BÁRBARA TAVARES SCHÄFER

**Estudo do plexo mioentérico do cólon descendente de cães acometidos
pela distrofia muscular (GRMD)**

São Paulo
2014

BÁRBARA TAVARES SCHÄFER

**Estudo do plexo mioentérico do cólon descendente de cães acometidos
pela distrofia muscular (GRMD)**

Dissertação 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 Mestre em
Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Patrícia Castelucci

São Paulo
2014

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.2992
FMVZ

Schäfer, Bárbara Tavares

Estudo do plexo mioentérico do cólon descendente de cães acometidos pela distrofia muscular (GRMD) / Bárbara Tavares Schäfer. -- 2014.
48 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profª. Drª. Patrícia Castelucci.

1. Sistema nervoso entérico. 2. Golden Retriever. 3. Cão. 4. Imunohistoquímica. 5. Intestino grosso.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo do plexo mioentérico do cólon descendente de cães acometidos pela distrofia muscular (GRMD)", protocolado sob o nº 2701/2012, utilizando 10 (dez) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Patrícia Castelucci, 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 15/8/2012.

We certify that the Research "Study of the myenteric plexus of the descending colon of dogs affected by muscular dystrophy (GRMD)", protocol number 2701/2012, utilizing 10 (ten) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Patrícia Castelucci, 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 8/15/2012.

São Paulo, 9 de junho de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SCHÄFER, Bárbara Tavares

Título: Estudo do plexo mioentérico do cólon descendente de cães acometidos pela distrofia muscular (GRMD)

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À Deus, por provar a minha força diante dos momentos difíceis e por sua presença constante;

Aos meus pais Zilda Tavares e Paulo Schäfer e minha irmã Jaqueline, meus maiores exemplos de simplicidade e humildade, meus primeiros professores, minha base e meus amores;

Ao prof. Althen Teixeira Filho ou simplesmente Althen, por ter me apresentado pela primeira vez o Sistema Nervoso Entérico, por me ensinar a dissecar, por todo o estímulo e dedicação, por sempre estar ao meu lado, me escutar e ser o meu ombro amigo, por seres um exemplo pra mim e o melhor anatomista! Por me dares ânimo e não me deixar cair, pelos infinitos conselhos, por todas as risadas e por seres essa pessoa tão especial. Pelas ajudas nos trabalhos e traduções dos artigos em alemão. Tem uma citação de Albert Einstein que te descreve perfeitamente: A tarefa essencial do professor é despertar a alegria de trabalhar e de conhecer. Enfim, faltam palavras.. obrigada por tudo!;

À profª. Patrícia Castelucci, por ser uma orientadora presente e por abrir as portas do laboratório para que eu pudesse aprender mais sobre o sistema nervoso entérico;

Ao prof. Ii-Sei Watanabe, pelas orientações e verdadeiras aulas durante o preparo e análises dos materiais de microscopia eletrônica;

À profª. Maria Angélica Miglino e ao setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pela confiança depositada ao ser aceita como aluna deste programa;

Às amigas e colegas de laboratório Cristina Eusébio, Kelly Palombit e Mariana Póvoa, pela amizade, apoio, cumplicidade, muitos risos e pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Juntas formamos o quarteto (mais que fantástico, sarado ou ainda bucho)!;

À amiga e nova colega de laboratório Maria Brito pelos cafézinhos e “deliciosos, nutritivos e saudáveis” bolinhos integrais feitos com “açúcar mascavo, uvas passas e muitas fibras”;

Ao amigo Diego Cury pela ajuda com a microscopia eletrônica, pelas conversas divertidas, por todos os programas instalados no computador (sem eles as pranchas deste trabalho não existiriam) e pelas revigorantes sonecas em palestras pós almoços;

Às famílias Orlandin e Patriota, por me acolherem no início desta jornada, em especial à Jéssica Orlandin pela garra que vem demonstrando nos últimos meses... Tenho certeza que vais superar essa fase, és um exemplo e tenho um orgulho enorme de ti!

Aos meus amados cães do canil GRMD: Bis, Teco, Lola, Nemo, Choquito, Gaspar, Totó, Liz, Mostra, Mogli, Geninha, Balu, Zezinho, Bela, Akira, Laika, Kissara, Gucci, Angel, Prada, Primavera, Flora, Fauna, Tatu, Dandara, Érica, Pandora, Keiti, Cindy, Kiara, Cláudia, Mousse, Vanderléia, Ana Maria, Suspiro, Sonho, Rapadura, Cocada,

Jujuba e Carolina. Agradeço por cada lambida, cada empurrão, cada olhar, pela companhia... é um sonho ver todos saudáveis e em lares confortáveis e cheio de amor. Tenho muita saudade dos que já partiram;

Aos sensacionais mascotes do CRUSP: Princesa, Paulo, Paula, Tarsila, John Lennon, Paul McCartney, Chicão, Milu, Zóinho, Jade, Hiena, Yoko... alguns já partiram, mas amo todos! Meus companheiros do dia-a-dia, curam a tristeza somente com a presença! Ser recebida diariamente com esses rabinhos abanando é um dádiva!;

Aos meus filhos peludos que ficaram em Pelotas/RS por sempre me receberem com tanta alegria e amor e por sempre me aquecerem no inverno. Sinto tanta falta!;

Ao Abel e à Tracy, afinal não é todo o dia que se encontra um coelho ou um filhote de pombinha rola na rua e se cria num quarto. Meus fiéis companheiros, cada um com suas peculiaridades, me conquistaram e muito me ensinaram! Agradeço também pela confiança, amor e por serem sempre tão pontuais na hora de me acordar pedindo comida, são os despertadores mais especiais!;

À toda equipe do canil GRMD, por todo carinho e cuidados destinados aos cães.

Aos técnicos do ICB: Marta Maria da Silva Righetti, Sônia Regina Yokomizo, Kelly Patrícia Nery Borges, Sebastião Aparecido Boleta. Agradeço pela ajuda no processamento dos materiais de histologia e transmissão e pela recepção sempre calorosa e divertida;

À esteticista Rosana Prisco por me ajudar com tantos números, mas principalmente por sempre me receber com uma boa conversa e muitas risadas deixando o trabalho mais leve;

Aos técnicos e funcionários da Anatomia Animal: Ronaldo Agostinho, Rose Eli Ricci, Jaqueline Santana, Maicon Barbosa e Edinaldo (Índio), por me ajudarem com os experimentos, disciplinas e pela ajuda burocrática;

Aos amigos Aline Ambrogi, Camila Machado, Diego Leão e Billy, pela convivência durante 3 agradáveis meses;

Ao Departamento de Patologia da FMVZ/USP pela contribuição no fornecimento de material;

Às bibliotecárias Neusa Kazue Habe, Elza Maria Rosa Bernardo Faquim, Stela do Nascimento Madruga, Sandra Regina Ponte da Costa Salles Toledo pelas orientações durante a escrita desta dissertação e pela correção;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

“Ah sim, os animais têm alma e valem pelos melhores amigos”

Chico Xavier

RESUMO

SCHÄFER, B. T. **Estudo do plexo mioentérico do cólon descendente de cães acometidos pela distrofia muscular (GRMD)**. [Study of the myenteric plexus of the descending colon of dogs affected by Muscular Dystrophy (GRMD)]. 2014. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014.

A distrofia muscular do Golden Retriever é uma doença degenerativa de caráter hereditário com alterações musculares semelhantes às descritas na distrofia muscular de Duchenne, sendo comprovada a existência de alterações na musculatura lisa do trato gastrointestinal destes animais. Alguns autores sugerem que um dos fatores responsáveis por essas alterações possa estar relacionado com a motilidade intestinal. Este trabalho tem como objetivo estudar os neurônios nitrérgicos e colinérgicos, além da expressão do receptor P2X7, no plexo mioentérico do cólon descendente de cães afetados e não afetados pela distrofia muscular. Foram utilizadas técnicas de imunohistoquímica para marcação das enzimas Óxido Nítrico Sintase (NOS) e Acetilcolina Transferase (ChAT) e da população neuronal total pelo HuC/D e analisada a presença do receptor P2X7. Também foram utilizadas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e histologia básica. Os resultados indicam que neurônios nitrérgicos tendem a ser maiores em cães distróficos e apresentam morfologia Dogiel tipo I; neurônios que expressam o receptor P2X7 colocalizam com neurônios nitrérgicos e colinérgicos. As análises qualitativas demonstram que cães distróficos apresentam maior quantidade de colágeno entre as fibras musculares, entre as camadas musculares circular e longitudinal e, ainda, no interior dos gânglios mioentéricos. Este estudo fornece base para futuras pesquisas e tratamentos da distrofia muscular do Golden Retriever e mais futuramente da Distrofia Muscular de Duchenne, além de poder auxiliar no entendimento das desordens gastrointestinais que são observadas nesta última.

Palavras-chave: Sistema nervoso entérico. Golden Retriever. Cão. Imunohistoquímica. Intestino grosso

ABSTRACT

SCHÄFER, B. T. **Study of the myenteric plexus of the descending colon of dogs affected by Muscular Dystrophy (GRMD).** [Estudo do plexo mioentérico do cólon descendente de cães acometidos pela distrofia muscular (GRMD)]. 2014. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014.

The golden retriever muscular dystrophy is a hereditary degenerative disease characterized by muscle changes similar to those described in Duchenne muscular dystrophy, as well as by alterations in the smooth muscles of the gastrointestinal tract. Some authors suggest that these abnormalities may be associated with intestinal motility. This study evaluated nitrergic and cholinergic neurons in the myenteric plexus of the descending colon of dogs with and without muscular dystrophy, in addition to P2X7 receptor expression. Immunohistochemical techniques were used to label nitric oxide synthase (NOS) and acetylcholine transferase (ChAT), as well as to label total HuC/D-immunoreactive neurons and neurons containing the P2X7 receptor. Transmission electron microscopy and basic histology were used for analysis. Results showed that nitrergic neurons tend to be larger in dystrophic dogs and to be characterized by Dogiel type I morphology, and neurons that express the P2X7 receptor colocalize with nitrergic and cholinergic neurons. Transmission and light microscopy revealed higher collagen density between muscle fibers, between circular and longitudinal muscle layers and within myenteric ganglia of affected dogs. These findings provide support for future research and treatment of the golden retriever muscular dystrophy and hence of the Duchenne muscular dystrophy and contribute to the understanding of the gastrointestinal disorders found in these patients.

Keywords: Enteric nervous system. Golden Retriever. Dog. Immunohistochemistry. Large intestine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Triplas marcações de neurônios NOS-ir/ ChAT-ir com HuC/D-ir e DAPI no plexo mioentérico do cólon descendente de cães controles e distróficos	25
Figura 2 - Triplas marcações de neurônios NOS-ir/ ChAT-ir com P2X7-ir e DAPI no plexo mioentérico do cólon descendente de cães controles e distróficos	26
Figura 3 - Triplas marcações de fibras nervosas NOS-ir/ ChAT-ir com P2X7-ir e DAPI no plexo mioentérico do cólon descendente de cães controles e distróficos	28
Figura 4 - Análise histológica do plexo mioentérico do cólon descendente de cães controles e distróficos usando as colorações de Hematoxilina-Eosina, Tricrômico de Masson e Picrosírius	30
Figura 5 - Microscopia eletrônica de transmissão em cólon descendente de cães controles	31
Figura 6 - Microscopia eletrônica de transmissão em cólon descendente de cães distróficos	32
Figura 7 - Área do perfil neuronal em μm^2 (A, B, C), $D_{\text{máx}}$ (μm) (A', B', C') e $D_{\text{mín}}$ (μm) (A'', B'', C'') dos neurônios NOS-ir (A – A'), ChAT-ir (B – B'') e HuC/D (C – C'') do plexo mioentérico do cólon descendente de cães controles e distróficos	34
Figura 8 - Número de neurônios por gânglio (A, B, C), área gangliônica em mm^2 (A', B', C') e densidade neuronal/ mm^2 de área gangliônica (A'', B'', C'') dos neurônios NOS-ir (A – A''), ChAT-ir (B – B'') e HuC/D (C – C'') do plexo mioentérico do cólon descendente de cães controles e distróficos.....	36
Figura 9 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2), dos neurônios NOS-ir (A), ChAT-ir (B) e HuC/D-ir (C) no cólon descendente de cães dos grupos Controle e Distrófico	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados dos animais utilizados no experimento.....	18
Tabela 2 - Características dos anticorpos primários	20
Tabela 3 - Características dos anticorpos secundários.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus Celsius

µm - Micrômetros

µm² - Micrômetros quadrados

ChAT - Acetilcolina Transferase

CT - Controle

DAPI - 2,6-diamino-2-fenilindole dicloridrato

DMáx - Diâmetro máximo

DMD - Distrofia Muscular de Duchenne

DMín - Diâmetro mínimo

DMSO - Dimetilsulfóxido

DT - Distrófico

FMVZ - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

GRMD - Distrofia Muscular do Golden Retriever

HE - Hematoxilina-Eosina

Ir - Imunorreativo

NO - Óxido Nítrico

NOS - Óxido Nítrico Sintase

PBS - Tampão Salina Fosfato

pH - Potencial Hidrogeniônico

PM - Plexo Mioentérico

SNA - Sistema Nervoso Autônomo

SNC - Sistema Nervoso Central

SNE - Sistema Nervoso Entérico

TGI - Trato Gastrointestinal

USP - Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 MATERIAL E MÉTODO	17
2.1 MATERIAL.....	18
2.2 MÉTODO DE IMUNOHISTOQUÍMICA POR FLUORESCÊNCIA	19
2.3 MÉTODO DE HISTOLOGIA.....	20
2.4 MÉTODO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	21
2.5 ANÁLISES QUANTITATIVAS.....	21
3 RESULTADOS	23
3.1 ANÁLISES QUALITATIVAS.....	24
3.1.1 Análise imunohistoquímica	24
3.1.2 Análise histológica	29
3.1.3 Análise ultraestrutural	29
3.2 ANÁLISES QUANTITATIVAS.....	33
4 DISCUSSÃO	39
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso entérico (SNE) está presente no trato gastrointestinal (TGI), desde o esôfago até o esfíncter anal externo, inclusive na vesícula biliar, ducto cístico, ducto biliar comum e pâncreas. Este extenso e diferenciado SNE é didaticamente considerado como uma porção do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) e contém todos os neurônios sensoriais, motores e interneurônios necessários à função gastrointestinal (KRAMMER et al., 1997). O SNE possui diversas funções e dentre estas estão o controle da motilidade gastrointestinal, regulação do transporte de fluidos através da mucosa, controle da secreção ácida estomacal, controle do fluxo sanguíneo e interação entre os sistemas endócrino e imune do intestino (FURNESS, 2012). O SNE do trato digestório tubular é composto por redes interconectadas, ou plexos, de neurônios e seus axônios e células gliais entéricas. Nos intestinos delgado e grosso, grande parte destas células são encontradas nos gânglios dos plexos mioentérico (de Auerbach) e submucoso (de Meissner). Os axônios que partem desses neurônios se direcionam para outros gânglios, camadas mucosa e musculares e tecidos de outros órgãos digestórios (FURNESS, 2006). O SNE é um “cérebro integrativo” com uma coleção de neurônios no TGI, e é capaz de funcionar independentemente do sistema nervoso central (SNC) (ALTAF; SOOD, 2008). Através de estudos farmacológicos foram caracterizados, por combinações histoquímica e imunohistoquímica específicas para marcadores neuronais, os neurônios inibitórios e excitatórios, estes marcados através das enzimas Óxido Nítrico Sintase (NOS) e Acetilcolina Transferase (ChAT) (FURNESS, 2006). Além disso, foi constatada a presença dos receptores P2X os quais são ativados pela Adenosina Trifosfato (ATP) (VULCHANOVA et al., 1996).

A distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD) é uma doença degenerativa de caráter hereditário com alterações musculares semelhantes às descritas na distrofia muscular de Duchenne (DMD) em humanos, sendo a forma mais grave e de evolução mais rápida dentre as miopatias hereditárias (NELSON et al., 2009). A DMD é uma desordem recessiva ligada ao cromossomo X na qual ocorre progressiva degeneração das musculaturas esquelética e cardíaca, devido à perda de distrofina. Cães afetados apresentam um fenótipo mais grave, se comparado aos humanos afetados pela DMD, possibilitando assim que possamos prever melhor tanto o curso quanto a eficácia do tratamento da DMD (KORNEGAY et al., 2012). Os autores Miyazato et al. (2011)

demonstraram que todos os modelos GRMD apresentaram alterações na musculatura lisa do TGI, a qual apresentou perda da organização das fibras e aumento na quantidade de tecido conjuntivo, com danos mais severos na musculatura gástrica quando comparado ao intestino. Alguns dos sintomas gastrointestinais descritos para humanos incluem motilidade gástrica aumentada, disfagia e vômitos (BOLAND et al., 1996) além de inchaço e constipação (MULÈ; AMATO; SERIO, 2010). Em camundongos *mdx*, outro exemplo de modelo animal para estudo da distrofia muscular, ocorre uma redução tanto no trânsito gastrointestinal quanto na excreção fecal, comprovando que há um comprometimento da função motora intestinal (MULÈ; AMATO; SERIO, 2010). Silveira (2013) demonstrou no íleo de cães distróficos alteração nos neurônios entéricos tanto na área dos perfis neuronais quanto na densidade de neurônios por gânglio. Segundo Mulè, Amato e Serio (2010), a motilidade do cólon, o que pode ser um fator responsável pela constipação em pacientes com DMD, não foi ainda estudada. Esta constipação tem na verdade sido associada com a fraqueza da musculatura abdominal.

Portanto, este trabalho tem como objetivo estudar os neurônios do plexo mioentérico do cólon descendente de cães afetados e não afetados pela distrofia muscular através da imunorreatividade neuronal à NOS, à ChAT, ao pan-neuronal HuC/D e ao receptor P2X7, além de análise histológica e ultraestrutural dos gânglios mioentéricos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Foram utilizados cães adultos com diferentes raças, idades, pesos e sexos (Tabela 1) de acordo com a casuística de óbitos. Os animais controles foram provenientes de necropsias realizadas no Departamento de Patologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) e os animais distróficos foram obtidos no canil Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) Brasil, do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres do Departamento de Cirurgia (FMVZ/ USP). Como critério para coleta, os animais controles estudados não apresentavam alterações gastrointestinais, todas as amostras foram coletadas após óbito espontâneo ou eutanásia dos animais devido à presença de doenças debilitantes. Este estudo foi desenvolvido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no uso de animais da FMVZ (protocolo nº 2701/2012) e Instituto de Ciências Biomédicas (protocolo nº 013/13) da USP.

Tabela 1 - Dados dos animais utilizados no experimento

Animal	Causa do óbito	Idade	Peso	Sexo	Raça
Controles					
CT#2	Doença Renal Crônica	11 anos	7 Kg	Macho	Schnauzer
CT#5	Broncopneumonia	12 anos	28Kg	Macho	Labrador Retriever
CT#7	Insuficiência Cardíaca	10 anos	22 Kg	Fêmea	Golden Retriever
CT#9	Carcinoma Nasal	14 anos	21 Kg	Macho	Golden Retriever
CT #10	Insuficiência Renal (eutanásia)	12 anos	20,6 Kg	Fêmea	SRD
Distróficos					
DT#N	Pneumonia (eutanásia)	1A6M	10 Kg	Macho	Golden Retriever
DT#C	Insuficiência Cardíaca	6 anos	21,8 Kg	Macho	Golden Retriever
DT#T	Evolução da doença (eutanásia)	2A3M	15 Kg	Macho	Golden Retriever
DT#G	Insuficiência Cardíaca	5A7M	16,8 Kg	Macho	Golden Retriever
DT#B	Gastroenterite	2A3M	12,90 Kg	Fêmea	Golden Retriever

Fonte: SCHÄFER, B. T. (2014)

2.2 MÉTODO DE IMUNOHISTOQUÍMICA POR FLUORESCÊNCIA

Os cólons descendentes dos animais foram imersos em Tampão Salina Fosfato (PBS 0,15 M NaCl 0,01 M tampão fosfato de sódio, pH 7,1 - 7,2) imediatamente após a coleta. Os segmentos foram lavados com PBS e abertos ao longo do bordo mesentérico, colocados em balsas de madeira com a mucosa para baixo e esticados com uso de alfinetes. Após, foram imersos no fixador com 4% de paraformaldeído em tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 7,3 à 4 °C durante 24 horas. No dia seguinte os tecidos foram retirados do fixador e lavados 3 vezes em PBS durante 10 minutos por lavagem. Após, foram armazenados em PBS contendo Sódio-Azida (0,1%), à 4 °C, para sua conservação. Os tecidos foram dissecados para a remoção da mucosa, submucosa e camada muscular circular. A serosa, juntamente com parcela da camada muscular longitudinal, foram também retiradas com o intuito de reduzir a espessura do tecido. Por fim, obtivemos o preparado de membrana composto pelo plexo mioentérico e uma fina camada de musculatura longitudinal. As amostras foram clareadas, com 3 lavagens de 10 minutos cada, em Dimetilsulfóxido (DMSO) 100%, seguido por 3 lavagens de 10 minutos cada em PBS.

Os preparados de membrana foram pré-incubados em 10% de solução de Soro Normal de Cavalo em 1,5% de Triton-X (Sigma) em PBS, por 45 minutos, em temperatura ambiente. Após, foram incubadas em anticorpos primários (Tabela 2) e permaneceram por 48 horas, à 4 °C. Foram realizadas duplas e triplas marcações do plexo mioentérico com uso destes anticorpos primários. Passadas 48 horas, os tecidos foram novamente submetidos a lavagem em PBS (3 vezes de 10 minutos cada) e incubados em anticorpos secundários (Tabela 3), por 1 hora, em temperatura ambiente, com posterior lavagem em PBS (3 vezes de 10 minutos cada). Por fim, os tecidos foram imersos por 5 minutos em 2,6-diamino-2-fenilindole dicloridrato (DAPI) para marcação dos núcleos de todas as células. Durante este passo, deve-se manter o tecido em câmara escura e, após este tempo, o tecido deve ser novamente lavado com PBS (3 vezes de 5 minutos cada). Os preparados de membrana foram montados em lâmina com Glicerol tamponado com 0,5 M tampão carbonato de cálcio (pH 8,6). As análises qualitativas de imunohistoquímica dos neurônios imunorreativos (ir) à NOS, à ChAT, ao anti-HuC/D e ao receptor P2X7 foram realizados em microscópio de fluorescência Nikon 80. As imagens foram capturadas pelo programa NIS Elements (Nikon). As preparações

também foram analisadas pelo microscópio Confocal de Varredura a Laser Olympus Fluorview FV10SW.

Tabela 2 - Características dos anticorpos primários

Antígeno	Hospedeiro	Diluição	Referência
NOS	Carneiro	1:2000	EMSO
ChAT	Cabra	1:200	Chemicon
Anti-HuC/D	Camundongo	1:200	Molecular Probes
Receptor P2X7	Coelho	1:300	Chemicon/ Millipore

Fonte: SCHÄFER, B. T. (2014)

Tabela 3 - Características dos anticorpos secundários

Anticorpo	Diluição	Referência
Burro anti-carneiro IgG 594	1:100	Molecular Probes
Burro anti-carneiro IgG 488	1:400	Molecular Probes
Burro anti-camundongo IgG 594	1:200	Molecular Probes
Cabra anti-camundongo IgG 488	1:200	Molecular Probes
Burro anti-coelho IgG 488	1:500	Molecular Probes

Fonte: SCHÄFER, B. T. (2014)

2.3 MÉTODO DE HISTOLOGIA

Para análise histológica foram coletados segmentos dos cólons descendentes de 3 cães de cada grupo. Os tecidos foram lavados com PBS, abertos pelo bordo mesentérico, colocados em balsas de madeira e fixados em paraformaldeído a 4% por 48 horas. Os tecidos foram desidratados através de passagem por uma série de concentrações crescentes de álcoois, após foram diafanizados em séries de xilóis e incluídos em parafina. Após, os tecidos foram cortados transversalmente em micrótomo, com uma espessura de 5 μ m e corados pelos métodos de Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Masson e Picrosirius, estes dois últimos para análise de fibras colágenas. As imagens foram obtidas pelo microscópio de fluorescência Nikon 80i e programa NIS Elements (Nikon).

2.4 MÉTODO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Foram coletados pequenos fragmentos de 3 mm², colocados em PBS inicialmente e após fixados em glutaraldeído a 2,5%, a 4 °C por dois dias. O material passou por 3 lavagens em PBS, e foi pós fixado com Tetróxido de Ósmio a 1% por 2 horas a 4 °C. Foram realizadas 3 lavagens com solução salina a 0,9%. O tecido foi colocado em Uranila a 5% por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. Após, foi efetuada desidratação em série crescente de álcoois por 10 minutos cada. Em seguida, o material foi imerso em Óxido de Propileno, duas vezes de 10 minutos cada. As amostras foram colocadas em Resina Spurr com Óxido de Propileno por 40 minutos (proporção de 1:1). Após, o tecido foi imerso nessa solução na proporção de 3:1 por 1 hora e 30 minutos, estas duas últimas etapas em misturador rotatório. Finalmente as amostras foram colocadas em resina pura pelo período de 24 horas. No dia seguinte, foi realizada a inclusão do material em Resina Spurr em moldes de silicone, que foram mantidos por 3 dias em estufa a 60 °C. O corte semi-fino foi feito em ultra micrótomo Leica Ultracut UCT com 400nm de espessura e o material foi corado com Azul de Toluidina 1% para a observação dos gânglios mioentéricos em microscópio óptico. Foi realizada nova trimagem para corte ultra fino com 60 nm. Os cortes foram coletados em telas de cobre de 200 “mesh”, contrastados com acetato de uranila por 10 minutos e citrato de chumbo por 8 minutos (REYNOLDS, 1963) e examinados em microscópio eletrônico de transmissão Morgagni 265 (WATANABE; YAMADA, 1983).

2.5 ANÁLISES QUANTITATIVAS

Para as análises quantitativas utilizou-se 4 animais de cada grupo com marcações imunohistoquímicas simples para NOS, ChAT e HuC/D. As análises foram feitas em microscópio de fluorescência Nikon 80i acoplado aos filtros para discriminar o fluoróforo 594 ou 488 e as imagens foram obtidas através do programa NIS Elements (Nikon). Para a obtenção da área do perfil neuronal do corpo celular (μm²), diâmetro máximo (DMáx - μm) e diâmetro mínimo (DMín - μm), foram fotografados 50 neurônios de cada animal dos grupos Controle e Ditrófico para cada uma das 3

marcações. As mensurações foram feitas no programa Image-Pro Plus 4.1.0.0. Para obtenção das densidades neuronais (número de neurônios / mm^2 de área gangliônica) foram identificados e fotografados 10 gânglios, sob a objetiva de 10x, de cada animal para cada uma das 3 marcações (HOFF et al., 2008; SILVEIRA, 2013). Após, realizou-se a contagem do número de neurônios por gânglio, no aumento de 40x. Para a obtenção da área gangliônica (mm^2) utilizou-se o programa Image J 1.48.

A análise estatística foi realizada comparando os grupos Distrófico e Controle, verificando as variáveis da área do perfil neuronal, DMáx, DMín, área gangliônica, número de neurônios/ gânglio e densidades neuronais. Os dados foram comparados estatisticamente através da análise de T-Student, com nível de significância $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Nesta seção estão descritos os resultados obtidos considerando análises qualitativas e quantitativas.

3.1 ANÁLISES QUALITATIVAS

As análises qualitativas compreendem os experimentos de imuno-histoquímica, histológica e ultraestrutural que são descritos a seguir:

3.1.1 Análise imunohistoquímica

Na marcação com a NOS foi possível identificar muitos neurônios com a morfologia Dogiel tipo I e que, aparentemente, alguns cães distróficos apresentavam neurônios maiores, com relação a alguns cães controles. Os neurônios NOS-ir não estavam presentes em grande quantidade nos gânglios e podem estar tanto aglomerados, quanto dispersos nestes (Figuras 1 e 2).

Na marcação com a ChAT, para ambos os grupos, observou-se uma grande quantidade de neurônios ChAT-ir. Observou-se neurônios de tamanhos e formatos variados. A marcação dos neurônios colinérgicos não foi tão nítida quanto a marcação de nitrérgicos. Também houve marcação das fibras musculares da camada longitudinal o que dificultou a visualização neuronal (Figuras 1 e 2).

A imunomarcação com HuC/D demonstrou muitos neurônios marcados dentro do gânglio. Observou-se muitos neurônios por gânglio e bem distribuídos dentro deste, (Figura 1).

Nas três marcações já citadas foram localizados neurônios fora dos gânglios e marcação de fibras nervosas.

Figura 1 - Triplas marcações de neurônios NOS-ir/ ChAT-ir com HuC/D-ir e DAPI no plexo mioentérico do cólon descendente de cães controles (CT) e distróficos (DT)

Fonte: SCHÄFER, B. T. (2014)

Legenda: Neurônios imunorreativos à NOS (A e B), à ChAT (C e D) e ao pan-neuronal HuC/D (A' - D') no plexo mioentérico do cólon descendente de cães controles (A-A''' e C-C''') e distróficos (B-B''' e D-D'''). As setas indicam neurônios NOS-ir ou ChAT-ir que colocalizam com neurônios HuC/D-ir. Os núcleos das células estão marcados com DAPI (A''-D''). (Barra: 20 μ m).

Figura 2 - Triplas marcações de neurônios NOS-ir/ ChAT-ir com P2X7-ir e DAPI no plexo mioentérico do cólon descendente de cães controles e distróficos

Fonte: SCHÄFER, B. T. (2014)

Legenda: Neurônios imunorreativos à NOS (A e B), à ChAT (C e D) e P2X7 (A' - D') no plexo mioentérico do cólon descendente de cães controles (A-A''' e C-C''') e distróficos (B-B''' e D-D'''). As setas indicam neurônios NOS-ir ou ChAT-ir que colocalizam com neurônios P2X7-ir. Os asteriscos indicam neurônio NOS-ir que não colocaliza com P2X7. Os núcleos das células estão marcados com DAPI (A''-D''). (Barra: 20 μ m).

Foi observado a imunomarcção do receptor P2X7 nos neurônios do plexo mioentérico. Houve colocalização do receptor P2X7 tanto com neurônios nitrérgicos quanto com colinérgicos, porém na tripla marcação com NOS e DAPI observou-se que muitos neurônios não colocalizavam, já na tripla marcação com ChAT foi visto que a grande maioria dos neurônios P2X7-ir colocalizava com neurônios ChAT-ir (Figura 2). Observou-se também que fibras nervosas imunorreativas à NOS e ChAT colocalizam com o receptor P2X7 e, assim como visto nos neurônios, percebe-se que fibras colinérgicas colocalizam em maior quantidade com as purinérgicas, provavelmente por estas primeiras estarem em maior quantidade no tecido (Figura 3).

Figura 3 - Triplas marcações de fibras nervosas NOS-ir/ ChAT-ir com P2X7-ir e DAPI no plexo mioentérico do cólon descendente de cães controles e distróficos

Fonte: SCHÄFER, B. T. (2014)

Legenda: Fibras nervosas imunorreativas à NOS (A e B), à ChAT (C e D) e P2X7 (A' - D') no plexo mioentérico do cólon descendente de cães controles (A-A''' e C-C''') e distróficos (B-B''' e D-D'''). As setas indicam fibras nervosas NOS-ir ou ChAT-ir que colocalizam com fibras nervosas P2X7-ir. Os núcleos das células musculares adjacentes estão marcados com DAPI (A''-D''). (Barra: 20 μm).

3.1.2 Análise histológica

Na análise histológica pela coloração de HE foi observada a diferença na espessura das camadas musculares circular e longitudinal, estas são bem mais delgadas em animais distróficos. Em alguns pontos, cães distróficos parecem ter a submucosa nitidamente mais espessa do que em cães controles. Nos gânglios mioentéricos de cães distróficos foi visível um conjunto de fibras de tecido conjuntivo que adentra nos mesmos (Figura 4B, E). Na análise dos cortes corados pela técnica de Tricrômico de Masson, indicada para evidenciar colágeno e tecido muscular, foi possível confirmar a presença de fibras colágenas intraganglionares que estão em maior quantidade nos cães distróficos, formando uma malha que se destaca, já nos cães controles esta organização é mais tênue (Figura 4I, J, M, N). Na coloração de Picrosírius, indicada também para visualização de fibras colágenas, observa-se um aparente equilíbrio na concentração entre fibras colágenas dos tipos I e III localizadas principalmente na submucosa; quantidade considerável de colágeno foi identificada também ao redor dos gânglios dos animais distróficos, confirmando o que foi visto nas técnicas de HE e Tricrômico de Masson (Figura 4C, D, G, H, K, L, O, P).

3.1.3 Análise ultraestrutural

Na análise da microscopia eletrônica de transmissão identificou-se, em ambos os grupos, fibras musculares lisas do cólon descendente, neurônios e fibras amielínicas. Na análise das fibras musculares observou-se que cães controles apresentavam menor quantidade de fibras colágenas adjacentes, as células musculares lisas eram mais justapostas se comparadas com cães distróficos (Figuras 5A, 6A). Em um corte transversal destas fibras notou-se que o núcleo apresenta-se arredondado e com contornos regulares além da presença de mitocôndrias de diversos tamanhos no citoplasma, num corte longitudinal constatou-se que o núcleo era alongado acompanhando o eixo maior da fibra (Figura 6B). Os neurônios foram identificados através de seus grandes e arredondados núcleos que correspondem a grande parcela da célula; ao redor destes foram identificadas fibras musculares e colágenas (Figuras 5C,

6C). Cavéolas foram observadas nas regiões de junções intercelulares das células musculares, num aspecto semelhante a um cacho de uva (Figuras 5D, 6D). Fibras amielínicas foram identificadas em grande quantidade nas regiões analisadas do plexo mioentérico, estando sempre em íntima relação também com as fibras musculares e colágenas; no interior destas foi possível reconhecer principalmente grânulos eletrodensos e vesículas responsáveis pelo armazenamento de neurotransmissores (Figuras 5E, 5F, 6E, 6F).

Figura 4 - Análise histológica do plexo mioentérico do cólon descendente de cães controles e distróficos usando as colorações de Hematolixina-Eosina, Tricrômico de Masson e Picrosírius

Fonte: SCHÄFER, B. T. (2014)

Legenda: Cortes histológicos do cólon descendente de cães dos grupos Controle (A, C, E, G, I, K, M, O) e Distrófico (B, D, F, H, J, L, N, P) corados com Hematoxilina-Eosina (A, B, E, F), Tricrômico de Masson (I, J, M, N) e Picrosírius (C, G, K, O com luz não polarizada e D, H, L, P com luz polarizada). G: gânglio; M: mucosa; MC: musculatura circular; ML: musculatura longitudinal; SM: submucosa. Barras 500 μ m (C, D, G, H), 50 μ m (A, B, I, J, K, L, O, P), 20 μ m (E, F, M, N).

Figura 5 - Microscopia eletrônica de transmissão em cólon descendente de cães controles

Fonte: SCHÄFER, B. T. (2014)

Legenda: Cães controles. Fig. A: células musculares lisas (*) cortadas transversalmente com seus respectivos núcleos e circundadas por colágeno (cabeça de seta preta) (x2200). Fig. B: Células musculares lisas (*) evidenciando um núcleo (seta branca) com bordo regular e mitocôndrias (cabeças de setas brancas) no citoplasma; a cabeça de seta preta indica o colágeno adjacente e a seta preta aponta para uma junção intercelular (x11000). Fig. C: Neurônio do plexo mioentérico (seta branca) com presença de mitocôndrias (cabeça de seta branca) cercado por colágeno (cabeça de seta preta) e por fibras musculares (*) (x6000). Fig. D: Setas brancas indicam a presença de cavéolas na parede de células musculares (*), a cabeça de seta branca evidencia a junção intercelular entre duas destas células (x14000). Fig. E: Cabeça de seta preta indica fibras amielínicas no plexo mioentérico circundadas também por colágeno (cabeça de seta branca) (x7100). Fig. F: fibras amielínicas (cabeças de setas pretas) com a presença de grânulos eletrodensos (setas brancas) e vesículas (setas pretas) (x14000).

Figura 6 - Microscopia eletrônica de transmissão em cólon descendente de cães distróficos

Fonte: SCHÄFER, B. T. (2014)

Legenda: Cães distróficos. Fig. A: células musculares lisas (*) cortadas transversalmente e circundadas por colágeno (seta branca) (x3500). Fig. B: Células musculares lisas (*) cortadas longitudinalmente evidenciando um núcleo alongado (cabeça de seta branca); a cabeça de seta preta indica fibras amielínicas adjacentes (x3500). Fig. C: Neurônio do plexo mioentérico com núcleo (seta branca) grande e arredondado e com presença de mitocôndrias (cabeça de seta preta) no citoplasma, cercado por colágeno (cabeça de seta preta) e por fibras musculares (*) (x5600). Fig. D: Setas brancas indicam a presença de cavéolas na parede de células musculares (*) (x28000). Fig. E: Cabeça de seta preta indica fibras amielínicas no plexo mioentérico circundadas também por colágeno (seta branca) e fibras musculares (*) (x5600). Fig. F: fibras amielínicas (cabeças de setas pretas) com a presença de mitocôndrias (setas brancas) (x8900).

3.2 ANÁLISES QUANTITATIVAS

Analisou-se estatisticamente a área do perfil do corpo celular assim como o DMáx e DMín dos neurônios imunorreativos à NOS, à ChAT e ao HuC/D.

A análise dos perfis neuronais imunorreativos à NOS demonstrou os valores entre 329,9 a 661,5 μm^2 considerando os dois grupos. A média da área do perfil neuronal foi de $447,2 \pm 65 \mu\text{m}^2$ no grupo Controle e de $544,4 \pm 147 \mu\text{m}^2$ no grupo Distrófico (Figura 7A). O DMáx dos neurônios NOS-ir apresentou valores entre 26,9 μm a 45,6 μm nos dois grupos. A média do DMáx foi de $33,6 \pm 4,1 \mu\text{m}$ no grupo Controle e de $38,2 \pm 8,3 \mu\text{m}$ no grupo Distrófico (Figura 7A'). O DMín dos neurônios NOS-ir apresentou valores entre 14,3 μm a 19,1 μm nos dois grupos. A média do DMín foi de $16,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$ no grupo controle e de $17,2 \pm 2,1 \mu\text{m}$ no grupo Distrófico (Figura 7A'').

A análise do perfil neuronal ChAT-ir demonstrou os valores entre 418 a 672,9 μm^2 considerando os dois grupos. A média da área do perfil neuronal foi de $536,8 \pm 113,1 \mu\text{m}^2$ no grupo Controle e de $475,7 \pm 51,7 \mu\text{m}^2$ no grupo Distrófico (Figura 7B). O DMáx dos neurônios ChAT-ir apresentou valores entre 31,2 μm a 40,3 μm nos dois grupos. A média do DMáx foi de $36,0 \pm 4,3 \mu\text{m}$ no grupo Controle e de $34,0 \pm 1,8 \mu\text{m}$ no grupo Distrófico (Figura 7B'). O DMín dos neurônios ChAT-ir apresentou valores entre 15,5 μm a 18,9 μm nos dois grupos. A média do DMín foi de $17,56 \pm 1,6 \mu\text{m}$ no grupo Controle e de $17,6 \pm 1,3 \mu\text{m}$ no grupo Distrófico (Figura 7B'').

A análise do perfil neuronal HuC/D-ir demonstrou os valores entre 386,8 a 583,8 μm^2 considerando os dois grupos. A média da área do perfil neuronal foi de $475,7 \pm 84,9 \mu\text{m}^2$ no grupo Controle e de $507,5 \pm 83,4 \mu\text{m}^2$ no grupo Distrófico (Figura 7C). O DMáx dos neurônios HuC/D-ir apresentou valores entre 29,3 μm a 38,9 μm nos dois grupos. A média do DMáx foi de $34,0 \pm 3,8 \mu\text{m}$ no grupo Controle e de $35,3 \pm 3,0 \mu\text{m}$ no grupo Distrófico (Figura 7C'). O DMín dos neurônios HuC/D-ir apresentou valores entre 15,4 μm a 19,9 μm nos dois grupos. A média do DMín foi de $17,15 \pm 1,5 \mu\text{m}$ no grupo Controle e de $17,6 \pm 1,9 \mu\text{m}$ no grupo Distrófico (Figura 7C'').

Não foi detectada diferença significativa entre os grupos estudados nas três marcações imunohistoquímicas, porém o grupo Distrófico na marcação nitrérgica tende a apresentar neurônios maiores, visto que, dos 4 animais, 3 apresentaram área neuronal

maior que a dos cães controles e apenas 1 animal distrófico apresentou área neuronal menor que a vista nos 4 controles.

Figura 7 - Área do perfil neuronal em μm^2 (A, B, C), DMáx (μm) (A', B', C') e DMín (μm) (A'', B'', C'') dos neurônios NOS-ir (A – A''), ChAT-ir (B – B'') e HuC/D (C – C'') do plexo mioentérico do cólon descendente de cães controles e distróficos

Fonte: SCHÄFER, B. T. (2014)

Com relação ao número de neurônios NOS-ir/gânglio, o grupo Controle apresentou $17,8 \pm 6,4$ neurônios (Figura 8A), a área gangliônica foi de $0,25 \pm 0,06$ (Figura 8A') e a densidade dos neurônios NOS-ir /mm² da área gangliônica foi de $89,8 \pm 25,11$ (Figura 8A''). Com relação ao número de neurônios NOS-ir/gânglio, o grupo Distrófico apresentou $21,1 \pm 4,5$ neurônios (Figura 8A), a área gangliônica foi de $0,22 \pm 0,07$ (Figura 8A') e a densidade dos neurônios NOS-ir /mm² de área gangliônica foi de $129,2 \pm 105,5$ (Figura 8A''). Não houve diferença significativa entre os grupos, nas três análises.

Com relação ao número de neurônios ChAT-ir/gânglio, o grupo Controle apresentou $40,9 \pm 9,4$ neurônios (Figura 8B), a área gangliônica foi de $0,21 \pm 0,03$ (Figura 8B') e a densidade dos neurônios ChAT-ir /mm² da área gangliônica foi de $208,9 \pm 35,0$ (Figura 8B''). Com relação ao número de neurônios ChAT-ir/gânglio, o grupo Distrófico apresentou $45,7 \pm 13,5$ neurônios (Figura 8B), a área gangliônica foi de $0,21 \pm 0,03$ (Figura 8B') e a densidade dos neurônios ChAT-ir /mm² de área gangliônica foi de $239,5 \pm 55,4$ (Figura 8B'').

Com relação ao número de neurônios HuC/D-ir/gânglio, o grupo Controle apresentou $43,03 \pm 5,1$ neurônios (Figura 8C), a área gangliônica foi de $0,17 \pm 0,05$ (Figura 8C') e a densidade dos neurônios HuC/D-ir/mm² da área gangliônica foi de $348,6 \pm 144,0$ (Figura 8C''). Com relação ao número de neurônios HuC/D-ir/gânglio, o grupo Distrófico apresentou $68,1 \pm 12,8$ neurônios (Figura 8C), a área gangliônica foi de $0,22 \pm 0,07$ (Figura 8C') e a densidade dos neurônios HuC/D-ir/mm² de área gangliônica foi de $369,2 \pm 62,8$ (Figura 8C''). Com relação ao número de neurônios HuC/D-ir/gânglio, foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, onde distróficos apresentam aumento significativo de 58,34% ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle.

Com relação à frequência de distribuição, nos neurônios NOS-ir nos grupos Controle e Distrófico, a área do perfil variou de 50 a 2700 μm^2 . No grupo Controle, 21,42% dos neurônios estavam entre 200 e 400 μm^2 enquanto que no grupo Distrófico a maioria dos neurônios, 30,29%, estava entre 100 e 300 μm^2 (Figura 9A). O histograma do DMáx apresentou a maioria dos neurônios NOS-ir situados na faixa de 20-40 μm nos dois grupos. O DMín apresentou a maioria dos neurônios situados entre 12 e 15 μm tanto nos animais controles e nos distróficos entre 15 e 18 μm .

Figura 8 - Número de neurônios por gânglio (A, B, C), área gangliônica em mm^2 (A', B', C') e densidade neuronal/ mm^2 de área gangliônica (A'', B'', C'') dos neurônios NOS-ir (A – A''), ChAT-ir (B – B'') e HuC/D (C – C'') do plexo mioentérico do cólon descendente de cães controles e distróficos

Fonte: SCHÄFER, B. T. (2014)

A frequência dos neurônios ChAT-ir nos grupos estudados demonstrou que a área do perfil variou de 50 a 2500 μm^2 . No grupo controle a maioria dos neurônios (18,40%) estava entre 200 e 300 μm^2 enquanto que no grupo distrófico 35,85% dos neurônios estavam entre 200 e 500 μm^2 (Figura 9B). Os histogramas dos DMáx dos neurônios ChAT-ir apresentou a maioria dos neurônios situados na faixa de 20-40 μm tanto no grupo controle quanto no distrófico. O DMín apresentou a maioria dos valores entre 15-21 μm nos dois grupos analisados.

Com relação à frequência de distribuição dos neurônios HuC/D-ir nos grupos Controle e Distrófico, a área do perfil variou de 50 a 1900 μm^2 . No grupo controle a maioria dos neurônios (34,98%) estava entre 300 e 500 μm^2 enquanto que no grupo distrófico 30,29% dos neurônios estavam entre 300 e 500 μm^2 , mostrando que não houve diferença da área do perfil do corpo celular entre os grupos estudados (Figura 9C). O histograma do DMáx dos neurônios HuC/D apresentou a maioria dos valores entre 30-40 μm nos animais de ambos os grupos. O DMín apresentou a maioria dos valores entre 12-18 μm nos dois grupos analisados.

Figura 9 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2), dos neurônios NOS-ir (A), ChAT-ir (B) e HuC/D-ir (C) no cólon descendente de cães dos grupos Controle e Ditrófico

Fonte: SCHÄFER, B. T. (2014)

4 DISCUSSÃO

Deve-se salientar que os grupos estudados apresentam diversas variáveis, visto que este trabalho foi realizado com a doação de animais advindos de necropsias sendo, portanto, grupos heterogêneos. É de extrema importância que, durante análise dos dados, sejam levados em consideração idades, pesos e sexos dos animais. De forma geral os animais distróficos estudados são mais jovens e leves se comparados aos controles. Hanani et al. (2004), em estudo feito com humanos relacionando alterações do SNE com o envelhecimento, encontraram maior área gangliônica além de gânglios com mais espaços internos e uma maior proporção de gânglios com estes espaços, tanto no íleo quanto no cólon, o que pode indicar espaços deixados por neurônios que já morreram. Em cobaias foi relatado que há uma maior separação entre os gânglios, uma maior densidade neuronal e redução na área dos perfis neuronais (GABELLA, 1989). Diversos estudos já foram realizados nas mais variadas espécies relatando alterações que ocorrem durante o envelhecimento, principalmente nos intestinos delgado e grosso, porém existem grupos que fazem tal pesquisa em esôfago, estômago e reto (SAFFREY, 2013).

O modelo canino para estudo da distrofia muscular, considerando cães da raça Golden Retriever, é considerado como o melhor para se estudar a DMD. O camundongo *mdx*, outro modelo experimental e, por vez, o mais utilizado nas pesquisas de terapia gênica e transplante celular, manifesta uma progressão da distrofia diferente da encontrada em humanos. O *mdx* apresenta uma progressão mais lenta devido a uma menor degeneração das fibras musculares, menor índice de fibrose e maior regeneração das fibras. Já o GRMD, compartilha seu quadro de miopatia severa e desenvolvimento clínico fatal com o quadro encontrado em humanos. Em ambas as doenças, a necrose e regeneração começam cedo no músculo esquelético e estão associados com a proliferação do tecido conjuntivo (COOPER et al., 1988; VALENTINE et al., 1988; VALENTINE et al., 1990).

Diversos autores (BEVANS, 1945; HUVOS, 1967; CHUNG, 1998; DINAN et al., 2003; MULÈ; AMATO; SERIO, 2010) relatam algumas alterações gastrointestinais em pacientes com DMD, dentre elas gastroparesia, dilatação gástrica aguda, pseudo-obstrução intestinal, diminuição da espessura da parede intestinal, constipação e megacólon.

Animais submetidos a experimentos como modelos de inflamação (DE GIORGIO; GUERRINI; BARBARA, 2004; DA SILVA, 2011), isquemia intestinal (BOBNA, 2011; PAULINO et al., 2011; PALOMBIT et al., 2013) e desnutrição (CASTELUCCI et al., 2002a; MISAWA et al., 2010; GIROTTI et al., 2013) apresentaram alterações quanto a forma dos gânglios, densidade, tamanho ou número de neurônios.

A análise qualitativa dos preparados de membranas demonstraram neurônios imunorreativos à NOS, ChAT e HuC/D. De maneira geral não houve diferenças na imunorreatividade dos neurônios ao serem comparados os grupos Controle e Distrófico. Os neurônios NOS e ChAT positivos apresentaram morfologia Dogiel Tipo I nos dois grupos estudados. A literatura demonstra que os neurônios inibitórios e colinérgicos se distribuem nos gânglios entéricos e apresentam morfologias Dogiel Tipo I (FURNESS, 2006). Os neurônios NOS-ir e ChAT-ir colocalizaram com o pan-neuronal HuC/D. A imunorreatividade ao HuC/D foi observada no citoplasma e no núcleo dos neurônios.

Na análise histológica, assim como na análise ultraestrutural constatou-se um aumento da densidade de tecido colágeno adjacente aos gânglios mioentéricos e fibras musculares lisas em cães distróficos, sendo este um dado marcante e que deve sempre ser avaliado no estudo da distrofia muscular, ao passo que, segundo os autores Tanabe, Esaki e Nomura (1986), quanto maior for a atividade muscular, maior será o grau de necrose das miofibrilas ocasionando perda progressiva da massa e função musculares. Embora as fibras necróticas possuam capacidade de regeneração, com a progressão da doença este processo regenerativo torna-se reduzido e então nota-se um processo de fibrose entre as células musculares e, aos poucos, estas vão tornando-se irregulares e sendo substituídas por tecido fibroadiposo (PALMIERI; SBLENDORIO, 2006). Os dados do presente trabalho concordam com Silveira (2013) que, ao analisar o plexo mioentérico do íleo de cães distróficos, constatou que neste segmento intestinal encontra-se também uma maior quantidade de colágeno entre as fibras musculares lisas de animais distróficos, além da menor espessura das camadas musculares da parede ileal nestes animais. Miyazato et al. (2011) e Gerger et al. (2010) também relataram a quantidade aumentada de colágeno e tecido conjuntivo em geral nos diversos segmentos do TGI inclusive entre as camadas musculares de cães distróficos. De forma geral, o colágeno tipo I (vermelho) está sempre em maior quantidade nos tecidos, sendo o tipo III (verde) a forma imatura podendo variar também com a idade (MAURIEL; SHUTFLEWORTH; BOUISSOU, 1987). Gomes, Souza e Liberti (1997) em estudo

realizado em cólon de humanos em diferentes faixas etárias relataram que fibras colágenas e elásticas foram encontradas em maior número ao redor dos gânglios mioentéricos nos indivíduos mais velhos. No presente trabalho, foi encontrado um equilíbrio nas concentrações de colágenos I e III mesmo se tratando de dois grupos heterogêneos com relação à idade. Além disso, os autores Bevans (1945) e Dinan et al. (2003) relatam que em estudos de necropsias em pacientes com DMD é possível encontrar danos gastrointestinais assim como em cães, como exemplo a fibrose e a infiltração de tecido adiposo.

No grupo Distrófico houve uma tendência de que neurônios nitrérgicos apresentem áreas de perfis neuronais maiores do que no grupo controle. Enquanto 3 cães distróficos apresentaram áreas neuronais maiores que os 4 cães controles, há apenas 1 cão distrófico com áreas neuronais menores que os demais 7 cães. Coincidentemente, ou não, este cão distrófico é justamente o cão mais jovem da amostragem. Essa discrepância encontrada pode ter como causa diversos fatores, dentre eles a própria idade ou ainda por, talvez, ser mais debilitado pela distrofia muscular. Em trabalho realizado com intestino delgado de camundongos *mdx* foi reportado que animais distróficos com 4 semanas apresentam neurônios nitrérgicos maiores que animais controles, já nos grupos de 10 semanas não foi detectada diferença estatisticamente significativa (BEBER, 2011).

De acordo com a pesquisa de Silveira (2013), os neurônios ileais imunorreativos à NOS, ChAT e HuC/D, seja de cães controles ou distróficos, são em média menores que os neurônios colônicos aqui mensurados, nas mesmas três marcações imunohistoquímicas, uma indicação de segurança dos dados se baseia no fato de que foi utilizado o mesmo protocolo para ambas as pesquisas, assim como alguns animais.

Na análise de densidade neuronal/ mm^2 de área gangliônica na marcação com HuC/D, observou-se que um dos animais distróficos apresentou densidade, em média, bem mais elevada que os demais, sendo justamente o mesmo animal que apresentou a menor área neuronal nas três marcações (NOS, ChAT e HuC/D) podendo assim justificar uma possível plasticidade neuronal, ou seja, pode ter ocorrido um aumento no número de neurônios para suprir a diminuta área dos mesmos. Vale salientar que a área gangliônica mensurada neste estudo não deve ser analisada sozinha, mas sim em conjunto com os dados de densidade, visto que, como já citado, apenas puderam ser medidos gânglios sob a objetiva de 10x, tendo de serem desconsiderados alguns maiores.

Em estudo realizado com camundongos *mdx* relata-se que em deficientes de distrofina há uma redução da expressão de NOS e assim agravando a enfermidade, visto que o Óxido Nítrico (NO) pode atuar como anti-inflamatório além de ser uma molécula citoprotetora, ou seja, na ausência de NOS há uma maior propensão para que ocorram danos musculares devido ao processo inflamatório (WEHLING; SPENCER; TIDBALL, 2001). Baccari et al. (2007) relataram que já foi detectado decréscimo total da produção de NO em pacientes com DMD e que já se pensa num possível tratamento paliativo com doadores de NO, além disso cita ainda que os sintomas gastrointestinais podem ser neutralizados com o uso de substâncias que possam elevar os níveis de NO através de produção endógena.

Os receptores P2X são encontrados em neurônios entéricos (CASTELUCCI et al., 2002b), células musculares lisas e células gliais entéricas (VANDERWINDEN; TIMMERMANS; SCHIFFMANN, 2003). A expressão dos receptores purinérgicos P2X1-7 pode ser modulada de acordo com diversas condições patológicas, como por exemplo, estresse mecânico, inflamação, hipóxia, axoniotomia, doenças neurodegenerativas ou pelo processo de maturação e diferenciação celular, ou seja, a expressão e atividade purinérgica pode ocorrer tanto em processos apoptóticos como em processos benéficos ao organismo (BURNSTOCK et al., 2011; FRANKE; ILLES, 2006). O receptor P2X7, neste trabalho, estava presente em neurônios e fibras ChAT-ir e NOS-ir, porém nestes últimos não houve uma grande taxa de colocalização como nos primeiros. Outros estudos comprovam alterações na expressão desse receptor em outras espécies animais utilizadas em diversos protocolos a citar: isquemia/reperfusão intestinal (PALOMBIT et al., 2013), colite ulcerativa (DA SILVA, 2011) e desnutrição (GIROTTI et al., 2013), os quais demonstraram que o receptor P2X7 tem sua expressão diminuída nessas enfermidades.

A presente pesquisa contribui para o conhecimento dos efeitos da GRMD sobre os neurônios mioentéricos do cólon descendente. Para tal foram utilizadas técnicas de imunohistoquímica, histologia e de microscopia eletrônica de transmissão. Foram estudados os neurônios inibitórios e colinérgicos e a colocalização com HuC/D e o receptor P2X7. Estes achados podem contribuir para o entendimento das alterações na motilidade intestinal, assim como pode auxiliar no desenvolvimento de novas terapias tanto para a GRMD quanto para a DMD.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALTAF, M. A.; SOOD, M. R. The nervous system and gastrointestinal function. **Developmental Disabilities Research**, v. 14, p. 87-95, 2008.
- BACCARI, M. C.; NISTRI, S.; VANNUCCHI, M. G.; CALAMAI, F.; BANI, D. Reversal by relaxin of altered ileal spontaneous contractions in dystrophic (mdx) mice through a nitric oxide-mediated mechanism. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, p. 662–668, 2007.
- BEBER, E. H. **Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do intestino delgado de camundongos mdx: um modelo de distrofia muscular de Duchene**. 2011. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- BEVANS, M. Changes in the musculature of the gastrointestinal tract and in the myocardium in progressive muscular dystrophy. **Archives of Pathology**, v. 40, p. 225-38, 1945.
- BOBNA, A. R. M. **Efeitos da isquemia/ reperusão intestinal sobre o receptor P2X2 e neurônios entéricos do íleo de ratos**. 2011. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- BOLAND, B. J.; SILBERT, P. L.; GROOVER, R. V.; WOLLAN, P. C.; SILVERSTEIN, M. D. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne Muscular Dystrophy. **Pediatric Neurology**, v. 14, p. 7-12, 1996.
- BURNSTOCK, G.; KRÜGEL, U.; ABBRACHIO, M. P.; ILLES, P. Purinergic signaling: from behavior to pathological brain function. **Progress in Neurobiology**. v. 95, p. 229-274, 2011.
- CASTELUCCI, P.; DE SOUZA, R. R.; DE ANGELIS, R. C.; FURNESS, J. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pre and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. **Cell Tissue Research**, v. 310, p. 1-7, 2002a.
- CASTELUCCI, P.; ROBBINS, H. L.; POOLE, D. P.; FURNESS, J. B. The distribution of purine P2X(2) receptors in the guinea-pig enteric nervous system. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 117, n. 5, p. 415-422, 2002b.
- CHUNG, B. C.; PARK, H. J.; YOON, S. B. Acute gastroparesis in Duchenne's muscular dystrophy. **Yonsei Medical Journal**, v. 39, p. 175-179, 1998.

COOPER, B. J.; WINAND, N. J.; STEDMAN, H.; VALENTINE, B. A.; HOFFMAN, E. P.; KUNKELL, L. M.; SCOTT, M.; FISCHBECK, K. H.; KORNEGAY, J. N.; AVERY, R. J.; WILLIAMS, J. R.; SCHMICKEL, R. D.; SYLVESTER, J. E. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. **Nature**, v. 334, p. 154-156, 1988.

DA SILVA, M.V. **Estudo do efeito da colite ulcerativa experimental sobre o receptor P2X7 no SNE de ratos Wistar**. 2011. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DE GIORGIO, R.; GUERRINI, S.; BARBARA, G. Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system. **Gastroenterology**, v.126, p.1872–1883, 2004.

DINAN, D.; LEVINE, M.; GORDON, A.; RUBESIN, S.; ROMBEAU, J. Gastric wall weakening resulting in separate perforations in a patient with Duchenne's Muscular Dystrophy. **American Roentgen Ray Society**, v. 181, p. 807-808, 2003.

FRANKE, H.; ILLES, P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 109, n. 3, p. 297-324, 2006.

FURNESS, J. B. Review: the enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews of Gastroenterology and Hepatology**, p. 9, n. 5, p. 286-94, 2012

FURNESS, J. B. **The enteric nervous system**. Malden: Blackwell Publishing, 2006.

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

GERGER, A. A. C.; SOUZA, C. C.; MARTINS, D. S.; GAIAD, T.; BRÓLIO, M. P.; LUPPI, M. R.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Alterações do trato digestório de cães da raça Golden Retriever afetados pela distrofia muscular. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n.12, p. 1064-1070, 2010.

GIROTTI, P. A.; MISAWA, R.; PALOMBIT, K.; MENDES, C. E.; BITTENCOURT, J. C.; CASTELUCCI, P. Differential effects of undernourishment on the differentiation and maturation of rat enteric neurons. **Cell Tissue Research**, v. 353, n. 3, p. 367-380, 2013.

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, p. 210-217, 1997.

HANANI, M.; FELLIG, Y.; UDASSIN, R.; FREUND, H. R. Age-related changes in the morphology of the myenteric plexus of the human colon. **Autonomic Neuroscience**, v. 113, n. 1, p. 71-78, 2004.

HOFF, S.; ZELLER, F.; VON WEYHERN, C. W.; WEGNER, M.; SCHEMANN, M.; MICHEL, K.; RÜHL, A. Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. **Journal of Comparative Neurology**, v. 509, n. 4, p. 356-371, 2008.

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

KORNEGAY, J. N.; BOGAN, J. R.; BOGAN, D. J.; CHILDERS, M. K.; LI, J.; NGHIEM, P.; DETWILER, D. A.; LARSEN, C. A.; GRANGE, R. W.; BHAVARAJU-SANKA, R. K.; TOU, S.; KEENE, B. P.; HOWARD, JR. J. F. ; WANG, J.; FAN, Z.; SCHATZBERG, S. J.; STYNER, M. A.; FLANIGAN, K. M.; XIAO, X.; HOFFMAN, E. P. Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. **Mammalian Genome**, v. 23, n. 1-2, p. 85-108, 2012.

KRAMMER, H.J.; WEDEL, T.; BREHMER, A.; STACH, W.; KÜHNEL, W.; SINGER, M.V.. The enteric nervous system – What can we learn from morphology? **Zeitschrift für Gastroenterologie**, v. 2, p. 5-13, 1997.

MAURIEL, E.; SHUTFLEWORTH, C. A.; BOUISSOU, H. Interstitial collagens and ageing in human aorta. **Virchows Archiv**, v.410, p. 383-390, 1987.

MISAWA, R.; GIROTTI, P. A.; MIZUNO, M. S.; LIBERTI, E. A.; CASTELUCCI, P. Effects of protein deprivation and re-feeding on P2X2 receptors in enteric neurons. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 29, p. 3651-3663, 2010.

MIYAZATO, L. G; BERETTA, D. C.; ENGRACIA-FILHO, J. R.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Involvement of organic systems in golden retriever x-linked muscular dystrophy. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 2, p. 87-94, 2011.

MULÈ, F.; AMATO, A.; SERIO, R. Gastric emptying small intestinal transit and fecal output in dystrophic (*mdx*) mice. **Journal of Physiological Sciences**. v. 60, p. 75-79, 2010.

NELSON, S. F.; CROSBIE, R. H.; MICELI, M. C.; SPENCER, M. J. Emerging genetic therapies to treat Duchenne muscular dystrophy. **Current Opinion in Neurology**, v. 22, n. 5, p. 532-538, 2009.

PALMIERI, B.; SBLENDORIO, V. Duchenne muscular dystrophy: rational basis, state of the art. **Recenti Progressi in Medicina**, v. 97, n. 9, p. 441-447, 2006.

PALOMBIT, K.; MENDES, C.E.; TAVARES DE LIMA, W.; SILVEIRA, M. P.; CASTELUCCI, P. Effects of the ischemia and reperfusion on subpopulations of rat enteric neurons expressing the P2X7 receptor. **Digestive Diseases and Sciences**, v.58, p. 3429-3439, 2013.

PAULINO, A. S.; PALOMBIT, K.; CAVRIANI, G.; DE LIMA, W.; MIZUNO, M. S.; MAROSTI, A. M. B.; DA SILVA, M.; LIBERTI, E.; CASTELUCCI, P. Effects of ischemia and reperfusion on P2X2 receptor expressing neurons of the rat ileum enteric nervous system. **Digestive Disease Science**, v. 56, n. 8, p. 2262-2275, 2011.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 1208-1212, 1963.

SAFFREY, M. J. Cellular changes in the enteric nervous system during ageing. **Developmental Biology**, v. 382, p. 344-355, 2013.

SILVEIRA, M. P. **Estudo morfoquantitativo do plexo mioentérico de cães afetados pela distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD)**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

TANABE, Y.; ESAKI, K.; NOMURA, T. Skeletal muscle pathology in x chromosomal-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse. **Acta Neuropathologica**, v. 69, p. 91-95, 1986.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; LAHUNTA, A.; BLUE, J. T. Canine X-linked muscular dystrophy. an animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinica studies. **Journal of Neurological Sciences**, v. 88, p. 69-81, 1988.

VALENTINE, B. A.; BLUE, J. T.; SHELLEY, S. M.; COOPER, B. J. Increased serum alanine aminotransferase activity associated with muscle necrosis in the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 4, p. 140-143, 1990.

VANDERWINDEN, J. M.; TIMMERMANS, J. P.; SCHIFFMANN, S. N. Glial cells, but not interstitial cells, express P2X7, an ionotropic purinergic receptor, in rat gastrointestinal musculature. **Cell Tissue Research**, v. 312, p. 149-154, 2003.

VULCHANOVA, L.; ARVIDSSON, U.; RIEDHL, M.; WANG, J.; BUELL, G.; SUPRENT, A.; NORTH, R. A. Differential distribution of two ATP-gated ion channels P2x receptors determined by immunohistochemistry. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences**, v. 93, p. 8063-8067, 1996.

WATANABE, I.; YAMADA, E. The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingival. **Archivum Histologicum Japonicum**, v. 46, p. 173-182, 1983.

WEHLING, M.; SPENCER, M. J.; TIDBALL, J. G. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in *mdx* mice. **Journal of Cell Biology**, v. 155, p. 123-131, 2001.