

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 Virgínie 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: Prof.^a Dr.^a Patrícia Castelucci.

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

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

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.

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 imunoreatividade 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 imunoreatividade 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/referfusão 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/ reperfusão 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 chromosome-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.; SUPRENTANT, 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.