

HISTOMORFOMETRIA DOS NEURÔNIOS DO PLEXO MIOENTÉRICO DO CÓLON DESCENDENTE DE EQUÍNOS EXPOSTOS AO CLORETO DE BENZALCÔNIO

(HISTOMORPHOMETRY OF MYENTERIC PLEXUS NEURONS OF THE HORSE DESCENDING COLON AFTER EXPOSURE TO BENZALKONIUM CHLORIDE)

(HISTOMORFOMETRÍA DE LAS NEURONAS DEL PLEXO MIENTÉRICO DEL COLON DESCENDENTE DE EQUINOS EXPUESTOS AL CLORURO DE BENZALCONIO)

**F. A. BATISTA¹, S. ZUCOLOTO², A. C. ALESSI³, A. I. SOUZA⁴,
E. NOGUEIRA⁵, C. A. A. VALADÃO⁶.**

RESUMO

Avaliaram-se os efeitos do cloreto de benzalcônio (CB) na morfometria dos neurônios do plexo mioentérico do cólon descendente de oito equínos. Dois animais foram sacrificados no dia 01, dois no dia 03 e quatro no dia 15. Foram colhidas amostras do segmento intestinal tratado e amostras de igual segmento intestinal de outros dez equínos abatidos em frigorífico, não tratados, para fins de comparação. A histomorfometria dos neurônios do plexo mioentérico foi realizada por meio de analisador de imagem. Houve uma redução no número de neurônios do plexo mioentérico após o tratamento com CB e os neurônios remanescentes apresentavam áreas médias do corpo neuronal, do citoplasma e do núcleo menores que os animais controle, principalmente aqueles que vieram a óbito no dia 03, apresentando os animais do dia 15 valores próximos aos animais controle. Concluiu-se que 15 dias após a exposição ao CB os neurônios do plexo mioentérico do cólon descendente de equínos apresentavam áreas dos corpos neuronais inferiores aos animais controle, portanto, sem indícios de neuroplasticidade.

PALAVRAS-CHAVE: Plexo mioentérico. Cloreto de benzalcônio. Morfometria. Neuroplasticidade. Equino.

SUMMARY

We evaluated the effects of benzalkonium chloride (BC) on the morphometry of the myenteric plexus neurons of the descending colon in eight horses. Two animals were euthanased at day 1, two at day 3, and four at day 15. Samples of the treated intestinal segment were obtained, as well as samples of the same intestinal segment from ten untreated horses slaughtered in a meat packing plant and used for comparison. Histomorphometry of the myenteric plexus neurons was performed with an image analyzer. There was a reduction in the number of myenteric plexus neurons after treatment with BC and the remaining neurons showed smaller mean neuronal body, cytoplasm and nucleus areas than control animals, especially in animals slaughtered at day 3, whereas animals slaughtered at day 15 presented values close to those of control animals. We concluded that the myenteric plexus neurons of the horse descending colon presented smaller

¹ Prof. Dr. de Clínica Cirúrgica - UNIDERP- Campo Grande - MS.

² Professor Titular do Departamento de Patologia da FMRP-USP - SP.

³ Professor Titular do Departamento de Patologia Veterinária - FCAV/ Unesp - Campus de Jaboticabal - SP.

⁴ Doutoranda do Depto. de Clínica Médica - FCAV/Unesp - Campus de Jaboticabal - SP. Prof^a de Clínica Médica - UNIDERP - Campo Grande - MS.

⁵ Doutorando do Depto. de Reprodução Animal - FCAV/ Unesp - Campus de Jaboticabal - SP

⁶ Professor Adjunto do DCCV/FCAV/Unesp - Campus de Jaboticabal - SP

neuronal bodies at fifteen days after exposure to BC in comparison with controls, thus showing no signs of neuroplasticity.

KEY - WORDS: Myenteric plexus. Benzalkonium chloride. Morphometry. Neuroplasticity. Horses.

RESUMEN

Fueron evaluados los efectos del cloruro de benzalconio (CB) en la morfometría de las neuronas del plexo mientérico del colon descendente de ocho equinos. Dos animales fueron sacrificados en el día 1, dos en el día 3 y cuatro en el día 15. Fueron colectadas muestras del segmento intestinal tratado y muestras del mismo segmento de otros diez equinos no tratados abatidos en un frigorífico, para fines de comparación. La histomorfometría de las neuronas del plexo mientérico fue realizada por medio de un analizador de imagen. Hubo reducción del número de neuronas del plexo mientérico después del tratamiento con CB y las neuronas remanecientes presentaron áreas medias del cuerpo neuronal, del citoplasma y del núcleo menores que las de los animales control, principalmente aquellos sacrificados en el 3^{er} día. Los animales del día 15 mostraron valores próximos a los animales control. Se concluyó que 15 días después de la exposición al CB las neuronas del plexo mientérico del colon descendente de equinos presentaban áreas de los cuerpos neuronales inferiores a las de los animales control, por lo tanto sin indicios de neuroplasticidad.

PALABRAS CLAVE: Plexo mientérico. Cloruro de benzalconio. Morfometría. Neuroplasticidad. Equino.

INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal possui inervação intrínseca e extrínseca. A inervação extrínseca é composta por fibras nervosas da divisão simpática e parassimpática do sistema nervoso autônomo. A inervação intrínseca é composta pelo sistema nervoso entérico (SNE). O SNE compõe-se do plexo mioentérico ou de Auerbach localizado entre a camada muscular longitudinal (externa) e a camada muscular circular (interna); do plexo de Meissner localizado na submucosa e, ainda, do plexo da mucosa (JESSEN et al., 1980, GERSHON, 1981, FOX et al., 1983, FOX & BASS, 1986, LLEWELLYN-SMITH et al., 1983). A maioria dos corpos celulares nervosos do SNE localizam-se nos gânglios do plexo mioentérico (FURNESS & COSTA, 1980). SANTER & BAKER (1988) observaram que a maioria das áreas dos corpos dos neurônios do plexo mioentérico do cólon de ratos estavam entre 200 e 400 mm². Maifirino et al. (1999) observaram que a área do corpo neuronal dos neurônios do plexo mioentérico do cólon de camundongos variou de 80 a 600 mm².

A ausência ou degeneração de neurônios intestinais intrínsecos diminui a atividade propulsiva no segmento afetado e tem sido descrita como fatal para os equinos (HULTGREN, 1982, VONDERFECHT et al., 1983, MURRAY et al., 1988, BURNS & CUMMINGS, 1991). No homem, a aganglionose intestinal congênita (doença de Hirschsprung) e a doença de Chagas caracterizam-se pela ausência ou por degeneração dos neurônios intrínsecos causando perda da motilidade intestinal (SMITH, 1972, SCHUFFLER et al., 1983).

A aganglionose do cólon tem sido descrita em cavalos da raça Paint Horse, de pelagem branca. O

mecanismo de herdabilidade dessa desordem é desconhecido, mas tem sido demonstrado não ser resultante de um simples gene recessivo (TROMMERSHAUSEN-SMITH, 1977), devendo a suspeita clínica ser levantada quando cavalos jovens apresentarem sinais de distensão crônica do cólon (MURRAY et al., 1988).

A “grass sickness” ou disautonomia equina, como é conhecida na Europa e que na Argentina e no Chile tem sido denominada como “mal seco”, é uma doença de etiologia desconhecida que destrói grande número de neurônios dos plexos mioentérico e submucoso (UZAL & ROBLES, 1993), causando disfunção intestinal e apresentando uma taxa de mortalidade próxima a 100%, a despeito da intensidade dos sinais clínicos ter grande variabilidade. Nos casos agudos de “grass sickness”, as lesões ocorreram predominantemente no plexo mioentérico, enquanto, nos casos crônicos, elas estavam restritas ao plexo submucoso (OBEL, 1955). Em casos agudos e subagudos causam lesão severa e diminuição dos neurônios do jejuno. Esse tipo de lesão acomete também o cólon descendente, porém é menos evidente. A gravidade da doença relaciona-se com o número de neurônios acometidos no jejuno, observando-se alterações menos severas nos casos crônicos (DOXEY et al., 1995).

Sato et al. (1978) relataram que a aplicação tópica com cloreto de benzalcônio (CB), diluído em solução salina, na serosa do cólon de ratos produzia destruição seletiva dos elementos nervosos intestinais. Esse modelo passou a ser estudado para induzir destruição do plexo mioentérico e, conseqüentemente, simular doenças nas quais isso ocorre naturalmente. Batista (1999) descreveu

que o CB a 5% aplicado sobre a serosa do jejuno de eqüinos causou desnervação do plexo mioentérico muito semelhante àquela induzida pelo quadro agudo de “grass sickness” (SCHOLETS et al., 1993). Vários autores realizaram a mesma técnica variando a concentração do CB e o local da aplicação no trato gastrointestinal de ratos (FOX et al., 1983, FOX & BASS, 1986, OLIVEIRA et al. 1990, ZUCOLOTO et al. 1991, HADZIJAHIC et al., 1993, RAMALHO et al., 1993).

HANANI et al. (2003) observaram que 14 dias após o tratamento do cólon de ratos com CB os neurônios do plexo mioentérico apresentavam hipertrofia com 52% de aumento em relação aos animais controle.

Neste estudo avaliou-se a histomorfometria dos neurônios do plexo mioentérico do cólon descendente, de eqüinos, após a exposição ao CB.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram retirados segmentos de cólon descendente, quando do abate no Frigorífico Santa Fé, localizado no Município de Santa Fé do Sul - PR, de 10 eqüinos, 5 machos (n=5) e 5 fêmeas (n=5), pensando entre 240 e 400 kg, portanto, não tratados com cloreto de benzalcônio (GNT), considerados grupo controle.

No grupo tratado com cloreto de benzalcônio (GCB), foram utilizados 8 eqüinos, mestiços, 4 machos (n=4) e 4 fêmeas (n=4), com idade inferior a 7 anos, considerados hígidos e sem alterações gastrointestinais aparentes, com peso entre 245 e 384 kg de massa corpórea, os quais foram mantidos em piquetes, por um período de quadro semanas, ingerindo, diariamente, dois quilos de ração concentrada, pastagem de capim *Coast Cross* e água à vontade. Decorrido esse período, foram alojados em baias individuais, com restrição de alimentos sólidos por oito horas. Subseqüentemente, esses eqüinos, foram sedados com acepromazina⁷ 0,05 mg.kg⁻¹, em associação com 0,05 mg.kg⁻¹ de butorfanol⁸, por via intravenosa (IV), e preparados para a cirurgia de exposição do cólon descendente. A compressa umedecida com CB permaneceu sobre a alça por um período de trinta minutos. Decorridos trinta minutos aplicou-se 1 mg.kg⁻¹ de xilazina⁹, pela mesma via. Procedeu-se à anestesia local infiltrativa no flanco esquerdo, com lidocaína a 2%¹⁰, com o animal de pé. Praticou-se uma incisão de 15 e 20 centímetros, introduziu-se a mão na cavidade abdominal, identificando-se o cólon descendente por palpação exteriorizando-o em seguida. Localizou-se a região entre o primeiro e segundo arco anastomótico do mesocólon, que foi isolada, por um campo plástico. Delimitou-se a área do intestino a ser tratada, que foi envolvida por uma compressa umedecida com o CB¹¹ diluído a 2% em solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%), utilizando-se em média um litro de solução de CB, em cada paciente. A compressa umedecida com CB

permaneceu sobre a alça por um período de 30 minutos.

Após essa fase, o segmento foi lavado com quatro litros de NaCl 0,9% para remover o excesso de CB. Imediatamente após, procedeu-se à sutura da parede abdominal. Os animais foram colocados e mantidos em piquetes onde receberam alimento e água “ad libitum”. Adicionalmente receberam tratamento com antiinflamatórios não-esteroidais. Os pontos de sutura da pele foram retirados no 10º dia. A eutanásia sob anestesia barbitúrica foi realizada 15 dias após o tratamento ou, imediatamente à sintomatologia de dor abdominal refratária ao tratamento com analgésicos.

Para fins de comparação, foram colhidas amostras de segmentos de cólon descendente, dos dez eqüinos do grupo controle. Escolheu-se segmento anatômico do cólon descendente igual àqueles expostos ao CB, ou seja, a porção média entre o primeiro e o segundo arco anastomótico do mesocólon, para serem colhidos e fixados em Bouin, no máximo, em trinta minutos após a morte do animal.

Imediatamente após a eutanásia, colheu-se um segmento de cólon descendente, da área exposta ao CB, de aproximadamente sete centímetros, o qual foi aberto no sentido longitudinal próximo à face mesentérica. Tanto os segmentos intestinais expostos como os normais foram grampeados em papel cartão e imersos em Bouin por 24 horas. Após esse período, retirou-se o papel, deixando as amostras de tecido no fixador, por mais 12 horas. Para o processamento histomorfométrico, foram realizadas lavagens e imersão em álcool 70%. O material foi incluído em parafina e, posteriormente, obtiveram-se cortes histológicos de 3 mm de espessura, os quais foram corados com cresil violeta. Realizou-se a histomorfometria dos neurônios do plexo mioentérico por meio de um analisador de imagem¹², utilizando-se uma lente de imersão (100X).

De cada grupo (GCB e GNT), foram avaliados 100 neurônios, escolhendo-se aqueles que apresentavam definição perfeita dos citoplasmas e do núcleos, localizados nas faces mesentérica, lateral e anti-mesentérica nos segmentos expostos ou não. Para calcular a área do citoplasma diminuiu-se a área do núcleo da área total da célula (corpo neuronal). Todas essas medidas foram expressas em mm². Calculou-se a área do núcleo em relação ao corpo neuronal através de regra de três.

Os dados foram avaliados pela análise de variância e as médias comparadas aplicando-se o teste de Student-Neuman-Keuls com nível de significância de 5% (p<0,05).

RESULTADOS

Os neurônios do plexo mioentérico do cólon descendente, de eqüinos, apresentaram ótima definição após a coloração com cresil violeta (Figura 01). Observou-se que a quantidade de neurônios do plexo mioentérico

reduziu drasticamente após o tratamento com CB.

A área do corpo neuronal do GNT variou de 52 a 962 μm^2 , com média de 342 μm^2 . A área do núcleo variou de 33 a 212 μm^2 , com média de 107 μm^2 . O núcleo correspondia a 36% da área do corpo neuronal. A área do citoplasma variou de 22 a 786 μm^2 , com média de 235 μm^2 .

Nos animais GCB, a área do corpo neuronal variou de 38 a 414 mm^2 , com média de 230 mm^2 . A área do núcleo variou de 14 a 195 mm^2 , com média de 97 mm^2 . O núcleo correspondia a 45% da área do corpo neuronal. A área do citoplasma variou de 13 a 309 mm^2 com média de 133 m^2 .

Quando se compararam as áreas dos corpos neuronais dos animais GNT com os animais GCB 15 não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$). Os animais

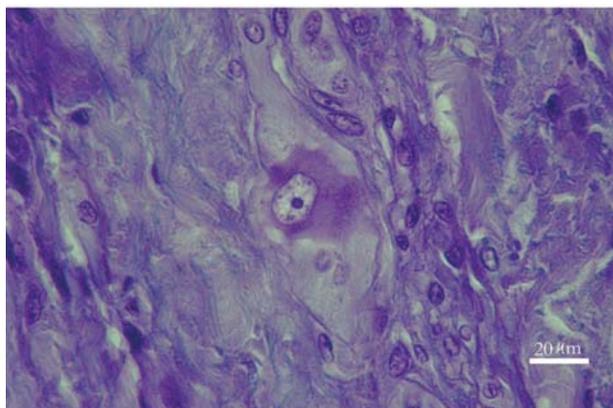


Figura 01 - Fotomicrografia de neurônio do plexo mioentérico do cólon descendente de equino controle corado com cresil violeta (obj. 100X). Observar a ótima definição das estruturas em relação ao tecido adjacente.

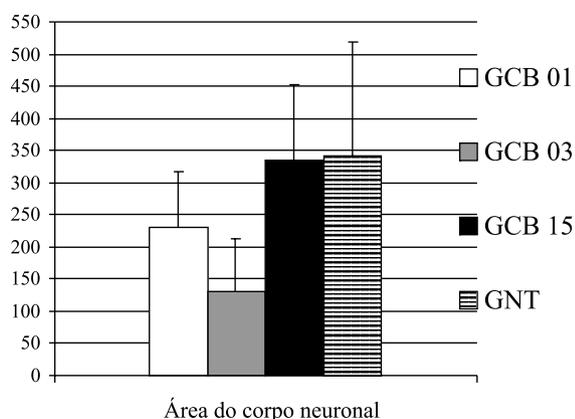


Figura 02 - Áreas dos corpos de neurônios do plexo mioentérico do cólon descendente de equinos tratados pelo cloreto de benzalcônio e sacrificados nos dias 01 (GCB 01), 03 (GCB 03) e 15 (GCB 15) e de animais controle (GNT). Valores expressos em μm^2 .

GCB 01 e GCB 03 apresentaram diferenças ($p < 0,05$) quando comparados aos animais do GNT e GCB 15. Os animais GCB 01 e GCB 03 apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparados entre si (Figura 02).

Quando se comparou a área do núcleo dos animais GNT com a dos animais GCB 01 e GCB 15, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$). Os animais GCB 03 apresentaram diferenças ($p < 0,05$) quando comparados aos demais (Figura 03). A área do núcleo em relação ao corpo neuronal foi maior nos animais GCB 01 e GCB 03, uma vez que havia uma maior redução de citoplasma nesses períodos (Figura 04).

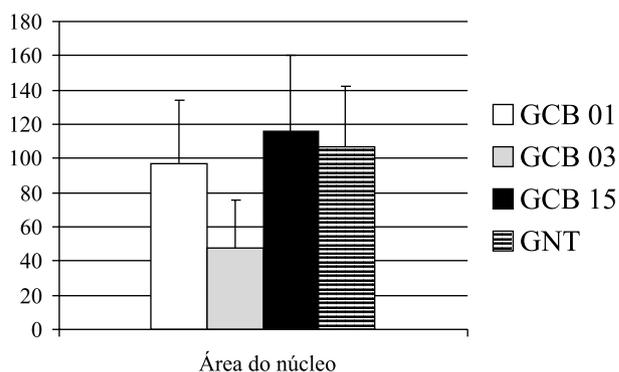


Figura 03 - Áreas dos núcleos de neurônios do plexo mioentérico do cólon descendente de equinos tratados pelo cloreto de benzalcônio e sacrificados nos dias 01 (GCB 01), 03 (GCB 03) e 15 (GCB 15) e de animais controle (GNT). Valores expressos em μm^2 .

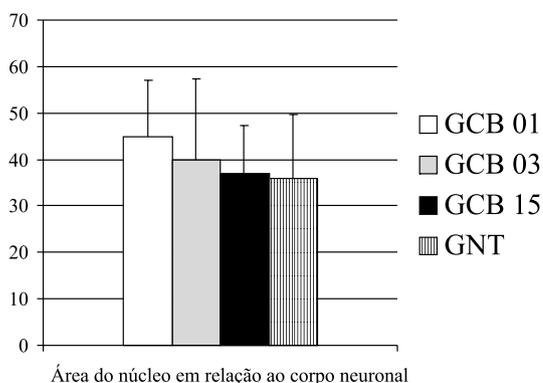


Figura 04 - Área do núcleo em relação ao corpo neuronal (%) dos neurônios do plexo mioentérico do cólon descendente de equinos tratados pelo cloreto de benzalcônio e sacrificados nos dias 01 (GCB 01), 03 (GCB 03) e 15 (GCB 15) e de animais controle (GNT).

DISCUSSÃO

Doxey et al. (1995) modificaram a técnica de coloração pela hematoxilina-eosina para a coloração dos neurônios do plexo mioentérico de equinos, porém, Batista (1999) encontrou dificuldades no momento da identificação e diferenciação entre os neurônios e as células satélites. Diante dessa dificuldade, optou-se pela coloração de cresil violeta, que permitiu e facilitou a contagem dos neurônios do plexo mioentérico, pela melhor diferenciação de suas estruturas citoplasmática (POLLI-LOPES et al., 2003).

Embora não se tenha encontrado valores de referência para equinos, a área média do corpo neuronal encontrada nos animais controle foram semelhantes à descrita por Santer & Baker (1988).

A exposição ao CB provocou a redução da área do corpo neuronal e do citoplasma nos animais sacrificados nos primeiros dias, indicando a ação tóxica do CB sobre os neurônios do plexo mioentérico, pois a área do núcleo em relação ao citoplasma foi maior do que aquela dos animais controle, devido à diminuição do volume do citoplasma. Esse agente químico pode ter interferido no mecanismo de transporte ativo de sódio, causando degeneração e morte celular (SAKATA et al., 1979).

Os animais sacrificados no décimo quinto dia (GCB 15) apresentavam sinais de recuperação de atividade celular, uma vez que o citoplasma e o núcleo neuronal recuperaram o volume, mas mesmo assim contrariam os achados de Hanani et al. (2003) que relatam aumento da área do corpo neuronal 14 dias após o tratamento com CB.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que, 15 dias após a exposição dos neurônios do plexo mioentérico ao CB, houve diminuição das áreas dos corpos neuronais, não sendo possível demonstrar um quadro de neuroplasticidade.

AGRADECIMENTOS

À Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP) pelo financiamento desta pesquisa.

ARTIGO RECEBIDO: Outubro/2003
APROVADO: Setembro/2004

REFERÊNCIAS

BATISTA, F. A. **Efeito da desnervação mioentérica no jejuno de equinos**. Jaboticabal, SP. 1999. 65 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

BURNS, G. A., CUMMINGS, J. F. Equine myenteric plexus with special reference to the pelvic flexure pacemaker. **The Anatomical Record**, v. 230, p. 417-24, 1991.

DOXEY, D. L., PEARSON, G. T., MILNE, E. M., GILMOUR, J. S., CHISHOLM, H. K. The equine enteric nervous system - neuron characterization and distribution in adults and juveniles. **Veterinary Research Communications**, v. 19, p. 433-49, 1995.

FOX, D. A., EPSTEIN, M. L., BASS, P. Surfactants selectively ablate enteric neurons of the rat jejunum. **Journal of Pharmacology Experimental and Therapeutics**, v.227, p.538-44, 1983.

FOX, D. A., BASS, P. Pharmacological characterization of rat jejunal contractility after chronic ablation of myenteric plexus. **Journal of Pharmacology Experimental and Therapeutics**, v. 238, n. 1, p. 372-7, 1986.

FURNESS, J. B., COSTA, M. Types of nerves in the enteric nervous system. **Neuroscience**, v. 5, p. 1-20, 1980.

GERSHON, M. D. The enteric nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v. 4, p. 227-72, 1981.

HADZIJAHIC, N., RENEHAN, W. E., MA, C. K., ZHANG, X., FOGEL, R. Myenteric plexus destruction alters morphology of rat intestine. **Gastroenterology**, v. 105, n. 4, p. 1017-1028, 1993.

HANANI, M., LEDDER, O., YUTKIN, V., ABU-DALU, R., HUANG, T., HARTIG, W., VANNUCCHI, M., FAUSSONE-PELEGRINI, M. Regeneration of myenteric plexus in the mouse colon after experimental denervation with benzalkonium chloride. **Journal of Comparative Neurology**, v. 462, p. 315-27, 2003.

HULTGREN, B. D. Ileocolonic aganglionosis in white progeny of overo spotted horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 3, p. 289-92, 1982.

JESSEN, K. R., POLAK, J. M., NOORDEN, S. V., BLOOM, S. R., BURNSTOCK, G. Peptide-containing neurones connect the two ganglionated plexuses of the enteric nervous system. **Nature**, v. 283, p. 391-3, 1980.

- LLEWELLYN-SMITH, I. J., FURNESS, J. B., WILSON, A. J., COSTA, M. Organization and fine structure of enteric ganglia. In: ELFVIN, L. **Autonomic ganglia**. p. 145-182, 1983.
- MAIFRINO, L. B. M., LIBERTI, E. A., WATANABE, S., De-SOUZA, R. R. Morphometry and acetylcholinesterase activity of the myenteric neurons of the mouse colon in chronic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 60, n. 5, p. 721-5, 1999.
- MURRAY, M. J., PARKER, G. A., WHITE, N. A. Megacolon with myenteric hypoganglionosis in a foal. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 7, p. 917-9, 1988.
- OBEL, A. L. Studies on grass sickness disease. The morphological pictures with special reference to the vegetative nervous system. **Journal of Comparative Pathology**, v. 65, p. 334-46, 1955.
- OLIVEIRA, J. S. M., LLORACH-VELLUDO, M. A. S., SALES-NETO, V. N. Megacolon in rats. **Digestion**, v.45, p.166-71, 1990.
- POLLI-LOPES, A.C. ZUCOLOTO S, DE QUEIROS CUNHA, F., DA SILVA FIGUEIREDO, L.A., GARCIA, S. B. Myenteric denervation reduces the incidence of gastric tumors in rats. **Cancers Letters**, v. 190, p. 45-50, 2003.
- RAMALHO, F. S., SANTOS, G. C., RAMALHO, L. N., KAJIWARA, J. K., ZUCOLOTO, S. Myenteric neuron number after acute and chronic denervation of the proximal jejunum induced by benzalkonium chloride. **Neuroscience Letters**, v. 163, p. 74-76, 1993.
- SAKATA, K., KUNIEDA, T., FURUTA, T., SATO, A. Selective destruction of intestinal nervous elements by local application of benzalkonium solution in the rat. **Experientia**, v. 35, p. 1611-1613, 1979.
- SANTER, R. M., BAKER, D. M. Enteric neurons number and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v.25, p. 59-67, 1988.
- SATO, A., YAMAMOTO, M., IMAMURA, K., KASHIKI, Y., KUNIEDA, T., SAKATA, K. Pathophysiology of aganglionic colon and anorectum : An experimental study on aganglionosis produced by a new method in the rat. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 13, p. 399-405, 1978.
- SCHOLES, S. F. E., VAILLANT, C., PEACOCK, P., EDWARDS, G. B., KELLY, D. F. Enteric neuropathy in horses with grass sickness. **Veterinary Record**, v. 132, p. 647-51, 1993.
- SCHUFFLER MD, BAIRD HW, FLEMING CR, BELL CE, BOULDIN TW, MALAGELADA JR, MCGILL DB, LEBAUER SM, ABRAMS M, LOVE J. Intestinal pseudo-obstruction as the presenting manifestation of small-cell carcinoma of the lung. A paraneoplastic neuropathy of the gastrointestinal tract. **Annals Internal Medicine**, .v. 98, n. 2, p.129-34, 1983.
- SMITH, B. **The neuropathology of the alimentary tract**. London : Edward Arnold, 1972, p.70.
- TROMMERSHAUSEN-SMITH, A. Lethal white foals in matings of overo spotted horses. **Theriogenology**, v.8, p.303-11, 1977.
- UZAL, F. A., ROBLES, C. A. Mal seco, a grass sickness-like syndrome of horses in Argentina. **Veterinary Research Communications**, v. 17, p. 449-57, 1993.
- VONDERFECHT, S. L., TROMMERSHAUSEN BOWLING, A., COHEN, M. Congenital intestinal aganglionosis in white foals. **Veterinary Pathology**, v. 20, p. 65-70, 1983.
- ZUCOLOTO, S., SILVA, J. C., OLIVEIRA, J. S. M., MUCILLO, G. The chronological relationship between the thickening of smooth muscle, epithelial cell proliferation and myenteric neural denervation in the rat jejunum. **Cell Proliferation**, v. 24, p. 15-20, 1991.