Valquíria Barboza Mariotti

**Caracterização morfoquantitativa do plexo
mioentérico do esôfago no modelo de distrofia
muscular camundongo *MDX***

**São Paulo
2012**

VALQUÍRIA BARBOZA MARIOTTI

Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do esôfago no modelo de distrofia muscular camundongo *MDX*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2012

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2694
FMVZ

Mariotti, Valquíria Barboza
Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do esôfago no modelo de distrofia
muscular camundongo MDX / Valquíria Barboza Mariotti. -- 2012.
100 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti.

1. Distrofia muscular de Duchenne. 2. Esôfago. 3. Plexo mioentérico. 4. Camundongo MDX.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do esôfago no modelo de distrofia muscular camundongo mdx", protocolado sob o nº 2085/2010, utilizando 60 (sessenta) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 08/12/2010.

We certify that the Research "Morphoquantitative features of myenteric plexus of esophagus in mdx mice", protocol number 2085/2010, utilizing 60 (sixty) mice, under the responsibility Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/08/2010.

São Paulo, 02 de fevereiro de 2011

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Ribeirão Preto, 29 de outubro de 2010

Prezado(a) Senhor(a) Prof(a) Dr.(a) Odair Alfredo Gomes

Vimos por meio desta informar que Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos da Universidade de Ribeirão Preto CEP/UNAERP analisou e aprovou sem restrições, o Projeto intitulado "AVALIAÇÃO MORFOQUANTITATIVA DOS EFEITOS DA Distrofia Muscular no Córtex Cerebral e no Plexo Mioentérico de Camundongos MDX" tendo como pesquisador(a) Prof(a) Dr(a) Odair Alfredo Gomes, registrado sobre o Comitê: 046/2010.

Temos a ciência de que os estudos estão sendo conduzidos na Universidade de Ribeirão Preto

Solicitamos que nos encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas e novos termos de consentimento livre e esclarecido, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo para que possamos fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luciana Bezende Alves de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARIOTTI, Valquíria Barboza

Título: Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do esôfago no modelo de distrofia muscular camundongo *MDX*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*A todos os portadores de distrofia muscular
e suas famílias*

*Aos animais de experimentação, que tornaram
possível a realização deste trabalho*

*“A grandiosidade de uma nação e o seu progresso moral podem
ser medidos pela forma como os seus animais são tratados”*

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Meu mais profundo agradecimento a Deus, que meu deu a vida e permitiu que ela não fosse interrompida antes da conclusão destas páginas, e por ter colocado na minha estrada as pessoas certas, no momento exato e nas circunstâncias ideais.

“Pedi, e dar-se-vos-á; buscai, e achareis; batei e abrir-se-vos-á. Porque todo o que pede, recebe; e o que busca, acha; e a quem bate, abrir-se-lhe-á. Pois se vós outros, sendo maus, sabeis dar boas dádivas a vossos filhos, quanto mais vosso Pai, que está nos Céus, dará boas dádivas aos que lhe pedirem”.

(Mateus, VII: 7-8; Mateus VII: 11)

Este trabalho é mais uma gota no oceano de estudos que buscam informações e respostas para perguntas que se propõem a levar ao caminho da cura para as distrofias musculares, ou que ao menos se propõem melhorar da qualidade de vida de seus portadores.

Expresso a minha gratidão àqueles que estiveram ao meu lado nesta maratona. Não apenas na bancada, na sala de aula ou em casa, como também aos que não mediram esforços para estarem próximos quando fui surpreendida por uma internação hospitalar e cirurgia inesperadas, além de um longo tratamento médico, em meio ao curso de doutoramento. Nem mesmo as distâncias quilométricas se mostraram tão curtas.

Aos meus pais, Aldo (in memoriam) e Olga, e à minha irmã Morgana, companheiras e amigas, compartilharam cada letra desta tese, zelando pela minha saúde e pelo meu bem-estar, contribuíram de forma única para a conclusão deste trabalho.

A generosidade, compreensão, respeito, honestidade, caráter, amizade e o “amparo acolhedor” que encontro na pessoa do meu orientador, Prof. Edson Aparecido Liberti, foram essenciais para a elaboração dessas páginas e para a convivência harmoniosa e familiar nesses cinco anos. Sou muito grata por todos os ensinamentos e exemplo na arte de ensinar Anatomia. Mas, acima de tudo, sou grata pela confiança e oportunidade de conviver com esta pessoa que entrega a sua paixão naquilo que faz. Obrigada pelos momentos vividos no VQM.

Ao lado do Prof. Liberti e esbanjando exemplo de excelente convivência, união, ponderação, positivismo, valorização do ser humano e força, a Prof^a Sílvia de Campos Boldrini conduziu e liderou o grupo do LAFACC-VQM, sem jamais perder sua ternura. Mostrou-se uma grande companheira, sempre. Além de não poupar esforços para estar junto a mim em um momento ímpar da minha vida, representando o pilar deste trabalho.

A inesgotável fonte de idealização veio da Prof^a Maria Angélica Miglino, sempre com energia vibrante de apoio, incentivo e positivismo. Por trás da figura firme e vigorosa, a professora imbuíu-se da mesma vontade, e me fez acreditar que o improvável é possível.

Com assistência constante, apoio, muitos ensinamentos e amizade, o Prof. Odair Alfredo Gomes foi o elo entre mim e a Associação de Amigos dos Portadores de Distrofia Muscular (AADM), de onde obtivemos os animais de experimentação. A AADM é fruto da idealização e empenho de um grupo de pais de portadores de distrofia muscular, dentre

estes a Sra. Edna Pupin. A equipe de profissionais composta por Angélica de Souza, Daniel Giuliano Cerri, Yan Zuanon Barruchelli, Daniela Dover, Cláudia Pasquim Santos Silva esteve sempre disposta em auxiliar-me e elucidar minhas dúvidas.

A interpretação e análise dos dados se devem ao excelente trabalho e disponibilidade da estatística Rosana Duarte Prisco, do Departamento de Anatomia do ICB-USP.

À agência CAPES e seus funcionários pela concessão das bolsas de doutorado e doutorado sandwich.

Aos colegas de pós-graduação, amigos e jovens anatomistas da FMVZ-USP, ICB-USP e LAFACC-VQM, e especialmente aos amigos Ricardo Eustáquio da Silva, Ricardo Bragança de Vasconcellos Fontes, Ricardo Bandeira, Lynda Jhailú Tamayo Arango, Regina de Sousa Bolina Matos, Bruna Caixeta de Oliveira, Sabrina Caixeta de Oliveira, Marcelo Arthur Cavalli, Catarina Tivane Nhamposse, Paulo Henrique Alves Matos, Flávia de Oliveira, Thiago Habacuque e Cristina Fürstenau Basso, pela convivência, auxílio prestado e troca de conhecimentos.

Ao companheiro de experimento e de laboratório Eduardo Henrique Beber pelo trabalho conjunto e troca de experiências. Gratidão especial à Gisele Miyamura Martins pela disposição em coletar e confeccionar parte do material durante a minha ausência.

À Prof^a Sílvia Massironi, do ICB-USP, pelos esclarecimentos quanto às particularidades dos camundongos de diferentes linhagens.

Aos funcionários do setor de Anatomia, da Biblioteca e da Pós-graduação da FMVZ-USP e do Departamento de Anatomia do ICB-USP, especialmente a Maicon Barbosa da Silva e Jaqueline Martins de Santana.

Aos alunos de graduação que, com suas infinitas heterogeneidades, tanto nos ensinam.

Ao acolhimento dos amigos e apoio espiritual encontrados no Grupo Espírita Cairbar Schutel e na Creche Lar do Alvorecer.

Minha gratidão especial ao amigo Ricardo Bragança de Vasconcellos Fontes e a Matheus Schmidt, que me conduziram às mãos do excelente Dr. Hector Navarro Cabrera e sua equipe. As equipes médica, de enfermagem, assistentes sociais e psicólogos são alguns, dentre tantos profissionais da Faculdade de Medicina da USP (Hospital Universitário, Hospital das Clínicas, Instituto de Psiquiatria e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo), que trabalham e estudam incessantemente em favor da vida de seus pacientes.

A todos aqueles que me auxiliaram direta e indiretamente neste trabalho, mas que, por um lapso, tiveram seus nomes omitidos, os meus sinceros agradecimentos.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

Francisco Cândido Xavier (1910-2002)

Platão em detalhe. "Scuola di Atenas" (Rafael Sanzio - 1510). Stanza della Segnatura, Palazzi dei Pontifici, Vaticano.

*"Não se deve tratar os olhos sem tratar a cabeça.
Não se deve tratar a cabeça sem tratar o corpo.
Tampouco se deve tratar o corpo sem tratar a alma."*

Platão (427 a.C – 347 a.C)

RESUMO

MARIOTTI, V. B. **Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do esôfago no modelo de distrofia muscular camundongo MDX**. [Morphoquantitative features of myenteric plexus of oesophagus in MDX mice]. 2012. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é um tipo de miopatia grave, degenerativa e progressiva, geneticamente determinada e ligada ao cromossomo X. Além dos graves distúrbios cardiorrespiratórios e da motricidade, o paciente apresenta disfunções do sistema digestório, caracterizadas pelas desordens da motilidade. Entretanto, sabe-se que tais disfunções não ocorrem no camundongo MDX. O objetivo deste estudo foi estimar a densidade numérica por área da população total de neurônios ($Q_{A[TJ]}$) e dos neurônios nitrérgicos ($Q_{A[NJ]}$); assim como a área de secção transversal média do corpo celular destes neurônios ($A_{[TJ]}$ e $A_{[NJ]}$) do plexo mioentérico esofágico e a largura média das fibras estriadas (L) das camadas musculares. Foram utilizados 40 camundongos machos da linhagem C57BL/10 nas idades de 4 e 10 semanas, distribuídos entre grupos experimentais (MDX4 e MDX10), e controles (C4 e C10). As estimativas foram analisadas em preparados de membrana dos esôfagos, e técnicas histoquímicas de NADH-diaforase (NADH-d) e NADPH-diaforase (NADPH-d) foram utilizadas para evidenciar toda a população de neurônios e os neurônios nitrérgicos, respectivamente. Os resultados mostraram que a $Q_{A[TJ]}$ foi significativamente maior no grupo MDX10 em relação ao C10 ($p<0.05$); enquanto a $Q_{A[NJ]}$ foi menor no grupo MDX4 em relação ao C4 ($p<0.05$). A $A_{[TJ]}$ foi menor no grupo MDX10 em relação ao MDX4 e ao C10 ($p<0.05$); enquanto que para a $A_{[NJ]}$ não houve diferença significativa entre os grupos controle e experimental, e tampouco entre os grupos de 4 e de 10 semanas. A variável L foi maior nos grupos MDX4 e MDX10 em relação aos seus respectivos controles de mesma idade ($p<0.05$). Concluímos que no plexo mioentérico esofágico de camundongos MDX existe uma redução dos neurônios mediadores do relaxamento, especialmente em animais jovens (MDX4), provavelmente porque o organismo tenta manter íntegra a função peristáltica do órgão. Esse fato pode explicar a adaptação e ausência de disfunções esofágicas durante quase toda a vida desses animais.

Palavras-chave: Distrofia muscular de Duchenne. Esôfago. Plexo mioentérico. Camundongo MDX.

ABSTRACT

MARIOTTI, V. B. **Morphoquantitative features of myenteric plexus of the oesophagus in MDX mice.** [Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do esôfago no modelo de distrofia muscular camundongo *MDX*]. 2012. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is the most common and the most severe muscular dystrophy of childhood. DMD is degenerative, progressive and a genetic X-linked disease. Besides the cardiomyopathy and the movement disorders, the patients have serious disfunctions in the alimentary system, characterized by motility disorders. However, it is known that such changes do not exist in *MDX* mice. The aim of this study was to estimate the neuronal numerical density/area of total ($Q_{A[T]}$) and nitregic neurons ($Q_{A[N]}$), the average cross-sectional area of total ($A_{[T]}$) and nitregic ($A_{[N]}$) neurons in myenteric plexus of the oesophagus and the average width of striped muscle of muscular layer (L). Forty C57BL/10 male mice were studied from four to ten weeks of age, divided into four groups: *MDX* mice formed the experimental groups (*MDX4* and *MDX10*) and C57BL/10 male mice without the mutation formed the control groups (*C4* and *MDX10*). Whole mounts preparations were obtained from the samples and histochemistry for NADH-diaphorase (NADH-d) and NADPH-diaphorase (NADPH-d) were used for morphometric evaluation. The results showed a significant increase of the $Q_{A[T]}$ in the *MDX10* than *C10* ($p<0.05$), and a decrease of the $Q_{A[N]}$ in *MDX4* comparing to *C4* ($p<0.05$). The $A_{[T]}$ decreased significantly in *MDX10* comparing to both *MDX4* and *C10* ($p<0.05$), while no significant differences were observed among all the groups regarding the $A_{[N]}$. The groups *MDX4* and *MDX10* showed a significant increase in L when compared to its controls at the same age ($p<0.05$). We conclude that in the myenteric plexus of the oesophagus in *MDX* mice there is a reduction of the inhibitory neurons, mainly in the young animals (*MDX4*), probably to keep normal the peristaltic functions. Thus, it may explain the adaptation and the absence of oesophageal disfunction during almost the whole life in this animal model.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy. Oesophagus. Myenteric plexus. *MDX* mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Tipos de neurônios no intestino.....	46
Figura 2 -	Fotomicrografia de preparado de membrana de esôfago de camundongo após marcação histoquímica com NADH-d.....	54
Figura 3 -	Fotomicrografia de preparado de membrana de esôfago de camundongo após marcação histoquímica com NADPH-d.....	55
Figura 4 -	Fotomicrografia do esôfago.....	56
Figura 5 -	Fotomicrografia de uma amostra do esôfago de camundongo após reação histoquímica com NADH-d.....	57
Figura 6 -	Fotomicrografia de preparado de membrana de esôfago de camundongo. Neurônios nitrérgicos evidenciados pela marcação histoquímica NADPH-d.....	59
Figura 7 -	Fotografia do monitor do computador, utilizando o <i>software</i> Zeiss Axion Vision® KS400 Rel. 4.8 no modo em tempo real em tela cheia.....	59
Figura 8 -	Fotografia do monitor do computador com aumento do zoom da imagem para medição da área neuronal.....	60
Figura 9 -	Fotografia do monitor do computador com aumento do zoom da imagem para medição da largura das fibras musculares estriadas.....	60
Figura 10 -	Médias $\pm$ dp das massas corporais (M) em gramas (g)	64
Figura 11 -	Médias $\pm$ dp das densidades numéricas da população total de neurônios ($Q_{A[TJ]}$ /mm ²), da população de neurônios nitrérgicos ($Q_{A[NJ]}$ /mm ²) e da razão da população total de neurônios/população de neurônios nitrérgicos. ($Q_{A[TJ]}/Q_{A[NJ]}$).....	66
Figura 12 -	Frequências e médias $\pm$ dp das áreas de secção transversal média da população total de neurônios ($A_{[TJ]}$) em μm^2	68
Figura 13 -	Frequências e médias $\pm$ dp das áreas de secção transversal média dos neurônios nitrérgicos ($A_{[NJ]}$) em μm^2	69
Figura 14 -	Médias $\pm$ dp das larguras médias das fibras musculares estriadas (L) em μm	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Médias $\pm$ dp padrão das massas corporais (M) em gramas (g) - São Paulo – 2012.....	63
Tabela 2	Médias $\pm$ dp das densidades numéricas da população total de neurônios ($Q_{A[TJ]}$)/mm ² , dos neurônios nitrérgicos ($Q_{A[NJ]}$)/mm ² e a razão da população total de neurônios/população de neurônios nitrérgicos ($Q_{A[TJ]}/Q_{A[NJ]}$) - São Paulo – 2012.....	65
Tabela 3	Médias $\pm$ dp das áreas dos perfis neuronais (A) em μm^2 - São Paulo – 2012.....	67
Tabela 4	Médias $\pm$ dp das larguras médias das fibras musculares estriadas (L) em μm - São Paulo – 2012.....	70

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

$A_{[N]}$	Estimativa da área de secção transversal média dos neurônios nitrérgicos
$A_{[T]}$	Estimativa da área de secção transversal média da população total de neurônios
ATP	Trifosfato de adenosina
C4	Grupo controle de 4 semanas de idade
C10	Grupo controle de 10 semanas de idade
CK	Creatinofosfoquinase
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
dp	Desvio padrão
GRMD	Golden Retriever Muscular Dystrophy
L	Estimativa da largura média das fibras musculares estriadas
M	Massa corporal
MDX	do inglês, <i>X chromossome-linked muscle dystrophy</i>
$MDX4$	Grupo experimental de 4 semanas de idade
$MDX10$	Grupo experimental de 10 semanas de idade
NADH-d	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH-d	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NANC	do inglês <i>Nonadrenergic and noncholinergic</i>
NBT	do inglês, <i>Nitroblue Tetrazolium</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
PBS	do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>
PM	Plexo Mioentérico
$Q_{A[N]}$	Estimativa da densidade numérica da população de neurônios nitrérgicos/mm ²
$Q_{A[T]}$	Estimativa da densidade numérica da população total de neurônios/mm ²
$Q_{A[T]}/Q_{A[N]}$	Estimativa da razão das densidades numéricas da população total de neurônios/ população de neurônios nitrérgicos por mm ²
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
TGI	Tracto gastrointestinal
VIP	do inglês, <i>vasoactive intestinal peptide</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
Ca ⁺⁺	íon cálcio
μmol/min	Micromol por minuto
M	Molar
=	Igual
Σ	Somatória
cm ²	Centímetros quadrados
<	Menor
±	Mais ou menos
mm ²	Milímetros quadrados
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3.1 AS DISTROFIAS MUSCULARES.....	26
3.2 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.....	27
3.2.1 Recursos Terapêuticos.....	30
3.3 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA A DISTROFIA MUSCULAR.....	31
3.3.1 O camundongo MDX.....	32
3.4 ANATOMIA MACROSCÓPICA DO ESÔFAGO.....	34
3.5 ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS DO TRATO DIGESTÓRIO NA DISTROFIA MUSCULAR.....	36
3.6 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO.....	38
3.6.1 Plexo Mioentérico.....	40
3.6.1.1 Particularidades funcionais do esôfago relacionadas ao circuito neuronal.....	42
3.6.2 Neurônios do Plexo Mioentérico.....	44
3.6.3 Principais neurotransmissores relacionados à excitabilidade e inibição dos músculos esofágicos.....	47
3.6.3.1 Acetilcolina.....	47
3.6.3.2 Substância P.....	48
3.6.3.3 Óxido Nítrico.....	48
3.6.3.4 VIP.....	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	52
4.2 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	52
4.3 HISTOQUÍMICA.....	53
4.3.1 NADH-d.....	53
4.3.2 NADPH-d.....	54
4.4 PREPARADO DE MEMBRANA.....	55
4.5 ESTUDO MORFOQUANTITATIVO.....	57
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61

5. RESULTADOS.....	62
5.1 MASSA CORPORAL.....	63
5.2 DENSIDADE NUMÉRICA NEURONAL.....	64
5.3 ÁREA DO PERFIL NEURONAL	67
5.4 LARGURA MÉDIA DAS FIBRAS MUSCULARES ESTRIADAS.....	70
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXO.....	99

1 INTRODUÇÃO

As distrofias musculares são formas de miopatias hereditárias, geneticamente determinadas, que afetam os músculos de seus portadores. Neste vasto grupo de doenças, a chamada Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) – encontrada somente na espécie humana - representa a mais grave e a mais freqüente delas nesta espécie (KUNKEL et al., 1986; YIU; KORNBERG, 2008).

Dentre as principais alterações encontradas nos portadores de DMD, estão aquelas que prejudicam a locomoção e o sistema cardiorrespiratório. Provoca perda da marcha ainda em tenra idade e evolui com sério comprometimento do sistema respiratório, o que na maioria dos casos leva o paciente à morte por insuficiência respiratória ao final da adolescência ou início da segunda década de vida (EMERY; EMERY, 1993; JAY; VAJSAR, 2001).

Nas últimas décadas, diversas terapias têm sido utilizadas para tratar ou amenizar as repercussões causadas pela doença. Desde tratamentos conservadores como a fisioterapia (ARAÚJO LEITÃO; DURO; DE ANDRADE PENQUE, 1995), medicamentos, terapia genética e, mais recentemente, tem-se testado a terapia com células-tronco em animais de experimentação (KERKIS et al., 2008; JAZEDJE et al., 2009).

Uma das principais preocupações da equipe de reabilitação é a manutenção da qualidade de vida de seus portadores (RAFAËL et al., 1992; KOHLER et al., 2005). Sob este aspecto, não apenas os sistemas locomotor e respiratório merecem atenção, como também as funções do sistema digestório, visto que ao longo da evolução da doença o paciente apresenta graves distúrbios desde a deglutição até a digestão dos alimentos nas porções mais aborais deste sistema, caracterizados essencialmente pelas desordens da motilidade que o acometem (JAFFE et al., 1980; BAROHN et al., 1988; STAIANO et al., 1992; CAMELO et al., 1997; CHUNG et al., 1998).

Entretanto, existem relatos que em camundongos *MDX* não se observam alterações morfofuncionais da musculatura estriada do esôfago (BOLAND et al., 1995). Daí a importância deste modelo animal para o estudo das distrofias musculares, especialmente a DMD, tão incapacitante ao homem.

Desta forma, este estudo propõe-se caracterizar morfoquantitativamente toda a população de neurônios e os neurônios nitrérgicos do plexo mioentérico do esôfago de camundongos afetados pela distrofia muscular; assim como, analisar as fibras musculares estriadas constituintes da parede deste órgão condutor de alimentos.

Tais características do esôfago no camundongo *MDX* podem ajudar a investigação do porquê da ausência de prejuízo morfofuncional desse órgão, além de somar informações experimentais no meio científico acerca deste assunto, tão incomuns nas literaturas nacional e internacional. A hipótese do presente estudo é que as características morfoquantitativas de tais neurônios contribuiriam para a manutenção adequada do desempenho funcional do esôfago nesses animais.

A compreensão e a discussão críticas acerca dos resultados e das implicações de tais alterações podem oferecer maiores esclarecimentos para o tratamento dos distúrbios da motilidade do trato digestório em portadores de DMD. Também busca-se somar informações que possam levar a tratamentos mais eficazes, e colaborar para a melhora da qualidade de vida destes indivíduos ao longo da progressão da doença.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar as características morfoquantitativas do plexo mioentérico do esôfago no modelo experimental para o estudo da distrofia muscular camundongo *MDX*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estimar:

1. No plexo mioentérico do esôfago de camundongos *MDX* (grupo experimental) e camundongos C57Bl10 (grupo controle), estimar os seguintes parâmetros:

- a) a densidade numérica da população total de neurônios por unidade de área;
- b) a densidade numérica da população de neurônios nitrérgicos por unidade de área;
- c) a área de secção transversal média do corpo celular da população total de neurônios;
- d) a área de secção transversal média do corpo celular dos neurônios nitrérgicos.

2. a largura média das fibras musculares estriadas do esôfago.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 AS DISTROFIAS MUSCULARES

As distrofias musculares são doenças que afetam as proteínas presentes na membrana das células musculares, provocando diversos tipos de estas distrofias, as quais o processo primário está associado à degeneração das fibras musculares (HOAGLAND; SHANK; LAVIN, 1944). A distrofia muscular de Duchenne faz parte deste amplo grupo de doenças.

Em 1975, o professor Victor Dubowitz listou em seu trabalho de revisão algumas destas distrofias, descritas no século XVIII, no qual diz que os autores se basearam principalmente na distribuição da fraqueza e grupos musculares comprometidos. Além do tipo Duchenne, também cita: a distrofia de Becker, do tipo cinturas, (ou de Erb, para acometimento da cintura escapular; de Leyden-Moebius, quando o acometimento é na cintura pélvica) e facioescapuloumbral (ou de Landouzy-Déjerine) (DUBOWITZ, 1975).

Outras distrofias musculares estão descritas, tais como: de Emery-Dreifuss (ROWLAND et al., 1979), oculofaríngea (CHAMPION; HARRISON, 1971) e distrofia muscular com miotonia (doença de Steinert) (FAU, 1955). As principais variedades de distrofia muscular diferenciam-se pela topografia inicial, predominância da lesão muscular, idade de início dos sintomas, evolução, manifestações associadas e pelas modalidades de transmissão genética, presente em todas elas.

Este estudo não pretende explorar as demais distrofias, mas chama atenção a expressiva quantidade dos diferentes tipos, pois estes são alguns dentre dezenas de outras distrofias musculares. Nas páginas que se seguem, somente a distrofia do tipo Duchenne e as distrofias presentes nos modelos animais serão abordadas com mais detalhes.

3.2 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Na espécie humana a Distrofia Muscular de Duchenne é um tipo de miopatia grave geneticamente determinada, de caráter recessivo, ligada ao braço curto do cromossomo X, degenerativa e progressiva (KUNKEL et al., 1986; JAZEDJE et al., 2009). Dentre as distrofias progressivas é a mais freqüente e a mais grave (WAGNER, 2008), e a sua incidência está em torno de um caso para cada 3500 nascimentos masculinos (VOISIN; DE LA PORTE, 2004).

A descrição mais completa e acurada da doença foi feita em 1861 pelo neurologista francês Guillaume Benjamin Amand Duchenne (1806-1875). Primeiramente nomeou-a “*paraplégie hypertrophique de l'enfance de cause cérébrale*”, pois o paciente também apresentava comprometimento intelectual, então pensou tratar-se de uma doença com envolvimento cerebral. Entretanto, em uma série de outros casos descritos posteriormente, em 1868 Duchenne atentou para a notável proeminência dos músculos, e criou o termo “pseudohipertrofico” (DUBOWITZ, 1975). Este termo foi emprestado pelo Dr. William Richard Gowers (CLARKE; GOWERS, 1874) e permaneceu arraigado no jargão médico até o século passado, mas foi substituído por um epônimo porque a pseudohipertrofia aparece em outros tipos de distrofias. Desde então, a doença passou a ser conhecida oficialmente na medicina como Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) (DUBOWITZ, 1975).

Todavia, antes outros médicos foram pioneiros na descrição da doença, entre eles o cirurgião escocês Charles Bell e os pesquisadores Wernich, Lockhart Clarke e Down (BONSETT; RUDMAN, 1994). Mas quem primeiro a descreveu em detalhes foi o médico inglês Edward Meryon (1807-1880), em dezembro de 1851 em uma reunião da *Royal Medical and Surgical Society of London*, relatando oito casos de distrofia muscular em meninos de três famílias (MERYON¹, 1852 apud EMERY; EMERY, 1993. p. 1).

No ano seguinte Meryon publicou que a doença é familiar e que afeta meninos, porém, sem alterações em neurônios da medula espinhal e gânglios. Mas a conclusão mais importante foi que, ao exame microscópico *post-mortem* do tecido muscular, percebeu que as fibras estriadas primitivas estavam completamente destruídas, e a

¹ MERYON, E. On granular and fatty degeneration of the voluntary muscles. **Med Chir Trans**, v. 35, p. 73-84, 1852.

substância granular e o sarcolema ou a túnica das fibras elementares estavam rotas e destruídas (MERYON, 1852). Pelas descobertas de Meryon, mais de 150 anos após a primeira descrição da doença, pesquisadores ainda questionam o nome dado à doença (EMERY, 1991).

A DMD é causada por mutações no gene que codifica a proteína 427-KD (BANKS; CHAMBERLAIN, 2008), cujo *locus* do defeito está no cromossomo Xp21 (KUNKEL et al., 1986; JAZEDJE et al., 2009). O gene afetado deixa de codificar a proteína, a qual tem papel vital na manutenção da estrutura e função muscular. Pesquisadores nomearam este tipo de proteína como distrofina porque sua identificação ocorreu por meio do isolamento do *locus* gênico em portadores da DMD.

A distrofina é parte de uma complexa proteína responsável pela estabilidade da membrana celular dos músculos (JAZEDJE et al., 2009). Participa da composição do citoesqueleto da membrana das células musculares e está presente no sarcolema (ZUBRZYCKA-GAARN et al., 1988); ela prove reforço mecânico para a superfície da membrana celular quando o músculo é alongado ou durante atividades físicas (ARAÚJO LEITÃO; DURO; DE ANDRADE PENQUE, 1995).

A distrofina representa cerca de 0,002% do total de proteínas musculares estriadas e também está presente na musculatura lisa (HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1987; HOFFMAN et al., 1987) e nos tendões (ARAÚJO LEITÃO; DURO; DE ANDRADE PENQUE, 1995). Sua ausência conduz à progressiva degeneração das musculaturas esquelética, cardíaca e lisa (VOISIN; DE LA PORTE, 2004), já que o sarcolema é submetido a necroses segmentares perdendo sua propriedade contrátil durante exercícios excêntricos e concêntricos (ARAÚJO LEITÃO; DURO; DE ANDRADE PENQUE, 1995), o que permite um grande influxo de íon cálcio (Ca^{++}) na célula (MOENS; BAATSEN; MARÉCHAL, 1993; MUNTONI; TORELLI; FERLINI, 2003). Acredita-se também que a distrofina esteja envolvida na distribuição e/ou função dos canais de Ca^{++} presentes no sarcolema. A ausência da distrofina faria com que estes canais ficassem abertos por tempo demasiado, o que resultaria não apenas em grande influxo deste íon na célula, como também poderia contribuir para o crescente processo degenerativo das células musculares (DENETCLAW et al., 1994).

Na criança portadora da DMD observa-se fraqueza progressiva dos músculos dos membros inferiores, paradoxalmente associada a uma pseudo-hipertrofia, evoluindo

para os membros superiores e músculos respiratórios (DUCHENNE², 1868 apud RONDOT, 2005. p. 2). A fraqueza muscular afeta principalmente a musculatura proximal dos membros, e à necropsia as fibras musculares apresentaram-se rotas e substituídas por camada granular e adiposa, daí a aparência pseudo-hipertrofiada. A dificuldade para caminhar e subir escadas é precoce e progressiva (MERYON³, 1852 apud EMERY; EMERY, 1993. p. 2), e culmina com a perda da marcha por volta dos 12 anos de idade (YIU; KORNBERG, 2008).

Dentre os exames laboratoriais, um dos mais importantes e confiáveis para a detecção da doença é analisar os níveis da creatinofosfoquinase (CK), que na DMD está de 20 a 200 vezes mais alta do que o normal. A CK é uma enzima muscular inespecífica que desempenha importante papel regulador do metabolismo dos tecidos contráteis, tendo papel chave no transporte de energia nas células musculares. Em 1958 o Dr. Setsuro Ebashi (OZAWA; HAGIWARA; YOSHIDA, 1999) descobriu que em humanos portadores de DMD a CK presente no interior da célula muscular passa através de sua membrana e é liberada na circulação sanguínea. A necrose das fibras musculares e a ruptura da membrana são os maiores fatores que influenciam a elevação da CK (SOMER; DUBOWITZ; DONNER, 1976). Assim como em humanos, em camundongos MDX os níveis de CK também estão aumentados durante toda a vida do animal, sendo seu pico atingido na idade de 5 semanas (GLESBY et al., 1988).

A progressão da doença segue com o aparecimento de deformidades e degeneração dos músculos paravertebrais, acarretando em cifoescoliose progressiva (SMITH; KORESKA; MOSELEY, 1989). A cardiopatia é caracterizada por fibrose e por distúrbios do ritmo e condução (NIGRO et al., 1990).

Menos citados na literatura, mas também importantes, são os relatos que associam a doença a distúrbios cognitivos, talvez provocados pela falta da distrofina no cerebelo (CYRULNIK; HINTON, 2008).

Na espécie humana o paciente geralmente vai a óbito ao final da adolescência ou por volta dos 20 anos de idade (KOHLENER et al., 2005); porém quando o paciente tem acesso a modernos recursos terapêuticos, pode alcançar a terceira década de vida (BANKS; CHAMBERLAIN, 2008).

² DUCHENNE, G. B. A. Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myosclérotique. *Arch gén Méd*, v. 11, p. 5-25, 179-209, 305-321, 421-443, 552-588, 1868.

³ MERYON, E. On granular and fatty degeneration of the voluntary muscles. *Med Chir Trans*, v. 35, p. 73-84, 1852.

3.2.1 Recursos Terapêuticos

Apesar dos esforços da ciência, atualmente ainda não existe um tratamento definitivo e eficaz para a cura da DMD (BANKS; CHAMBERLAIN, 2008). As pesquisas atuais envolvem, entre outras, a terapia genética, celular e fármacos (COLLINS; MORGAN, 2003).

Segundo Wagner (2008) o alicerce dos tratamentos atuais incluem corticoesteróides para o tratamento da fraqueza da musculatura esquelética, redução da pós-carga em cardiomiopatia e ventilação mecânica não-invasiva para a deficiência respiratória. Com essas intervenções o paciente pode ter uma sobrevida relativamente longa. Entretanto, o aumento de estudos provenientes de instituições públicas e privadas conduz a um grande número de novos agentes terapêuticos potencialmente promissores. Como por exemplo, agentes que modificam a expressão da distrofina, aumentam o crescimento e a regeneração muscular e modulam as respostas inflamatórias.

A perda progressiva das funções motoras e a inevitável progressão da insuficiência respiratória, por volta da segunda década de vida, fazem da fisioterapia uma das ferramentas essenciais para a manutenção das funções e da qualidade de vida dos portadores de DMD (KOHLENER et al., 2005). O tratamento conservador objetiva manter a máxima função possível que o paciente consiga independentemente, durante o maior tempo possível, além de tentar retardar ao máximo as contraturas e deformidades. Estão indicados andadores e dispositivos que auxiliem as transferências e o ortostatismo, além da cadeira de rodas na fase em que a marcha já consome considerável gasto energético ou quando esta não é mais funcional (SIEGEL, 1989).

Cerca de 90 % dos pacientes vão a óbito por falência respiratória e cardiopatia, sendo assim, a fraqueza dos músculos respiratórios requer suporte ventilatório mecânico. Atualmente a ventilação mecânica não-invasiva por pressão positiva é o método de escolha para a melhora da qualidade de vida e para o aumento da expectativa de vida do paciente (SHNEERSON; SIMONDS, 2002; FINSTERER, 2006), assim como o aporte de oxigênio e a tosse assistida (WAGNER; LECHTZIN; JUDGE, 2007).

3.3 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA A DISTROFIA MUSCULAR

Alguns modelos mamíferos, em que a mutação genética é espontânea (WELLS; WELLS, 2005), são atualmente utilizados para a melhor compreensão da patogênese da distrofia muscular e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

O modelo canino Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) representa o melhor modelo animal disponível para a realização de ensaios clínicos que objetivam tratamentos futuros e ensaios clínicos da DMD (AMBRÓSIO et al., 2009; JAZEDJE et al., 2009), por apresentar a correlação patológica mais próxima àquela encontrada em humanos (COLLINS; MORGAN, 2003; GAIAD et al., 2011). Mas o fenótipo da maioria é bastante variável (BANKS; CHAMBERLAIN, 2008; AMBRÓSIO et al., 2009; GAIAD et al., 2011), o que pode dificultar determinadas investigações.

Ambrósio et al. (2009) descreveram 15 cães GRMD, com a doença confirmada pela genotipagem e outros exames específicos complementares. A observação clínica da musculatura esquelética, do trato gastrointestinal, e dos sistemas respiratório, cardiovascular e renal permitiu identificar três fenótipos distintos nos cães: leve (grau I), moderado (II) e grave (III), sendo que os três grupos não apresentaram nenhuma diferença nas alterações distróficas da morfologia dos músculos e nos níveis de CK.

Outro relato interessante é sobre o cão “Ringo”. Um GRMD atípico, ele nasceu em 2003, é portador da doença, mas possui força muscular preservada (AMBRÓSIO et al., 2008). Compreender o mecanismo que protege “Ringo” dos efeitos deletérios da mutação do gene da distrofina ainda é uma pergunta que intriga os pesquisadores. Por isso, estes ressaltam que o impacto clínico de ensaios terapêuticos devem ser interpretados com cautela (ZUCCONI et al., 2010).

Outro modelo ainda muito utilizado no meio científico é o camundongo da linhagem C57BL/10, como descrito a seguir.

3.3.1 O Camundongo *MDX*

A alteração genética espontânea do camundongo mutante da linhagem C57BL/10 foi descrita pela primeira vez na literatura científica em 1984 por Bulfield et al. do Departamento de Genética da Universidade da Califórnia. Os cientistas nomearam-no *MDX*, do inglês *X chromosome-linked muscle dystrophy*.

Apesar de sua patogênese ser comparativamente tênue à humana, já que não apresenta alterações fenotípicas evidentes, o camundongo *MDX* é largamente utilizado em pesquisas (BANKS; CHAMBERLAIN, 2008). Além disso, características histoquímicas e histopatológicas comuns, evidências que se tratam de doença de origem miogênica, ligada ao cromossomo X, além de a alteração cromossômica ser no mesmo *locus* gênico da DMD, fazem do *MDX* um bom modelo para o estudo da DMD humana (BULFIELD et al., 1984).

Para esta pesquisa deu-se a preferência em usar o camundongo *MDX*, pela viabilidade e disponibilidade no meio científico, por ser menos oneroso, e pela homogeneidade fenotípica, o que proporciona maior confiabilidade aos resultados, especialmente os quantitativos. É importante ressaltar que neste estudo, tanto para os grupos experimentais quanto para os controles, foram utilizados especificamente animais da linhagem C57BL/10, e não C57BL/6. Além de serem geneticamente diferentes (LEWIS et al., 2006), ambos são alvo de outras distinções, como por exemplo, o comportamento (DEACON et al., 2007), resistência a infecções por bactérias (APPELBERG et al., 2000) e produção de óxido nítrico (NO) (RODRIGUES-BASTOS et al., 2004).

Bulfield et al. (1984) descrevem cuidadosamente as alterações encontradas no *MDX*, além de estabelecerem as semelhanças com a DMD. Os níveis de CK e de piruvatoquinase (PK) estão elevados – em torno de 22,2 $\mu\text{mol}/\text{min}$ - enquanto que o normal seria 7,84 $\mu\text{mol}/\text{min}$. A partir de 3 semanas de idade podem ser observadas alterações histológicas características de degeneração nos músculos dos membros, com excessiva atrofia e perda das fibras musculares, variação do tamanho das fibras e células fagocíticas no lugar das fibras musculares perdidas. Em *MDX* adultos de 9 semanas há degeneração de quase todas as fibras musculares, incluindo a cabeça, o pescoço e tronco. Alargamento de algumas fibras e atrofia de outras. Observam-se ainda áreas de fibras

basófilas com núcleo vesicular proeminente. Tais características foram interpretadas como regeneração do tecido muscular. Não foi encontrada substituição das células musculares por tecido adiposo, embora houvesse focos de células adiposas em algumas áreas do tecido muscular. Dilatação do retículo sarcoplasmático, rompimento do plasmalema e da lâmina basal, desaparecimento da arquitetura miofibrilar normal das linhas e bandas, e os miofilamentos desintegraram-se e tornaram-se desalinhados. Apesar destes achados, o *MDX* apresenta evidências clínicas da doença somente a partir da 12^a semana de idade, na forma de tremor e discreta incoordenação.

Lefaucheur e Sebillé (1995) descrevem que as alterações musculares em camundongos *MDX* ocorrem na idade adulta do animal, por volta dos 20 meses, ao contrário do que acontece na espécie humana, em que podem ser observadas alterações musculares já na primeira infância. Os autores descrevem fraqueza muscular progressiva, substituição das fibras musculares por tecido conectivo, vários graus de envolvimento distrófico em órgãos como o coração, sistema respiratório, musculatura dos membros pélvicos e também da musculatura lisa dos trato digestório e urinário. Entretanto, sem grandes alterações histológicas em outros tecidos que não o muscular.

A musculatura esquelética de camundongos *MDX* apresenta vários tipos de padrões: desde severas, como o diafragma e o esterno-hioideo (dilatador da faringe); média, como os membros e tronco; e ausente, no caso do esôfago, intrínsecos da laringe e os extrínsecos do olho (BOLAND et al., 1995; MARQUES et al., 2007).

Também foi observado que em camundongos *MDX*, apesar da ausência de distrofina nos músculos cricoaritenóideo posterior e tireo-aritenóideo, os mesmos não apresentam sinais de lesão da membrana, inflamação, necrose ou regeneração. Provavelmente, estes músculos sofreriam uma adaptação intrínseca protetora para enfrentar a ausência de distrofina (THOMAS et al., 2008).

Muitas perguntas permanecem sem resposta quando o assunto é a distrofia muscular: quais os mecanismos morfofisiológicos protetores ou adaptadores envolvidos no desenvolvimento da doença em camundongos, ou no caso de “Ringo”?

Apesar disso e da complexidade do mecanismo fisiopatológico da distrofia muscular, além das limitações encontradas nos modelos experimentais (BANKS; CHAMBERLAIN, 2008), o estudo é essencial para o desenvolvimento das diversas estratégias terapêuticas que buscam uma substituição para a distrofina ou uma barreira para a degeneração muscular e a progressão da doença.

3.4 ANATOMIA MACROSCÓPICA DO ESÔFAGO

O esôfago é um órgão tubular muscular que conecta a faringe ao estômago, localizado dorsalmente à traquéia, atravessa o mediastino do tórax e passa através do diafragma por meio do hiato esofágico. O esôfago origina-se do ângulo caudal crico-faríngeo e estende-se até o limite rostral do esfíncter distal do esôfago, e tem por função transportar o alimento da boca para o estômago pelos movimentos peristálticos dos músculos de sua parede (CHRISTENSEN, 1987).

Assim como os outros órgãos do trato digestório, o esôfago possui quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Macroscopicamente pode-se distinguir facilmente a mucosa aderida à submucosa, e a muscular aderida à serosa. Na submucosa existem grupos de pequenas glândulas secretoras de muco – as glândulas esofágicas – cuja secreção facilita o transporte dos alimentos e protege a mucosa. Na lâmina própria da região próxima ao estômago existem as glândulas esofágicas do óstio cárdico, também secretoras de muco. A camada muscular é constituída pela musculatura longitudinal (externa) e a circular (interna); entre estas duas camadas de músculos está o plexo mioentérico. A camada muscular longitudinal apresenta fibras paralelas ao eixo longitudinal do órgão; enquanto que a camada circular contém fibras que circundam o esôfago. Microscopicamente, o esôfago é revestido internamente por um epitélio pavimentoso estratificado não corneificado (CHRISTENSEN, 1987).

Na espécie humana, ao longo de seu trajeto, o esôfago apresenta três regiões morfológicamente distintas quanto ao tipo de fibras musculares. A porção oral apresenta apenas fibras musculares esqueléticas; em sua porção média, um misto de musculatura estriada esquelética e lisa; e na porção aboral apresenta exclusivamente células musculares lisas (AREY; TREMAINE, 1933). Apenas o trecho esofágico contido na cavidade peritoneal é recoberto por uma membrana serosa; o restante é envolto por uma camada de tecido conjuntivo, a adventícia, que se mistura com o tecido conjuntivo circundante. Na maioria das espécies a camada muscular externa é composta por fibras estriadas em todo o seu comprimento, inclusive todos os roedores e carnívoros, e

apresentam toda a extensão do órgão constituída por musculatura estriada em ambas as camadas (OPPEL⁴, 1897 apud CHRISTENSEN, 1987. p. 596).

No esôfago de camundongos, diferentemente da musculatura esquelética do restante do corpo, os músculos estriados são oriundos da transdiferenciação de células musculares lisas no final do período fetal e início do desenvolvimento pós-natal (PATAPOUTIAN; WOLD; WAGNER, 1995). As células musculares lisas diferenciam-se em estriadas no sentido crânio-caudal e da camada externa para a interna. Além disso, há um aumento na proporção de células musculares estriadas, e redução no tamanho e número de células musculares lisas, o que pode sugerir falta de inervação do músculo liso (ZHAO; DHOOT, 2000a). Na camada externa da parte cranial são encontradas tanto fibras de contração rápida quanto de contração lenta a partir do 14º dia de gestação. As fibras rápidas estão presentes no músculo estriado em todo o comprimento do órgão, enquanto que as lentas estão restritas a um subconjunto de tubos musculares durante o desenvolvimento fetal, indicando que as fibras lentas e rápidas surgem durante as fases iniciais da miogênese. Durante o desenvolvimento pós-natal observa-se diferenciação de fibras lentas em rápidas, especialmente na região cranial, onde se pode notar uma supressão completa das lentas em animais com 4 semanas de idade. Entretanto, na região caudal ainda pode-se encontrar fibras lentas mesmo no adulto (ZHAO; DHOOT, 2000b).

O suprimento nervoso extrínseco é parassimpático - desempenhado pelo nervo vago - e simpático. A parte cervical recebe ramos provenientes dos nervos laríngeos recorrentes e dos troncos simpáticos cervicais. A parte torácica é innervada pelos ramos provenientes dos troncos vagais e do plexo esofágico, dos troncos simpáticos e dos nervos esplâncnicos torácicos maiores (WILLIAMS, 1995). A parte abdominal é suprida pelos troncos vagais, troncos simpáticos torácicos, nervos esplâncnicos torácicos maiores e pelos plexos em torno das artérias gástrica esquerda e frênica inferior (MITCHELL, 1938). Estes ramos formam um plexo contendo grupos de células ganglionares entre as duas camadas de revestimento muscular e de um segundo plexo mucoso (SEMENOVA, 1962). Fibras de terminações nervosas livres foram observadas no epitélio do esôfágico (ROBLES-CHILLIDA et al., 1981) e intraganglionares, possivelmente aferentes (RODRIGO et al., 1975).

⁴ OPEL, A. Lehrbuch der verglichenen mikroskopischen anatomie der Wirbeltiere. Gustav Fischer, Jena, 1897. v. 2.

Os ramos do nervo vago entram no trato gastrointestinal na intersecção entre o esôfago e o estômago, e formam ramos intramurais que se ramificam em todo o plexo mioentérico (WANG; POWLEY, 2000). As fibras simpáticas entram como feixes de fibras nervosas acompanhando as artérias mesentéricas (FURNESS, 2006).

Neste ponto, é importante fazer um breve relato funcional do órgão. A partir da faringe o bolo alimentar é movido para o esôfago pela contração dos músculos da faringe, mas para o bolo adentrar o esôfago as fibras do músculo constritor inferior da faringe, que atuam como um esfíncter, devem se relaxar, prevenindo o regurgitamento de alimento do esôfago para a faringe. Já no esôfago o bolo é propelido pelas contrações peristálticas da contração da camada muscular circular esofágica. Em resposta à dilatação da parede pelo bolo, um anel de músculos circulares, cranialmente ao bolo, se contrai, estreitando o tubo e empurrando o alimento em direção caudal. O esfíncter esofágico inferior, localizado cranialmente ao orifício cárdico e constituído por musculatura lisa, mantém a porção inferior do esôfago fechada, o que garante que o alimento não retorne do estômago para o esôfago. À medida que a onda peristáltica move-se ao longo do esôfago, esse esfíncter se relaxa e o bolo alimentar entra no estômago (SPENCE, 1991).

Christensen (1987) considera ainda que a função do esôfago no homem é complicada por duas restrições: uma anatômica e outra fisiológica. A anatômica é que o tubo alimentar e as vias aéreas são estruturas comuns por uma curta distância, ainda que seus conteúdos devam ser mantidos separados. A restrição fisiológica é que o conteúdo gastroduodenal é danoso à mucosa do esôfago.

A partir do conteúdo visto anteriormente, nota-se a importância clínica e complexidade funcional deste órgão que, muitas vezes, é visto como um coadjuvante no complexo Sistema Digestório.

3.5 ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS DO TRATO DIGESTÓRIO NA DISTROFIA MUSCULAR

Menos conhecidas e descritas, porém também importantes, são as alterações da musculatura visceral, especialmente as porções orais do trato digestório.

Além das conhecidas alterações da musculatura estriada, também têm sido descritos os distúrbios funcionais da musculatura lisa do trato gastrointestinal como causa da dilatação gástrica aguda e da pseudo-obstrução intestinal, que podem ser fatais para o paciente (BAROHN et al., 1988; CHUNG et al., 1998).

A disfunção muscular que ocorre nas porções orais do trato gastrointestinal é detectável em crianças ainda no início do desenvolvimento da doença. Por meio de testes com a utilização de um manômetro, foi observado que a musculatura estriada do esôfago de crianças portadoras apresenta disfunção em 14 de um total de 15 casos. Entretanto, não foram observadas diferenças quanto à motilidade aboral ou nas pressões e relaxamento dos esfíncteres oral e aboral, apesar de a amplitude de contração da porção oral do esôfago ter sido significativamente menor que do grupo controle (STAIANO et al., 1992).

Em seus estudos, Camelo et al. (1998) detectaram alterações na musculatura da deglutição e da motilidade esofágica. Ao exame manométrico, houve alterações em todos os casos de portadores de DMD, principalmente ondas não peristálticas simultâneas de amplitude diminuída, tanto na musculatura estriada e lisa. Setenta e sete por cento dos pacientes apresentaram sintomas gastrointestinais, tanto em regiões orais quanto aborais (disfagia, regurgitação, dor epigástrica, constipação e distensão)

Jaffe et al. (1990) também verificaram uma percentagem significativamente maior de disfunções orofaríngeas, esofágicas e gastrointestinais em portadores de DMD do que não portadores. O autor incluir também a disfagia, engasgo ao se alimentar, azia e vômito durante ou após as refeições, e necessidade de higiene da orofaringe após as refeições.

Em cães distróficos a presença do megaesôfago é uma condição comum. O esôfago aumenta de duas a três vezes o seu diâmetro, torna-se flácido, podendo ser facilmente observado macroscopicamente ou por exames radiográficos (VAN KRUININGEN, 1998). Também é caracterizado pela ocorrência de regurgitação por expulsão retrógrada passiva do conteúdo esofágico logo após as refeições (JESKINS, 2004), hálito fétido e perda de massa corporal, podendo ainda ocorrer pneumonia por aspiração (VAN KRUININGEN, 1998). As fibras musculares esofágicas encontram-se degeneradas, fibrosadas e com tamanhos variados (VALENTINE et al., 1990). Dentre 11 cães necropsiados, 10 apresentaram o órgão de duas a três vezes mais espessados (MIYAZATO, 2005).

O manejo adequado diante desta condição torna-se importante, pois, tanto o megaesôfago idiopático quanto o adquirido levam à alta morbidade e mortalidade pelo manejo incorreto. Assim, os animais sucumbem aos efeitos da subnutrição crônica e aos episódios repetidos de pneumonia por aspiração (WASHABAU, 2003). Portanto, o tratamento das disfunções que envolvem a parte oral do tubo digestório consiste em abordar a causa e tratar suas possíveis conseqüências, como a pneumonia por aspiração e esofagites de refluxo (WASHABAU, 2003). Entretanto, em cães tem-se usado também terapias com procinéticos de músculo liso para estimular a peristalse, como a metoclopramida e a cisaprida, porém não possuem grande efeito sobre a musculatura estriada, que compõe todo o trato esofágico do cão (WASHABAU, 2003).

Diferentemente de espécies como a humana e a canina, como mencionado anteriormente, as características morfofuncionais da musculatura estriada esofágica de camundongos *MDX* está livre de alterações (BOLAND et al., 1995).

Entretanto, são raros os estudos que descrevem tais características do esôfago de camundongos *MDX*, e difícil encontrar algum que investiga as particularidades do plexo mioentérico deste órgão neste modelo animal. Desta forma, o fato nos permite buscar informações do porquê da ausência de tais alterações neste modelo animal.

3.6 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO

O Sistema Nervoso Entérico (SNE) é o conjunto de neurônios, seus axônios e células de sustentação, as células da glia, localizados na parede de todo o sistema digestório (esôfago, estômago e intestinos). Estas células formam agrupamentos chamados de gânglios entéricos, os quais estão interconectados por feixes de fibras nervosas.

O SNE é especial porque é o único que possui grupos de neurônios fora do Sistema Nervoso Central (SNC) que formam circuitos neuronais capazes de atividades reflexas autonômicas, responsáveis por várias funções como secreção, transporte de íons e água, peristalse e fluxo sanguíneo intestinal (FURNESS, 2006).

No homem são cerca de 500 milhões de neurônios, distribuídos em 20 classes funcionais. Em virtude do tamanho, complexidade e certas estruturas similares, o SNE

costuma ser tratado por alguns autores como um segundo cérebro. Inclusive, um aspecto marcante do SNE é que seus circuitos reflexos são capazes de direcionar funções do sistema digestório sem o comando do cérebro ou da medula espinal (GERSHON, 1998).

As células nervosas do sistema entérico são provenientes da crista neural. Durante o desenvolvimento embrionário, os neurônios entéricos alcançam o intestino pela migração ao longo do nervo vago (GERSHON; CHALAZONITIS; ROTHMAN, 1993; YOUNG; NEWGREEN 2001). Em mamíferos também há uma pequena contribuição das células da crista sacral que colonizam o reto (KAPUR, 2000). Uma onda de células migratórias flui para o intestino, a partir da parte superior do tubo alimentar para o final da parte caudal do tubo alimentar no período compreendido entre 9,5 e 14,5 dias do desenvolvimento embrionário (KAPUR; YOST; PALMITER, 1992; YOUNG et al., 1998). À medida que a onda avança, células em maturação são interrompidas no seu progresso e, subsequentemente, formam os glânglios. Então, atrás da onda principal há um SNE em maturação. Além disso, endotelinas que se ligam a receptores superficiais de células também controlam o desenvolvimento do SNE (NEWGREEN; YOUNG, 2002). A endotelina ET3 é produzida pelo desenvolvimento do mesênquima, e seu receptor ETB é produzido nos neurônios entéricos (KAPUR et al., 2004).

O desenvolvimento das funções do SNE começa na vida fetal e continua por algum tempo após o nascimento, o qual varia consideravelmente entre as espécies. Em camundongos, cuja gestação é de 21 dias, as primeiras sinapses são detectadas no 16º dia (VANNUCCHI; FAUSSONE-PELLEGRINI, 2000) e a maturação continua após o nascimento (MATINI; MAYER; FAUSSONE-PELLEGRINI, 1997). Tanto na espécie humana (WADE; COWEN, 2004) quanto em outras espécies animais, como o rato, pode ocorrer considerável perda de neurônios entéricos ao longo da vida. No rato a perda é de cerca de 40% no jejuno e 63% no colo (SANTER; BAKER, 1988).

Fibras nervosas para-vasculares seguem as artérias que carregam axônios destinados ao suprimento de estruturas como glânglios entéricos, músculos intestinais e mucosa, além dos próprios vasos sanguíneos. Além disso, as artérias e arteríolas são circundadas por contínuas redes de feixes de fibras nervosas – o plexo perivascular – que contém tanto fibras sensitivas aferentes quanto motoras destinadas aos vasos sanguíneos. Veias do mesentério também têm um plexo perivascular. Fibras nervosas

associadas aos vasos do sistema linfático intestinal são relativamente raras (FURNESS, 1971).

Numerosas pequenas glândulas secretam muco na luz do esôfago, as quais são inervadas por neurônios de pequenos gânglios localizados na submucosa, adjacente às glândulas (KADANOFF; SPASSOWA 1959; FURNESS, 2006).

O SNE é formado pelos plexos mioentérico e submucoso. Em virtude da complexidade e dimensões da estrutura do SNE, neste texto serão abordados apenas os circuitos neuronais da camada muscular do esôfago, pertinentes aos aspectos relacionados a esta pesquisa.

3.6.1 Plexo Mioentérico

As semelhanças entre a estrutura macroscópica do esôfago, estômago e intestinos se devem à origem evolutiva comum dos seus plexos. Inclusive, os gânglios mioentéricos têm essencialmente a mesma arquitetura ao longo do tubo digestório (MORIKAWA; KOMURO, 1999). Isto nos permite fazer analogias das descrições morfológicas dos intestinos, tão abundantes na literatura, para o esôfago.

O plexo mioentérico (PM) é uma rede delicada de neurônios, fibras nervosas e pequenos gânglios que repousam entre as camadas musculares longitudinal (externa) e circular (interna) do trato gastrointestinal. O PM se estende desde a língua (SBARBATI et al., 2002) e faringe, próximo da junção com o esôfago (SHIMAZAKI; YOSHIDA; HIRANO, 1998), até o esfíncter interno do ânus (SCHOFIELD⁵, 1968 apud FURNESS, 2006 p. 15). Entretanto, Furness (2006) considera o início do PM na parte oral do esôfago.

As células nervosas se conectam com outros neurônios que inervam o músculo, epitélio secretor, vasos sanguíneos do trato digestório, sistema biliar e pâncreas. Neurônios localizados fora do trato digestório também se conectam com o SNE e se inter-relacionam com o sistema entérico.

⁵ SCHOFIELD, G. C. Anatomy of muscular and Neural tissue in the alimentary canal. In: CODE, C. F. (Ed.). **Handbook of physiology**: alimentary canal. Washington, DC.: American Physiological Society, 1968. v. 46, p. 1579-1627.

O PM possui três componentes principais: os plexos primário, secundário e terciário. O plexo primário inclui os gânglios e fibras interganglionares (chamadas de fibras internodais). O plexo secundário corresponde às fibras mais finas que saem das fibras internodais e as cruzam paralelamente à camada muscular circular e inervam-na. O plexo terciário consta dos feixes mais finos que preenchem os espaços entre a rede formada pelo plexo primário e inervam a camada muscular longitudinal (FURNESS, 2006).

O suprimento da camada muscular longitudinal se dá por neurônios motores cujos corpos celulares estão localizados, em sua maioria, no PM. Entretanto, alguns destes neurônios estão localizados no plexo submucoso. Esta camada de músculos é inervada por plexos longitudinais, os quais consistem de feixes de fibras nervosas que correm paralela e internamente às fibras musculares, ou pelo componente terciário do PM, que consiste de feixes de axônios que repousam sobre a superfície da camada muscular (RICHARDSON, 1958).

Já a camada circular é inervada por feixes de fibras nervosas que correm paralelamente ao comprimento das células musculares, os quais se conectam aos componentes primário e terciário do PM, e com o plexo muscular profundo (do intestino delgado). Os feixes de fibras nervosas do plexo muscular circular formam uma contínua trama em torno da circunferência do intestino, e o atravessa obliquamente conectando fibras nervosas ao longo do seu comprimento. Nos pequenos mamíferos, como a cobaia, a maioria dos neurônios que inervam a camada muscular circular tem seus corpos celulares no gânglio mioentérico, mas em algumas espécies, como rato (EKBLAD et al., 1987), cão (SANDERS; SMITH, 1986; FURNESS et al., 1990) e porco (TIMMERMANS; HENS; ADRIAENSEN, 2001) a inervação pode vir de gânglios da submucosa (FURNESS, 2006).

Cajal (1895 - 1911) descreveu ainda um plexo muscular profundo e o plexo submuscular, caracterizados pela concentração de fibras próximas à camada muscular circular. Estes plexos separam a fina camada de células musculares do volumoso músculo circular, que é geralmente chamado de plexo muscular profundo (GABELLA, 1974).

Embora os plexos sejam descritos separadamente, estes são conectados por numerosas redes de fibras. Existem conexões entre nervos extrínsecos (vagal e

mesentérico), PM via plexo submucoso (AUERBACH⁶, 1864 apud FURNESS, 2006 p. 14), e conexões entre o PM e o plexo submucoso (DRASCH⁷, 1881 apud FURNESS, 2006 p. 14), as quais correm quase perpendicularmente à camada muscular circular (FURNESS et al., 1990; BREHMER; SCHRODL; NEUHUBER, 1998)

Os gânglios entéricos são estruturas compactas compostas por neurônios, glia e processos neuronais (GABELLA, 1972). Não são encapsulados, e tampouco possuem vasos sanguíneos, células de tecido conectivo e fibras colágenas, como outros gânglios autonômicos. As células nervosas são circundadas por células da glia e a sua nutrição ocorre por difusão proveniente de vasos sanguíneos que atravessam o tecido conectivo que os circundam (JACOBS, 1977). Além disso, não existe uma barreira efetiva gânglio/sangue, ou seja, medicamentos que não afetam o SNC podem afetar o SNE (FURNESS, 2006).

As sinapses têm densidades pré e pós-sinápticas e acumulação pré-sináptica de vesículas de armazenamento de neurotransmissores, como toda sinapse típica. São observadas terminações livres de axônios na união com as células intersticiais de Cajal, células musculares e a mucosa (GABELLA, 1972).

3.6.1.1 Particularidades funcionais do esôfago relacionadas ao circuito neuronal

Apesar de o circuito neuronal esofágico não ter sido suficientemente investigado, acredita-se ser similar ao do intestino delgado, como mencionado anteriormente. Porém, funcionalmente há diferenças no que se refere ao PM destas estruturas (FURNESS, 2006). Por isso, as particularidades do esôfago merecem ser mencionadas.

Os movimentos do esôfago são controlados por um programa motor gerado no tronco encefálico, e coordenado por movimentos de deglutição esofágicos. Sendo assim, apesar de haver um grande número de neurônios entéricos neste órgão, estes desempenham um papel pequeno no controle peristáltico. Há evidências de que a inervação entérica inibe a transmissão proveniente de fibras vagais, e isto pode estar

⁶ AUERBACH, L. Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. **Arch. Pathol. Anat. Physiol**, v. 30, p. 457-460, 1864.

⁷ DRASCH, O. Beiträge zur Kenntnis des feineren Baues des Dunndarmes, insbesondere über die Nerven desselben. **Sitz. Akad. Wiss**, v. 82, p. 168-198, 1881.

envolvido no movimento coordenado das regiões com musculatura lisa e estriada. Igualmente, a inervação vagal que supre a musculatura lisa da parte distal do esôfago pode estar envolvida na coordenação das duas regiões (FURNESS, 2006).

Neurônios motores vagais, com seus corpos celulares localizados na medula oblonga, são os principais neurônios que suprem a motricidade dos músculos estriados do esôfago. Entretanto, cerca de um terço das placas motoras tem uma inervação adicional de neurônios mioentéricos por meio da qual a excitação vagal é modulada. A parte distal da musculatura lisa e o esfíncter esofágico são inervados por neurônios entéricos.

A inervação do controle das fibras estriadas vem diretamente de fibras vagais que não fazem sinapse no gânglio entérico, visto que a secção de fibras do vago causa paralisia da musculatura estriada, a qual não recupera sua função (INGELFINGER, 1958). Além disso, a distensão causada pela deglutição do bolo alimentar na regulação do peristaltismo da parte com musculatura estriada é feita através da via vagal (ROMAN⁸, 1982 apud FURNESS, 2006 p. 159; LU; BIEGER, 1998). O programa motor que controla a velocidade e a força de contração do músculo estriado é feito em geral por circuitos no tronco encefálico (BIEGER, 1993; JEAN, 2001).

Então, embora o PM seja proeminente na musculatura estriada do esôfago, este não desempenha papel chave na geração ou controle dos movimentos peristálticos. Entretanto, neurônios mioentéricos, de fato, suprem a inervação de cerca de um terço das placas motoras e, deste modo, diferentemente de placas motoras de outros locais, placas motoras individuais no esôfago recebem dupla inervação, um axônio proveniente de neurônios vagais e outra que se origina de corpos celulares do plexo mioentérico (NEUHUBER et al., 1994; KURAMOTO et al., 1996; WÖRL; MAYER; NEUHUBER, 1997; WU et al., 2003).

Em macacos, gatos e ratos as terminações vagais são imunorreativas para o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, e as terminações mioentéricas tem imunorreatividade para a óxido nítrico sintetase (NOS), significando que a transmissão a partir destes neurônios é nitrérgica. Marcações duplas usando anti-corpo ao peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e ao NOS indicam que tanto terminações vagais quanto terminações nervosas entéricas estão intimamente alocadas nas placas motoras,

⁸ ROMAN, C. Nervous control of esophageal and gastric motility. In: BERTACCINNI, G. (Ed.). **Handbook of experimental pharmacology**: mediators and drugs in gastro-intestinal motility. Berlin: Springer-Verlag, 1982. v. 59, p. 223-278.

tanto que podem interagir pré-sinápticamente (WÖRL; MAYER; NEUHUBER, 1997). A inibição pré-sináptica da transmissão excitatória vagal tem sido demonstrada ocorrer por experimentos nos quais neurônios entéricos NOS foram estimulados indiretamente (IZUMI et al., 2003). A redução da estimulação vagal induziu a contração muscular, e a inibição da transmissão vagal aos músculos esofágicos foi abolida pelo bloqueio da atividade de NOS com Nitro-L-Arginina-Metil-Ester.

Desta forma, o sistema nervoso entérico parece ter um papel na modulação do peristaltismo do terço oral do esôfago. A inervação entérica pode desempenhar um papel maior em animais jovens porque todas as placas motoras recebem inervação entérica na idade de 4 a 10 dias, depois que há retirada parcial da inervação. E em adultos, cerca de 35% das placas motoras recebem inervação entérica além da inervação vagal que todas as células musculares estriadas recebem (BREUER et al., 2004).

Outro aspecto interessante é que em macacos o SNC, por intermédio do vago, também parece comandar centros diretamente relacionados ao peristaltismo na parte distal (músculos lisos) do esôfago. Em uma série de experimentos foi demonstrado que o desvio do bolo alimentar no nível cervical não evita a progressão da onda peristáltica para dentro da parte distal esofágica (JANSSENS et al., 1976), implicando que uma vez o programa motor é desencadeado, este continua sem a necessidade de distensão da parte muscular lisa. Este conceito é apoiado pela observação que a atividade peristáltica da parte distal do esôfago pode ser provocada pela distensão da faringe ou do terço oral do esôfago, ou até por estimulação elétrica das vias aferentes nervosas do vago supridoras desta região, o que ocorre quando a contração da parte oral é impedida pelo bloqueio da transmissão a partir da sua inervação com curare (ROMAN⁹, 1982 apud FUNESS, 2006 p. 160).

3.6.2 Neurônios do Plexo Mioentérico

Os neurônios entéricos possuem diferentes formas, propriedades fisiológicas e marcações histoquímicas e imuno-histoquímicas específicas; além de outras

⁹ ROMAN, C. Nervous control of esophageal and gastric motility. In: BERTACCINNI, G. (Ed.). **Handbook of experimental pharmacology**: mediators and drugs in gastro-intestinal motility. Berlin: Springer-Verlag, 1982. v. 59, p. 223-278.

características distinguíveis, incluindo estruturas que inervam, os neurotransmissores que utilizam e as conexões que recebem.

Dogiel descreveu sete tipos diferentes de neurônios, nomeados com algarismos romanos, sendo os tipos I, II e III os mais descritos, além de mini neurônios (BREHMER et al., 1999) e outros que não se encaixam na classificação de Dogiel (GUNN, 1968). Estes neurônios variam de acordo com a forma, número de dendritos, localização e função - motores inibitórios, excitatórios ou interneurônios. (DOGIEL¹⁰, 1899 apud FURNESS, 2006 p. 34; LAWRENTJEW¹¹, 1929 apud FURNESS, 2006 p. 34; FURNESS et al., 1989).

No esôfago de ratos, os neurônios estão no gânglio mioentérico da parte que contém a musculatura estriada e têm potencial de ação com elevação na fase de queda, a qual é medida pela entrada de Ca^{++} (DE LAET et al., 2002).

Os neurônios são agrupados de acordo com as funções como aferentes intrínsecos primários (IPANs), interneurônios, neurônios motores e neurônios intestino-fugais. Pode-se dizer que, genericamente, é verdade que neurônios que desempenham a mesma função em diferentes espécies apresentam a mesma forma (PETERS¹², et al., 1991 apud FURNESS, 2006 p. 29), o que justifica a observação da forma como o primeiro indicador de analogia em diferentes espécies.

Os neurônios motores incluem aqueles musculares excitatórios e inibitórios, secretores, secretores/vasodilatadores e neurônios que inervam células entero-endócrinas. Embora neste estudo nos atemos ao estudo da população total de neurônios e dos neurônios motores inibitórios, segue também uma explanação dos neurônios motores excitatórios.

A figura 1 ilustra o plexo mioentérico e seus diferentes tipos de neurônios.

¹⁰ DOGIEL, A.S. Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. **Arch. Anat. Physiol. Leipzig Anat Abt Jg**, p. 130-158, 1899.

¹¹ LAWRENTJEW, B. J. Experimentelle-morphologische Studien über den feineren Bau des autonomen Nervensystems. II. Über den Aufbau der Ganglien der Speiseröhre nebst einigen Bemerkungen über das Vorkommen und die Verteilung zweier Arten von Nervenzellen in dem autonomen Nervensystem. **Z. Mikrosk. Anat. Forsch.**, v, 18, p. 233-262, 1929.

¹² PETERS, A.; PALAY, S. L.; WEBSTER, HD. **The fine Structure of the Nervous System**. New York: Oxford University Press, 1991.

Figura 1 - Tipos de neurônios do intestino

Fonte: (FURNESS, 2006)

Legenda: LM, camada muscular longitudinal; MP, plexo mioentérico; CM, camada muscular circular; SM, plexo submucoso; Muc, mucosa. Interneurônios ascendentes (reflexos locais, 1), neurônios aferentes intrínsecos primários do plexo mioentérico (2) e submucoso (11), neurônios intestino-fugais (3), neurônios excitatórios (4) e inibitórios (5) da camada muscular longitudinal, neurônios excitatórios (6) e inibitórios (7) da camada muscular circular, interneurônios descendentes (8, 9, 10), neurônios colinérgicos secretomotores (12, 13, 14) e neurônios uni-axonais (15) (figura traduzida do idioma inglês).

3.6.3 Principais neurotransmissores do plexo mioentérico relacionados à excitabilidade e inibição dos músculos

Didaticamente, os neurônios entéricos são separados em grupos de acordo com características que combinam as propriedades dos reflexos entéricos, a identificação morfológica e as correlações das propriedades neuroquímicas e farmacológicas de seus neurotransmissores e receptores. Neste item, optou-se por classificá-los de acordo com o neurotransmissor envolvido.

A coordenação da atividade entre as diferentes partes do trato gastrointestinal é dada por neurotransmissores que determinam os reflexos neurais. Algumas vias reflexas estão presentes dentro da parede intestinal e algumas saem do intestino em direção ao SNC ou ao gânglio pré-vertebral simpático e voltam à parede intestinal. Desta maneira, o plexo mioentérico está envolvido nas atividades reflexas e integrativas do intestino (FURNESS, 2000). Apenas sob a ação do SNE, o intestino contrai-se normalmente, contudo, os neurotransmissores exercem um efeito modulador da motilidade intestinal (FURNESS, 2006).

Como neurotransmissores excitatórios têm-se a acetilcolina e as taquicininas; os neurônios inibitórios possuem vários neurotransmissores, dentre eles o NO, VIP e trifosfato de adenosina (ATP) (FURNESS et al., 1995).

3.6.3.1 Acetilcolina

A acetilcolina é o principal neurotransmissor que determina a excitabilidade do músculo liso e atua através dos receptores muscarínicos M_2 (TAKEUCHI et al., 2005), tendo como co-transmissor a substância P (FURNESS, 2006). Os neurônios motores excitatórios também são revelados por imunorreatividade para taquicininas ou a transportadora acetilcolina vesicular. Ambos suprem toda a região do trato digestório, inclusive os esfíncteres (LLEWELLYN-SMITH et al., 1988).

3.6.3.2 Substância P

Também produzida pelos neurônios do sistema nervoso entérico, a substância P estimula a secreção e a contração da musculatura lisa, provoca vasodilatação e têm papel modulador no sistema imune.

A substância P pertence ao grupo das taquicininas, que inclui também a neuroquinina A, o neuropeptídeo γ e o neuropeptídeo K; além disso, têm sido identificados os receptores apropriados e os pontos específicos de ligação para a substância P no músculo entérico (BURCHER et al., 1986; SHUTTLEWORTH; SANDERS; KEEF, 1993). O papel das taquicininas na excitação do músculo tem sido comprovado, já que a contração persiste depois do bloqueio muscarínico e é reduzida quando os receptores para taquicininas no músculo são antagonizados (BARTHÓ; HOLZER, 1985; SMITH; FURNESS, 1988). A imunorreatividade às taquicininas é muito disseminada nas fibras que inervam o músculo gastrointestinal e, em muitas espécies, as análises farmacológicas demonstram o envolvimento das taquicininas na transmissão nervosa (BARTHÓ; HOLZER, 1985).

3.6.3.3 Óxido Nítrico

Os neurônios nitrérgicos utilizam óxido nítrico (NO) como neurotransmissor, o qual é sintetizado pela enzima NOS, que por sua vez requer nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) para sua atividade (PHILLIPS; KIEFFER; POWLEY, 2003).

O NO, mediador primário da transmissão não-adrenérgica não-colinérgica no trato gastrointestinal, tem como função regular a atividade neuronal motora colinérgica (além de outros neurotransmissores), já que medeia o relaxamento do músculo liso do trato gastrointestinal (BROOKES, 1993).

Em 1990, o NO foi reconhecido como neurotransmissor (BREDT; HWANG; SNYDER, 1990), e o descobrimento do seu papel no controle da atividade muscular esofágica iniciou-se através de pesquisas de desordens da motilidade deste órgão em pacientes com acalasia e aperistalse, bem como na camada muscular circular do piloro

na estenose infantil dessa região, casos onde a NOS não foi detectada (VANDERWINDEN et al., 1992; MEARIN, 1993). O NO é um mensageiro químico peculiar, porque não é armazenado, mas produzido à demanda quando a NOS é ativada (FURNESS, 2006). O NO é formado a partir de L-arginina com intermediação da enzima NOS, produzindo citrulina como subproduto e usando NADPH-d como co-fator (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Ademais, já foi demonstrado que o NOS é co-localizado com a atividade da diaforase de adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH-diaforase ou NADPH-d), por meio de coloração histoquímica em outras espécies (BELAI et al., 1992; SAFFREY et al., 1992; WARD et al., 1992b).

Os neurônios positivos ao NOS modulam a motilidade gastrointestinal exercendo um efeito inibitório pré-juncional na liberação de acetilcolina e substância P (HEBEISS; KILBINGER, 1998) ou por meio da ativação da guanilil ciclase e, subsequentemente, aumentando a concentração de GMPc no músculo liso (KANADA et al., 1992; WARD et al., 1992a). Os neurônios nitrérgicos projetam suas fibras preferencialmente em direção anal (COSTA et al., 1992). Já foi demonstrado que as varicosidades presentes nas fibras imunorreativas a NOS fazem sinapse com outros neurônios mioentéricos no intestino delgado da cobaia (LLEWELLYN-SMITH et al., 1992).

Existe evidência farmacológica e fisiológica de que, no jejuno humano normal, o NO exógeno evoca uma hiperpolarização da membrana e inibe a atividade mecânica da camada muscular circular (STARK et al., 1993). A inibição da biossíntese de NO ou a aplicação de hemoglobina exógena, conhecida por sua capacidade para inativar o NO, leva a uma atenuação do efeito relaxante da estimulação elétrica nos nervos NANC (do inglês *Nonadrenergic and noncholinergic*) no intestino humano (BURLEIGH, 1992; STARK et al., 1993). Uma deficiência na inervação nitrérgica produz um segmento intestinal hiperexcitável e contraído (DAVIDSON; BAUER, 1958).

3.6.3.4 VIP

VIP é uma sigla proveniente do idioma inglês *vasoactive intestinal peptide*. Trata-se de um neuropeptídeo de 28 aminoácidos, altamente básico liberado da mucosa intestinal. Dentre suas principais funções nos órgãos do trato entérico, estão: afeta a

secreção local, provoca o relaxamento do esfíncter esofágico caudal, relaxamento receptivo do estômago e do canal anal, aumento do fluxo sanguíneo, estimula a lipólise, glicogenólise e secreção intestinal e pancreática, inibe o estímulo da histamina sobre a secreção ácida e estimula a distensão esofágica e o estímulo mecânico da mucosa.

No intestino delgado da cobaia, os neurônios entéricos inibitórios contêm VIP, assim como em outras espécies. Esses neurônios projetam-se analmente para inervar o músculo circular (LLEWELLYN-SMITH et al., 1988; BROOKES; STEELE; COSTA, 1991). O VIP é detectado em fibras nervosas que inervam o músculo (FURNESS, 2006). Axônios reativos ao VIP são numerosos em todas as regiões do intestino, sendo de origem intrínseca (BRYANT et al., 1976). As fibras nervosas VIP-érgicas têm sido observadas inervando os corpos celulares nitrérgicos em forma de cesta.

O VIP possui um potente efeito relaxante no músculo intestinal e têm sido identificados os sítios de ligação para VIP no músculo (ZIMMERMAN et al., 1988). O VIP e o ATP são os neurotransmissores secundários da inibição motora do intestino (FURNESS, 2006).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/10, com 4 e 10 semanas de idade, provenientes do Biotério da Associação de Amigos do Portador de Distrofia Muscular (AADM)/Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), e do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Os grupos experimentais foram compostos por mutantes **MDX** machos dessa linhagem (**MDX4** e **MDX10**) e os respectivos grupos controles, formados por C57BL/10 machos (**C4** e **C10**).

Os animais de todos os grupos, mantidos de acordo com as recomendações do Instituto de Pesquisa em Animais de Laboratório (Ilar, 1996), foram acondicionados em gaiolas de polipropileno em uma sala climatizada, por meio de janelas convencionais de alvenaria, com foto-período 12 horas claro/12 horas escuro (luzes acesas às 7 horas). Durante todo o período do experimento, foram fornecidas, sem restrições, água e ração comercial referência para ratos (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S.A.). O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelas Comissões de Bioética da FMVZ-USP (Protocolo nº 2085/2010) e da UNAERP (Protocolo nº 046/2010).

4.2 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para cada reação histoquímica (NADH-d e NADPH-d) foram utilizados 5 animais de cada grupo (**C4** e **C10**; **MDX4** e **MDX10**), perfazendo um total de 40 animais que, após anestesiados com Cloridrato de cetamina (75mg/kg) e Xilazina (5mg/kg) (WIXSON et al., 1987), tiveram o esôfago coletado através de tóraco e laparotomia, desde a sua parte oral, no nível da glândula tireóide, até a parte aboral, adjacente ao cárdia.

4.3 HISTOQUÍMICA

4.3.1 NADH-d

Inicialmente, os espécimes foram atados em suas extremidades aborais e, utilizando-se uma cânula adaptada a uma seringa, foram preenchidos com uma solução adequada a cada técnica histoquímica.

Assim, para a técnica da NADH-d (Figura 2), que permite identificar toda a população de neurônios (portanto, uma técnica pan-neuronal) foi injetada na luz da víscera, solução de Krebs [NaHCO_3 1,3 mg; MgCl_2 0,24 mg; KCl 0,44 mg; NaH_2PO_4 0,165 mg, NaCl 7,05; CaCl_2 0,367 mg em 100 mL de tampão fosfato (PBS 0,1 M; pH 7,4)], até a leve distensão de suas paredes. Atada a extremidade oral, os espécimes foram imersos na mesma solução por 20 minutos e, após imersão por 5 minutos em uma solução detergente (Krebs e Triton X-100 a 0,3 %) foram lavados em três passagens de solução de Krebs, num período de 10 minutos.

A marcação dos neurônios foi feita pela imersão dos esôfagos em um meio de incubação contendo 0,05 g de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (β -NADH-d; Sigma, St.Louis, EUA); 0,0125 g de Nitroblue Tetrazolium (NBT, N-6876; Sigma, St.Louis, EUA) em 25 mL de PBS, e 75 mL de água destilada, durante 90 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, em um período de 10 minutos, os espécimes foram lavados em PBS por três vezes consecutivas, e fixados em solução de formaldeído 4% (Sigma, St.Louis, EUA) tamponado em PBS, durante 30 minutos em temperatura ambiente.

Figura 2 - Fotomicrografia de preparado de membrana de esôfago de camundongo após marcação histoquímica com NADH-d

Fonte: (MARIOTTI, 2012)

Legenda: a seta aponta um neurônio. Observar o citoplasma marcado em azul, enquanto o núcleo é negativo para esta reação.

4.3.2 NADPH-d

Para a técnica da NADPH-d (Figura 3), que evidencia a subpopulação de neurônios nitrérgicos, injetou-se na luz da víscera quantidade suficiente de PBS para distender levemente as suas paredes, quando então procedeu-se à imediata ligadura da extremidade oral. Após a imersão dos esôfagos durante 30 minutos à temperatura ambiente na mesma solução fixadora utilizada anteriormente, foram feitas, num período de 10 minutos, três lavagens sucessivas em PBS. Em seguida, sob agitação constante a 37° C e durante 90 minutos (SANTER, 1994), os espécimes foram imersos em um meio de incubação proposto por Scherer-Singler (1983) onde, para cada 100 mL de PBS adicionou-se 0,01 g de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (β -NADPH, N-7505; Sigma, St.Louis, EUA), 0,05 g de Nitroblue Tetrazolium (NBT, N-6876; Sigma, St.Louis, EUA) e 0,3% de Triton (X-100; Sigma, St.Louis, EUA).

Os neurônios positivos são evidenciados pela coloração azul de seus citoplasmas, enquanto que as regiões nucleares são negativas para esta reação (BEESLEY, 1995). O NADPH-d reduz o sal NBT em água insolúvel na presença de NADPH-d (SCHMIDT et al., 1992), o qual pode ser observado ao microscópio de luz como um precipitado azul (BEESLEY, 1995).

Figura 3 - Fotomicrografia de preparado de membrana de esôfago de camundongo após marcação histoquímica com NADPH-d

Fonte: (MARIOTTI, 2012)

Legenda: a seta aponta um gânglio formado por neurônios nitrérgicos. Observar os citoplasmas marcados em azul, enquanto os núcleos são negativos para esta reação.

4.4 PREPARADO DE MEMBRANA

Preparados totais de membrana de ambas as técnicas foram obtidos de cada esôfago, como descrito a seguir. Após abertos no sentido do seu maior eixo, os espécimes foram dissecados com o auxílio de pinças e tesouras oftalmológicas, sob lupa estereoscópica com transiluminação (Zeiss Stemi SV 6), as camadas mucosa e

submucosa, evidenciando-se desta forma, os componentes do plexo mioentérico, contidos entre as camadas musculares circular e longitudinal. Os preparados de membrana foram montados entre lâmina e lamínula de vidro, com uma mistura de glicerina e PBS na proporção 2:1 (Figuras 4 e 5).

Figura 4 – Fotomicrografia do esôfago

Fonte: (MARIOTTI, 2012)

Legenda: **A:** Esôfago com marcação histoquímica de NADH-d preenchido e ligado em suas extremidades oral (com linha vermelha) e aboral (com linha verde); e o corte em bisel da extremidade oral para manter a identificação de suas extremidades. **B:** Corte da amostra ao longo do seu eixo longitudinal. Em seguida, o espécime aberto, pronto para a dissecação do preparado de membrana.

Figura 5 - Fotomicrografia de uma amostra do esôfago de camundongo após reação histoquímica com NADH-d

Fonte: (MARIOTTI, 2012)

Legenda: A: Dissecção do preparado de membrana com o uso de instrumental oftalmológico, mostrando a separação das camadas mucosa e submucosa, das camadas muscular e serosa. 1: camadas mucosa e submucosa. 2: camadas musculares (interna e externa). B: Preparado de membrana pronto.

4.5 ESTUDO MORFOQUANTITATIVO

Para o estudo morfoquantitativo foram obtidas imagens utilizando-se um microscópio trinocular (Carl Zeiss Microimagin[®], modelo Axioshop 40, Alemanha), acoplado a uma vídeo-câmera (Axio Cam HRC-ZEISS[®], Alemanha), ambos conectados a um computador com *software* específico para morfometria (Zeiss, AxioVision[®] KS400 Rel. 4.8, Alemanha).

Foram utilizadas objetivas de 40x para a quantificação da **densidade numérica neuronal/área (Q_A)**, a mensuração da **área de secção transversal média (A)** dos neurônios nitrérgicos (NADPH-d) e da largura média **das fibras musculares estriadas (L)**, e de 100x para a Q_A e A da população total de neurônios (NADH-d).

A amostragem do material foi feita se baseando em princípios da estereologia, com a captura e a análise das imagens iniciando-se a partir do ângulo superior esquerdo

da amostra (padronizado como ponto de origem), e percorrendo-se todo o preparado de membrana em sentido horizontal e direção descendente, até atingir o ângulo inferior direito (GUNDERSEN; JENSEN et al., 1987). Cada amostra foi cuidadosamente dividida em campos, seguindo-se o padrão de amostragem sistemático e uniformemente aleatório (SURS), com o uso de uma tabela de números randômicos (HOWARD; REED, 2005) (Anexo A). Desta forma, o número de campos selecionados foi o suficiente para contar no mínimo 100 e no máximo 200 neurônios em cada animal (GUNDERSEN; JENSEN, 1987).

Para a quantificação da Q_A deu-se preferência ao uso das imagens em tempo real em tela cheia, cuidando-se para focar o material ao longo de seu eixo Z, ou seja, planos inferiores ou superiores ao obtido em um primeiro foco ideal. Tal recurso permitiu a contagem, inclusive, de neurônios localizados ao longo do eixo Z, imperceptíveis ou mal definidos no primeiro foco ideal (Figura 6).

Figura 6 – Fotomicrografia de preparado de membrana de esôfago de camundongo. Neurônios nitrérgicos evidenciados pela marcação histoquímica NADPH-d

Fonte: (MARIOTTI, 2012)

Legenda: a observação das imagens mostra, em um mesmo campo, dois neurônios em planos diferentes. Enquanto em **A** o neurônio **1** está focado, o neurônio **2** está desfocado. Em **B** ocorre o inverso.

A densidade numérica neuronal/área (Q_A) foi expressa pela seguinte fórmula:

$Q_A = \Sigma Q_A / \Sigma a$, onde:

ΣQ_A = somatória dos neurônios contados em cada animal

Σa = somatória das áreas de todos os marcos (área total de contagem)

Os valores foram expressos em número de neurônios/mm.²

Em virtude da abundância de neurônios reagentes à técnica de NADH-d, neste caso, a área de contagem foi delimitada por um marco sem viés com área igual a 100 cm², formado por linhas de inclusão (verdes e pontilhadas) e exclusão (vermelhas e cheias) (GUNDERSEN et al., 1988) (Figura 7).

Figura 7 – Fotografia do monitor do computador, utilizando o *software* Zeiss Axion Vision® KS400 Rel. 4.8 no modo em tempo real em tela cheia

Fonte: (MARIOTTI, 2012)

Legenda: **A**: contagem da população total de neurônios (NADH-d). **B**: contagem dos neurônios nitrérgicos (NADPH-d).

Os parâmetros A e L foram obtidos a partir de médias aritméticas de 50 mensurações. Para a largura (L) das fibras musculares estriadas foram mensurados ainda três valores em cada fibra, para a obtenção da média aritmética individual de cada fibra (Figuras 8 e 9).

Figura 8 – Fotografia do monitor do computador com aumento do zoom da imagem para medição da área neuronal

Fonte: (MARIOTTI, 2012)

Figura 9 – Fotografia do monitor do computador com aumento do zoom da imagem para medição da largura das fibras musculares estriadas

Fonte: (MARIOTTI, 2012)

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados e a análise estatística foram apresentados por médias e desvio padrão (dp) obtidos a partir das quantificações realizadas. Empregou-se análise de variância com dois fatores (distrofia e idade), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey quando necessário. A homogeneidade de variâncias foi verificada, e quando necessário se utilizou transformação nos dados.

O nível de significância adotado em todos os testes foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados por médias e seus respectivos valores de desvio padrão ($\pm dp$) em tabelas e gráficos, referentes aos parâmetros analisados.

As tabelas de 1 a 4 mostram os valores dos parâmetros estudados; e as figuras de 10 a 14 representam graficamente os grupos.

Adicionalmente ao que se propôs nos objetivos, inicialmente estão expostos os valores referentes às massas corporais dos animais imediatamente antes da eutanásia.

5.1 MASSA CORPORAL

Para ambas as técnicas histoquímicas, NADH-d e NADPH-d, houve aumento significativo das massas corporais (**M**) ao longo do desenvolvimento dos animais, quando comparados os grupos de 4 semanas (**MDX4** e **C4**) com os grupos de 10 semanas (**MDX10** e **C10**), $p < 0.05$.

Entre os grupos de 4 semanas utilizados para técnica de NADH-d, o grupo experimental (**MDX4**) apresentou **M** significativamente menor do que seu controle, $p < 0.05$. Porém, tal diferença não ocorreu nos animais de 4 semanas submetidos à técnica de NADPH-d (Tabela 1 e Figura 10).

Tabela 1 – Médias $\pm dp$ padrão das massas corporais (**M**) em gramas (g) - São Paulo – 2012

Massa corporal (g)	C4	MDX4	C10	MDX10
NADH-d	15,24 $\pm$ 0,19	9,34 $\pm$ 0,87 ^a	24,97 $\pm$ 0,20 ^b	26,63 $\pm$ 3,35 ^b
NADPH-d	8,11 $\pm$ 1,79	8,12 $\pm$ 1,34	24,69 $\pm$ 0,93 ^b	23,36 $\pm$ 0,52 ^b

^a MDX vs C; ^b 10s vs 4s; ANOVA, $p < 0.05$

Figura 10 – Médias $\pm$ dp das massas corporais (*M*) em gramas (g)

Fonte: (MARIOTTI, 2012)

Legenda: ^a MDX vs C; ^b 10s vs 4s; ANOVA, $p < 0.05$

5.2 DENSIDADE NUMÉRICA NEURONAL

Os animais de 10 semanas (**MDX10** e **C10**) apresentaram redução significativa nos valores da $Q_{A[TJ]}$ quando comparados aos de 4 semanas (**MDX4** e **C4**), $p < 0.05$. E o grupo **MDX10** apresentou aumento significativo da $Q_{A[TJ]}$ em relação ao controle **C10**, $p < 0.05$.

Quanto à $Q_{A[INJ]}$, a comparação entre si dos grupos de 4 semanas (**MDX4** vs **C4**) mostrou que os animais distróficos apresentaram esta variável significativamente menor ($p < 0.05$). Contudo, na comparação dos grupos de 10 semanas entre si (**MDX10** vs **C10**) não foi observada diferença significativa entre os grupos. No grupo experimental de 10 semanas (**MDX10**) observou-se aumento significativo destes neurônios quando comparado ao grupo experimental de 4 semanas (**MDX4**), $p < 0.05$; enquanto que na comparação entre os grupos controles (**C4** e **C10**) houve redução da $Q_{A[INJ]}$ no grupo **C10** ($p < 0.05$).

Com relação à razão $Q_{A[TJ]}/Q_{A[INJ]}$, tanto a comparação entre si dos grupos de 4 semanas (**MDX4** vs **C4**) quanto a comparação entre os animais semanas (**MDX10** vs **C10**),

mostra que nos animais distróficos este parâmetro foi significativamente maior, $p < 0.05$. Após a maturação dos animais, observa-se que no grupo experimental de 10 semanas (**MDX10**) este parâmetro é significativamente menor do que no **MDX4**, embora o grupo **C10** não tenha apresentado diferença significativa em relação ao grupo **C4** (Tabela 2 e Figura 11).

Tabela 2 – Médias $\pm$ dp das densidades numéricas da população total de neurônios ($Q_{A[T]}$)/mm², dos neurônios nitrérgicos ($Q_{A[N]}$)/mm² e a razão da população total de neurônios/população de neurônios nitrérgicos ($Q_{A[T]}/Q_{A[N]}$) - São Paulo – 2012

Densidade	C4	MDX4	C10	MDX10
$Q_{A[T]}/\text{mm}^2$	108.736 $\pm$ 12.035	111.417 $\pm$ 25.492	36.516 $\pm$ 5.050 ^b	57.658 $\pm$ 5.943 ^{ab}
$Q_{A[N]}/\text{mm}^2$	36,92 $\pm$ 7,93	7,83 $\pm$ 1,56 ^a	14,64 $\pm$ 1,53 ^b	13,92 $\pm$ 0,68 ^b
$Q_{A[T]}/Q_{A[N]}$	3.091,72 $\pm$ 865,42	14.366,4 $\pm$ 2.642,33 ^a	2.527,7 $\pm$ 494,8	4.139,87 $\pm$ 340,36 ^{ab}

^a MDX vs C; ^b 10s vs 4s; ANOVA, $p < 0.05$

Figura 11 – Médias $\pm$ dp das densidades numéricas da população total de neurônios ($Q_{A[TJ]}/\text{mm}^2$), da população de neurônios nitrérgicos ($Q_{A[N]}/\text{mm}^2$) e da razão da população total de neurônios/população de neurônios nitrérgicos. ($Q_{A[TJ]}/Q_{A[N]}$)

Fonte: (MARIOTTI, 2012)

Legenda: ^a MDX vs C; ^b 10s vs 4s; ANOVA, p < 0.05

5.3 ÁREA DE SECÇÃO TRANSVERSAL MÉDIA NEURONAL

O grupo **MDX10** apresentou redução significativa da A_{ITJ} , quando comparados aos grupos **MDX4** e **C10**. Para a A_{INJ} não houve diferença significativa entre os grupos controle e experimental, tampouco entre os grupos de 4 e de 10 semanas, embora exista, especialmente no grupo **MDX4**, uma tendência em apresentar neurônios maiores que seu controle (Tabela 3 e Figuras 12 e 13).

Tabela 3 – Médias $\pm$ dp das áreas de secção transversal média neuronais (A) em μm^2 - São Paulo – 2012

Área (A) em μm^2	C4	MDX4	C10	MDX10
Neurônios NADH-d reativos	271,06 $\pm$ 58,2	255,40 $\pm$ 52,42	347,50 $\pm$ 93,8	142,08 $\pm$ 25,6 ^{ab}
Neurônios NADPH-d reativos	282,75 $\pm$ 26,78	338,62 $\pm$ 19,42	338,02 $\pm$ 30,04	345,65 $\pm$ 34,23

^a MDX vs C; ^b 10s vs 4s; ANOVA, $p < 0.05$

Figura 12 – Frequências e médias $\pm$ dp das áreas de secção transversal média da população total de neurônios (A_{TT}) em μm^2

Fonte: (MARIOTTI, 2012)

Legenda: ^a MDX vs C; ^b 10s vs 4s; ANOVA, $p < 0.05$

Figura 13 – Frequências e médias $\pm$ dp das áreas de secção transversal média dos neurônios nitrérgicos (A_{IN}) em μm^2

Fonte: (MARIOTTI, 2012)

Legenda: ^a MDX vs C; ^b 10s vs 4s; ANOVA, $p < 0.05$

5.4 LARGURA MÉDIA DAS FIBRAS MUSCULARES ESTRIADAS

As comparação entre si, tanto dos grupos de 4 semanas (**MDX4** vs **C4**) como dos grupos de 10 semanas (**MDX10** vs **C10**), mostrou que os animais distróficos apresentaram *L* significativamente maior do que os animais controles, $p < 0.05$.

Ao longo da maturação dos animais, tanto o **MDX10** quanto o **C10** sofreram aumento significativo na largura de suas fibras musculares, ambos diferindo de **MDX4** e **C4** respectivamente, $p < 0.05$ (Tabela 4 e Figura 14).

Tabela 4 – Médias $\pm$ dp das larguras médias das fibras musculares estriadas (L) em μm - São Paulo – 2012

Perfil	C4	MDX4	C10	MDX10
Largura (μm)	$10,97 \pm 0,89$	$13,14 \pm 2,40^a$	$15,94 \pm 2,37^b$	$20,46 \pm 1,61^{ab}$

^a MDX vs C; ^b 10s vs 4s; ANOVA, $p < 0.05$

Figura 14 - Médias $\pm$ dp das larguras médias das fibras musculares estriadas (L) em μm

Fonte: (MARIOTTI, 2012)

Legenda: ^a MDX vs C; ^b 10s vs 4s; ANOVA, $p < 0.05$

6 DISCUSSÃO

A busca de artigos científicos nacionais e internacionais, obtida a partir da pesquisa na base de dados PubMed, a respeito do plexo mioentérico do esôfago em distrofia muscular, é escassa. Por isso, foram consultados e analisados estudos não apenas em esôfago, como também em outros órgãos do trato gastrointestinal (TGI), como os intestinos delgado e grosso, que são mais amplamente estudados. Além disso, existem semelhanças entre a estrutura macroscópica e a arquitetura dos gânglios do esôfago, estômago e intestinos, que se devem à origem evolutiva comum dos seus plexos (MORIKAWA; KOMURO, 1999). Isso nos permite fazer analogias das descrições morfológicas destes órgãos para o esôfago.

Além das disfunções e alterações bastante evidentes já descritas da DMD, outra preocupação dos profissionais de saúde é com a manutenção da qualidade de vida dos portadores da doença (RAFAËL et al., 1992; KOHLER et al., 2005). Sob este aspecto, não apenas os sistemas locomotor e respiratório merecem atenção, como também as funções do sistema digestório, visto que ao longo da evolução da doença o paciente apresenta graves distúrbios desde a deglutição até a digestão dos alimentos nas porções aborais deste sistema, caracterizados essencialmente pelas desordens da motilidade que o acometem (JAFFE et al., 1980; BAROHN et al., 1988; STAIANO et al., 1992; CAMELO et al., 1997; CHUNG et al., 1998).

Porém, diferentemente de espécies como a humana (BEVANS, 1945; HUVOS; PRUZANSKI, 1967; LEON et al., 1986; BAROHN et al., 1988) e a canina (AMBRÓSIO et al., 2009), as características morfofuncionais da musculatura estriada esofágica de camundongos *MDX* está livre de alterações, sem a presença de necrose e tecido adiposo nas fibras musculares lisas da túnica externa do TGI (BOLAND et al., 1995). Além disso, a doença evolui em ciclos sucessivos de degeneração/regeneração das fibras musculares, sendo que a degeneração atinge seu pico entre a terceira e quarta semanas de vida, período após o qual se observa intensa regeneração destas. Na idade adulta, o *MDX* exibe uma musculatura praticamente normal, porém, a presença de focos de regeneração indica o caráter permanente do processo degenerativo, mesmo que em menor intensidade (LEFAUCHEUR; SEBILLE, 1995).

Apesar desta particularidade, como descrito anteriormente, são raros os estudos que demonstram tais características do esôfago de camundongos *MDX*, sendo difícil encontrar investigações acerca do plexo mioentérico deste órgão neste modelo animal. Desta forma, isso nos permite, ao indagar sobre a ausência de tais alterações neste modelo animal, buscar e tentar produzir informações sobre o tema. Consideramos assim, a importância deste modelo animal para o estudo das distrofias musculares, especialmente a DMD, tão incapacitante ao homem.

Entre os grupos de 4 semanas utilizados para a técnica de NADH-d, o grupo *MDX4* apresentou massa corporal significativamente menor do que o de seu controle, podendo ser um indicativo de que nesta fase os animais apresentem alguma disfunção na deglutição ou no metabolismo nutricional dos alimentos, fato que determinaria a perda de massa corporal. A constatação de que tal diferença não ocorreu nos animais de 4 semanas submetidos à técnica de NADPH-d, pode ser justificada pelo fato de que apenas este grupo ter sido formado por animais provenientes de um biotério diferente dos demais.

A perda de massa corporal tem íntima relação nos casos de megaesôfago idiopático ou adquirido, que conduzem à alta morbidade e mortalidade, podendo os animais sucumbirem aos efeitos da subnutrição crônica e aos episódios repetidos, tanto de pneumonia por aspiração, como de esofagites de refluxo (WASHABAU, 2003). Em humanos, a disfagia, azia e vômito durante ou após as refeições (JAFFE et al., 1990) também contribuem para a perda de massa corporal nestes pacientes portadores de DMD.

Crabb, Fiorotto e Grounds (2011) sustentam a teoria de que pacientes com DMD e também os camundongos *MDX* têm seu metabolismo alterado. Ainda, afirmam que a suplementação nutricional pode reduzir a gravidade da fisiopatologia da doença, um vez que demonstraram que uma dieta rica em gorduras, associada a exercício físico, é capaz de reduzir a necrose dos miócitos em ratos distróficos jovens, e não em animais distróficos sedentários.

Na idade de 10 semanas, além do aumento significativo na massa corporal, não houve diferença significativa entre os grupos *MDX* e os respectivos grupos controles em ambas as técnicas histoquímicas utilizadas, sugerindo que nesta idade há algum reestabelecimento funcional das funções gástricas e/ou metabólicas.

Quanto aos achados acerca da densidade numérica neuronal (Q_A), os animais de 10 semanas (**MDX10** e **C10**) apresentaram redução significativa nos valores da Q_{ATJ} (neurônios NADH-d reativos) quando comparados aos de 4 semanas (**MDX4** e **C4**).

Ao estudar o plexo mioentérico do intestino delgado de camundongos MDX com 4 semanas de idade, Beber (2011) observou uma redução da densidade numérica por área dos neurônios em relação aos controles, a qual associou ao aumento de 43% da área total do órgão dos animais distróficos. Segundo Wertz e Füchtbauer (1998), alguns animais mutantes desenvolvem um esôfago dilatado, provavelmente devido à constrição causada pela hipertrofia do músculo diafragma. Entretanto, no adulto jovem (10 semanas de idade) não foi observado diferença significativa da densidade entre distróficos e controles nem por fatores diretos, tampouco por fatores indiretos, uma vez que as áreas dos intestinos foram praticamente as mesmas em ambos os grupos (BEBER, 2011). Em cães distróficos, também se observa o aumento do diâmetro esofágico de duas a três vezes, o que o torna flácido, levando a uma condição bastante comum conhecida como megaesôfago (VAN KRUININGEN, 1998).

Outras pesquisas também apontam uma redução na densidade numérica dos neurônios NADH-d reativos nos intestinos delgado e grosso com o avançar da idade em camundongos (EL-SALHY; SANDSTRÖM; HOLMLUND, 1999), ratos (SANTER; BAKER, 1988), cobaias (GABELLA, 1989) e humanos (DE SOUZA et al., 1993; GOMES; DE SOUZA; LIBERTI, 1997).

Entretanto, no presente estudo deve-se ter cautela ao assumir que essa queda deve-se à diferença etária, uma vez que foram comparados somente dados de animais jovens (de 4 semanas) e adultos jovens (de 10 semanas). Muito embora Gabella (1987) tenha sugerido que durante o desenvolvimento o SNE exibe uma densidade neuronal reduzida em virtude da eliminação de neurônios redundantes, o mais plausível é atrelar a densidade reduzida aqui verificada, ao aumento da área analisada, em virtude do consequente aumento do tamanho do órgão nos animais mais velhos, permitindo inferir que o número de neurônios totais não acompanhe este aumento de forma proporcional.

Já na comparação dos grupos de 10 semanas (**MDX10** vs **C10**), a Q_{ATJ} no grupo distrófico é significativamente maior. Embora não se tenha avaliado no presente trabalho a presença de neurônios que expressem outros tipos de neurotransmissores, podemos admitir serem esses neurônios os mais presentes nessa fase, uma vez que em animais portadores de distrofia muscular, acreditamos existir uma tentativa constante

de se estabilizar o desequilíbrio entre neurônios que medeiam a contração muscular, e aqueles que medeiam o seu relaxamento. Isso pode ser explicado pela modificação no comportamento quantitativo dos neurônios nitrérgicos nessa faixa etária.

Neste estudo, além de o grupo **C10** apresentar redução significativa da $Q_{A/NJ}$ (neurônios NADPH-d reativos) quando comparado ao grupo **C4**, a avaliação entre os grupos de 4 semanas (**MDX4** vs **C4**) revelou que os animais distróficos apresentaram a $Q_{A/NJ}$ 78,8% menor, enquanto que entre os grupos **MDX10** e **C10** não foi observada diferença significativa. Este dado é importante, pois nos mostra que na idade de 4 semanas existe uma tentativa de se reduzir os neurônios mediadores do relaxamento, provavelmente porque o organismo tenta manter íntegra a função peristáltica. Passada essa fase de reorganização, o organismo encontra seu equilíbrio, daí a ausência de diferença significativa entre animais distróficos e controles na idade de 10 semanas. Isso corrobora os estudos que descrevem que o esôfago do **MDX** não apresenta alterações morfofuncionais, e explica a adaptação e ausência de sinais da doença durante a maior parte da vida desses animais; e no caso do grupo **MDX4**, a redução dos neurônios nitrérgicos pode de fato ser a chave para a preservação funcional deste órgão. Muito embora, tenha sido relatado em diversos estudos que a falta ou ausência da inervação inibitória exercida pelos neurônios nitrérgicos e da NOS pode ser um importante mecanismo patogênico da estenose e aperistalse esofágica em humanos (AGGESTRUP et al., 1985; VANDERWINDEN et al., 1992; SINGARAM et al., 1995).

Nesses estudos, os pesquisadores comparam esôfagos de adultos normais e com estenose esofágica congênita, e encontram uma redução significativa dos neurônios nitrérgicos do plexo mioentérico, sem redução significativa de neurônios VIP-érgicos e produtores de substância P (SINGARAM et al., 1995). Outra disfunção importante é a acalasia, caracterizada pelo relaxamento incompleto do esfíncter distal esofágico, acarretando em dilatação do corpo do órgão (megaesôfago) o qual perde seus movimentos peristálticos. A histopatologia do órgão nestes casos revela intensa perda dos neurônios do plexo mioentérico, como os VIP-érgicos (AGGESTRUP et al., 1985) e perda total dos neurônios nitrérgicos (VANDERWINDEN et al., 1992; SINGARAM et al., 1993).

Em outras situações adversas, como a subnutrição e o envelhecimento, também foi observada redução significativa dos neurônios nitrérgicos do esôfago (RODRIGO et al., 1998; LIBERTI et al., 2007). No caso da subnutrição em ratos, os pesquisadores

sugerem que tal redução esteja relacionada ao retardo no desenvolvimento desses neurônios, alterando a motilidade esofágica (LIBERTI et al., 2007).

A fim de corroborar essas assertivas, cabe aqui citar a relação $Q_{A[TJ]}/Q_{A[NJ]}$, onde pode-se notar, tanto na comparação entre os grupos de 4 semanas (**C4** vs **MDX4**), como entre os de 10 semanas (**C10** vs **MDX10**), que nos animais distróficos este parâmetro foi significativamente maior.; ao se comparar os grupos distróficos entre si (**MDX4** vs **MDX10**), os animais de 10 semanas apresentam $Q_{A[TJ]}/Q_{A[NJ]}$ 71,2% menor do que os animais de 4 semanas.

Esses dados estão de acordo com os estudos de Beber (2011) no intestino delgado de camundongos, onde justifica a redução da densidade numérica dos neurônios NADPH-d reativos em animais de 4 semanas de idade devido ao aumento significativo da área do órgão neste grupo, o que provocou a diluição destes neurônios ao longo da víscera. Já a ausência de diferença significativa desta variável entre os animais adultos jovens (10 semanas) foi justificada em virtude de a área dos intestinos também terem se igualado, permitindo ao autor concluir que nesta idade, a distrofia não afeta diretamente os componentes nitrérgicos do plexo mioentérico.

Como descrito anteriormente, ao se comparar os grupos distróficos, observou-se um aumento significativo da $Q_{A[NJ]}$ nos animais de 10 semanas (**MDX10**), o que também foi descrito por Beber (2011) no intestino delgado de animais distróficos com 10 semanas de idade, comparativamente aos animais de 4 semanas.

Existem evidências farmacológica e fisiológica de que, no jejuno humano normal, o NO exógeno evoca uma hiperpolarização da membrana e inibe a atividade mecânica da camada muscular circular (STARK et al., 1993). A inibição da biossíntese de NO ou a aplicação de hemoglobina exógena, conhecida por sua capacidade para inativar o NO, leva a uma atenuação do efeito relaxante da estimulação elétrica nos nervos NANC no intestino humano (BURLEIGH, 1992; STARK et al., 1993). Logo, uma deficiência na inervação nitrérgica produz um segmento intestinal hiperexcitável e contraído (DAVIDSON; BAUER, 1958).

Outros estudos descrevem que a alta densidade de neurônios nitrérgicos encontrada nos terços médio e aboral do esôfago, assim como em fibras nervosas, sugere um papel funcional importante no relaxamento do esfíncter esofágico de cães (DE MAN et al., 1991) e de humanos (MCKIRDY et al., 1992) mediado pelo NO (SANDERS; WARD, 1992). Este, segundo Boeckxstaens et al. (1991), está envolvido por

respostas dos NANC em várias regiões do TGI de gambás (MURRAY et al., 1991) e de humanos (MCKIRDY et al., 1992), onde a NOS medeia a hiperpolarização da camada muscular circular (CAYABYAB; DANIEL et al., 1995).

Tendo em vista que foram encontradas variações quantitativas significativas dos neurônios NADH-d e NADPH-d reativos, tanto na comparação entre os grupos distróficos quanto nas comparações etárias, cabe aqui uma análise da área de secção transversal média do perfil do corpo celular neuronal.

Assim, o grupo **MDX10** apresentou redução da A_{ITJ} , quando comparada aos grupos **C10** e **MDX4**. Investigações acerca do processo de desenvolvimento e maturação, demonstraram que a área do perfil neuronal da população total de neurônios de outros órgãos do TGI aumentou em torno de 5% em animais em desenvolvimento (14 a 180 dias de idade), e com o envelhecimento (de 6 meses a 24 meses), sendo que no primeiro caso, o aumento estava relacionado ao desenvolvimento celular e, no segundo, à adaptação celular relativa à perda de neurônios inerente ao avançar da idade (PECK et al., 2009). A redução da A_{ITJ} encontrada no **MDX10** pode ser estar relacionada aos demais tipos de neurônios que não os nitrérgicos, uma vez que não houve diferença significativa da A_{INJ} entre todos os grupos.

Embora tenha sido descrito por Gabella (1991) que as dimensões dos neurônios NADPH-d reativos acompanham o tamanho do animal durante o desenvolvimento, neste estudo, não houve diferença significativa desta variável entre os grupos controle e experimental, tampouco entre os grupos de 4 e de 10 semanas. Porém, especialmente o grupo **MDX4**, exibe uma tendência em apresentar neurônios NADPH-d reativos maiores que seu controle, o que pode ser atribuído à redução da $Q_{A_{INJ}}$ no grupo **MDX4**, uma vez que os corpos celulares de neurônios motores aumentam na medida em que estes são requisitados a inervar um número maior de fibras musculares (KRISHNAN; PAL; BORADKAR, 1982; GOMES; DE SOUZA; LIBERTI, 1997). Esses resultados estão de acordo com o verificado em experimentos semelhantes no intestino delgado e colo de camundongos **MDX**, onde se descreveu que a área média dos neurônios nitrérgicos foi maior do que aquela verificada nos controles (BEBER, 2011).

A largura média das fibras musculares estriadas (L), que se apresentou significativamente maior nos animais distróficos (**MDX4** e **MDX10**), pode estar relacionada com o fato de a $Q_{A_{INJ}}$, neurônios estes mediadores do relaxamento muscular, ser significativamente menor nos grupos distróficos, uma situação que pode ter

determinado um estado de contratilidade maior da musculatura, com consequente aumento da largura de suas fibras. Esses dados não correspondem aos descritos por De Souza et al. (1993), na musculatura lisa da parede intestinal, uma vez que observaram uma hipertrofia dessa musculatura com o avanço da idade, e a relacionaram com a redução dos neurônios colinérgicos (excitatórios).

Conquanto na estenose esofágica congênita de humanos, as camadas musculares deste órgão apresentam-se hipertrofiadas (MURPHY; YAZBECK; RUSSO, 1995), principalmente no esfíncter esofágico distal, acarretando dilatação do órgão até a sua ruptura (KAWAHARA et al., 2000), considera-se aqui que o aumento da *L* nos animais de 10 semanas de idade em ambos os grupos (*MDX10* e *C10*) é decorrente do processo de maturação e desenvolvimento, devendo-se ter cautela ao assumir que esses dados estejam relacionados ao aumento da espessura do tecido muscular (hipertrofia?), uma vez que este parâmetro não foi quantificado. Essas assertivas estão de acordo com Boland et al. (1995), que não detectaram diferenças na espessura da camada muscular do TGI entre camundongos controles e *MDX*.

A comparação das alterações esofágicas e do TGI em outras espécies permite-nos fazer algumas analogias, como nos casos de megaesôfago em cães GRMD, onde as fibras musculares esofágicas encontram-se degeneradas, fibrosadas e com tamanhos variados (VALENTINE et al., 1990), e o órgão apresenta-se de duas a três vezes mais espessado (MIYAZATO, 2005), tendo como consequência, a ocorrência de regurgitação por expulsão retrógrada passiva do conteúdo esofágico logo após as refeições (JESKINS, 2004). Ainda, em humanos, onde os distúrbios funcionais da musculatura lisa do TGI como causa da dilatação gástrica aguda e da pseudo-obstrução intestinal podem ser fatais para o paciente com DMD (BAROHN et al., 1988; CHUNG et al., 1998), a disfunção da musculatura estriada do esôfago ocorre em 14 de um total de 15 casos não tendo sido, entretanto, observadas diferenças quanto à motilidade aboral ou nas pressões e relaxamento dos esfíncteres oral e aboral, apesar de a amplitude de contração da porção oral do esôfago ter sido significativamente menor do que do grupo controle (STAIANO et al., 1992).

Os resultados do presente estudo podem explicar achados de outras pesquisas que descrevem os vários tipos de padrões de acometimento da musculatura de camundongos *MDX*, que vão desde severas, como o músculo diafragma e o músculo esterno-hioideo (dilatador da faringe); médias, como os músculos dos membros e do

tronco; até ausentes, no caso do esôfago, os músculos intrínsecos da laringe e os músculos extrínsecos do olho (BOLAND et al., 1995; MARQUES et al., 2007). Além disso, foi observado que em camundongos *MDX*, apesar da ausência de distrofina nos músculos cricoaritenóideo posterior e tireo-aritenóideo, estes não apresentam sinais de lesão da membrana, inflamação, necrose ou regeneração. Segundo Thomas et al. (2008), estes músculos sofreriam uma adaptação intrínseca protetora ainda desconhecida para enfrentar a ausência de distrofina.

Como se depreende, especificamente para o esôfago, o *MDX* difere substancialmente do humano, uma vez que Camelo et al. (1998), ao avaliarem a musculatura da deglutição e da motilidade esofágica ao exame manométrico, detectaram alterações em todos os casos de portadores de DMD, principalmente ondas não peristálticas simultâneas de amplitude diminuída, tanto na musculatura estriada quanto na lisa. Um grupo elevado de pacientes (77%) apresentou sintomas gastrointestinais, tanto em regiões orais quanto aborais (disfagia, regurgitação, dor epigástrica, constipação e distensão). Jaffe et al. (1990) também verificaram em portadores de DMD uma percentagem significativamente maior de disfunções orofaríngeas, esofágicas e gastrointestinais, além de apresentarem alterações musculares ainda na primeira infância, e redução significativa da espessura da túnica muscular externa do TGI (HUVOS; PRUZANSKI, 1967; DINAN et al., 2003). Sendo assim, seria possível, com esses achados, conjecturar sobre possíveis distinções das características morfoquantitativas do plexo mioentérico do esôfago entre camundongos *MDX* e humanos portadores de DMD?

Pesquisas têm sido desenvolvidas sugerindo que, provavelmente, existam isoformas da distrofina em determinados órgãos capazes de substituí-las sem prejuízo funcional. Voit et al. (1989) discutem a presença da proteína nebulina, cujos níveis estão reduzidos na musculatura esquelética de camundongos *MDX* de 6 semanas de idade, mas não na musculatura do esôfago. Contudo, a glicoproteína RCA I-kDa 370, que está muito reduzida no músculo esquelético na DMD, está presente em quantidades normais no músculo esquelético do *MDX*. Esses resultados mostraram, pela primeira vez, que a miopatia do camundongo *MDX* difere da DMD de humanos não apenas morfológicamente, mas também nas suas características bioquímicas.

Apesar dos intensos estudos morfológicos, bioquímicos e de biologia molecular, as distrofias musculares nos modelos experimentais e em humanos continuam a ser um

desafio para a ciência. O estudo morfológico tem o papel de ajudar a compreender a doença e estabelecer mecanismos ainda desconhecidos, que podem auxiliar as pesquisas desenvolvidas nas demais áreas do conhecimento.

Assim, apesar da complexidade do mecanismo fisiopatológico da distrofia muscular e das limitações encontradas nos modelos experimentais, as pesquisas são essenciais para o desenvolvimento das diversas estratégias terapêuticas que buscam respostas para o controle da degeneração muscular, das disfunções e da progressão da doença. Também, podem oferecer maiores esclarecimentos para o tratamento dos distúrbios da motilidade do trato digestório em portadores de DMD, além de somar informações que possam levar a tratamentos mais eficazes, colaborando para a melhora da qualidade de vida destes indivíduos ao longo da progressão da doença.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e as análises realizadas acerca das diferentes variáveis nos animais distróficos e controles, em ambas as idades estudadas, podemos concluir que a respeito do plexo mioentérico do esôfago de camundongos *MDX*:

- 1) A densidade numérica por área da população total de neurônios é maior nos animais de 10 semanas do que nos animais controles de mesma idade.
- 2) Os animais de 4 semanas apresentaram densidade numérica da população de neurônios nitrérgicos 78,8% menor que seus controles de mesma idade.
- 3) Com 10 semanas de idade, os animais distróficos apresentaram densidade numérica de neurônios nitrérgicos equivalente a dos controles.
- 4) Com 10 semanas de idade, os animais distróficos apresentaram área do perfil neuronal da população total significativamente menor que os controles de 10 semanas e do que os distróficos de 4 semanas de idade.
- 5) Os animais distróficos apresentaram largura média de suas fibras musculares estriadas esofágicas maior do que os seus respectivos controles etários.

Desta forma, pode-se inferir que no plexo mioentérico esofágico de camundongos *MDX* existe uma tentativa de se reduzir os neurônios mediadores do relaxamento, especialmente em animais jovens, provavelmente porque o organismo tenta manter íntegra a função peristáltica do órgão. Esse fato pode explicar a adaptação e a ausência de disfunções esofágicas durante a maior parte da vida desses animais.

REFERÊNCIAS¹³

- AGGESTRUP, S.; UDDMAN, R.; JENSEN, S. L.; SUNDLER, F.; SCHAFFALITZKY, D. E.; MUCKADELL, O.; HOIST, J. J.; HAKANSON, R.; EKMAN, R.; SORENSEN, H. R. Regulatory peptides in the lower esophageal sphincter of man. **Regulatory Peptides**, v. 10, p. 167-178, 1985.
- AMBRÓSIO, C. E.; FADEL, L.; GAIAD, T. P.; MARTINS, D. S.; ARAÚJO, K. P.; ZUCCONI, E.; BROLIO, M. P.; GIGLIO, R. F.; MORINI, A. C.; JAZEDJE, T.; FROES, T. R.; FEITOSA, M. L.; VALADARES, M. C.; BELTRÃO-BRAGA, P. C.; MEIRELLES, F. V.; MIGLINO, M. A. Identification of three distinguishable phenotypes in golden retriever muscular dystrophy. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 8, n. 2, p. 389-396, 2009.
- AMBRÓSIO, C. E.; VALADARES, M. C.; ZUCCONI, E.; CABRAL, R.; PEARSON, P. L.; GAIAD T. P.; CANOVAS, M.; VAINZOF, M.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Ringo, a Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog with absent dystrophin but normal strength. **Neuromuscular Disorders: NMD**, v. 18, n. 11, p. 892-893, 2008.
- APPELBERG, R.; LEAL, I. S.; PAIS, T. F.; PEDROSA, J.; FLÓRIDO, M. Differences in resistance of C57BL/6 and C57BL/10 mice to infection by Mycobacterium avium are independent of gamma interferon. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 1, p. 19-23, 2000.
- ARAÚJO LEITÃO, A. V. de; DURO, L. A.; DE ANDRADE PENQUE, G. M. Progressive muscular dystrophy--Duchenne type. Controversies of the kinesitherapy treatment. **São Paulo Medical Journal = Revista Paulista de Medicina**, v. 113, n. 5, p. 995-999, 1995.
- AREY, L. B.; TREMAINE, M. J. The muscle content of the lower oesophagus of man. **Anatomical Record**, v. 56, p. 315-320, 1933.
- BANKS, G. B.; CHAMBERLAIN, J. S. The value of mammalian models for duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 84, p. 431-453, 2008.
- BAROHN, R. J.; LEVINE, E. J.; OLSON, J. O.; MENDELL, J. R. Gastric hypomotility in Duchenne's muscular dystrophy. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 1, p. 15-18, 1988.
- BARTHÓ, L.; HOLZER, P. Search for a physiological role of substance P in gastrointestinal motility. **Neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 1-32, 1985.
- BEBER, E. H. **Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do intestino delgado de camundongos MDX: um modelo de distrofia muscular de Duchenne**. 2011. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

¹³ De acordo com as Diretrizes para apresentação de dissertações e teses na FMVZ-USP, elaborada a partir das normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) /NBR 6023

BEESELEY, J. E. Histochemical methods for detecting nitric oxide synthase. **The Histochemical Journal**, v. 27, n. 10, p. 757-769, 1995.

BELAI, A.; SCHMIDT, H. H.; HOYLE, C. H.; HASSALL, C. J.; SAFFREY, M. J. MOSS, J.; FÖRSTERMANN, U.; MURAD, F.; BURNSTOCK, G. Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in the myenteric plexus of the rat gut. **Neuroscience Letters**, v. 143, n. 1-2, p. 60-64, 1992.

BEVANS, M. Changes in the musculature of the gastrointestinal tract and in the myocardium in progressive muscular dystrophy. **Archives of Pathology**, v. 40, p. 225-238, 1945.

BIEGER, D. Central nervous system control mechanisms of swallowing: a neuropharmacological perspective. **Dysphagia**, v. 8, n. 4, p. 308-310, 1993.

BOECKXSTAENS, G. E.; PELCKMANS, P. A.; HERMAN, A. G.; VAN MAERCKE, Y. M. Involvement of nitric oxide in the inhibitory innervation of the human isolated colon. **Gastroenterology**, v. 104, n. 3, p. 690-697, 1993.

BOLAND, B.; HIMPENS, B.; DENEFF, J. F.; GILLIS, J. M. Site-dependent pathological differences in smooth muscles and skeletal muscles of the adult *MDX* mouse. **Muscle & Nerve**, v. 18, n. 6, p. 649-657, 1995.

BONSETT, C. A.; RUDMAN, A. "Oil globules" in Duchenne muscular dystrophy--history, demonstration, and metabolic significance. **Medical Hypotheses**, v. 43, n. 5, p. 327-338, 1994.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 768-770, 1990.

BREHMER, A.; SCHRODL, F.; NEUHUBER, W. Morphological classifications of enteric neurons--100 years after Dogiel. **Anatomy and Embryology**, v. 200, n. 2, p. 125-135, 1999.

BREHMER, A.; STACH, W.; KRAMMER, H. J.; NEUHUBER, W. Distribution, morphology and projections of nitrergic and non-nitrergic submucosal neurons in the pig small intestine. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 109, n. 1, p. 87-94, 1998.

BREUER, C.; NEUHUBER, W. L.; WÖRL, J. Development of neuromuscular junctions in the mouse esophagus: morphology suggests a role for enteric coinnervation during maturation of vagal myoneural contacts. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 475, n. 1, p. 47-69, 2004.

BROOKES, S. J. Neuronal nitric oxide in the gut. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, n. 6, p. 590-603, 1993.

BROOKES, S. J.; STEELE, P. A.; COSTA, M. Calretinin immunoreactivity in cholinergic motor neurones, interneurons and vasomotor neurones in the guinea-pig small intestine. **Cell and Tissue Research**, v. 263, n. 3, p. 471-481, 1991.

- BRYANT, M. G.; POLAK, M. M.; MODLIN, I.; BLOOM, S. R.; ALBUQUERQUE, R. H.; PEARSE, A. G. Possible dual role for vasoactive intestinal peptide as gastrointestinal hormone and neurotransmitter substance. **Lancet**, v. 1, n. 7967, p. 991-993, 1976.
- BULFIELD, G.; SILLER, W. G.; WIGHT, P. A.; MOORE, K. J. X chromosome-linked muscular dystrophy (*MDX*) in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 4, p. 1189-1192, 1984.
- BURCHER, E.; BUCK, S. H.; LOVENBERG, W.; O'DONOHUE, T. L. Characterization and autoradiographic localization of multiple tachykinin binding sites in gastrointestinal tract and bladder. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 236, n. 3, p. 819-831, 1986.
- BURLEIGH, D. E. Ng-nitro-L-arginine reduces nonadrenergic, noncholinergic relaxations of human gut. **Gastroenterology**, v. 102, n. 2, p. 679-683, 1992.
- CAMELO, A. L.; AWAD, R. A.; MADRAZO, A.; AGUILAR, F.; AWARD, R. A. Esophageal motility disorders in Mexican patients with Duchenne's muscular dystrophy. **Acta Gastroenterologica Latinoamericana**, v. 27, n. 3, p. 119-122, 1997.
- CAMELO, M.; NEVINS, M. L.; SCHENK, R. K.; SIMION, M.; RASPERINI, G.; LYNCH, S. E.; NEVINS, M. Clinical, radiographic, and histologic evaluation of human periodontal defects treated with Bio-Oss and Bio-Gide. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 18, n. 4, p. 321-331, 1998.
- CAYABYAB, F. S.; DANIEL, E. E. K⁺ channel opening mediates hyperpolarizations by nitric oxide donors and IJPs in opossum esophagus. **The American Journal of Physiology**, v. 268, n. 5 pt. 1, p. G831-842, 1995.
- CHAMPION, P.; HARRISON, R. J. Oculopharyngeal muscular dystrophy. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 64, n. 1, p. 45, 1971.
- CHRISTENSEN, J. **Motor functions of the pharynx and esophagus**. Physiology of the gastrointestinal Tract. 2. ed. New York: Raven Press - Leonard R. Johnson, 1987. 2000 p.
- CHUNG, B. C.; PARK, H. J.; YOON, S. B.; LEE, H. W.; KIM, K. W.; LEE, S. I.; PARK, I. S. Acute gastroparesis in Duchenne's muscular dystrophy. **Yonsei Medical Journal**, v. 39, n. 2, p. 175-179, 1998.
- CLARKE, J. L.; GOWERS, W. R. On a Case of Pseudo-hypertrophic Muscular Paralysis. **Medico-Chirurgical Transactions**, v. 57, p. 247-260, 1874.
- COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, n. 4, p. 165-172, 2003.
- COSTA, M.; FURNESS, J. B.; CUELLO, A. C.; VERHOFSTAD, A. A.; STEINBUSCH, H. W.; ELDE, R. P. Neurons with 5-hydroxytryptamine-like immunoreactivity in the enteric nervous system: their visualization and reactions to drug treatment. **Neuroscience**, v. 7,

n. 2, p. 351-363, 1982.

COSTA, M.; FURNESS, J. B.; POMPOLO, S. BROOKES, S. J.; BORNSTEIN, J. C.; BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea-pig small intestine. **Neuroscience Letters**, v. 148, n. 1-2, p. 121-125, 1992.

CRABB, H.; FIOROTTO, M. L.; GROUNDS, M. D. The different impact of a high fat diet on dystrophic *MDX* and control C57Bl/10 mice. **PLoS Currents**, v. 3, p. RRN1276, 2011.

CYRULNIK, S. E.; HINTON, V. J. Duchenne muscular dystrophy: a cerebellar disorder? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 3, p. 486-496, 2008.

DAVIDSON, M.; BAUER, C. H. Studies of distal colonic motility in children. IV. Achalasia of the distal rectal segment despite presence of ganglia in the myenteric plexuses of this area. **Pediatrics**, v. 21, n. 5, p. 746-761, 1958.

DEACON, R. M. J.; THOMAS, C. L.; RAWLINS, J. N. P.; MORLEY, B. J. A comparison of the behavior of C57BL/6 and C57BL/10 mice. **Behavioural Brain Research**, v. 179, n. 2, p. 239-247, 2007.

DE LAET, A.; CORNELISSEN, W.; ADRIAENSEN, D.; VAN BOGAERT, P. P.; SCHEUERMANN, D. W.; TIMMERMAN, J. P. Ca²⁺ involvement in the action potential generation of myenteric neurones in the rat oesophagus. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 14, n. 2, p. 161-172, 2002.

DE MAN, J. G.; PELCKMANS, P. A.; BOECKXSTAENS, G. E.; BULT, H.; OOSTERBOSCH, L.; HERMAN, A. G.; VAN MAERCKE, Y. M. The role of nitric oxide in inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in the canine lower oesophageal sphincter. **British Journal of Pharmacology**, v. 103, n. 1, p. 1092-1096, 1991.

DENETCLAW JR, W. F.; HOPF, F. W.; COX, G. A.; CHAMBERLAIN, J S; STEINHARDT, R. A. Myotubes from transgenic *MDX* mice expressing full-length dystrophin show normal calcium regulation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 5, n. 10, p. 1159-1167, 1994.

DE SOUZA, R. R.; MORATELLI, H. B.; BORGES, N.; LIBERTI, E A. Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. **Gerontology**, v. 39, n. 4, p. 183-188, 1993.

DINAN, D.; LEVINE, M. S.; GORDON, A. R.; RUBESIN, S. E.; ROMBEAU, J. L. Gastric wall weakening resulting in separate perforations in a patient with Duchenne's muscular dystrophy. **AJR Am J Roentgenol**, v. 181, n. 3, p. 807-808, 2003.

DUBOWITZ, V. Neuromuscular disorders in childhood. Old dogmas, new concepts. **Archives of Disease in Childhood**, v. 50, n. 5, p. 335-346, 1975.

EKBLAD, E.; WINTHER, C.; EKMAN, R.; HÅKANSON, R.; SUNDLER, F. Projections of peptide-containing neurons in rat small intestine. **Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 169-188, 1987.

EL-SALHY, M.; SANDSTRÖM, O.; HOLMLUND, F. Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 107, n. 1, p. 93-103, 1999.

EMERY, A. E.; EMERY, M. L. Edward Meryon (1809-1880) and muscular dystrophy. **Journal of Medical Genetics**, v. 30, n. 6, p. 506-511, 1993.

EMERY, A. E. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. **Neuromuscular Disorders: NMD**, v. 1, n. 1, p. 19-29, 1991.

FAU, R. [Atrophic myotonia (Steinert's disease)]. **La Revue du Praticien**, v. 5, n. 9, p. 889-891, 1955.

FINSTERER, J. Cardiopulmonary support in duchenne muscular dystrophy. **Lung**, v. 184, n. 4, p. 205-215, 2006.

FURNESS, J. B. The adrenergic innervation of the vessels supplying and draining the gastrointestinal tract. **Z Zellforsch Mikrosk Anat.**, v. 113, n. 1, p. 67-82, 1971.

FURNESS, J. B. **The enteric nervous system**. Carlton: Blackwell Publishing Asia Pty Ltd, 2006. 274 p.

FURNESS, J. B.; CLERC, N.; LOMAX, A. E.; BORNSTEIN, J. C.; KUNZE, W. A. Shapes and projections of tertiary plexus neurons of the guinea-pig small intestine. **Cell and Tissue Research**, v. 300, n. 3, p. 383-387, 2000.

FURNESS, J. B.; LLOYD, K. C.; STERNINI, C.; WALSH, J. H. Projections of substance P, vasoactive intestinal peptide and tyrosine hydroxylase immunoreactive nerve fibres in the canine intestine, with special reference to the innervation of the circular muscle. **Archives of Histology and Cytology**, v. 53, n. 2, p. 129-140, 1990.

FURNESS, J. B.; TRUSSELL, D. C.; POMPOLO, S. BORNSTEIN, J. C.; MALEY, B. E.; STORM-MATHISEN, J. Shapes and projections of neurons with immunoreactivity for gamma-aminobutyric acid in the guinea-pig small intestine. **Cell and Tissue Research**, v. 256, n. 2, p. 293-301, 1989.

FURNESS, J. B.; YOUNG, H. M.; POMPOLO, S.; BORNSTEIN, J. C.; KUNZE, W. A.; MCCONALOGUE, K. Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. **Gastroenterology**, v. 108, n. 2, p. 554-563, 1995.

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

GABELLA, G. Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. **Journal of Anatomy**, v. 111, pt. 1, p. 69-97, 1972.

GABELLA, G. Special muscle cells and their innervation in the mammalian small intestine. **Cell and Tissue Research**, v. 153, n. 1, p. 63-77, 1974.

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

GABELLA, G. Ultrastructure of the tracheal muscle in developing, adult and ageing guinea-pigs. **Anatomy and Embryology**, v. 183, n. 1, p. 71-79, 1991.

GAIAD, T. P.; SILVA, M. B.; SILVA, G. C. A.; CAROMANO, F. A.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E. Physical therapy assessment tools to evaluate disease progression and phenotype variability in Golden Retriever muscular dystrophy. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 2, p. 188-193, 2011.

GERSHON, M. D.; CHALAZONITIS, A.; ROTHMAN, T. P. From neural crest to bowel: development of the enteric nervous system. **Journal of Neurobiology**, v. 24, n. 2, p. 199-214, 1993.

GERSHON, M. **The Second Brain**. New York: Harper Collins Publishers Inc, 1998. 336 p.

GLESBY, M. J.; ROSENMAN, E.; NYLEN, E. G.; WROGEMANN, K. Serum CK, calcium, magnesium, and oxidative phosphorylation in *MDX* mouse muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, v. 11, n. 8, p. 852-856, 1988.

GOMES, O. A.; DE SOUZA, R. R.; LIBERTI, E. A. A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. **Gerontology**, v. 43, n. 4, p. 210-217, 1997.

GUNDERSEN, H. J.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MØLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SØRENSEN, F. B.; VESTERBY, A.; WEST, M. J. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 96, n. 5, p. 379-394, 1988.

GUNDERSEN, H. J.; JENSEN, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **Journal of Microscopy**, v. 147, pt. 3, p. 229-263, 1987.

GUNN, M. Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. **Journal of Anatomy**, v. 102, pt. 2, p. 223-239, 1968.

HEBEISS, K.; KILBINGER, H. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase inhibits acetylcholine release and excitatory motor transmission in the guinea-pig ileum. **Neuroscience**, v. 82, n. 2, p. 623-629, 1998.

HOAGLAND, C. L.; SHANK, R. E.; LAVIN, G. I. The histopathology of progressive muscular dystrophy as revealed by ultraviolet photomicrography. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 80, n. 1, p. 9-18, 1944.

HOFFMAN, E. P.; BROWN JR., R. H.; KUNKEL, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, v. 51, n. 6, p. 919-928, 1987.

HOFFMAN, E. P.; KNUDSON, C. M.; CAMPBELL, K. P.; KUNKEL, L. M. Subcellular

fractionation of dystrophin to the triads of skeletal muscle. **Nature**, v. 330, n. 6150, p. 754-758, 1987.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased Stereology**: three-dimensional measurement in microscopy. 2nd ed. Abingdon: Garland Science/BIOS Scientific Publishers, 2005. 277 p.

HUVOS, A. G.; PRUZANSKI, W. Smooth muscle involvement in primary muscle disease. II. Progressive muscular dystrophy. **Archives of Pathology**, v. 83, n. 3, p. 234-240, 1967.

ILAR. **Guide for the care and use of laboratory animals**. Washington, DC: The National Academy Press, 1996. 140 p.

INGELFINGER, F. J. Esophageal motility. **Physiological Reviews**, v. 38, n. 4, p. 533-584, 1958.

IZUMI, N.; MATSUYAMA, H.; KO, M.; SHIMIZU, Y.; TAKEWAKI, T. Role of intrinsic nitrergic neurones on vagally mediated striated muscle contractions in the hamster oesophagus. **The Journal of Physiology**, v. 551, pt. 1, p. 287-294, 2003.

JACOBS, J. M. Penetration of systemically injected horseradish peroxidase into ganglia and nerves of the autonomic nervous system. **Journal of Neurocytology**, v. 6, n. 5, p. 607-618, 1977.

JAFFE, K. M.; MCDONALD, C. M.; INGMAN, E.; HAAS, J. Symptoms of upper gastrointestinal dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: case-control study. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 71, n. 10, p. 742-744, 1990.

JANSSENS, J.; DE WEVER, I.; VANTRAPPEN, G.; HELLEMANS, J. Peristalsis in smooth muscle esophagus after transection and bolus deviation. **Gastroenterology**, v. 71, n. 6, p. 1004-1009, 1976.

JAY, V.; VAJSAR, J. The dystrophy of Duchenne. **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 550-552, 2001.

JAZEDJE, T.; SECCO, M.; VIEIRA, N. M.; ZUCCONI, E.; GOLLOP, T. R.; VAINZOF, M.; ZATZ, M. Stem cells from umbilical cord blood do have myogenic potential, with and without differentiation induction in vitro. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 6, 2009.

JEAN, A. Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 929-969, 2001.

JESKINS, C. C. Disfagia e regurgitação. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed). **Tratado de medicina interna veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. v. 1, 1039 p.

KADANOFF, D.; SPASSOWA, I. [Forms of ganglion cells in intramural plexuses of the human esophagus]. **Acta Neurovegetativa**, v. 20, n. 1, p. 19-32, 1959.

KANADA, A.; HATA, F.; SUTHAMNATPONG, N.; MAEHARA, T.; ISHII, T.; TAKEUCHI, T.; YAGASAKI, O. Key roles of nitric oxide and cyclic GMP in nonadrenergic and

noncholinergic inhibition in rat ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 216, n. 2, p. 287-292, 1992.

KAPUR, R. P. Developmental disorders of the enteric nervous system. **Gut**, v. 47, p. 81-83, 87, 2000. Supplement, 4.

KAPUR, R. P.; GERSHON, M. D.; MILLA, P. J.; PACHNIS, V. The influence of Hox genes and three intercellular signalling pathways on enteric neuromuscular development. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 16, p. 8-13, 2004. Supplement, 1.

KAPUR, R. P.; YOST, C.; PALMITER, R. D. A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. **Development**, v. 116, n. 1, p. 167-175, 1992.

KERKIS, I.; AMBROSIO, C. E.; KERKIS, A.; MARTINS, D. S.; ZUCCONI, E.; FONSECA, S. A.; CABRAL, R. M.; MARANDUBA, CM.; GAIAD, T. P.; MORINI, A. C.; VIEIRA, N. M.; BROLIO, M. P.; SANT'ANNA, O. A.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? **Journal of Translational Medicine**, v. 6, p. 35, 2008.

KOHLER, M.; CLARENBACH, C. F.; BÖNI, L.; BRACK, T.; RUSSI, E. W.; BLOCH, K. E. Quality of life, physical disability, and respiratory impairment in Duchenne muscular dystrophy. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 172, n. 8, p. 1032-1036, 2005.

KRISHNAN, R. V.; PAL, G. P.; BORADKAR, R. V. Size plasticity of intact motoneurons as reaction to partial denervation of muscle. **The International Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 43-49, 1982.

KUNKEL, L. M.; HEJTMANCIK, J. F.; CASKEY, C. T.; SPEER, A.; MONACO, A. P.; MIDDLESWORTH, W.; COLLETTI, C. A.; BERTELSON, C.; MÜLLER, U.; BRESNAN, M.; SHAPIRO, F.; TANTRAVAH, U.; SPEER, J.; LATT, S. A.; BARTLETT, R.; PERICAK-VANCE, M. A.; ROSES, A. D.; THOMPSON, M. W.; RAY, P. N.; WORTON, R. G.; FISCHBECK, K. H.; GALLANO, P.; COULON, M.; DUROS, C.; BOUE, J.; JUNIEN, C.; CHELLY, J.; HAMARD, G.; JEANPIERRE, M.; LAMBERT, M.; KAPLAN, J. C.; EMERY, A.; DORKINS, H.; MCGLADE, S.; DAVIES, K. E.; BOEHM, C.; ARVEILER, B.; LEMAIRE, C.; MORGAN, G. J.; DENTON, M. J.; AMOS, J.; BOBROW, M.; BENHAM, F.; BOSWINKEL, E.; COLE, C.; DUBOWITZ, V.; HART, K.; HODGSON, S.; JOHNSON, L.; WALKER, A.; RONCUZZI, L.; FERLINI, A.; NOBILE, C.; ROMEO, G.; WILCOX, D. E.; AFFARA, N. A.; FERGUSON-SMITH, M. A.; LINDOLF, M.; KAARIAINEN, H.; DE LA CHAPPELLE, A.; IONASESCU, V.; SEARBY, C.; IONASESCU, R.; BAKKER, E.; VAN OMMEN, G. J.; PEARSON, P. L.; GREENBERG, C. R.; HAMERTON, J. L.; WROGEMANN, K.; DOHERTY, R. A.; POLAKOWSKA, R.; HYSER, C.; QUIRK, S.; THOMAS, N.; HARPER, J. F.; DARRAS, B. T.; FRANCKE, U. Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. **Nature**, v. 322, n. 6074, p. 73-77, 1986.

KURAMOTO, H.; KATO, Y.; SAKAMOTO, H.; ENDO, Y. Galanin-containing nerve terminals that are involved in a dual innervation of the striated muscles of the rat esophagus.

Brain Research, v. 734, n. 1-2, p. 186-192, 1996.

LEFAUCHEUR, J. P.; SEBILLE, A. Basic fibroblast growth factor promotes in vivo muscle regeneration in murine muscular dystrophy. **Neuroscience Letters**, v. 202, n. 1-2, p. 121-124, 1995.

LEON, S. H.; SCHUFFLER, M. D.; KETTLER, M.; ROHRMANN, C. A. Chronic intestinal pseudoobstruction as a complication of Duchenne's muscular dystrophy. **Gastroenterology**, v. 90, n. 2, p. 455-459, 1986.

LEWIS, S. R.; DYM, C.; GINZBERG, M.; KEST, B.; BODNAR, R. J. Genetic variance contributes to ingestive processes: A survey of mercaptoacetate-induced feeding in eleven inbred and one outbred mouse strains. **Physiology & Behavior**, v. 88, n. 4-5, p. 516-522, 2006.

LIBERTI, E. A.; FONTES, R. B. V.; FUGGI, V. M.; MAIFRINO, L. B. M.; SOUZA, R. R. Effects of combined pre- and post-natal protein deprivation on the myenteric plexus of the esophagus of weanling rats: a histochemical, quantitative and ultrastructural study. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 13, n. 26, p. 3598-3604, 2007.

LLEWELLYN-SMITH, I. J.; FURNESS, J. B.; GIBBINS, I. L.; COSTA, M. Quantitative ultrastructural analysis of enkephalin-, substance P-, and VIP-immunoreactive nerve fibers in the circular muscle of the guinea pig small intestine. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 272, n. 1, p. 139-148, 1988.

LLEWELLYN-SMITH, I. J.; SONG, Z. M.; COSTA, M.; BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Ultrastructural localization of nitric oxide synthase immunoreactivity in guinea-pig enteric neurons. **Brain Research**, v. 577, n. 2, p. 337-342, 1992.

LU, W. Y.; BIEGER, D. Vagovagal reflex motility patterns of the rat esophagus. **The American Journal of Physiology**, v. 274, n. 5, pt. 2, p. R1425-1435, 1998.

MARQUES, M. J.; FERRETTI, R.; VOMERO, V. U.; MINATEL, E.; NETO, H. S. Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the *MDX* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, v. 35, n. 3, p. 349-353, 2007.

MATINI, P.; MAYER, B.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S. Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life. **Cell and Tissue Research**, v. 288, n. 1, p. 11-23, 1997.

MCKIRDY, H. C.; MCKIRDY, M. L.; LEWIS, M. J.; MARSHALL, R. W. Evidence for involvement of nitric oxide in the non-adrenergic non-cholinergic (NANC) relaxation of human lower oesophageal sphincter muscle strips. **Experimental Physiology**, v. 77, n. 3, p. 509-511, 1992.

MEARIN, F.; MOURELLE, M.; GUARNER, F.; SALAS, A.; RIVEROS-MORENO, V.; MONCADA, S.; MALAGELADA, J. R. Patients with achalasia lack nitric oxide synthase in the gastro-oesophageal junction. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 23, n. 11, p. 724-728, 1993.

MERYON, E. On granular and fatty degeneration of the voluntary muscles. **Medico-Chirurgical Transactions**, v. 35, p. 73-84, 1852.

MITCHELL, G. A. Nerve supply of the gastro-oesophageal junction. **British Journal Surgery**, v. 26, p. 33-45, 1938.

MIYAZATO, L. G. **Distrofia muscular no golden retriever**. 2005. 82 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2005.

MOENS, P.; BAATSEN, P. H.; MARÉCHAL, G. Increased susceptibility of EDL muscles from *MDX* mice to damage induced by contractions with stretch. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 14, n. 4, p. 446-451, 1993.

MORIKAWA, S.; KOMURO, T. Ultrastructure of intramural ganglia in the striated muscle portions of the guinea pig oesophagus. **Journal of Anatomy**, v. 195, pt. 1, p. 111-120, 1999.

MUNTONI, F.; TORELLI, S.; FERLINI, A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. **Lancet Neurology**, v. 2, n. 12, p. 731-740, 2003.

MURPHY, G.; YAZBECK, S.; RUSSO, P. Isolated congenital esophageal stenosis. **Journal Pediatric Surgery**, v. 30, p. 1238- 41, 1995.

MURRAY, J.; DU, C.; LEDLOW, A.; BATES, J. N.; CONKLIN, J. L. Nitric oxide: mediator of nonadrenergic noncholinergic responses of opossum esophageal muscle. **The American Journal of Physiology**, v. 261, n. 3, pt. 1, p. G401-406, 1991.

NEUHUBER, W. L.; WÖRL, J.; BERTHOUD, H. R.; CONTE, B. NADPH-diaphorase-positive nerve fibers associated with motor endplates in the rat esophagus: new evidence for co-innervation of striated muscle by enteric neurons. **Cell and Tissue Research**, v. 276, n. 1, p. 23-30, 1994.

NIGRO, G.; COMI, L. I.; POLITANO, L.; BAIN, R. J. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. **International Journal of Cardiology**, v. 26, n. 3, p. 271-277, 1990.

OZAWA, E.; HAGIWARA, Y.; YOSHIDA, M. Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 190, n. 1-2, p. 143-151, 1999.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.

PATAPOUTIAN, A.; WOLD, B. J.; WAGNER, R. A. Evidence for developmentally programmed transdifferentiation in mouse esophageal muscle. **Science**, v. 270, n. 5243, p. 1818-1821, 1995.

PECK, C. J.; SAMSURIA, S. D.; HARRINGTON, A. M.; KING, S. K.; HUTSON, J. M.; SOUTHWELL, B. R. Fall in density, but not number of myenteric neurons and circular muscle nerve fibres in guinea-pig colon with ageing. **Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 21, n. 10, p. 1075-e90, 2009.

PHILLIPS, R. J.; KIEFFER, E. J.; POWLEY, T. L. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 106, n. 2, p. 69-83, 2003.

RAPHAËL, J. C.; DAZORD, A.; JAILLARD, P.; ANDRONIKOF-SANGLADE, A.; BENONY, H.; KOVESS, V.; CHARPAK, Y.; AURIANT, I. [Assessment of quality of life for home ventilated patients with Duchenne muscular dystrophy]. **Revue Neurologique**, v. 158, n. 4, p. 453-460, 2002.

RICHARDSON, K. C. Electronmicroscopic observations on Auerbach's plexus in the rabbit, with special reference to the problem of smooth muscle innervation. **The American Journal of Anatomy**, v. 103, n. 1, p. 99-135, 1958.

ROBLES-CHILLIDA, E. M.; RODRIGO, J.; MAYO, I.; ARNEDO, A.; GÓMEZ, A. Ultrastructure of free-ending nerve fibres in oesophageal epithelium. **Journal of Anatomy**, v. 133, pt. 2, p. 227-233, 1981.

RODRIGO, J.; HERNÁNDEZ, J.; VIDAL, M. A.; PEDROSA, J. A. Vegetative innervation of the esophagus. II. Intraganglionic laminar endings. **Acta Anatomica**, v. 92, n. 1, p. 79-100, 1975.

RODRIGO, J.; UTTENTHAL, L. O.; PEINADO, M. A.; ESTEBAN, F. J.; FERNANDEZ, A. P.; SERRANO J.; MARTINEZ DE VELASCO, J.; SANTACANA, M.; BENTURA, M. L.; MARTINEZ-MURILLO, R.; PEDROSA, J. A. Distribution of nitric oxide synthase in the esophagus of the cat and monkey. **Journal Autonomic Nervous System**, v. 70, p. 164-179, 1998.

RODRIGUES-BASTOS, A. P. M.; NASCIMENTO, C. X.; WERNECK-BARROSO, E.; CORDEIRO, R. S.; HENRIQUES, M. G.; MOURA, A. C. Comparison between C57Bl/6 and C57Bl/10 mycobacterial mouse pleurisy with respect to cellular migration and nitric oxide production. **Inflammopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 353-372, 2004.

RONDOT, P. G. B. A. Duchenne de Boulogne (1806-1875). **Journal of Neurology**, v. 252, n. 7, p. 866-867, 2005.

ROWLAND, L. P.; FETELL, M.; OLARTE, M.; HAYS, A.; SINGH, N.; WANAT, F. E. Emery-Dreifuss muscular dystrophy. **Annals of Neurology**, v. 5, n. 2, p. 111-117, 1979.

SAFFREY, M. J.; HASSALL, C. J.; HOYLE, C. H.; BELAI, A.; MOSS, J.; SCHMIDT, H. H.; FÖRSTERMANN, U.; MURAD, F.; BURNSTOCK, G. Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in cultured myenteric neurones. **Neuroreport**, v. 3, n. 4, p. 333-336, 1992.

SANDERS, K. M.; SMITH, T. K. Motoneurons of the submucous plexus regulate electrical

activity of the circular muscle of canine proximal colon. **The Journal of Physiology**, v. 380, p. 293-310, 1986.

SANDERS, K. M.; WARD, S. M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. **The American Journal of Physiology**, v. 262, n. 3, pt. 1, p. G379-392, 1992.

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

SANTER, R. M. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 49, n. 2, p. 115-121, 1994.

SBARBATI, A.; MERIGO, F.; BERNARDI, P.; CRESCIMANNO, C.; BENATI, D.; OSCULATI, F. Ganglion cells and topographically related nerves in the vallate papilla/von Ebner gland complex. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 50, n. 5, p. 709-718, 2002.

SCHERER-SINGLER, U.; VINCENT, S. R.; KIMURA, H.; MCGEER, E. G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 9, n. 3, p. 229-234, 1983.

SCHMIDT, H. H.; GAGNE, G. D.; NAKANE, M.; POLLOCK, J. S.; MILLER, M. F.; MURAD, F. Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 40, n. 10, p. 1439-1456, 1992.

SEMENOVA, G. S. Innervation of the pharynx and the cervical portion of the oesophagus in man and certain animals. **Trudy Smolensk Med Inst**, v. 15, p. 18-27, 1962.

SHIMAZAKI, T.; YOSHIDA, Y.; HIRANO, M. Morphological study of the intrapharyngeal ganglia and ganglionic neurons in cats. **Acta Oto-laryngologica**, v. 118, n. 1, p. 131-137, 1998.

SHNEERSON, J. M.; SIMONDS, A. K. Noninvasive ventilation for chest wall and neuromuscular disorders. **The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology**, v. 20, n. 2, p. 480-487, 2002.

SHUTTLEWORTH, C. W.; SANDERS, K. M.; KEEF, K. D. Inhibition of nitric oxide synthesis reveals non-cholinergic excitatory neurotransmission in the canine proximal colon. **British Journal of Pharmacology**, v. 109, n. 3, p. 739-747, 1993.

SIEGEL, I. M. Update on Duchenne muscular dystrophy. **Comprehensive Therapy**, v. 15, n. 3, p. 45-52, 1989.

SINGARAM, C.; SENGUPTA, A.; REICHELDERFER, M.; ROBBINS, J.; WINTER, H. S.; SUGARBAKER, D. J.; GOYAL, R. K. Nitrinergic and peptidergic innervations of human achalasia. **Journal Gastrointestinal Motility**, v. 5, p. 218, 1993.

SINGARAM, C.; SWEET, M. A.; GAUMNITZ, E. A.; CAMERON, A. J.; CAMILLERI, M. Peptidergic and nitrinergic denervation in congenital esophageal stenosis. **Gastroenterology**, v. 109, n. 1, p. 275-281, 1995.

SMITH, T. K.; FURNESS, J. B. Reflex changes in circular muscle activity elicited by stroking the mucosa: an electrophysiological analysis in the isolated guinea-pig ileum. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 25, n. 2-3, p. 205-218, 1988.

SMITH, A. D.; KORESKA, J.; MOSELEY, C. F. Progression of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 71, n. 7, p. 1066-1074, 1989.

SOMER, H.; DUBOWITZ, V.; DONNER, M. Creatine kinase isoenzymes in neuromuscular diseases. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 29, n. 2-4, p. 129-136, 1976.

SPENCE, A. P. **Anatomia humana básica**. 2. ed. São Paulo: Manole. 1991. 713 p.
STAIANO, A.; DEL GIUDICE, E.; ROMANO, A.; ANDREOTTI, M. R.; SANTORO, L.; MARSULLO, G.; RIPPA, P. G.; IOVINE, A.; SALVATORE, M. J. Upper gastrointestinal tract motility in children with progressive muscular dystrophy. **The Journal of Pediatrics**, v. 121, n. 5 Pt 1, p. 720-724, 1992.

STARK, M. E.; BAUER, A. J.; SARR, M. G.; SZURSZEWSKI, J. H. Nitric oxide mediates inhibitory nerve input in human and canine jejunum. **Gastroenterology**, v. 104, n. 2, p. 398-409, 1993.

TAKEUCHI, T.; FUJINAMI, K.; GOTO, H.; FUJITA, A.; TAKETO, M. M.; MANABE, T.; MATSUI, M.; HATA F. Roles of M2 and M4 muscarinic receptors in regulating acetylcholine release from myenteric neurons of mouse ileum. **Journal of Neurophysiology**, v. 93, n. 5, p. 2841-2848, 2005.

THOMAS, L. B.; JOSEPH, G. L.; ADKINS, T. D.; ANDRADE, F. H.; STEMPLE, J. C. Laryngeal muscles are spared in the dystrophin deficient *MDX* mouse. **Journal of Speech, Language, and Hearing Research: JSLHR**, v. 51, n. 3, p. 586-595, 2008.

TIMMERMANS, J. P.; HENS, J.; ADRIAENSEN, D. Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. **The Anatomical Record**, v. 262, n. 1, p. 71-78, 2001.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; CUMMINGS, J. F.; DE LAHUNTA, A. Canine X-linked muscular dystrophy: morphologic lesions. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 97, n. 1, p. 1-23, 1990.

VANDERWINDEN, J. M.; MAILLEUX, P.; SCHIFFMANN, S. N.; VANDERHAECHEN, J. J.; DE LAET, M. H. Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 8, p. 511-515, 1992.

VAN KRUININGEN, H. J. Sistema Gastrointestinal. In: CARLTON W. W.; MC GAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thompson**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 672 p.

VANNUCCHI, M. G.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S. Synapse formation during neuron differentiation: an in situ study of the myenteric plexus during murine embryonic life. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 425, n. 3, p. 369-381, 2000.

VOISIN, V.; DE LA PORTE, S. Therapeutic strategies for Duchenne and Becker dystrophies. **International Review of Cytology**, v. 240, p. 1-30, 2004.

VOIT, T.; PATEL, K.; DUNN, M. J.; DUBOWITZ, V.; STRONG, P. N. Distribution of dystrophin, nebulin and Ricinus communis I (RCA-I)-binding glycoprotein in tissues of normal and *MDX* mice. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 89, n. 2-3, p. 199-211, 1989.

WADE, P. R.; COWEN, T. Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. **Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 16, p. 19-23, 2004. Supplement, 1.

WAGNER, K. R. Approaching a new age in Duchenne muscular dystrophy treatment. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 5, n. 4, p. 583-591, 2008.

WAGNER, K. R.; LECHTZIN, N.; JUDGE, D. P. Current treatment of adult Duchenne muscular dystrophy. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1772, n. 2, p. 229-237, 2007.

WANG, F. B.; POWLEY, T. L. Topographic inventories of vagal afferents in gastrointestinal muscle. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 421, n. 3, p. 302-324, 2000.

WARD, S. M.; DALZIEL, H. H.; BRADLEY, M. E.; BUXTON, I. L.; KEEF, K.; WESTFALL, D. P.; SANDERS, K. M. Involvement of cyclic GMP in non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmission in dog proximal colon. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, n. 4, p. 1075-1082, 1992a.

WARD, S. M.; XUE, C.; SHUTTLEWORTH, C. W.; BREDT, D. S.; SNYDER, S. H.; SANDERS, K. M. NADPH diaphorase and nitric oxide synthase colocalization in enteric neurons of canine proximal colon. **The American Journal of Physiology**, v. 263, n. 2, pt. 1, p. G277-284, 1992b.

WASHABAU, R. J. Gastrointestinal motility disorders and gastrointestinal prokinetic therapy. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 33, n. 5, p. 1007-1028, vi, 2003.

WELLS, D. J.; WELLS, K. E. What do animal models have to tell us regarding Duchenne muscular dystrophy? **Acta Myologica: myopathies and cardiomyopathies**, v. 24, n. 3, p. 172-180, 2005.

WERTZ, K.; FÜCHTBAUER, E. M. Dmd (*MDX*-beta geo): a new allele for the mouse dystrophin gene. **Developmental Dynamics**: Official Publication of the American Association of Anatomists, v. 212, n. 2, p. 229-241, 1998.

WILLIAMS, P. L.; WARWICK, R.; DYSON, M.; BANNISTER, L. H. **Gray anatomy**. 37. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 1995. v. 1, 808 p.

WIXSON, S. K.; WHITE, W. J.; HUGHES JR., H. C.; LANG, C. M.; MARSHALL, W. K. A comparison of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam anesthesia in adult male rats. **Laboratory Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 726-730, 1987.

WÖRL, J.; MAYER, B.; NEUHUBER, W. L. Spatial relationships of enteric nerve fibers to vagal motor terminals and the sarcolemma in motor endplates of the rat esophagus: a confocal laser scanning and electron-microscopic study. **Cell and Tissue Research**, v. 287, n. 1, p. 113-118, 1997.

WU, M.; MAJEWSKI, M.; WOJTKIEWICZ, J.; ADRIAENSEN, D.; TIMMERMANS, J. P. Anatomical and neurochemical features of the extrinsic and intrinsic innervation of the striated muscle in the porcine esophagus: evidence for regional and species differences. **Cell and Tissue Research**, v. 311, n. 3, p. 289-297, 2003.

YIU, E. M.; KORNBERG, A. J. Duchenne muscular dystrophy. **Neurology India**, v. 56, n. 3, p. 236-247, 2008.

YOUNG, H. M.; NEWGREEN, D. Enteric neural crest-derived cells: origin, identification, migration, and differentiation. **The Anatomical Record**, v. 262, n. 1, p. 1-15, 2001.

ZHAO, W.; DHOOT, G. K. Both smooth and skeletal muscle precursors are present in foetal mouse oesophagus and they follow different differentiation pathways. **Developmental Dynamics**: Official Publication of the American Association of Anatomists, v. 218, n. 4, p. 587-602, 2000b.

ZHAO, W.; DHOOT, G. K. Development and composition of skeletal muscle fibres in mouse oesophagus. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 21, n. 5, p. 463-473, 2000a.

ZIMMERMAN, R. P.; GATES, T. S.; MANTYH, C. R.; VIGNA, S. R.; BOEHMER, C. G.; MANTYH P. W. Vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in the canine gastrointestinal tract. **Peptides**, v. 9, n. 6, p. 1241-1253, 1988.

ZUBRZYCKA-GAARN, E. E.; BULMAN, D. E.; KARPATI, G.; BURGHESE, A. H.; BELFALL, B.; KLAMUT, H. J.; TALBOT, J.; HODGES, R. S.; RAY, P. N.; WORTON, R. G. The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. **Nature**, v. 333, n. 6172, p. 466-469, 1988.

ZUCCONI, E.; VALADARES, M. C.; VIEIRA, N. M.; BUENO JR., C. R.; SECCO, M.; JAZEDJE, T.; DA SILVA, H. C.; VAINZOF, M.; ZATZ, M. Ringo: discordance between the molecular and clinical manifestation in a golden retriever muscular dystrophy dog. **Neuromuscular disorders: NMD**, v. 20, n. 1, p. 64-70, 2010.

Anexo A – Tabela de números randômicos

You are looking for a random number R fulfilling $1 \leq R \leq 57$.

1: Take the first unused digit in the first (unnumbered) blocks- and cross it out! (= 9)

2: In the block with that number read the unused digits in pairs until a pair fulfill the criterion. (= 26)

Cross out all read pairs. If the upper limit of the number you are looking for is $\Rightarrow 100$ you deal with triplets in stead, etc.

Random Numbers'

Random Numbers																																				
72137	73850	32733	35321	80647	39713	61060	57865	88049	20557	43375	50914	83628	73935	72502	48174	62551	96122	22375	96488	46596	51960	02957	56574	18672	02994	39960	02489	53079	72789	22562	39359	38220	13972	86115	17196	24569
04254	60099	50584	10961	57642	19101	30613	01549	96531	83936	45842	78222	88481	44933	12839	20750	47116	58973	99018	22769	52928	66296	15570	31407	54988	78749	16135	82797	31296	93268	10104	95616	82618	85756	51156	74037	12501
48083	50731	81250	57995	41467	29834	08059	22945	72193	36477	82577	16210	76092	87730	90049	02115	37096	20505	91937	69776	09403	50848	71088	31308	35477	49046	10870	72107	11550	61175	33345	56717	07896	74085	59866	03051	78702
16602	26772	80963	92558	38394	84119	68486	17622	30953	78267	31568	48727	58488	50436	88135	42726	54307	20170	13045	65527	30328	72163	66728	81091	52307	78952	60261	11207	73065	48286	57057	49472	95241	84360	13690	95736	43637
29910	55480	47184	79775	09779	08718	45822	17643	63252	00232	98059	01255	90786	95246	15280	61692	45137	17539	31799	64780	78797	57821	28410	64908	30432	78760	36880	02564	96978	62332	77321	92228	53849	26578	39954	86726	91039
77708	83761	89238	86521	82711	79266	47763	36183	65869	64355	97251	42925	98354	28005	69792	01480	51557	70726	35862	73597	72927	64599	61325	78068	25601	30038	78786	65197	65283	18169	72967	53031	37956	99501	27753		
90715	65115	12870	89922	24926	44062	94896	97561	96490	35454	51623	98381	11055	32521	28363	16451	67912	66404	76254	75495	07446	66408	19558	65191	11338	39231	72802	70630	87336	16385	32784	38073	87910	89260	66444	15979	83469
79656	48119	38525	82189	34921	49838	47558	92343	47408	99542	44247	12762	54488	74321	36224	95619	16238	25374	13653	25345	47870	54448	14158	83451	58729	42430	42234	04905	83274	75032	93544	10482	34277	40177	01081	57788	
53294	49761	76235	55814	29900	03796	73326	94291	10739	36087	32326	52225	72447	77804	57045	27552	72387	34001	83792	66784	35524	35508	49481	36478	30264	41771	61398	98154	61644	12405	45037	68034	98561	46747	30655	41878	
44422	78305	76369	20601	39701	80769	17322	78280	42376	64899	62390	68375	42021	28545	33167	85710	11035	40171	04840	69848	52704	71441	50581	65679	37597	17182	60733	11765	09293	70076	40751	95846	80277	92450	60888	18689	45966
12601	54432	60507	91131	50551	77477	80761	31834	32401	11994	79280	06633	24271	61364	22681	02880	53815	47479	44017	37563	19020	09899	08316	32781	89791	52148	09111	61205	77930	32391	69076	14539	59898	78185	60268	30360	36814
05664	73660	24710	25458	23699	86413	19985	49355	24358	02915	81553	92012	50435	73814	96290	86827	51430	45597	82296	28947	19442	94873	36976	30366	65815	66895	27222	17378	59359	09055	66780	54939	78369	04163	77673	73342	78915
18365	26772	80963	92558	38394	84119	68486	17622	30953	78267	31568	48727	58488	50436	88135	42726	54307	20170	13045	65527	30328	72163	66728	81091	52307	78952	60261	11207	73065	48286	57057	49472	95241	84360	13690	95736	43637
09011	53688	72030	60683	86104	90576	04110	65531	30304	39202	82101	82254	03369	03281	11613	96236	98297	48100	71594	52667	0101	85057	49389	81200	21678	18969	81863	82245	11538	61448	12405	45037	68034	98561	46747	30655	41878
02878	83197	94318	47901	85252	91124	32399	75043	40325	52525	18175	09457	83816	46392	02705	85591	33192	65127	80852	42030	51725	60283	84034	73148	36959	83719	47022	79038	66939	63329	93821	58095	62204	69131	00672	36037	
79920	22780	43100	83886	26378	66010	00020	80666	66861	17820	50756	80608	35695	72641	26306	76208	32532	22644	94653	18610	91045	62674	42684	32419	12825	58785	84563	62071	17799	96994	41635	52830	19700	98813	67019	00672	58959
97556	54260	42361	12741	56996	86413	19985	49355	24358	02915	81553	92012	50435	73814	96290	86827	51430	45597	82296	28947	19442	94873	36976	30366	65815	66895	27222	17378	59359	09055	66780	54939	78369	04163	77673	73342	78915
79435	52143	12322	12254	04314	98550	58315	78036	24355	85822	44424	88508	66190	74660	93206	92840	44833	81146	64606	62975	72334	88115	77848	38006	45600	02181	79261	49705	31491	25318	22586	72494	66685	05344	71633	68536	18786
93903	78220	09178	35676	58996	78675	11648	96220	54127	24804	24720	66501	74157	42246	41688	72835	87258	89384	11251	34329	88397	78035	06366	37342	62070	74459	62026	13032	14048	16304	11959	78584	72590	47283	44545	35611	98354
04758	50961	90230	72006	24268	77817	10524	60304	79352	31942	85419	93017	28087	78323	77109	56832	78400	24190	39798	85863	52118	65337	13461	18438	16099	57330	05018	92605	10316	07351	78020	86361	30286	06434	50229	09070	44848
53841	28758	34442	42983	25254	96336	16570	89358	36619	72838	10933	99964	13468	17211	48046	51122	26668	96750	11139	06275	37202	05623	23595	79747	59772	37141	63390	48093	02366	05407	08325	52046	87494	95585	25547	03500	45047
07626	78473	17708	59059	33584	52451	11575	55992	83228	38546	49559	71671	53603	24491	57570	90789	32932	67449	51155	43941	71637	80269	89743	94628	26784	17792	09214	53781	90102	25774	92525	32301	25923	76556	13274	39776	
40645	27008	16341	05870	42604	79286	08720	13175	89573	38051	39391	92039	71664	40219	97707	93975	66981	19556	24605	52169	35790	19603	31212	34419	34728	47391	93272	09887	34196	98251	62453	37703	70711	37921	54989	78828	60976
82666	14127	94390	07069	39152	10357	94612	56748	75428	28101	38543	54214	48928	32818	51963	87553	15094	29529	87305	01361	99087	72525	34402	50115	09825	54728	37514	24437	01316	04770	06534	17768	36086	05468	41631	95632	78154
60147	99378	58310	34655	48242	58656	30544	01860	08322	70476	44424	54227	28598	64422	23961	20359	48577	05971	92373	22765	89768	36608	94608	92137	79809	81934	06370	18703	90858	55130	40869	88243	37403	42231	17073	49097	54147
61557	43927	11643	65225	76712	95782	34956	67384	47654	64999	11468	74149	81386	94127	48046	51122	26668	96750	11139	06275	37202	05623	23595	79747	59772	37141	63390	48093	02366	05407	08325	52046	87494	95585	25547	03500	45047
07626	78473	17708	59059	33584	52451	11575	55992	83228	38546	49559	71671	53603	24491	57570	90789	32932	67449	51155	43941	71637	80269	89743	94628	26784	17792	09214	53781	90102	25774	92525	32301	25923	76556	13274	39776	
40645	27008	16341	05870	42604	79286	08720	13175	89573	38051	39391	92039	71664	40219	97707	93975	66981	19556	24605	52169	35790	19603	31212	34419	34728	47391	93272	09887	34196	98251	62453	37703	70711	37921	54989	78828	60976
82666	14127	94390	07069	39152	10357	94612	56748	75428	28101	38543	54214	48928	32818	51963	87553	15094	29529	87305	01361	99087	72525	34402	50115	09825	54728	37514	24437	01316	04770	06534	17768	36086	05468	41631	95632	78154
60147	99378	58310	34655	48242	58656	30544	01860	08322	70476	44424	54227	28598	64422	23961	20359	48577	05971	92373	22765	89768	36608	94608	92137	79809	81934	06370	18703	90858	55130	40869	88243	37403	42231	17073	49097	54147
61557	43927																																			