVİREN, A.; DURGUN, B.; AYGUN, B.; ORS'J, U. 1996. Morphological changes in the myenteric plexus of rat ileum after transection and end-to-end anastomosis. *Journal of Anatomy*, 188: 323-331.
- KARNOVSKY MJ, ROOTS L. 1964. A "direct-coloring" method for cholinesterase. *Journal Histochemistry and Cytochemistry*, 12: 219-221.
- KIMPE A, DECOSTERE A, HERMANS K, BAELE M, HAESBROUCK F. 2004. Isolation of *Listeria ivanovii* from a septicemic chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Veterinary Record*, 154(25): 791-92.
- KIMBALL ES, SCHNEIDER CR, WALLACE NH, HORNBY PJ. 2006. Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by dextran sulphate sodium. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291: G364-G371.
- KNOWLES CH, DE GIORGIO R, KAPUR RP, BRUNDER E, FARRUGIA G, GEBOES K, GERSHON MD, HUTSON J, LINDBERG G, MARTIN JE, MEIER-RUGE WA, MILLA PJ, SMITH VV, VANDERVINDEN JM, VERESS B, WEDEL T. 2009. Gastrointestinal neuromuscular pathology: guidelines for histological techniques and reporting on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Acta Neuropathologica*, 118: 271–301.
- KOBAYASHI H, HIRAKAWA H, SURANA HR, O'BRIAIN DS, PURI P. 1995. Intestinal neuronal dysplasia is a possible cause of persistent bowel symptoms after pull-through operation for Hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery*, 30(2): 253-259.
- KRAMMER HJ, WEDEL TH, BREHMER A, STACH W, KUHNEL W, SINGER MV. 1997. The Enteric Nervous System. What can we learn from morphology? *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 2: 5-13.
- KRISHNAMURTI, C.R.; KITTS, W.D.; SMITH, D.C. 1974. The digestion of carbohydrates in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Canadian Journal of Zoology*, 52 (10): 1227-33.
- LANGLEY JN. 1921. *The Autonomic Nervous System*. Cambridge, England: W. Heffer and Sons.

- LANGNER G, ALBERT M, BRIEDE T. 2002. Temporal and spatial coding of periodicity information in the inferior colliculus of awake chinchilla (*Chinchilla laniger*). *Hearing Research*, 168(1-2): 110-30.
- LEAL MC, FRANÇA LR. 2008. Postnatal Sertoli and Leydig cell proliferation and the establishment of puberty and sexual maturity in *Chinchilla lanigera* (Rodentia, Chinchillidae). *Reproduction, Fertility and Development*, 20(6): 665-73.
- LEAL MC, FRANÇA LR. 2009. Slow increase of Sertoli cell efficiency and daily sperm production causes delayed establishment of full sexual maturity in the rodent *Chinchilla lanigera*. *Theriogenology*, 71(3): 509-18.
- LYFORD GL, HE CL, SOFFER E, HULL TL, STRONG SA, SENAGORE AJ, BURGART LJ, YONG-FADOK T, SZURSZIEWSKI JH, FARRUGIA G. 2002. Pan-colonic decrease in interstitial cells of cajal in patients with slow transit constipation. *Gut*, 51: 496-501.
- LIPMAN NS, WARDRIP CL, YUAN CS, COVENTRY S, BUNTE RM, LI, X. 1998. Familial megacecum and colon in the rat: a new model of gastrointestinal neuromuscular dysfunction. *Laboratory Animals Science*, 48(3): 243-252.
- LOMAX AE, LINDEN DR, MAWE GM, SHARKEY KA. 2006. Effects of gastrointestinal on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits. *Journal of Autonomic Neuroscience*, 126-127: 250-57.
- LOURENSSEN S, MILLER KG, BLENNERHASSETT MG. 2009. Discrete responses of Myenteric neurons to structural and functional damage by neurotoxins in vitro. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297: G228–G239.
- MAIFRINO LBM, ORATES JC, DE-SOUZA RR, LIBERTI EA. 1997. Morphometry and acetylcholinesterase activity of the myenteric plexus of the wild mouse *Calomys callosus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 627-632.
- MAIFRINO LBM, LIBERTI EA, WATANABE II-SEI, DE-SOUZA RR. 1999. Morphometry and acetylcholinesterase activity of the myenteric neurons of the mouse colon in the chronic phase of experimental *Trypanosomas cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(5): 721-725.
- MAIFRINO LBM, AMARAL SON,; WATANABE, LIBERTI EA, DE-SOUZA RR. 2005. *Trypanosoma cruzi*: Preliminary investigation of NADH-positive and somatostatin-immunoreactive neurons in the myenteric plexus of the mouse colon during the infection. *Experimental Parasitology*, 111: 224–229.

- MALAGELADA JR. 2002. Sensation and gas dynamics in functional gastrointestinal disorders. *Gut*, 51 1): i72- i75.
- MEIER-RUGE W, LUTTERBECK PM, HERZOG B. 1972. Acetylcholinesterase activity in suction biopsies of the rectum in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery*, 7: 11–17.
- MILNE EM, FINTL C, HUDSON NPH, PEARSON GT, MAYHEW IG, HAHN CN. 2005. Observation on the interstitial cells of Cajal and neurons in a recovered case of equine Dysautonomia (Grass Sickness). *Journal of Comparative Pathology*, 133: 33-40.
- MOHLIS C. 1983. Información preliminar sobre la conservación y manejo de la chinchilla silvestre en Chile. *Boletín Técnico*, No. 3: 1-41. Corporación Nacional Forestal, Santiago, Chile.
- MOORE RM. 2006. Diagnosis and treatment of selected diseases of the cecum and colon in horses, p.165-170. In: *Proceedings of the North American Veterinary Conference. Large animal edition. January 7-11, 2006, Orlando, USA. Vol 20.*
- MOORE SW, LAING D, MELIS J, CYWES S. 1993. Secondary effects of prolonged Intestinal obstruction on the enteric nervous system in the rat. *Journal of Pediatric Surgery*, 28(9): 1196-1199.
- MOREIRA NM, HERMES C, ALMEIDA CSL, SANTANA EC, SANT'ANA DMG, ARAÚJO EJA. 2008. Quantitative analysis of the neurons from the myenteric plexus in the ileum of rats submitted to severe protein deficiency. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 66: 242–245.
- MORRIS GP, BECH PL, HERRIDGE MS, SZEWCZUK MR, WALLACE JL. 1989. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 96: 795-803.
- MORTON DJ, BAKALETZ LO, JURCISEK JA, VANWAGNER TM, SEALE TW, WHITBY PW, STULL TL. 2004. Reduced severity of middle ear infection caused by nontypeable *Haemophilus influenza* lacking the hemoglobin/hemoglobin-haptoglobin binding proteins (Hgp) in a chinchilla model of otitis media. *Microbial Pathogenesis*, 36: 25-33.
- NAGLIĆ T, SEOL B, BEDEKOVIĆ M, GRABAREVIĆ Z, LISTES E. 2003. Outbreak of *Salmonella enteritidis* and isolation of *Salmonella sofia* in chinchillas (*Chinchilla laniger*). *Veterinary Record*, 152(23): 719-20.
- NELSON DA, KIESTER TE. 1978. Frequency discrimination in the chinchilla. *Journal Acoustical Society of America*, 64(1): 114-126.

- NEMETH L, FOURCADE L, PURI P. 2000. Marked morphological differences in the myenteric plexus between the mesenteric and antimesenteric sides of small bowel in premature infants. *Journal of Pediatric Surgery*, 35(5): 748-752.
- NEUNLIST M, AUBERT P, TOQUET C, ORESHKOVA T, BAROUK J, LEHUR PA, SCHEMANN M. 2003. Changes in chemical coding of myenteric neurons in ulcerative colitis. *Gut*, 52: 84-90.
- OZDEMIR V, CEVIK-DEMIRKAN A, TÜRKMENOĞLU I. 2008a. Subgross and macroscopic investigation of blood vessels originating from aortic arch in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Anatomy, Histologic, Embryology*, 37(2): 131-33.
- OZDEMIR V, CEVIK-DEMIRKAN A, TURKMENOGLU I. 2008b. The right coronary artery is absent in the Chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Anatomy, Histology Embryology*, 37: 114-17.
- PEARSON GT. 1993. Structural organization and neuropeptide distributions in the equine enteric nervous system: an immunohistochemical study using whole-mount preparations from the small intestine. *Cell Tissue Research*, 276: 523-534.
- PEREIRA MAS, MOLINARI SL, ANDRÉ FCOE, NETO MHM. 2003. Density and morphometry of myenteric neurons of the ileum of rats subjected to chronic alcoholism. *International Journal of Morphology*, 21(3): 245-250.
- PIENKOWSKI M, HARRISON RV. 2005a. Tone frequency maps and receptive fields in the developing chinchilla auditory cortex. *Journal of Neurophysiology*, 93(1): 454-66.
- PIENKOWSKI M, HARRISON RV. 2005b. Tone responses in core versus belt auditory cortex in the developing chinchilla. *Journal of Comparative Neurology*, 492(1): 101-9.
- QUINTON JF. *Novos animais de estimação: pequenos mamíferos*. São Paulo: Roca, 2005. 263p.
- REED SM, BAYLY WM. 2000. *Medicina Interna Eqüina*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- REMAK R. 1852. Über microscopische Ganglien an den "Asten des N. Vagus in der Wand des Magens bei Wilbertieren". *Verh, Ges. Deutesland.*, p. 183.
- RIVERA LR, THACKER M, PONTELL L, CHO H, FURNESS JB. 2011. Deleterious effects of intestinal ischemia/reperfusion injury in the mouse enteric nervous system are associated with protein nitrosylation. *Cell and Tissue Research*. Online First™, 8 February 2011.

- ROGAWSKI MA, GOODRICH JT, GERSHON MD, TOULOUKIAN RJ. 1978. Hirschsprung's diseases: absence of serotonergic neurons in the aganglionic colon. *Journal of Pediatric Surgery*, 13(6D): 608-615.
- ROSOWSKI JJ, RAVIEZ ME, SONGER J. 2006. Structures that contribute to middle-ear admittance in chinchilla. *Journal of Comparative Physiology A*, 192: 1287-1311.
- RÜHL A. 2005. Glial cells in the gut. *Neurogastroenterology Motility*, 17: 777-90.
- SAND E, THEMNER-PEARSON A, EKBLAD E. 2008. Infiltration of mast cells in rat colon is a consequence of ischemia/reperfusion. *Digestive Diseases Sciences*, 53: 3168-69.
- SANTOS MM, TANNURI U, COELHO MCM. 2008. Study of acetylcholinesterase activity in rectal suction biopsy for diagnosis of intestinal dysganglionoses: 17-year experience of a single Center. *Journal of Pediatric Surgery Internacional*, 24: 715–719.
- SANOVIC S, LAMB DP, BLENNERHASSETT MG. 1999. Damage to the Enteric Nervous System in Experimental Colitis. *American Journal of Pathology*, 155(4): 1051-57.
- SHARKEY K, KROESE ABA. 2001. Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators. *The Anatomical Record*, 262: 79-90.
- SHOFNER WP. 2002. Perception of periodicity strength of complex sounds by the chinchilla. *Hearing Research*, 173: 69-81.
- SILVEIRA ABM, LEMOS EM, ADAD SJ, CORREIA-OLIVEIRA R, FURNESS JB, REIS DD. 2007. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves and glial cells. *Human Pathology*, 38: 1256-64.
- SILVERIO SM, MARI RB, CLEBIS NK, SCOZ JR, GERMANO RM, MAJOR JAA, BOMBONATO PP, STABILLE SR. 2009. Effects of ascorbic acid supplementation in ileum myenteric neurons of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(4): 295-302.
- SINGARAM C, SWEET MA, GAUMNITZ EA, CAMERON AJ. 1995. Peptidergic and nitrinergic denervation in congenital esophageal stenosis. *Gastroenterology*, 109: 275-281.
- SMITH B. 1970. Disorders of the myenteric plexus. *Gut*, 1: 271-274.
- SPOTORNO AE, ZULETA CA, VALLADARES JP, DEANE AL, JIMÉNEZ JE. 2004a Mammalian species. *American Society of mammalogists*, 758: 1-9.
- SPOTORNO AE, VALLADARES JP, MARIN JC, PALMA RE, ZULETA CR. 2004b. Molecular divergence and phylogenetic relationships of chinchillids (rodentia: chinchillidae). *Journal of Mammalogy*, 85(3): 384-388.

- STACH W. 1988. A revised morphological classification of neurons in the enteric nervous system. In: SINGER MV and GOEBEL H. Nerves and the gastrointestinal tract. MTP Press Limited 1988. Chapter 3, p. 29 – 45.
- STAEBLER S, STEINMETZ H, KELLER S, DEPLAZES P. 2007. First description of natural *Echinococcus multilocularis* infections in chinchilla (*Chinchilla lanigera*) and Prevost's squirrel (*Callosciurus prevostii borneoensis*). Parasitology Research, 101: 1725-27.
- TAYLOR P, BROWN JH. 1999. Acetylcholine. In: SIEGEL GL. *et al.* (eds.), Basic Neurochemistry. Molecular, Celular and Medical Aspects. Cap. 11. Lippincott-Raven, Philadelphia. Pp. 213-242.
- TIMMERMANS J, BARBIES M, SCHEUERMANN DW, STACH W, ADRIAENSEN D, MAYER B, DE GROODT-LASSEEL MHA. 1994. Distribution pattern, neurochemical features and projections of nitrergic neurons in the pig small intestine. Annals of Anatomy, 176: 515-525.
- VASINA V, BARBARA G, TALAMONTI L, STANGHELLINI V, CORINALDESI R, TONINI M, DE PONTI F, DE GIORGIO R. 2006. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. Autonomic Neuroscience, 126-127: 264-72.
- VIVES PS. 2005. Morfologia do plexo mientérico do ceco de gatos (*Felis domesticus*) revelado através de NADPH-diaforase: aspectos descritivos e morfométricos. Dissertação mestrado. Programa de Pós-graduação em Sanidade Animal. Universidade Federal de Pelotas.
- WARD SM, XUE C, SHUTTLEWORTH CW, BREDT DS, SNYDER SH, SANDERS KM. 1992. NADPH diaphorase and nitric oxide synthase colocalization in enteric neurons of canine proximal colon. American Physiological Society, 263: G277-G284.
- WEBB RA. 1994. Chinchillas. In: BEYON, P.H. and COOPER, J. E. (Eds.) Manual of exotic pets. Iowa State University Press, 15-21.
- WEIMBERG RJ, VALTSCHANOFF JG, SCHIMIDT HHHW. 1996. The NADPH diaphorase histochemical stain. In: FEELISCH M, STAMLER JS. Methods in Nitric Oxide Research. John Willey and Sons Ltd., cap. 16, p. 237-248.
- WEISS DJ, EVASON AO, MCCLENAHAN D, FAGLIARI JJ, DUNNWIDDIE CT, WELLS RE. 1998. Effect of a competitive inhibitor of platelet aggregation on experimentally induced laminitis in ponies. American Journal of Veterinary Research, 59: 814-817.

- WESTER T, O'BRIAN S, PURI P. 1998a. NADPH diaphorase-containing nerve fibers and neurons in the myenteric plexus are resistant to postmortem changes: studies in Hirschsprung's disease and normal autopsy material. *Archives of pathology and laboratory medicine*, 122(5): 461-466.
- WESTER T, O'BRIAN S, PURI P. 1998b. Morphometric aspects of the submucous plexus in whole-mount preparations of normal human distal colon *Journal of Pediatric Surgery*, 33(4): 619-622.
- WHITBY PW, STULL TL. 2004. Reduced severity of middle ear infection caused by nontypeable *Haemophilus influenza* lacking the hemoglobin/hemoglobin-haptoglobin binding proteins (Hgp) in a chinchilla model of otitis media. *Microbial Pathogenesis*, 36: 25-33.
- WILHELM M, BATÓRI Z, PÁSZTOR I, GÁBRIEL R. 1998. NADH-Diaphorase positive myenteric neurons in the ileum of guinea-pig, rat, rabbit and cat: a comparative study. *European Journal of Morphology*, 36(3): 143-152.
- WOOD JD. 1987. Physiology of the Enteric Nervous System. In.: *Physiology of the Gastrointestinal tract*. 2. ed. New York: Raven Press, p.67-109.
- WOHLSEIN P, THIELE A, FEHR M, HAAS L, HENNEICKE K, PETZOLD DR, BAUMGÄRTNER W. 2002. Spontaneous human herpes virus type 1 infection in a chinchilla (*Chinchilla lanigera f. dom.*). *Acta Neuropathology*, 104: 674-678.
- YUNKER AMR, GALLIGAN JJ. 1998. Extrinsic denervation increases myenteric nitric oxide Synthase-containing neurons and inhibitory neuromuscular transmission in guinea pig. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 71: 148-158.
- <http://www.chinchila.com.br/manual-ascachila.asp> (acessado em 22 de outubro de 2008).
- <http://www.chinchila.org/doencas.php#infeccoesintestinais>(acessado em 28 de janeiro 2011)
- <http://www.saudeanimal.com.br/artig54a.htm> (acessado em 28 de janeiro 2011)