Eduardo Henrique Beber

**Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do intestino
delgado de camundongos *mdx*: um modelo de distrofia
muscular de Duchenne**

São Paulo
2011

Eduardo Henrique Beber

**Caracterização morfoquantitativa do plexo
mioentérico do intestino delgado de camundongos
mdx: um modelo de distrofia muscular de Duchenne**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

São Paulo
2011

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.2474
FMVZ

Beber, Eduardo Henrique

Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do intestino delgado de camundongos *mdx*: um modelo de distrofia muscular de Duchenne / Eduardo Henrique Beber. -- 2011.
97 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2011.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti.

1. Plexo mioentérico. 2. Camundongos *mdx*. 3. Distrofia muscular de Duchenne. 4. Intestino delgado. 5. Morfometria. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*Comissão de Ética no uso de animais***CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do intestino delgado de camundongos mdx", protocolado sob o nº 2172/2011, utilizando 52 (cinquenta e dois) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Morphoquantitative features of myenteric plexus of small intestine of mdx mice", protocol number 2172/2011, utilizing 52 (fifty-two) mice, under the responsibility Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 12 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Ribeirão Preto, 29 de outubro de 2010

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

Vimos por meio desta informar que Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos da Universidade de Ribeirão Preto CEP/UNAERP analisou e aprovou sem restrições, o Projeto intitulado **“AVALIAÇÃO MORFOQUANTITATIVA DOS EFEITOS DA DISTROFIA MUSCULAR NO CÓRTEX CEREBRAL E NO PLEXO MIOENTÉRICO DE CAMUNDONGOS MDX”** tendo como pesquisador(a) Prof(a) Dr(a) Odair Alfredo Gomes, registrado sobre o **ComÊt: 046/2010**.

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

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

Atenciosamente,

Profª Drª Luziana Rezende Alves de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Eduardo Henrique Beber

Título: Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do intestino delgado de camundongos *mdx*: um modelo de distrofia muscular de Duchenne

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem a ajuda das pessoas abaixo, portanto os meus mais sinceros agradecimentos a:

Minha família,

Dr. Edson Aparecido Liberti,

Dra. Silvia de Campos Boldrini,

Dr. Odair Alfredo Gomes,

Dra. Laura Beatriz Mesiano Maifrino,

Dr. Carlos Eduardo Seyfert,

Valquíria Barboza Mariotti,

Thiago Habacuque Silva de Souza,

Ricardo Bragança de Vasconcelos Fontes,

Adriano Ciena,

Rosana Duarte Prisco,

Sonia Regina Yokomizo Almeida,

Dra. Rose Eli Grassi Rici,

Gisele Miyamura Martins,

Dra. Maria Angélica Miglino,

Maicon Barbosa da Silva,

Dra. Cecília Helena Gouveia,

Todos integrantes do LAFACC/VQM,

Diretor e coordenadores da UFCG/Cajazeiras,

Patrícia Marega,

Todos que de alguma maneira me ajudaram e que tiveram seus nomes omitidos, do fundo do meu coração, MUITO OBRIGADO!

“Como tão somente busco a verdade, quero declarar publicamente que os esforços que esta obra exigiu tiveram por único objetivo produzir algo que resulte agradável para os bons, proveitoso para os doutos e útil para as letras.”

William Harvey, 1628

RESUMO

BEBER, E. H. **Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do intestino delgado de camundongos *mdx***: um modelo de distrofia muscular de Duchenne. [Morphoquantitative features of myenteric plexus of small intestine of *mdx* mice: a model for Duchenne muscular dystrophy]. 2011. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O plexo mioentérico é uma vasta rede de nervos e gânglios localizado entre as camadas longitudinal e circular da túnica muscular externa de todo o trato gastrointestinal (TGI). A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma miopatia ligada ao cromossomo X causada pela ausência da distrofina que, além dos evidentes efeitos degenerativos no músculo esquelético, causa severas alterações do TGI. No entanto as causas dessas alterações não são claras. Pesquisadores demonstraram que a distrofina é expressa nas fibras musculares lisas e também nos neurônios do plexo mioentérico, todavia não existe um consenso sobre o papel desta nessas estruturas. Desta forma pretende-se estudar os componentes do plexo mioentérico do intestino delgado de camundongos *mdx* (o modelo animal da DMD) nas idades de 4 e 10 semanas e de seus respectivos controles, camundongos C57BL/10. Os animais de ambos os grupos tiveram o intestino delgado retirado e seccionado em segmentos oral, médio e aboral para posterior avaliação através das técnicas histoquímicas de evidencição neuronal: NADH-d, NADPH-d e AChE. Além disso, a musculatura lisa e os neurônios do plexo mioentérico foram analisados por MET. A análise quantitativa mostrou que o grupo MDX4 apresentou uma área total do intestino delgado significativamente maior que o C4 ($p < 0,05$). Para as técnicas da NADH-d e NADPH-d foi observado um gradiente crescente de densidade numérica neuronal, no sentido oral-aboral, para todos os grupos estudados. O grupo MDX4 apresentou uma densidade neuronal significativamente menor que o C4 ($p < 0,05$), todavia MDX10 e C10 foram iguais. Além disso, a densidade neuronal dos grupos de 10 semanas foi significativamente menor que dos de 4 semanas para ambas as técnicas ($p < 0,05$). Em relação à estimativa do número total de neurônios, MDX10 e C10 apresentaram uma significativa redução de neurônios NADH-d positivos, quando comparada à dos grupos MDX4 e C4 ($p < 0,05$), porém, para os neurônios NADPH-d positivos, a estimativa dos grupos de 10 semanas foi estatisticamente superior que à dos de 4 semanas ($p < 0,05$). O grupo MDX4 apresentou uma área do perfil de neurônios nitrérgicos significativamente maior que o C4 ($p < 0,05$). Na técnica da NADH-d, não foi detectada diferença significativa relativa à esse aspecto. Comparativamente ao grupo C4, os neurônios do grupo MDX4 não apresentaram intensa reatividade a AChE, mas foram iguais em 10 semanas. Referente à ultra-estrutura dos neurônios, esta apresentou-se preservada em todos os grupos, no entanto as fibras musculares lisas do grupo MDX apresentaram alterações morfológicas.

Palavras-chave: Plexo mioentérico. Camundongos *mdx*. Distrofia muscular de Duchenne. Intestino delgado. Morfometria.

ABSTRACT

BEBER, E. H. **Morphoquantitative features of myenteric plexus of small intestine of *mdx* mice**: a model for Duchenne muscular dystrophy. [Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do intestino delgado de camundongos *mdx*: um modelo de distrofia muscular de Duchenne]. 2011. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The myenteric plexus is an extensive network of nerve strands and ganglia located between the outer longitudinal and inner circular muscle layers of the external muscle coat of the gastrointestinal tract (GI). Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a X-linked degenerative muscular myopathy caused by the absence of dystrophin which, apart from the obvious degenerative effects in skeletal muscle, causes severe alterations of gastrointestinal (GI) tract. However the causes of these changes remain unclear. Researchers have shown that dystrophin is expressed in both smooth muscle fibers and myenteric plexus neurons, however there is no consensus on the role of it in these structures. Thus, we intend to study the components of the myenteric plexus of the small intestine of *mdx* mice (an animal model for DMD) at the ages of 4 and 10 weeks and their respective controls, C57BL/10 mice. The animals of both groups had the small intestine removed and sectioned into oral, middle and aboral segments for further evaluation by histochemical techniques of neuronal evidencing: NADH-d, NADPH-d and AChE. In addition, smooth muscle and myenteric plexus neurons were analyzed by TEM. The quantitative analysis showed that the MDX4 group had a significantly higher small intestine total area than the C4 ($p < 0.05$). For the techniques of NADH-d and NADPH-d was observed an increasing gradient of neuronal numerical density, in the oral-aboral direction, for all groups. The MDX4 group showed a significantly lower neuronal density than C4 ($p < 0.05$), however MDX10 and C10 were the same. In addition, the neuronal density of 10 weeks groups was significantly lower than those of 4 weeks for both techniques ($p < 0.05$). Considering the total estimative number of neurons, MDX10 and C10 showed a significant reduction of NADH-d positive neurons, compared to groups MDX4 and C4 ($p < 0.05$), but for the NADPH-d positive neurons, the estimative of 10 weeks groups was statistically higher than that of 4 weeks ($p < 0.05$). The MDX4 group showed an nitrergic neurons profile area significantly higher than the C4 ($p < 0.05$). In the technique of the NADH-d, no significant difference was detected on this aspect. Compared to the C4 group, neurons of MDX4 group did not show intense AChE reactivity, but they were equal in 10 weeks. Concerning the neurons ultrastructure, it was preserved in all groups, however the smooth muscle fibers of MDX group showed morphological changes.

Keywords: Myenteric plexus. *mdx* mice. Duchenne. muscular dystrophy. Small intestine. Morphometry.

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE	- Acetilcolinesterase
BMD	- Distrofia Muscular de Becker
CK	- Creatina Quinase
DMD	- Distrofia Muscular de Duchenne
GRMD	- Distrofia muscular em cães da raça Golden Retriever
ICC	- Células Intersticiais de Cajal
IPANs	- Neurônios aferentes primários intrínsecos
<i>mdx</i>	- Camundongo com distrofia muscular ligada ao cromossomo X
MET	- Microscopia Eletrônica de Transmissão
NADH-d	- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-diaforase
NADPH-d	- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato-diaforase
NBT	- Azul de Nitrotetrazólio
NO	- Óxido Nítrico
NOS	- Óxido Nítrico Sintase
PBS	- Tampão fosfato
SNC	- Sistema Nervoso Central
SNE	- Sistema Nervoso Entérico
TGI	- Trato Gastrointestinal
VIP	- Peptídeo Intestinal Vasoativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 O sistema nervoso entérico (SNE)	13
1.2 A distrofia muscular de Duchenne	19
1.3 A causa da DMD	21
1.4 Modelos animais para o estudo da DMD	23
1.5 Relações entre DMD, TGI e SNE	25
2 PROPOSIÇÃO	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Animais utilizados e formação dos grupos	31
3.2 Coleta e obtenção dos segmentos do intestino delgado	32
3.3 Métodos histoquímicos de evidenciação neuronal	33
3.3.1 Evidenciação pela técnica da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo -diaforase (NADH-d)	34
3.3.2 Evidenciação pela técnica da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato -diaforase (NADPH-d)	35
3.3.3 Evidenciação pela técnica da Acetilcolinesterase (AChE)	36
3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	37
3.5 Análise Quantitativa	38
3.5.1 Área total do intestino delgado	38
3.5.2 Densidade numérica neuronal	39
3.5.3 Número total estimado de neurônios	39
3.5.4 Área do perfil do corpo neuronal	40
3.6 Análise estatística	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Aspectos Qualitativos	42
4.1.1 Análise morfológica dos componentes do plexo mioentérico evidenciados pela técnica da NADH-d	42
4.1.2 Análise morfológica dos componentes do plexo mioentérico evidenciados pela técnica da NADPH-d	46

4.1.3	Análise morfológica dos componentes do plexo mioentérico evidenciados pela técnica da AChE	49
4.1.4	Análise ultra-estrutural (MET) dos componentes do plexo mioentérico e da musculatura lisa adjacente	52
4.2	Aspectos Quantitativos	55
4.2.1	Área total do intestino delgado	55
4.2.2	Densidade numérica dos neurônios evidenciados pela técnica da NADH-d	56
4.2.3	Número total estimado de neurônios evidenciados pela técnica da NADH-d	58
4.2.4	Área do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica da NADH-d	59
4.2.5	Densidade numérica dos neurônios evidenciados pela técnica da NADPH-d	64
4.2.6	Número total estimado de neurônios evidenciados pela técnica da NADPH-d	65
4.2.7	Área do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica da NADPH-d	66
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI), do esôfago até o ânus, apresenta um padrão histológico constituído por quatro túnicas: a mucosa, a submucosa, a muscular externa e a serosa/adventícia. Evidentemente, cada uma destas túnicas é adaptada à função de cada órgão, e por isso diferem pontualmente entre si. Por exemplo, a mucosa do esôfago é estratificada para lhe conferir proteção; já a mucosa do intestino delgado, é de epitélio simples colunar com vilos e microvilos para aumentar a área de absorção de nutrientes (GARTNER, 2003). Além disso, partes diferentes de um mesmo órgão podem apresentar aspectos diferentes da mesma túnica, como no caso do intestino delgado, onde as vilosidades e microvilosidades da mucosa sofrem uma gradativa diminuição em comprimento e densidade do duodeno ao íleo (GABELLA, 1987), ou da túnica muscular externa do esôfago, a qual em seu quarto superior, é exclusivamente de músculo estriado esquelético, ao passo que o quarto inferior é essencialmente de músculo liso (TESTUT; LATARJET, 1959).

Outras diferenças podem ser citadas, mas fato marcante é que o padrão histológico das quatro túnicas, em geral não é alterado.

Para desempenhar suas funções de digestão, absorção e excreção, o TGI recebe uma inervação extrínseca, conferida pelas partes simpática e parassimpática da divisão autônoma do sistema nervoso, e também por uma inervação intrínseca, conferida por uma ampla rede nervosa organizada por plexos ganglionares dispostos entre suas túnicas.

As primeiras descrições de plexos ganglionares entre as túnicas do TGI foram realizadas por Meissner (1857); Billroth (1858) e Auerbach (1862, 1864). Algumas décadas depois, estudos demonstraram que o peristaltismo intestinal ocorria de forma independente da parte central do sistema nervoso (SNC) (LANGLEY; MAGNUS, 1905), evidenciando uma regulação intrínseca e caracterizando uma terceira divisão do sistema nervoso: o sistema nervoso entérico (SNE).

1.1 O sistema nervoso entérico (SNE)

Muito embora a etimologia da palavra “entérico” (*enteron*, do Grego) refira-se aos intestinos, o termo “sistema nervoso entérico” é aplicado à inervação intrínseca

de todo o TGI, da bexiga urinária, da vesícula biliar e vias bilíferas, do pâncreas e das vias respiratórias inferiores, como a traquéia e os brônquios. Fica claro portanto, que essa terminologia não foi adotada baseando-se nos órgãos maduros, mas sim considerando a embriologia dos mesmos, uma vez que são derivados das divisões do intestino (“*enteron*”) primitivo: anterior, médio e posterior (WILLIAMS, 1995; MOORE, 2004).

Por possuir neurônios com diversidade funcional e química comparada ao SNC, apresentar a mesma quantidade ou mais de neurônios que a medula espinal, e ser capaz de promover uma regulação intrínseca dos órgãos de maneira parcialmente independente do SNC, tornou-se clara a importância do SNE, o qual foi cognominado como o “segundo cérebro” (GERSHON, 1998; LEBOUVIER et al., 2009).

Muito além de somente regular a motilidade, as ações desse sistema no TGI abrangem a regulação da secreção/absorção de água, eletrólitos ou outras substâncias pela mucosa; regulação da atividade glandular na submucosa; regulação do tônus vascular, bem como interações com células entero-endócrinas e com o sistema imunológico (COSTA et al., 2000; FURNESS, 2006; BURNS et al., 2009).

No TGI, a organização do SNE consiste em uma vasta malha nervosa organizada por plexos ganglionares dispostos entre e no interior de suas túnicas. Dentre estes, destacam-se o *plexo mioentérico* (de Auerbach) e o *plexo submucoso* (de Meissner), ambos constituídos de neurônios e células da glia. Todavia, outros plexos foram descritos, contribuindo para a complexidade do SNE. Assim, Schabadasch et al. (1930) denominou de *plexo subseroso* os feixes nervosos encontrados entre a túnica serosa e a muscular externa do TGI. Acredita-se que esse plexo atue como mediador entre a inervação extrínseca (autônoma) e a intrínseca (entérica), uma vez que seus gânglios e feixes concentram-se na margem mesentérica e mesocólica dos intestinos, e junto aos ramos do nervo vago no esôfago e estômago (AUERBACH, 1864)

Richardson (1958) descreveu feixes nervosos delgados presentes na camada muscular longitudinal quando esta excede a espessura de 200nm. Nestes casos esses feixes recebem uma denominação homônima à sua localização, o *plexo*

muscular longitudinal. Quando esta camada é delgada, como ocorre em animais de pequeno porte, este plexo deixa de existir, sendo a camada em questão innervada somente pelas fibras terciárias do plexo mioentérico (descrito adiante) (LLEWELLYN-SMITH et al., 1993).

Um *plexo muscular profundo* ou *plexo submuscular* foi descrito por Cajal (1911), referindo-se a uma concentração de fibras localizadas na camada muscular circular, adjacente à túnica submucosa. A túnica mucosa, por sua vez, é innervada por uma densa malha nervosa a qual pode ser dividida em vários plexos: *plexo subglandular*, *plexo periglandular*, *plexo subepitelial do vilo* e *plexo central do vilo* (BILLROTH, 1858; BERKLEY et al., 1893).

Foge ao escopo do presente trabalho descrever cada um dos plexos acima citados, mas chama a atenção a complexidade do SNE. Conforme visto anteriormente, destacam-se no SNE do TGI os *plexos mioentérico* e o *submucoso*. Este último, por sua vez, foi descrito por Meissner (1857) e Billroth (1858), e como o próprio nome sugere, está localizado na túnica submucosa predominantemente dos intestinos, sendo encontrado apenas como gânglios isolados no estômago e no esôfago. Em geral, suas fibras são delgadas e seus gânglios são menores que os do plexo mioentérico. Em humanos e outros mamíferos de grande porte, dependendo da localização de seus neurônios e fibras nervosas, este pode ser subdividido em três partes: plexo submucoso interno (adjacente à camada muscular da mucosa), plexo submucoso externo (adjacente à camada circular da túnica muscular externa) e o plexo submucoso intermediário (entre os dois previamente citados, imerso no tecido conjuntivo da túnica submucosa) (TIMMERMANS et al., 2001; SCHEMANN et al., 2004).

Alvo de estudo do presente trabalho, o plexo mioentérico está localizado entre as camadas longitudinal e circular da túnica muscular externa, circundando todo TGI desde o esôfago até o esfíncter interno do ânus. Seus gânglios apresentam orientação, tamanhos e formatos variados entre as espécies (GABELLA, 1987; GÁBRIEL et al., 1998; WILHELM et al., 1998; BÓDI et al., 2009), e entre as partes dos intestinos (SANTER et al., 1988; FURNESS et al., 1994; KARAOSMANOGLU et al., 1996; BAGYÁNSZKI et al., 2000; MIRANDA NETO et al., 2001), sendo possível

encontrar gânglios com números bastante variados de neurônios ou ainda neurônios isolados, no ponto de convergência de várias fibras.

Sob o aspecto morfológico de suas fibras, o plexo mioentérico é subdividido em três malhas, de acordo com a sua espessura. Assim, a *malha primária* consiste nos gânglios e nas densas fibras que os conectam, as fibras interganglionares; a *malha secundária* são fibras mais delgadas que conectam as fibras interganglionares entre si, ou a gânglios. Normalmente, as fibras da malha secundária encontram-se dispostas perpendicularmente às fibras interganglionares. Por fim, a *malha terciária* corresponde às inúmeras ramificações das duas malhas precedentes, sendo representadas por fibras extremamente delgadas, dispostas de maneira irregular nos espaços formados pela intersecção das fibras interganglionares e secundárias (WILSON et al., 1987).

Até pela própria localização, é comum atribuir o controle da motilidade ao plexo mioentérico, enquanto o plexo submucoso fica encarregado de controlar as atividades das túnicas submucosa e mucosa, como a regulação do tônus vascular e a absorção/secreção de substâncias (SCHEMANN; NEUNLIST, 2004). No entanto, esta é uma visão muito simplificada, e até certo ponto incorreta sobre as funções do SNE. Apesar da descrição separada de cada plexo, é importante ressaltar que eles estão conectados uns aos outros, tornando o SNE uma malha singular. Neurônios dos gânglios mioentéricos emitem prolongamentos para gânglios submucosos e vice-versa, além de suprirem a maioria das túnicas do TGI (DRASCH, 1881; FURNESS, et al., 1990; BREHMER et al., 1998) demonstraram que as fibras que interconectam os plexos mioentérico e submucoso dispõem-se verticalmente através da camada muscular circular, sendo por esse motivo chamadas de *fibras penetrantes* ou *fibras verticais*. Hens et al. (2001) mostraram que 23% das projeções para a mucosa do intestino delgado de humanos provêm de neurônios do plexo mioentérico, enquanto Timmermans et al. (2001), descreveram projeções de neurônios do plexo submucoso externo para as camadas circular e longitudinal da túnica muscular externa, bem como para a túnica mucosa.

Tamanha é a complexidade do SNE, que pesquisadores focaram seus estudos no mapeamento completo (quantidade, localização, perfil, neuroquímica, projeções) de todos os tipos neuronais encontrados nesse sistema, e demonstraram

a existência de neurônios motores, interneurônios, neurônios aferentes primários intrínsecos (*intrinsic primary afferent neurons* - IPANs), e neurônios intestino-fugais (víscero-fugais). Cabe ressaltar a existência de inúmeras subdivisões para os neurônios anteriormente citados; por exemplo, os neurônios motores são subdivididos em excitatórios ou inibitórios das camadas circular e longitudinal, bem como da muscular da mucosa. Podem ainda inervar células entero-endócrinas, vasos (neurônios vasomotores), estimular secreção (neurônio secretomotor), além de exercerem uma interação neuro-imune, na qual foi observada a inervação das placas de Peyer e linfócitos da lâmina própria da mucosa por neurônios entéricos (KUNZE et al., 1999; COSTA et al., 2000; FURNESS 2000).

Em relação aos neurotransmissores dos neurônios entéricos, foi observado que um mesmo neurônio utiliza mais de um neurotransmissor; no entanto, apenas um é considerado o neurotransmissor primário, enquanto os outros são denominados subsidiários ou neuromoduladores. Considera-se como neurotransmissor primário aquele com maior atuação sobre as células, sendo estes fortemente conservados ao longo do TGI e entre as espécies (MC CONALOGUE; FURNESS 1994). Cserni et al. (2007) estudando o plexo mioentérico da parte aboral do colo de porcos, demonstraram que cerca de 30% dos neurônios apresentam uma co-localização de neurotransmissores excitatórios e inibitórios durante o desenvolvimento fetal. Os autores acreditam que tal fato seja parte do processo de maturação neuronal, uma vez que nesse mesmo estudo foi observado que a co-localização diminui ao passo que o animal se desenvolve, havendo apenas 8% de neurônios co-localizados no plexo de porcos adultos.

Dentre os neurotransmissores primários mais comuns do SNE, a acetilcolina e as taquicininas (com destaque para a substância P) são os transmissores dos neurônios motores excitatórios. Já dentre os neurônios motores inibitórios, os mais comuns são o óxido nítrico (*nitric oxide* - NO) e o peptídeo vasoativo intestinal (*vasoactive intestinal peptide* – VIP). No entanto, esses neurotransmissores não são os únicos nem exclusivos dos neurônios motores, atuando em outros tipos de transmissões neuronais (FURNESS et al., 1992; MC CONALOGUE et al., 1994; FURNESS 2000; SCHEMANN et al., 2004).

Além da necessidade de descobrir-se o número total de neurônios entéricos, devido à grande diversidade de neurotransmissores, metodologias foram desenvolvidas e aperfeiçoadas a fim de descobrir-se a representatividade de cada tipo neuronal encontrado no SNE. Ganhadores do prêmio nobel de medicina e fisiologia em 1906, Camillo Golgi e Santiago Ramón y Cajal desenvolveram a técnica da impregnação pela prata, a qual é fundamentada na reação do dicromato de potássio com o nitrato de prata, resultando em um depósito de cromato de prata no interior do neurônio (TORRES-FERNÁNDEZ, 2006).

Corantes de histologia convencional como o azul de toluidina, azul de metileno, e Giemsa (BARBOSA, 1978), foram utilizados como marcadores pan-neuronais devido à natureza básica dos mesmos. Desta maneira, as estruturas basófilas dos neurônios (ácidos nucleicos ou corpúsculos de Nissl) reagem com o corante e ficam visíveis ao microscópio de luz (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Gabella (1987) descreveu um método histoquímico amplamente utilizado de marcação pan-neuronal, o da enzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-diaforase (NADH-d). Esta técnica baseia-se na oxidação da enzima NADH em NAD^+ pela NADH-d, onde os elétrons liberados são captados por um sal acceptor artificial de elétrons, o azul de nitrotetrazólio (*Nitro Blue Tetrazolium* - NBT). Este por sua vez, ao receber os elétrons, é reduzido a um formazan insolúvel em água, de coloração azul escuro, facilmente detectadas sob microscopia de luz no citoplasma da célula. No entanto, Young et al. (1993) ao comparar a técnica histoquímica da NADH-d com uma marcação imunohistoquímica para o corpo neuronal, demonstraram que a técnica de Gabella evidencia 80% dos neurônios entéricos.

Karaosmanoglu et al. (1996) utilizaram o azul cuprolínico como marcador pan-neuronal e verificaram uma marcação amplamente satisfatória, superior a qualquer outra descrita na literatura. O azul cuprolínico, diferentemente dos demais corantes básicos, é seletivo pela molécula de RNA, atuando como um marcador ribossomal. Uma vez que as células não neuronais, como a neuroglia, fibras musculares lisas e células intersticiais de Cajal (*interstitial cells of Cajal* - ICC), e ainda os dendritos e axônios, apresentam poucos ribossomos, essa metodologia permite uma forte marcação do corpo neuronal (MENDELSON; TAS; JAMES, 1983).

Karnovsky e Roots (1964), a partir da evidenciação da enzima acetilcolinesterase (AChE), aperfeiçoaram o método de marcação de neurônios colinérgicos, ou seja, que possuem como neurotransmissor primário a acetilcolina.

Esta por sua vez, é fornecida como substrato da reação sendo hidrolizada pela AChE e liberando colina. A colina reduz o ferricianeto em ferrocianida, o qual se combina com íons de Cu^{++} , e forma um precipitado insolúvel de coloração cobre no citoplasma neuronal.

Assim como a detecção da atividade enzimática da AChE foi utilizada para marcação de neurônios colinérgicos, a detecção de atividade da óxido nítrico sintase (*nitric oxide synthase* - NOS) foi utilizada como marcador de neurônios nitrérgicos, ou seja, que utilizam o óxido nítrico (*nitric oxide* - NO) como neurotransmissor primário. Schmidt et al. (1992) demonstraram em neurônios a co-localização da enzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato-diaforase (NADPH-d) com a NOS, ou seja, essa molécula apresenta dois sítios enzimáticos, um de atividade óxido-redutase (essencial para a síntese do NO), e outro de atividade diaforase. Sendo assim, ao fornecer o NBT juntamente com o co-fator NADPH, este último é oxidado em NADP^+ pela diaforase, e o NBT reduzido pelos elétrons liberados. O produto da redução do NBT é o formazan azul escuro no citoplasma dos neurônios. Beesley (1995) analisou três métodos diferentes para detecção da NOS: histoquímica da NADPH-d, imunocitoquímica e hibridização *in situ*. Concluiu que todos são válidos, ressaltando a diferença entre eles: o NADPH-d detecta uma enzima co-localizada à NOS, a imunocitoquímica detecta a molécula de NOS e a hibridização *in situ* detecta o RNA mensageiro (mRNA) da NOS.

Vale ressaltar que as metodologias acima descritas não são as únicas existentes para marcação neuronal, e nem são totalmente eficazes. Na verdade, atualmente não existe um método de marcação neuronal (pan-neuronal ou específico) que não permita marcações falso positivas ou não tenha contra pontos, sendo este o objeto de estudo de muitos pesquisadores (YOUNG et al., 1993; BEESLEY, 1995; BELAI et al., 1995; KARAOSMANOGLU et al., 1996; MIRANDA NETO et al., 2001).

1.2 A distrofia muscular de Duchenne

Em dezembro de 1851, durante um encontro da *Royal Medical and Chirurgical Society*, o médico Edward Meryon descreveu o caso de oito meninos afetados pelo que ele chamou na época de “*granular degeneration of the voluntary*

muscles”. Além de descrever os sinais clínicos da doença (dificuldades para andar e subir escadas logo na infância, com morte na juventude), Meryon observou que esta afetava preferencialmente meninos da mesma família. Além disso, observou a atrofia dos músculos voluntários, os quais não apresentavam a coloração avermelhada, comum nos indivíduos saudáveis. Em análises microscópicas, notou que o sarcolema das fibras estava destruído, e estas apresentavam um aspecto difuso com muitas partes substituídas por “glóbulos de óleo” e matriz granular. Tal estudo foi publicado no ano seguinte sob o título “*On granular and fatty degeneration of the voluntary muscles*”, mas não foi o suficiente para creditar a Meryon a descoberta de uma nova patologia.

Desconhece-se o motivo pelo qual Meryon foi negligenciado na história; entretanto, após dezesseis anos, em 1868, o francês Guillaume Benjamin Amand Duchenne em seu estudo “*Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myo-sclerosique*”, relatou de forma acurada muitos dos sintomas descritos por Meryon, e assim, cedeu seu nome para consagrar um dos tipos mais conhecidos de distrofia muscular da atualidade: a distrofia muscular de Duchenne (DMD) (EMERY, A.; EMERY, M., 1993).

A DMD é o tipo mais severo e frequente das distrofias musculares, afetando 1 em cada 3500 nascimentos de indivíduos do sexo masculino. O diagnóstico é realizado logo no início da infância (3 a 5 anos), quando o indivíduo apresenta uma progressiva fraqueza muscular nas regiões proximais dos membros, o que resulta em dificuldades para se locomover, subir escadas e correr. Devido à fraqueza dos joelhos e músculos extensores do quadril, o indivíduo levanta-se de uma cadeira ou do chão com dificuldade, apoiando as mãos nos joelhos como auxílio, ou seja, apresentando o sinal característico de Gowers. A maioria dos portadores apresenta o tríceps sural aumentado, decorrente de uma pseudo-hipertrofia ocasionada pela substituição das fibras musculares necrosadas por tecido conjuntivo fibroso e adiposo. É comum ainda, algum tipo de acometimento mental, sendo que cerca de 20% dos pacientes afetados apresentam um QI inferior a 70. Além dos sinais clínicos, um fator determinante no diagnóstico é a mensuração do nível sérico da enzima creatina quinase (creatine kinase - CK), a qual encontra-se aumentada em até cem vezes nos indivíduos distróficos (EMERY, 2002a; HSU, 2004; MANZUR et al., 2008).

Entre 9 e 12 anos de idade, devido à progressiva fraqueza muscular, o portador de DMD já está completamente dependente de cadeira de rodas, e nos primeiros anos de puberdade desenvolve escoliose em consequência da atrofia dos músculos paravertebrais. Em torno dos 20 anos de idade morre geralmente por insuficiência respiratória, e na minoria dos casos, por complicações cardíacas (EMERY, 2002a; MANZUR et al., 2008).

1.3 A causa da DMD

Na década de 1980 o *locus* da DMD foi identificado no braço curto do cromossomo X (Xp21) (JACOBS et al., 1981; KUNKEL et al., 1985; RAY et al., 1985; MONACO et al., 1986). Este é o maior gene descrito nos seres humanos, com aproximadamente 2 milhões de pares de base, sendo 99% composto por íntrons e apenas 1% de sequências codificantes: 86 exons. Corresponde a 0,1% do genoma total, ou 1,5% de todo cromossomo X (GILLIS, 1996; MUNTONI et al., 2003).

Hoffman et al. (1987), em amostras de músculo esquelético, cardíaco, liso e de cérebro de humanos e camundongos normais, identificaram a proteína produto desse gene, e notaram sua ausência em pacientes e camundongos distróficos, denominando-a por este motivo de *distrofina*. Trata-se de uma proteína de 427kDa na sua forma completa, composta por quatro domínios: um domínio amino-terminal (NH₂), um domínio central, um domínio rico em cisteína e outro carboxi-terminal (COOH). A distrofina associa-se a um complexo glicoprotéico do sarcolema através do seu domínio carboxi-terminal, e à actina do citoesqueleto, através do seu domínio amino-terminal. O complexo glicoprotéico por sua vez, conecta-se à laminina-2 da matriz extracelular, resultando na formação de uma estrutura única e contínua: actina do citoesqueleto-distrofina-complexo glicoprotéico- laminina-2 (GILLIS, 1996; NELSON et al., 2009).

Aproximadamente 70% das mutações sofridas pelo gene da distrofina são deleções (raramente duplicações) entre os exons 44-55. Uma grande deleção não significa um fenótipo mais severo. A deleção apenas do exon 44 resulta no quadro clínico típico de DMD, enquanto uma deleção de até 50% do gene foi descrita numa

forma mais branda da distrofia. A grande chave para o entendimento dos diferentes fenótipos (dependentes da distrofina) está no “*reading-frame*” do gene. Mutações que mantêm o *reading-frame* transcrevem uma distrofina anormal, porém parcialmente funcional, e resultam numa variável mais branda da DMD, chamada Distrofia Muscular de Becker (BMD). Já as mutações que interrompem ou excluem o *reading-frame*, traduzem um RNA instável que transcreve uma distrofina truncada, a qual é rapidamente degradada. Desta forma, a ausência da distrofina resulta num fenótipo mais severo, a distrofia muscular de Duchenne (EMERY, 2002b; MUNTONI et al., 2003).

A relação entre a ausência de distrofina e o processo de degeneração muscular não é totalmente claro, mas duas teorias são amplamente aceitas:

1-Acredita-se que a distrofina exerça papel chave na estabilização do sarcolema durante o estresse da contração muscular. A ausência de distrofina desestabiliza o sarcolema, o qual torna-se propenso ao rompimento, permitindo um grande influxo de cálcio na célula (MOENS et al., 1993; MUNTONI et al., 2003).

2-Acredita-se que a distrofina esteja envolvida na distribuição e/ou função dos canais de cálcio presentes no sarcolema. A ausência de distrofina faz com que esses canais fiquem abertos por um tempo demasiadamente prolongado, o que resulta em um grande influxo de cálcio na célula (DENETCLAW et al., 1994).

O aumento do teor de cálcio nas fibras musculares de portadores de DMD ou camundongos distróficos, foi observado por vários autores e parece ser uma das primeiras mudanças bioquímicas sofridas pela fibra muscular (OBERC et al., 1977; EMERY et al., 1980; BERTORINI et al., 1982; GAILLY et al., 1993). Seja por rompimento do sarcolema ou por abertura prolongada dos canais de cálcio, fato é que, nas células privadas de distrofina, ocorre um influxo deste íon. Acredita-se que esse influxo seja suficiente para gerar a perda da homeostase citoplasmática do cálcio, o que leva a um ou mais processos em cascata, que culminam na necrose da fibra muscular e perda de enzimas sarcoplasmáticas, como a CK. Possíveis vias são a ativação direta de proteases pelo cálcio, ou a indireta, via disfunção mitocondrial (EMERY, 2002a; WHITEHEAD et al., 2006).

1.4 Modelos animais para o estudo da DMD

Bulfield et al. (1984), a partir de uma mutação espontânea do cromossomo X em camundongos C57BL/10, demonstraram um modelo animal bastante interessante para estudos da DMD. Foi observado pelos autores que este camundongo apresentava níveis séricos elevados de enzimas sarcoplasmáticas, como a creatina quinase e a piruvato quinase, e praticamente as mesmas alterações histológicas que indivíduos com DMD, com exceção de fibrose e substituição do tecido muscular pelo adiposo. Notando a oportunidade da utilização daquele camundongo como modelo animal para estudos de distrofias musculares ligadas ao cromossomo X, Bulfield e seu grupo o nomearam de “*X-linked muscular dystrophy mouse*”, mais conhecido pela sua sigla: *mdx*.

A viabilidade do camundongo *mdx* como um modelo de estudo para DMD foi logo questionada, devido ao fato deste não expressar o fenótipo característico da doença. Bridges (1986), estudando 36 camundongos *mdx* corroborou os achados de Bulfield mostrando severa degeneração da musculatura dos membros, ausência de fibrose e de deposição de tecido adiposo. Neste mesmo estudo foi notada a capacidade de regeneração das fibras degeneradas; apesar disto, o camundongo *mdx* foi considerado um potencial modelo de estudo da DMD.

A validação deste emergente modelo animal veio em 1987 com o estudo de Hoffman et al., no qual, comparando cDNAs de portadores de DMD e camundongos *mdx* identificaram que a mutação no cromossomo X de ambos ocorria exatamente no mesmo *locus*. Além disso, notaram que somente a proteína produto daquela mutação, a distrofina, estava ausente nas duas amostras musculares. A possível explicação para os camundongos *mdx* não expressarem o fenótipo característico da DMD, é o fato deles não apresentarem uma severa fibrose nem substituição do tecido muscular pelo adiposo. Como estas são as únicas diferenças entre o camundongo *mdx* e os humanos com DMD, acredita-se que o crescente aumento do tecido conjuntivo e deposição de tecido adiposo impeça as fibras musculares humanas de se regenerarem.

Alguns anos depois, Stedman et al. (1991) determinaram que o diafragma era o músculo do camundongo *mdx* mais apropriado para o estudo da DMD, por este sofrer os mesmos processos degenerativos observados nos pacientes distróficos. Neste músculo, em animais com apenas trinta dias de idade, houve o aparecimento de focos de degeneração e necrose. Diferentemente da musculatura dos membros a qual sofreu ampla regeneração, o diafragma sofreu uma progressiva degeneração. Aos seis meses de idade, a arquitetura e o tamanho das fibras musculares estavam fortemente alterados, sob contínuo processo necrótico e aumento significativo de tecido conjuntivo. Aos dezesseis meses, todo o músculo havia sido degenerado e substituído por tecido necrótico. Estranhamente, esses animais não demonstraram problemas respiratórios evidentes, sugerindo uma ação compensatória dos demais músculos que atuam na respiração; no entanto, ao recrutar tais músculos, os mesmos apresentaram alterações degenerativas semelhantes as do diafragma, concluindo que a ausência de distrofina altera o limiar de injúrias promovidas pela carga de trabalho muscular. De fato, Gomes et al. (2010) demonstraram um aumento do processo degenerativo nos músculos tibial anterior e gastrocnêmio de camundongos *mdx* submetidos ao exercício físico comparativamente à camundongos *mdx* sedentários.

Outro modelo animal utilizado no estudo da DMD é o canino. Uma mutação espontânea no gene da DMD em cães da raça Golden Retriever, resultou no modelo conhecido como Golden Retriever Muscular Dystrophic (GRMD). Esses cães apresentam as mesmas alterações musculares que o humano com DMD, inclusive expressando o fenótipo característico da doença (COOPER et al., 1988; VALENTINE et al., 1988). No entanto, cães não são animais ideais para se trabalhar em laboratório, uma vez que a manutenção das colônias é cara, além de serem extremamente sensíveis e emotivos.

Acredita-se que o camundongo *mdx* seja o modelo ideal da DMD para estudos genéticos e bioquímicos, enquanto o cão GRMD seja muito útil como modelo clínico, como um intermediário para terapias entre os camundongos e humanos, já que o cão adulto se assemelha mais ao humano em tamanho, massa e expressão da doença (COLLINS; MORGAN, 2003; VAINZOF et al., 2008).

1.5 Relações entre DMD, TGI e SNE

Devido aos evidentes sinais clínicos da DMD serem observados na musculatura estriada esquelética, chama a atenção a existência, comparativamente, de poucos estudos voltados para a musculatura lisa. Nowak et al. (1982) ressaltaram que distúrbios gastrintestinais podem ser os primeiros sinais, ou a principal característica de uma patologia muscular.

Estudos com portadores de DMD mostraram que estes indivíduos apresentam dificuldades ao se alimentar, caracterizadas por disfagia, sufocamento, azia e vômito, além da necessidade de manobras desobstrutivas durante ou após as refeições (JAFJE et al., 1990). Corroborando esses achados, Pane et al. (2006) acrescentaram a dificuldade em pacientes com mais de 18 anos de abrir a boca e mastigar, resultando num maior tempo de refeição. Notaram ainda, alterações gastrintestinais como constipação, acúmulo de gases, e em 4% dos pacientes, refluxo gastroesofágico.

Intensa dor abdominal, náusea, vômito e abdome dilatado foram os sintomas comuns em muitos relatos de casos de pacientes com DMD, que após análise acurada, apresentaram dilatação aguda do estômago (GOTTRAND et al., 1991; BENSEN et al., 1996; CHUNG et al., 1998; LUNSHOF et al., 2000), ou dos intestinos (LEON et al., 1986; BOLAND et al., 1996).

A motilidade do trato gastrintestinal de pacientes com DMD apresenta-se reduzida no esôfago, no estômago (LEON et al., 1986; BAROHN et al., 1988; CHUNG et al., 1998) e no intestino grosso (GOTTRAND et al., 1991). Tal alteração também foi observada por Mulè et al. (2010) no estômago e intestino delgado, e por Mancinelli et al. (1995) no intestino grosso de camundongos *mdx*.

Em relação aos aspectos histológicos da musculatura lisa, estudos em necrópsias de pacientes com distrofias musculares revelaram anormalidades como edema, deposição de tecido adiposo e fibrose, resultando em atrofia da túnica muscular externa (BEVANS, 1945; BAROHN et al., 1988). A presença de perfurações no estômago foi relatada em alguns casos, e atribuída à expressiva diminuição da espessura da túnica muscular externa (HUVOS; PRUZANSKI, 1967;

DINAN et al., 2003). Em camundongos *mdx* adultos, Boland et al. (1995) e Leflaucheur; Sebillé (1996) não observaram fibrose das fibras musculares lisas, mas também notaram uma significativa diminuição na espessura da túnica muscular externa do TGI.

Apesar de claro o acometimento do trato gastrointestinal na DMD, os estudos até aqui citados não exploram a contento as causas dessas alterações. Todavia, o trabalho de Brenman et al. (1995) demonstrou que a NOS está associada ao mesmo complexo glicoprotéico ao qual a distrofina se liga, destacando o papel do óxido nítrico na fisiopatologia da DMD. Os autores comprovaram a ausência da NOS no sarcolema de fibras musculares esqueléticas de pacientes distróficos e camundongos *mdx*, sugerindo uma interação direta da distrofina com a NOS. A ausência da distrofina impediria a ancoragem da NOS no sarcolema, a qual por esta razão estaria dispersa no sarcoplasma com consequente redução de sua atividade.

A partir desse achado, e sabendo que o NO é o neurotransmissor primário inibitório da musculatura gastrointestinal, estudos foram feitos na tentativa de elucidar o papel deste na gênese das alterações observadas nos pacientes com DMD. De uma forma geral, tais pesquisas relacionaram as alterações motoras do intestino de camundongos *mdx* a uma atividade diminuída do óxido nítrico, não havendo um consenso se isto é decorrente de uma redução miogênica da NOS, alterações nas ICC ou nos neurônios nitrérgicos. (AZZENA; MANCINELLI, 1999; MULÉ et al., 1999; MULÉ et al., 2001; SERIO et al., 2001; ZIZZO et al., 2003; TAMEYASU et al., 2004).

Somado a estes fatos, é intrigante a descoberta de que os neurônios entéricos, bem como as ICC expressam a isoforma completa da distrofina. Nos estudos em que isso foi demonstrado, os autores notaram uma distribuição descontínua da distrofina na membrana celular dos neurônios entéricos, onde apenas focos imunoreativos foram identificados. Longe de se saber o papel da distrofina nos neurônios entéricos, os autores sugeriram uma interação desta com a ancoragem de receptores e canais iônicos para os neurotransmissores, em especial o óxido nítrico (VANNUCCHI et al., 2001; VANNUCCHI et al., 2002).

Como se depreende, pelo até exposto, as alterações do TGI presentes em indivíduos com DMD e camundongos *mdx*, somada a falta de um consenso e conhecimento de suas causas, ressaltam a necessidade de estudos voltados nessa

área. Além disso, o fato da distrofina ser expressa nos neurônios entéricos, sugere possíveis relações desta com a manutenção da homeostase do TGI, justificando-se assim o presente estudo.

2 PROPOSIÇÃO

O trato gastrointestinal de indivíduos com distrofia muscular de Duchenne claramente apresenta alterações motoras, todavia, não existe um consenso na literatura sobre a(s) causa(s) dessas alterações.

A fim de contribuir para um melhor entendimento sobre tais alterações, pretende-se no presente estudo analisar, de forma quantitativa e qualitativa, a morfologia do plexo mioentérico do intestino delgado de camundongos *mdx* e seus respectivos controles, camundongos C57BL/10, em diferentes idades (4 e 10 semanas).

Desta forma, utilizando-se as técnicas histoquímicas da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-diaforase (NADH-d), Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato-diaforase (NADPH-d), Acetilcolinesterase (AChE) e de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), serão avaliadas:

- A área total do intestino delgado;
- A densidade e o número total de neurônios reativos à NADH-d;
- Área do perfil do corpo de neurônios reativos à NADH-d;
- A densidade e o número total de neurônios reativos à NADPH-d;
- Área do perfil do corpo de neurônios reativos à NADPH-d;
- A reatividade à AChE dos neurônios mioentéricos;
- A ultra-estrutura dos neurônios e das fibras musculares lisas constituintes das paredes do intestino delgado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais utilizados e formação dos grupos

O uso dos espécimes do presente estudo foi aprovado pela *Comissão de Ética no uso de animais* da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), sob o número de protocolo 2172/2011. Visto que pertenceram a um projeto amplo¹, os espécimes foram utilizados por outros pesquisadores em trabalhos envolvendo outros órgãos.

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos normais da linhagem C57BL/10 e mutantes C57BL/10-Dmd/mdx, provenientes do biotério da Associação de Amigos dos Portadores de Distrofia Muscular (AADM) em parceria com a Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), e também do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Figuras 1A e 1B).

Todos os animais foram mantidos, até os dias de coleta, em gaiolas de polipropileno com grade metálica (4 a 5 animais/gaiola) no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo sob condições controladas de luz e temperatura², sem restrições de ração e água (Figura 1C).

Figura 1 **A.** Camundongo normal C57BL/10 de 6,5 meses **B.** Camundongo mutante C57BL/10-Dmd/mdx de 6,5 meses. **C.** Gaiola para manutenção dos animais, medidas: 30x20x13cm

¹ “Avaliação morfoquantitativa dos efeitos da distrofia muscular no córtex cerebral e no plexo mioentérico de camundongos mdx”. Aprovado pelo *Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e Animais* da Universidade de Ribeirão Preto (CEP/UNAERP), sob o número de protocolo 046/2010.

² Ciclos alternados de claro/escuro de 12 horas em temperatura entre 23 e 25°C.

Os animais normais constituíram o grupo controle, sendo o grupo experimental formado pelos animais mutantes, grupo mdx. De acordo com a idade, os grupos foram assim subdivididos:

- **C4** - Camundongos normais (controle) de 4 semanas (peso $17 \pm 1g$).
- **MDX4** - Camundongos mutantes (*mdx*) de 4 semanas (peso $16,9 \pm 1,1g$).
- **C10** - Camundongos normais (controle) de 10 semanas (peso $26,7 \pm 2,8g$).
- **MDX10** - Camundongos mutantes (*mdx*) de 10 semanas (peso $24,8 \pm 1,3g$).

Desta forma, de acordo com a metodologia a que foram submetidos, o número de animais utilizados de cada grupo, foi o seguinte (Tabela 1):

Tabela 1 Quantidade de animais utilizados em cada técnica

Técnicas	GRUPOS			
	C4 (n° de animais)	C10 (n° de animais)	MDX4 (n° de animais)	MDX10 (n° de animais)
NADH	5	5	5	5
NADPH	5	5	5	5
AChE	3	3	3	3
MET	2	2	2	2

3.2 Coleta e obtenção dos segmentos do intestino delgado

Após serem eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO₂), através de uma secção mediana na região ventral acessou-se a cavidade abdominal de onde retirou-se todo o intestino delgado, a partir de secções nas extremidades oral (imediatamente após o piloro) e aboral (imediatamente antes da junção íleo-cecal).

A fim de se detectar possíveis diferenças morfológicas dos componentes do plexo mioentérico ao longo do intestino delgado, este foi dividido em três segmentos distintos de aproximadamente 3cm de comprimento: oral (após o piloro), aboral (antes da junção íleo-cecal) e médio (equidistante aos precedentes), desprezando-se o restante da víscera (Figura 2).

Figura 2 Esquema da divisão do intestino delgado em segmentos oral, médio e aboral. As linhas pontilhadas representam os locais onde foram praticadas as incisões

3.3 Métodos histoquímicos de evidenciação neuronal

O procedimento a seguir foi comum a todos os métodos histoquímicos realizados (NADH, NADPH e AChE). Logo após a obtenção dos segmentos, estes tiveram seu interior lavado com PBS (0.1M, pH 7,4) (Figura 3A) e em seguida uma de suas extremidades ligadas. Com auxílio de uma seringa, a solução apropriada para cada método foi injetada na luz da víscera, em quantidade suficiente para distender levemente suas paredes (Figuras 3B e 3C).

Figura 3 Procedimentos prévios às técnicas histoquímicas (NADH, NADPH e AChE) realizadas. **A.** Lavagem da luz dos segmentos. **B.** Ligadura de uma das extremidades antes de injetar solução. **C.** Segmentos preenchidos com solução adequada a cada técnica utilizada.

3.3.1 Evidenciação pela técnica da Nicotinamiada Adenina Dinucleotídeo - diaforase (NADH-d)

Após lavados, os espécimes foram preenchidos com solução de Krebs³ e submetidos à técnica de evidenciação da enzima β -NADH-d conforme descrito por Gabella (1987).

Inicialmente os espécimes foram imersos por 20 minutos em solução de Krebs, sendo em seguida transferidos para uma solução permeabilizante (Krebs contendo Triton X-100⁴ a 0,3%) onde permaneceram por 5 minutos. Após nova lavagem em solução de Krebs por 10 minutos, os espécimes permaneceram imersos por 90 minutos, em estufa a 37°C, no seguinte meio de incubação: solução de 0,5 mg/ml de Nitro Blue Tetrazolium⁵ (NBT) em água destilada; 25 partes de PBS (0.1M, pH 7,4) e 50 partes de água; 0,5 mg/ml de β -NADH na forma reduzida⁶. Finalizado o período de incubação, a reação foi interrompida transferindo-se os espécimes para uma solução fixadora de paraformaldeído a 4% em PBS (pH 7,4).

Cada segmento foi então aberto em sua margem mesentérica, tendo a camada muscular longitudinal dissecada sob lupa estereoscópica⁷, com auxílio de pinças oftalmológicas (Figura 4). Em seguida os espécimes foram montados como preparado total de membrana, entre lâmina e lamínula, em solução de glicerina tamponada.

³ 1.3g de NaHCO₃, 0.24g de MgCl₂, 0.44g de KCl, 0.165g de Na₂HPO₄, 7.05g de NaCl e 0.367 de CaCl₂ em 1litro de água destilada

⁴ Sigma-Aldrich. USA.

⁵ Sigma-Aldrich. USA.

⁶ Sigma-Aldrich. USA.

⁷ Advanced Microscopy Group (AMG). China

Figura 4 Dissecação da camada muscular longitudinal em dois momentos

3.3.2 Evidenciação pela técnica da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato - diaforase (NADPH-d)

Os segmentos após lavados, foram preenchidos com solução de PBS (0.1M, pH 7,4) sendo em seguida submetidos à técnica de evidenciação da enzima β -NADPH-d para neurônios nitrérgicos (SANTER 1994).

De acordo com essa metodologia, os segmentos permaneceram imersos por 30 minutos em solução fixadora de paraformaldeído a 4% em PBS sendo em seguida lavados em PBS (0.1M, pH 7,4) por 10 minutos. Após a lavagem, os espécimes foram imersos por 90 minutos, em estufa a 37°C, no seguinte meio de incubação: solução de 0,5 mg/ml de NBT em PBS (0.1M, pH 7,4) contendo 0,2% de Triton X-100; 0,1 mg/ml de β -NADPH na forma reduzida⁸. A interrupção da reação, dissecação da camada muscular longitudinal e a montagem dos preparados totais de membrana foram realizadas como descrito no item 3.3.1.

⁸ Sigma-Aldrich. USA.

3.3.3 Evidenciação pela técnica da Acetilcolinesterase (AChE)

Sendo preenchidos com solução de paraformaldeído a 4% em PBS (pH 7,4) após a lavagem, os segmentos foram submetidos a técnica de evidenciação de neurônios colinérgicos de acordo com o método de Karnovsky e Roots (1964), modificado por Mizuno et al. (2007) e aqui adaptado. Após permanecerem imersos por 1 hora a 4°C em solução fixadora de paraformaldeído a 4% em PBS, os espécimes foram transferidos para uma solução de lavagem⁹ (pH 6,0) contendo tetra-isopropil pirofosforamida¹⁰ (iso-OMPA) e hialuronidase¹¹, onde permaneceram por 12 a 18 horas a 4°C sob agitação.

Fim do esse período, a incubação foi realizada por 18 horas a 4°C sob agitação, em um meio¹² contendo acetilcolina¹³, PBS (pH 6,0), citrato de sódio (100mM), sulfato de cobre (30mM), água destilada, ferricianeto de potássio (5mM), Triton X-100, e quantidade equivalente de solução de lavagem.

A reação foi interrompida transferindo-se os espécimes para uma solução fixadora de paraformaldeído a 4% em PBS, onde permaneceram por um tempo mínimo de 2 horas. Cada segmento foi então aberto em sua margem mesentérica, tendo a camada muscular longitudinal dissecada como descrito no item 3.3.1. Os preparados totais de membrana foram então desidratados em álcool 70% (1x por 3 minutos) e diafanizados em xilol (1x por 3 minutos) para, em seguida, serem montados entre lâmina e lamínula com resina Entellan¹⁴.

⁹ 0,07g de iso-OMPA para 50 ml de Krebs, mais o mesmo volume de água destilada com hialuronidase (1 ampola para cada 25 ml)

¹⁰ Sigma-Aldrich. USA.

¹¹ 2000 UTR Apsen. Brasil

¹² Para 40 ml: 0,02g de acetilcolina, 26 ml de PBS, 2 ml de citrato de sódio, 4 ml de sulfato de cobre, 4 ml de água destilada, 4 ml de ferricianeto de potássio, 0,1% de Triton X-100

¹³ Sigma-Aldrich. USA.

¹⁴ Merck. Germany.

3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

De acordo com Ciena et al. (2010), os animais foram inicialmente anestesiados com cetamina¹⁵ (50mg/kg) e xilazina¹⁶ (10mg/kg) para, em seguida, serem perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução fixadora de Karnovsky modificada, contendo paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 2,5% em solução tampão cacodilato (0.1M, pH 7,4). Após a perfusão, o intestino delgado foi retirado, e dos segmentos oral, médio e aboral foram obtidos fragmentos de aproximadamente 1 mm de espessura. Estes foram imediatamente transferidos para uma solução fixadora de glutaraldeído a 2,5% em tampão, onde permaneceram por 2 horas a 4°C sendo então lavados em tampão e pós-fixados com tetróxido de ósmio (OsO₄) a 2% em tampão por 2 horas a 4°C.

Após lavado em solução salina para retirada do excesso de OsO₄, o material foi imerso em solução aquosa de acetato de uranila a 0,5%, onde permaneceu 12 a 18 horas, em temperatura ambiente e local escuro. Após esse período, visando a substituição da água do material por um fluido que fosse miscível tanto na água quanto na resina (óxido de propileno), iniciou-se a desidratação em uma série de banhos, 15 minutos cada: alcoóis 70%, 80%, 90%, 95% (1x), absoluto (4x) e óxido de propileno (2x).

Finalizada a desidratação, o material permaneceu por 4 horas em uma mistura de resina¹⁷ e óxido de propileno na proporção de 1:1 sob agitação em temperatura ambiente, para gradativa infiltração de resina no material. Em seguida, a mistura foi trocada por resina pura onde permaneceu por 12 a 18 horas sob agitação em temperatura ambiente. Após esse período, a resina foi novamente trocada por resina pura e os espécimes colocados por 1 hora em estufa a 37°C, com o frasco aberto para total evaporação de líquidos do material.

A inclusão foi realizada colocando-se o material em moldes retangulares preenchidos por resina e mantidos por 5 dias em estufa a 60°C, a fim de concretizar-se a polimerização do bloco. Assim obtido, o bloco foi trimado e, em seguida,

¹⁵ Syntec. Brasil.

¹⁶ Syntec. Brasil.

¹⁷ Low Viscosity Embedding Media Spurr's Kit, Electron Microscopy Sciences. USA.

realizados os cortes semifinos de 300nm em ultramicrotomo¹⁸, os quais foram corados com azul de toluidina a 1% para posterior observação sob microscopia de luz.

Selecionada a área de interesse, foram realizados cortes ultrafinos de 50nm em ultramicrotomo que foram coletados em telas de cobre de 200 “mesh”¹⁹, contrastados com solução aquosa de acetato de uranila a 4% por 3 minutos, lavados com água destilada, contrastados com solução aquosa de citrato de chumbo a 0,4% por 3 minutos e novamente lavados com água destilada. As telas foram analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão²⁰ do Departamento de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VCI-Anatomia/ FMVZ-USP).

3.5 Análise Quantitativa

Para as técnicas histoquímicas da NADH-d e NADPH-d foram determinadas a área total do intestino delgado, a densidade numérica neuronal, o número total estimado de neurônios e a área do perfil do corpo neuronal em cada grupo, de acordo com a tabela 1.

3.5.1 Área total do intestino delgado

Após a retirada do intestino delgado como descrito no item 3.2, este foi colocado entre duas lâminas de vidro sobre um negatoscópio, onde teve sua área decalcada em papel vegetal, para posterior mensuração da área total (em cm²) com o auxílio de um planímetro²¹ (Figuras 5A e 5B).

¹⁸ Leica Ultracut UCT. Germany.

¹⁹ Sigma-Aldrich. USA.

²⁰ FEI Morgagni 268 (D). USA.

²¹ OTT. Germany.

Figura 5 Determinação da área total do intestino delgado. **A.** Decalque em papel vegetal. **B.** Mensuração da área total com auxílio de planímetro

3.5.2 Densidade numérica neuronal

Utilizando um microscópio binocular²² com objetiva de 40x, a densidade numérica neuronal dos segmentos oral, médio e aboral foi determinada como n° de neurônios/mm², a partir da contagem de todos os neurônios em 25 campos aleatórios (6,37mm²) do preparado de membrana de cada segmento.

3.5.3 Número total estimado de neurônios

Sabendo-se a quantidade de neurônios encontrados em 75 campos (25 de cada segmento), bem como a respectiva área (6,37 x 3), e conhecendo-se a área total do intestino determinada de acordo com o item 3.5.1, foi possível estimar o número total de neurônios (NADH) do plexo mioentérico, bem como a quantidade de neurônios nitrérgicos (NADPH) para cada grupo.

²² Carl Zeiss, modelo Axioskop 40

3.5.4 Área do perfil do corpo neuronal

A área do perfil dos corpos neuronais foi analisada em 30 neurônios de cada segmento (oral, médio e aboral) e mensurada em μm^2 sob microscópio binocular com objetiva de 100x, integrado a uma câmera fotográfica²³ e adaptado ao programa Axiovision Rel. 4.8²⁴ (ferramenta *Outline*).

3.6 Análise estatística

Os valores referentes à área total do intestino delgado e ao número total estimado de neurônios foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com 2 fatores (grupo e idade), enquanto aqueles relativos à densidade numérica neuronal e à área do perfil do corpo neuronal foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com 3 fatores (grupo, idade e segmentos). Todas as análises de variâncias foram seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey, admitindo-se valores de $p < 0,05$ como significantes (ZAR, 1984).

²³ Carl Zeiss, modelo Axio Cam HRc

²⁴ Carl Zeiss.

4 RESULTADOS

4.1 Aspectos Qualitativos

As análises qualitativas relativas aos componentes do plexo mioentérico de todos os grupos propostos (C4, MDX4, C10 e MDX10), estão descritas a seguir para as técnicas histoquímicas de evidênciação neuronal (NADH-d, NADPH-d e AChE), bem como por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

4.1.1 Análise morfológica dos componentes do plexo mioentérico evidenciados pela técnica da NADH-d

Com a reação da NADH-d, no que concerne ao aspecto geral sobre a conformação e distribuição dos gânglios do plexo mioentérico nos diferentes segmentos do intestino delgado (oral, médio e aboral), verificou-se que os mesmos apresentaram-se, em sua maioria, como estruturas alongadas e paralelas entre si, contendo quantidade variável de neurônios e alinhados perpendicularmente ao longo eixo da víscera (Figuras 6A-D). Em alguns trechos, gânglios fusionados em uma das suas extremidades foram encontrados, apresentando-se como um gânglio de aspecto arredondado (Figura 6E); mormente na parte aboral, diversos gânglios exibiram aspecto poligonal (Figura 6F). Essas características foram observadas em todos os grupos estudados (C4, MDX4, C10 e MDX10), permitindo inferir que não ocorreram diferenças entre os animais Controle e MDX.

Ao se avaliar essa reação em maior aumento, quando então foi possível detectar as características dos neurônios mioentéricos (Figura 7), notou-se que a mesma foi intensa principalmente no citoplasma dos neurônios grandes em todos os grupos, sendo que, nos animais do grupo MDX, diversos neurônios grandes exibiram uma reatividade citoplasmática mais fraca do que a verificada nos animais Controle (Figuras 7D e 7F). Basicamente, os neurônios médios e pequenos apresentaram-se com fraca intensidade de reação, tanto nos animais Controle (C4 e C10) como nos animais MDX (MDX4 e MDX10); porém, aparentemente, essas células predominaram em diversos gânglios dos animais MDX, ou seja, havia

nesses gânglios, uma maior proporção de células com essas características, relativamente à presença de neurônios grandes. Fato marcante nos animais dos grupos MDX4 e MDX10 foi a presença de gânglios exibindo espaços em seu interior (Figuras 7D e 7F), onde não foi possível detectar a presença de neurônios. O mesmo não foi notado nos animais de C4 e C10, uma vez que nesses grupos, neurônios médios e pequenos estavam presentes, mesmo tendo exibido fraca intensidade de reação. Quando se analisou mais atentamente a morfologia dos neurônios, principalmente os grandes, verificou-se que a maioria deles presentes nos gânglios dos animais dos grupos C4 e C10 eram de aspecto geralmente alongado contendo núcleo excêntrico, com citoplasma de contorno regular e reação de aspecto homogêneo (Figuras 7A, 7C e 7E). Sob esse aspecto, diferenças significativas foram detectadas nos animais dos grupos MDX, ou seja, muito embora neurônios grandes de forma semelhante aos observados nos grupos Controle estivessem presentes, muitas dessas células exibiram contornos e formatos irregulares, com nítida alteração da reatividade no interior de seu citoplasma.

Figura 6 Aspecto geral dos gânglios mioentéricos dos animais dos grupos Controle (A-C) e MDX (D-F), evidenciados pela reação da NADH-d. Notar o aspecto alongado dos gânglios contendo quantidade variável de neurônios (A-D); gânglios fusionados (E) em uma de suas extremidades formando gânglios de aspecto arredondado (seta), e nos círculos (F) gânglios de conformação poligonal. (A,D- Oral; B,E- Médio; C, F- Aboral. A, B, D: 4 semanas; C, E, F: 10 semanas. Barra de calibração: 100µm)

Figura 7 Neurônios mioentéricos dos gânglios dos animais dos grupos Controle (A, C, E) e MDX (B, D, F) evidenciados pela reação da NADH-d. Em ambos os grupos foram observados neurônios pequenos, médios e grandes, estes, com aspecto alongado, núcleo excêntrico e reação citoplasmática homogênea nos animais dos grupos Controle (setas). Nos animais MDX verificou-se espaços no interior de diversos gânglios, onde não foi possível detectar nitidamente a presença de neurônios (*). Ainda nesse grupo (B), muito embora os neurônios grandes exibissem aspectos característicos daqueles presentes nos animais dos grupos Controle (seta), muitos deles (D, F) caracterizaram-se por apresentar contornos, formatos e reatividade irregulares de seu citoplasma (setas). (A, B- Oral; C, D- Médio; E, F- Aboral. A, B, C, E: 4 semanas; D, F: 10 semanas. Barra de calibração: 50µm)

4.1.2 Análise morfológica dos componentes do plexo mioentérico evidenciados pela técnica da NADPH-d

Ao se avaliar os preparados de membrana submetidos à reação da NADPH-d sob o aspecto geral, isto é, em pequeno aumento, verificou-se que os gânglios mioentéricos apresentaram-se de diferentes tamanhos e formatos, com número extremamente variado de neurônios nitrérgicos. Assim, foi possível observar desde neurônios isolados e gânglios pequenos contendo apenas um neurônio reativo, até gânglios com 50 ou mais neurônios expressando essa marcação. Nos gânglios de ambos os grupos e nas idades estudadas (C4, MDX4, C10 e MDX10), espaços pequenos ou amplos (de acordo com o tamanho do gânglio) foram notados, indicativos da presença de neurônios não reativos à NADPH-d (Figuras 8C, 8D, 8E, 8F). Relativamente às malhas do plexo, os três principais tipos: primárias, secundárias e terciárias, estiveram presentes em todos os grupos. (Figura 8B).

Na análise dos componentes do plexo mioentérico em maior resolução, notou-se que, tanto no grupo Controle (C4, C10) como no grupo MDX (MDX4, MDX10), os neurônios nitrérgicos exibiram contorno típico de células multipolares, sendo que em muitos deles, evidenciou-se também o seu prolongamento axonal (Figuras 9C e 9F). Poucos foram os neurônios que exibiram fraca reatividade à NADPH-d. Os espaços no interior dos gânglios, representativos de neurônios não nitrérgicos estavam circundados por prolongamentos neuronais delgados, exibindo varicosidades (Figuras 9B e 9C). Em relação a essas estruturas, as mesmas foram nitidamente mais evidenciadas nas malhas secundárias e terciárias do plexo dos animais MDX, quando comparadas àquelas do plexo dos animais dos grupos Controle.

Figura 8 Componentes do plexo mioentérico dos animais dos grupos Controle (A, C, E) e MDX (B, D, F), evidenciados pela reação da NADPH-d. Notar, em todos os grupos, os diferentes tamanhos e formatos dos gânglios contendo número variável de neurônios nitrérgicos e apresentando espaços em seu interior (*). Em determinados trechos (B, C, F), a presença de corpos neuronais isolados nas malhas do plexo foi detectada (setas). As malhas primárias (I), secundárias (II) e terciárias (III) foram evidenciadas em todos os grupos estudados. (A, B- Oral; C, D- Médio; E, F- Aboral. A, E: 10 semanas; B, C, D, F: 4 semanas. Barra de calibração: 100µm)

Figura 9 Gânglios do plexo mioentérico dos animais dos grupos Controle (A, C, E) e MDX (B, D, F), evidenciados pela reação da NADPH-d. Em todos os grupos estudados, os neurônios nitrérgicos exibem aspecto multipolar, destacando-se em alguns (C, F), os seus axônios (setas). Notar os espaços no interior dos gânglios circundados por prolongamentos neuronais (*) e a maior intensidade de reação da malha terciária dos animais do grupo MDX, onde se verifica nitidamente a grande quantidade de varicosidades,. (A, B- Oral; C, D- Médio; E, F- Aboral. A, C: 10 semanas; B, D, E, F: 4 semanas. Barra de calibração: 50 μ m)

4.1.3 Análise morfológica dos componentes do plexo mioentérico evidenciados pela técnica da AChE

A reação à AChE foi bem evidenciada nos preparados de membrana do intestino delgado dos animais de todos os grupos estudados (C4, MDX4, C10 e MDX10), permitindo evidenciar as principais características dos componentes do plexo mioentérico. Desta forma, gânglios com diferentes tamanhos e formatos foram identificados, assim como as malhas primárias, secundárias e terciárias. Nesse aspecto geral, ou seja, mesmo em pequeno aumento, ao se comparar os animais dos grupos de 4 semanas (C4 vs MDX4) observou-se neurônios intensamente reativos destacando-se no interior dos gânglios dos animais C4 (Figura 10A), ao passo que essa distinção em muitos casos, e em todos os segmentos do intestino (oral, médio e aboral), não foi possível de se detectar nos animais MDX (Figuras 10B e 10C). Já nos grupos de 10 semanas, o padrão geral referente a essa característica foi o mesmo tanto nos animais do grupo C10 como naqueles do grupo MDX10, isto é, neurônios intensamente reativos destacavam-se no interior dos gânglios mioentéricos dos animais Controle e MDX, indistintamente (Figuras 10D, 10E e 10F).

Relativamente a essa observação, a mesma foi comprovada ao se analisar os neurônios em maior aumento. De fato, com 4 semanas, pode-se verificar que os neurônios intensamente reativos evidenciaram-se no interior dos gânglios dos animais do grupo C4 (Figura 11B), não sendo possível destacá-los com precisão nos gânglios dos animais MDX4 (Figuras 11A e 11C). Contudo, com 10 semanas, os neurônios intensamente reativos foram encontrados bem definidos no interior dos gânglios dos animais de ambos os grupos, C10 e MDX10 (Figuras 11D, 11E e 11F).

Figura 10 Componentes do plexo mioentérico dos animais dos grupos Controle (A, E) e MDX (B, C, D, F), evidenciados pela reação da (AChE). Observar os gânglios de diferentes tamanhos e formatos em todos os grupos estudados, bem como as malhas primárias (I), secundárias (II) e terciárias (III). (A, D- Oral; B, E- Médio; C, F- Aboral. A-C: 4 semanas; D-F: 10 semanas. Barra de calibração: 100µm)

Figura 11 Gânglios do plexo mioentérico dos animais dos grupos Controle (B, D) e MDX (A, C, E, F), evidenciados pela reação da AChE. Neurônios intensamente reativos (setas) destacando-se em gânglio de animal do grupo C4 (B) (comparar com os gânglios dos animais MDX4 – A e C). Notar nos animais de 10 semanas, a presença de neurônios intensamente reativos (setas) no interior dos gânglios dos animais dos grupos C10 (D) e MDX10 (E, F), indistintamente. (A, D- Oral; B, E- Médio; C, F- Aboral. A-C: 4 semanas; D-F: 10 semanas. Barra de calibração: 50µm)

4.1.4 Análise ultra-estrutural (MET) dos componentes do plexo mioentérico e da musculatura lisa adjacente

As camadas musculares longitudinal e circular foram identificadas sob MET em todos os grupos estudados. Os núcleos das células musculares, tanto nos animais dos grupos Controle (C4, C10) quanto naqueles dos grupos MDX (MDX4, MDX10) apresentaram-se alongados, de contorno irregular com reentrâncias típicas e com as camadas da carioteca preservadas. A cromatina apresentou-se de aspecto denso, adjacente à carioteca (Figuras 12A, 12B e 13A). Em uma análise mais detalhada da estrutura das fibras musculares, notou-se nos animais dos grupos controle (C4, C10) estruturas lineares eletrondensas paralelas ao longo eixo da fibra, levemente demarcadas, caracterizando os limites entre as miofibrilas (Figuras 12B, 12D). Sob esse aspecto, verificou-se algumas diferenças estruturais significativas nos animais dos grupos MDX (MDX4, MDX10). Assim, foi possível observar que além dos limites entre as miofibrilas apresentarem-se mais demarcados, detectou-se a presença de amplas manchas e diversos corpos eletrondensos espalhados ao longo das fibras. Particularmente no grupo MDX10, muitas fibras exibiram em seu interior grupos de vesículas, indicativos da presença de tecido adiposo (Figuras 13A, 13C).

Relativamente aos componentes do plexo mioentérico, em todos os grupos (C4, C10, MDX4, MDX10) os corpos neuronais apresentaram-se com características normais, ou seja, núcleo com cromatina dispersa (típico de células com elevada atividade) e carioteca de aspecto normal. No citoplasma dessas células verificou-se a presença de cisternas íntegras do retículo endoplasmático rugoso, grande quantidade de ribossomos e diversas mitocôndrias com suas cristas bem evidentes (Figuras 12C, 12E e 13D). Nas terminações nervosas, vesículas grandes e pequenas, granulares e agranulares estavam presentes e, entre as fibras musculares, constatou-se a presença de varicosidades; todas essas estruturas, relacionadas à liberação dos diferentes neurotransmissores relativos ao plexo mioentérico (Figuras 12B, 12F e 13E).

Figura 12 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de animais dos grupos Controle (C4, C10). **A-** Camadas musculares longitudinal (l) e circular (c) constituintes da parede do intestino delgado, onde se observa a presença de núcleos das células musculares de aspecto alongado (setas). **B, D-** Limites entre as miofibrilas (setas pequenas) no interior de fibras musculares (fm), varicosidades entre as fibras musculares (setas grandes) e núcleo com cromatina densa agrupando-se em seu interior (*) distribuindo-se periféricamente, ao longo da carioteca (cabeças de setas). **C, E-** Neurônio mioentérico com núcleo exibindo cromatina nuclear dispersa (*) e membrana íntegra (seta longa). Notar, no citoplasma, mitocôndrias com cristas preservadas (m), ribossomos (círculo) e cisterna do retículo endoplasmático rugoso de aspecto normal (seta curta). **F-** Vesículas granulares e agranulares, grandes (setas) e pequenas (cabeças de setas). (A-C, E, F: 4 semanas; D: 10 semanas. Barras de calibração: A-6 μ m; B-0,5 μ m; C-0,2 μ m; D-1 μ m; E-1 μ m; F-0,2 μ m)

Figura 13 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de animais dos grupos MDX (MDX4, MDX10).

A- Parte de núcleo de célula muscular (n) com cromatina de disposição típica. Notar na célula muscular, manchas eletrondensas (setas). **B, C-** Corpos eletrondensos dispersos ao longo das fibras musculares (setas) e vesículas agrupadas em seu interior (círculos). **D-** Citoplasma de neurônio mioentérico exibindo vários ribossomos, e cisterna do retículo endoplasmático rugoso de aspecto normal (seta). **E-** Vesículas granulares e agranulares, grandes (setas) e pequenas (cabeças de setas). (A, C-E: 10 semanas; B- 4 semanas. Barras de calibração: A-2 μ m; B-1 μ m; C-1 μ m; D-0,5 μ m; E-1 μ m)

4.2 Aspectos Quantitativos

A seguir, para todos os grupos estudados, utilizando as técnicas histoquímicas da NADH-d e NADPH-d, seguem as análises quantitativas referentes à área total do intestino delgado, a densidade numérica neuronal, o número total estimado de neurônios e a área do perfil do corpo neuronal.

4.2.1 Área total do intestino delgado

O resultado referente às médias $\pm$ desvio padrão (D.P.) da área total do intestino delgado de todos os grupos é mostrado na tabela 2 e figura 14. O grupo MDX4 apresentou uma área significativamente maior que o grupo C4 ($p < 0,05$); no entanto essa diferença não se manteve entre os animais de 10 semanas, quando houve apenas uma tendência do grupo MDX10 apresentar uma área superior que o grupo C10. Além disso, tanto o grupo Controle quanto o MDX apresentaram em 10 semanas, áreas significativamente maiores que seus correspondentes de 4 semanas ($p < 0,05$).

Tabela 2 Área total do intestino delgado

Grupos	Média $\pm$ D.P. (cm ²)
C4	29,2 $\pm$ 2,6
MDX4	41,8 $\pm$ 2,1
C10	43,9 $\pm$ 4,3
MDX10	48,0 $\pm$ 3,9

D.P. – desvio padrão

Figura 14 Médias $\pm$ D.P. da área total do intestino delgado de todos os grupos propostos

4.2.2 Densidade numérica dos neurônios evidenciados pela técnica da NADH-d

A figura 15 e os dados da tabela 3 correspondem à densidade dos neurônios nos segmentos oral, médio e aboral de todos os grupos propostos (C4, MDX4, C10 e MDX10).

Considerando somente o fator idade, nota-se que os grupos de 4 semanas (C4 e MDX4) apresentaram uma densidade significativamente maior que seus correspondentes de 10 semanas (C10 e MDX10) ($p < 0,05$). No entanto, ao comparar os grupos Controle e MDX de mesma idade, nota-se que o grupo MDX4 apresentou uma densidade significativamente menor que seu correspondente C4 ($p < 0,05$), enquanto entre os grupos de 10 semanas (C10 e MDX10) essa diferença não foi mantida. É possível ainda observar que os segmentos que diferem entre os grupos são o oral e médio, uma vez que no grupo MDX apresentaram uma densidade neuronal inferior ao grupo Controle ($p < 0,05$ para ambos).

Vale ressaltar que a densidade neuronal variou entre os segmentos de um mesmo grupo. Desta forma, foi possível notar que no grupo Controle, o segmento oral apresentou uma densidade significativamente inferior ao aboral ($p < 0,05$),

enquanto que no grupo MDX, os segmentos oral e médio diferiram do segmento aboral, apresentando ambos uma densidade neuronal significativamente reduzida ($p < 0,05$ para ambos).

Figura 15 Médias $\pm$ D.P. da densidade numérica de neurônios (n° de neurônios/mm²) evidenciados pela técnica da NADH-d em todos segmentos de todos os grupos propostos

Tabela 3 Densidade numérica de neurônios (n° de neurônios/mm²) evidenciados pela técnica da NADH-d

Grupos	Segmentos		
	Oral (Média $\pm$ D.P.)	Médio (Média $\pm$ D.P.)	Aboral (Média $\pm$ D.P.)
C4	180,88 $\pm$ 28,71	222,52 $\pm$ 30,16	244,47 $\pm$ 33,92
MDX4	112,42 $\pm$ 15,25	168,84 $\pm$ 27,06	232,68 $\pm$ 31,77
C10	87,57 $\pm$ 27,70	119,31 $\pm$ 22,77	133,95 $\pm$ 27,46
MDX10	80,54 $\pm$ 14,47	86,02 $\pm$ 25,06	145,63 $\pm$ 29,23

D.P. – desvio padrão

4.2.3 Número total estimado de neurônios evidenciados pela técnica da NADH-d

Ao estimar o número total de neurônios, apenas em 4 semanas o grupo MDX apresentou uma diferença significativamente superior que o grupo Controle ($p=0,031$). Além disso, os grupos de 10 semanas apresentaram uma estimativa neuronal significativamente inferior que seus correspondentes de 4 semanas ($p<0,001$) (Figura 16 e Tabela 4).

Figura 16 Médias $\pm$ D.P. da estimativa do número total de neurônios evidenciados pela técnica da NADH-d de todos os grupos propostos

Tabela 4 Estimativa de neurônios evidenciados pela técnica da NADH- d

Grupos	Média $\pm$ D.P.
C4	627.429 $\pm$ 94.568
MDX4	784.621 $\pm$ 64.119
C10	477.772 $\pm$ 85.940
MDX10	516.901 $\pm$ 84.538

D.P. – desvio padrão

4.2.4 Área do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica da NADH-d

As médias $\pm$ D.P. relativas às áreas do perfil dos corpos dos neurônios dos segmentos oral, médio e aboral em todos os grupos propostos (C4, MDX4, C10 e MDX10) estão representadas na figura 17 e tabela 5.

Os dados permitem verificar que em 4 semanas não existem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, nem entre os segmentos estudados. Em 10 semanas, o grupo MDX não diferiu do Controle, no entanto, o segmento aboral de ambos apresentou uma área do perfil do corpo neuronal significativamente superior a área do respectivo segmento oral ($p < 0,05$), e também superior ao respectivo segmento nos grupos de 4 semanas (C4 e MDX4) ($p < 0,05$).

Figura 17 Médias $\pm$ D.P. da área (em μm^2) do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica da NADH-d em todos segmentos de todos os grupos propostos

Tabela 5 Área do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica da NADH-d

Grupos	Segmentos		
	Oral (Média ± D.P.)	Médio (Média ± D.P.)	Aboral (Média ± D.P.)
C4	350,5 ± 67,17	370,0 ± 52,59	330,1 ± 84,93
MDX4	383,4 ± 33,87	397,1 ± 104,46	368,34 ± 60,80
C10	382,5 ± 52,65	465,0 ± 38,13	475,4 ± 44,35
MDX10	364,3 ± 52,40	435,7 ± 53,94	469,7 ± 54,9

D.P. – desvio padrão

No histograma da área do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica da NADH-d (Figura 18) observa-se a distribuição de frequência (em %) nos grupos C4, MDX4, C10 e MDX10, nos segmentos oral (Tabela 6), médio (Tabela 7) e aboral (Tabela 8).

Todos os grupos estudados apresentaram mais de 80% dos neurônios do segmento oral com áreas entre 200-500 μm^2 . Todavia, dentre os grupos, apenas o grupo C4 apresentou a maioria dos neurônios no intervalo de 200-300 μm^2 , enquanto os demais apresentaram o pico de frequência no intervalo de 300-400 μm^2 .

Sobre o segmento médio, é possível notar que todos os grupos estudados apresentaram a maioria dos neurônios ($\geq 27\%$) com áreas entre 300-400 μm^2 , porém vale ressaltar a existência de uma grande porcentagem de neurônios no intervalo de 400-500 μm^2 em todos os grupos.

Relativo ao segmento aboral, nos grupos de 4 semanas (C4 e MDX4), 60% dos neurônios apresentaram áreas entre 200-400 μm^2 , enquanto nos grupos de 10 semanas (C10 e MDX10) os neurônios apresentaram áreas maiores, entre 300-600 μm^2 .

Chama a atenção a tendência do grupo MDX4 apresentar neurônios maiores (400-900 μm^2) e do grupo C4 apresentar neurônios menores (100-300 μm^2) em todos os segmentos. A análise das Tabelas 6, 7 e 8 permite verificar que no segmento oral, o grupo MDX4 apresenta 40% dos neurônios no intervalo de 400-800 μm^2 , contra 30% no grupo C4. No segmento médio, o grupo MDX4 apresentou 20% dos neurônios com áreas entre 500-900 μm^2 , já o grupo C4 apenas 8,5%. E por fim, no

segmento aboral, em um intervalo de 400-800 μm^2 , o grupo MDX4 apresentou 35% de neurônios contra 22% do grupo C4.

Tabela 6 Número e frequência (em %) dos neurônios do segmento oral encontrados nos intervalos de área do perfil do corpo neuronal

Intervalos (μm^2)	Segmento Oral							
	Grupos							
	C4		MDX4		C10		MDX10	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
0-100	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %
100-200	6	4,0 %	3	2,0 %	3	2,5 %	7	4,6 %
200-300	51	34,0 %	31	20,5 %	30	25,0 %	42	27,8 %
300-400	47	31,3 %	56	37,1 %	38	31,7 %	50	33,1 %
400-500	30	20,0 %	39	25,8 %	31	25,8 %	36	23,8 %
500-600	13	8,6 %	18	11,9 %	13	10,8 %	12	7,9 %
600-700	2	1,3 %	1	0,6 %	5	4,1 %	3	2,0 %
700-800	1	0,6 %	3	2,0 %	0	0 %	1	0,6 %
800-	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0 %	0	0,0 %

Tabela 7 Número e frequência (em %) dos neurônios do segmento médio encontrados nos intervalos de área do perfil do corpo neuronal

Intervalos (μm^2)	Segmento Médio							
	Grupos							
	C4		MDX4		C10		MDX10	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
0-100	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %
100-200	8	5,2 %	14	9,3 %	2	1,6 %	3	2,0 %
200-300	30	19,6 %	21	14,0 %	8	6,6 %	25	16,7 %
300-400	52	34,0 %	52	34,6 %	33	27,0 %	45	30,0 %
400-500	50	32,6 %	33	22,0 %	31	25,4 %	31	20,7 %
500-600	11	7,2 %	17	11,3 %	31	25,4 %	22	14,7 %
600-700	2	1,3 %	7	4,6 %	12	9,8 %	16	10,7 %
700-800	0	0,0 %	5	3,3 %	5	4,1 %	3	2,0 %
800-900	0	0,0%	1	0,6 %	0	0 %	4	2,7 %
900-1000	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,7 %
1000-	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

Tabela 8 Número e frequência (em %) dos neurônios do segmento aboral encontrados nos intervalos de área do perfil do corpo neuronal

Intervalos (μm^2)	Segmento Aboral							
	Grupos							
	C4		MDX4		C10		MDX10	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
0-100	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %
100-200	15	12,5 %	8	5,2 %	0	0,0 %	0	0,0 %
200-300	38	31,6 %	39	25,5 %	12	10,0 %	16	10,6 %
300-400	40	33,3 %	52	34,0 %	31	25,8 %	39	25,8 %
400-500	17	14,1 %	34	22,2 %	35	29,1 %	35	23,2 %
500-600	7	5,8 %	14	9,1 %	20	16,7 %	34	22,5 %
600-700	3	2,5 %	5	3,2 %	11	9,2 %	17	11,2 %
700-800	0	0,0 %	1	0,6 %	5	4,2 %	7	4,6 %
800-900	0	0,0%	0	0,0 %	4	3,3 %	1	0,7 %
900-1000	0	0,0%	0	0,0%	1	0,8 %	0	0,7 %
1000-1100	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0 %	2	1,3%
1100-1200	0	0,0%	0	0,0%	1	0,8 %	0	0,0%

Figura 18 Frequência (em %) das áreas do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica da NADH-d nos segmentos oral, médio e aboral de todos os grupos propostos

4.2.5 Densidade numérica dos neurônios evidenciados pela técnica da NADPH-d

As médias $\pm$ D.P. referentes à densidade dos neurônios em todos os segmentos dos grupos C4, MDX4, C10 e MDX10, estão expressas na tabela 9 e figura 19.

Em relação às idades, os animais de 4 semanas apresentaram uma densidade significativamente maior que os de 10 semanas ($p < 0,01$). Comparando-se os grupos, nota-se que grupo MDX4 apresentou uma densidade significativamente menor que o grupo C4 ($p < 0,01$). E ainda, comparando os segmentos de um mesmo grupo, é possível verificar que o segmento oral apresentou uma densidade menor que os demais, em qualquer idade e qualquer grupo (vs médio e vs aboral, $p < 0,05$ para ambos).

Figura 19 Médias $\pm$ D.P. da densidade numérica de neurônios (n° de neurônios/mm²) evidenciados pela técnica da NADPH-d em todos segmentos de todos os grupos propostos

Tabela 9 Densidade numérica de neurônios (nº de neurônios/mm²) evidenciados pela técnica da NADPH-d

Grupos	Segmentos		
	Oral (Média ± D.P.)	Médio (Média ± D.P.)	Aboral (Média ± D.P.)
C4	33,0 ± 6,6	40,8 ± 13,1	51,7 ± 12,6
MDX4	23,0 ± 7,2	33,4 ± 8,1	36,8 ± 10,0
C10	27,1 ± 2,6	30,8 ± 3,4	39,1 ± 6,7
MDX10	18,8 ± 8,0	34,8 ± 6,2	32,4 ± 3,3

D.P. – desvio padrão

4.2.6 Número total estimado de neurônios evidenciados pela técnica da NADPH-d

A média ± D.P. da estimativa do número total de neurônios em cada grupo (C4, MDX4, C10 e MDX10) está representada na tabela 10 e figura 20. Não houve diferença entre os animais Controle e MDX, no entanto foi detectada uma diferença significativa entre os animais de diferentes idades, apresentando os de 10 semanas um número total de neurônios superior em relação aos de 4 semanas ($p < 0,05$).

Tabela 10 Estimativa de neurônios evidenciados pela técnica da NADPH- d

Grupos	Média ± D.P.
C4	123.926 ± 25.367
MDX4	123.631 ± 3.608
C10	145.534 ± 11.773
MDX10	147.028 ± 25.076

D.P. – desvio padrão

Figura 20 Médias $\pm$ D.P. da estimativa do número total de neurônios evidenciados pela técnica da NADPH-d de todos os grupos propostos

4.2.7 Área do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica da NADPH-d

A tabela 11 e a figura 21 ilustram as médias $\pm$ D.P. referentes às áreas do perfil dos corpos dos neurônios dos segmentos oral, médio e aboral em todos os grupos propostos (C4, MDX4, C10 e MDX10).

Nos animais de 4 semanas, o grupo MDX apresentou uma área do perfil neuronal significativamente maior que o grupo Controle ($p < 0,05$). No entanto, essa diferença não foi encontrada em 10 semanas, uma vez que as áreas dos neurônios do grupo Controle apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$), e aqueles do grupo MDX mantiveram praticamente as mesmas áreas exibidas no grupo de 4 semanas. Relativamente aos segmentos, o médio apresentou uma área significativamente superior ao oral em todos os grupos e idades ($p < 0,05$) (Tabela 11).

Figura 21 Médias $\pm$ D.P. da área (em μm^2) do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica da NADPH-d em todos segmentos de todos os grupos propostos

Tabela 11 Área do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica da NADPH-d

Grupos	Segmentos		
	Oral (Média $\pm$ D.P.)	Médio (Média $\pm$ D.P.)	Aboral (Média $\pm$ D.P.)
C4	305,6 $\pm$ 46,6	341,9 $\pm$ 74,6	313,4 $\pm$ 58,9
MDX4	369,4 $\pm$ 54,5	416,1 $\pm$ 45,6	380,9 $\pm$ 35,1
C10	389,1 $\pm$ 27,5	459,0 $\pm$ 12,8	444,0 $\pm$ 26,4
MDX10	390,0 $\pm$ 17,3	443,2 $\pm$ 12,0	426,3 $\pm$ 29,5

D.P. – desvio padrão

O histograma da área do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica da NADPH-d (Figura 22) mostra a distribuição de frequência (em %) dos grupos e segmentos estudados, oral (Tabela 12), médio (Tabela 13) e aboral (Tabela 14).

Nota-se que a maior frequência de neurônios do segmento oral do grupo C4 encontrou-se no intervalo de $200-300\mu\text{m}^2$, enquanto nos demais grupos (C10, MDX4 e MDX10), a maior frequência encontrou-se no intervalo de $300-400\mu\text{m}^2$.

Referente aos segmentos médio e aboral, pode-se observar que o grupo C4 apresentou mais de 61% dos neurônios com áreas do perfil entre $200-400\mu\text{m}^2$. Já no grupo MDX4 predominaram os neurônios presentes no intervalo de $300-400\mu\text{m}^2$. Nos grupos de 10 semanas (C10 e MDX10) predominaram neurônios com área mais elevada, no intervalo de $400-500\mu\text{m}^2$.

Fato marcante no grupo MDX4 foi a porcentagem elevada de neurônios com áreas entre $400-800\mu\text{m}^2$ comparativamente ao grupo C4, no qual foram encontrados muitos neurônios com áreas menores, entre $100-300\mu\text{m}^2$. No segmento oral o grupo MDX4 apresentou 37% dos neurônios no intervalo de $400-800\mu\text{m}^2$, contra 12,5% no grupo C4. No segmento médio a porcentagem para o grupo MDX4 foi de aproximadamente 45% enquanto o grupo C4 apresentou cerca de 28%. E no segmento aboral foram encontrados 36% de neurônios neste intervalo contra 17% no grupo C4.

Figura 22 Frequência (em %) das áreas do perfil dos corpos de neurônios evidenciados pela técnica da NADPH-d nos segmento oral, médio e aboral de todos os grupos propostos

Tabela 12 Número e frequência (em %) dos neurônios do segmento oral encontrados nos intervalos de área do perfil do corpo neuronal

Intervalos (μm^2)	Segmento Oral							
	Grupos							
	C4		MDX4		C10		MDX10	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
0-100	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0 %	0	0,0 %
100-200	15	9,9 %	3	2,0 %	0	0 %	1	0,6 %
200-300	69	45,7 %	35	23,2 %	13	8,6 %	16	10,6 %
300-400	48	31,8 %	57	37,7 %	78	52 %	66	44,0 %
400-500	14	9,2 %	44	29,1 %	47	31,3 %	54	36,0 %
500-600	3	2,0 %	9	5,9 %	11	7,3 %	12	8,0 %
600-700	2	1,3 %	2	1,3 %	1	0,6 %	1	0,6 %
700-800	0	0,0 %	1	0,6 %	0	0 %	0	0,0 %
800-	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0 %	0	0,0 %

Tabela 13 Número e frequência (em %) dos neurônios do segmento médio encontrados nos intervalos de área do perfil do corpo neuronal

Intervalos (μm^2)	Segmento Médio							
	Grupos							
	C4		MDX4		C10		MDX10	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
0-100	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %
100-200	15	10,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %
200-300	45	30,0 %	16	13,3 %	8	5,3 %	4	2,6 %
300-400	47	31,3 %	49	40,8 %	40	26,5 %	49	32,6 %
400-500	28	18,6 %	23	19,1 %	53	35,1 %	61	40,6 %
500-600	12	8,0 %	22	18,3 %	37	24,5 %	29	19,3 %
600-700	3	2,0 %	8	6,6 %	12	7,9 %	6	4,0 %
700-800	0	0,0 %	1	0,8 %	1	0,6 %	1	0,6 %
800-	0	0,0 %	1	0,8 %	0	0,0 %	0	0,0 %

Tabela 14 Número e frequência (em %) dos neurônios do segmento aboral encontrados nos intervalos de área do perfil do corpo neuronal

Intervalos (μm^2)	Segmento Aboral							
	Grupos							
	C4		MDX4		C10		MDX10	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
0-100	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %
100-200	21	13,8 %	2	1,3 %	0	0,0 %	0	0,0 %
200-300	51	33,5 %	39	25,3 %	8	5,3 %	10	6,6 %
300-400	53	34,8 %	57	37,01 %	43	28,8 %	52	34,6 %
400-500	22	14,4 %	33	21,4 %	61	40,9 %	58	38,6 %
500-600	5	3,3 %	16	10,4 %	27	18,1 %	23	15,3 %
600-700	0	0,0 %	5	3,2 %	9	6,0 %	6	4,0 %
700-800	0	0,0 %	1	0,6 %	1	0,6 %	1	0,6 %
800-	0	0,0 %	1	0,6 %	0	0,0 %	0	0,0 %

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, os componentes do plexo mioentérico de diferentes partes do intestino delgado de camundongos *mdx* foram estudados comparativamente ao seu controle, o camundongo C57BL/10, em diferentes idades. Inicialmente, esses componentes foram estudados sob um aspecto geral, através de uma técnica de marcação pan-neuronal amplamente utilizada, a da NADH-d. Em um segundo momento, os dois principais grupos de neurônios entéricos, os excitatórios e os inibitórios da musculatura, foram evidenciados através das técnicas da AChE e NADPH-d, respectivamente. Por fim, aspectos preliminares acerca da MET foram descritos, tanto para os componentes do plexo mioentérico, como para a musculatura lisa que o envolve.

No que concerne ao aspecto geral dos componentes do plexo mioentérico, verificou-se que não houve diferenças entre os grupos Controle e MDX, em nenhum segmento ou idade estudada, não ocorrendo uma forma típica que permitisse caracterizar cada região. A maioria dos gânglios apresentaram-se como estruturas alongadas e paralelas entre si, dispostos perpendicularmente ao longo eixo da víscera e contendo quantidade variável de neurônios. Essa descrição corrobora as descrições de Gabella (1987) para camundongos, no entanto, ao que parece essa característica do plexo mioentérico é frequente entre as espécies. Nesse mesmo estudo, Gabella (1987) verificou um aspecto semelhante em cobaias e ovelhas, enquanto Santer (1994) o descreveu em ratos. Gânglios fusionados, de aspectos fusiforme, triangular e poligonal também foram observados em todos os grupos propostos, assemelhando-se às descrições de Gabella (1987) e Karaosmanoglu et al. (1996) no plexo mioentérico do intestino delgado de cobaias.

Uma análise mais acurada revelou que os gânglios dos grupos MDX, apresentaram espaços em seu interior, e também uma maior quantidade de neurônios médios e pequenos, relativamente aos grandes. Miranda Neto et al. (2001), utilizando a técnica da NADH-d, observaram grandes espaços no interior de gânglios mioentéricos no íleo de ratos, no entanto, ao utilizarem Giemsa notaram que esses espaços apresentavam-se reduzidos. Tal diferença foi atribuída à metodologia utilizada, sugerindo que esses espaços poderiam estar ocupados por neurônios pequenos, os quais não são evidenciados pela técnica da NADH-d. Mesmo considerando as limitações dessa técnica (YOUNG et al., 1993), o fato desses espaços terem sido observados apenas no grupo MDX, indica alguma

alteração decorrente da distrofia, até porque os neurônios médios e pequenos mostraram-se marcados nesse grupo. O contorno e formato irregular dos neurônios grandes, além da reatividade alterada no citoplasma dos mesmos, sugerem um processo neurodegenerativo, como descrito por Maifrino et al. (1999). Os neurônios, inclusive os entéricos, dependem de uma regulação trófica com o tecido alvo para crescerem, sobreviverem e sintetizarem neurotransmissores. O tecido alvo (neste caso o músculo liso), secreta fatores tróficos que são captados pelos neurônios entéricos, e desencadeiam as diversas atividades neuronais. É possível que a musculatura lisa dos animais MDX apresente alterações que reflitam nessa regulação trófica dos neurônios, prejudicando o *feedback* proveniente dessas células (PURVES et al., 1988; CAMILLERI et al., 2008).

No presente estudo, sob MET, a musculatura dos animais MDX apresentou um aspecto diferenciado em relação ao grupo Controle. Foram observadas inúmeras pequenas vesículas e manchas eletrondensas, que poderiam ser interpretadas como focos de necrose e infiltração de tecido adiposo, ambas características da DMD na musculatura estriada esquelética (EMERY, 2002a). Frente à escassa literatura sobre a ultra-estrutura da musculatura lisa do TGI de camundongos *mdx*, os dados aqui expressos sinalizam para a realização de estudos específicos acerca desse tema, uma questão ainda em aberto.

Apesar de Boland et al. (1995) e Lefaucheur (1996) não terem observado necrose, nem a presença de tecido adiposo nas fibras musculares lisas da túnica externa do TGI em camundongos *mdx*, essas características foram descritas em humanos (BEVANS, 1945; HUVOS; PRUZANSKI, 1967; LEON et al., 1986; BAROHN et al., 1988). Considerando que o camundongo *mdx* não expressa o fenótipo da DMD como os humanos, e as técnicas de observação aplicadas pelos autores, é possível que essas características tenham passado despercebidas.

No que diz respeito aos aspectos quantitativos do presente trabalho, para todos os grupos estudados, foram realizadas medidas da área total do intestino delgado, bem como a mensuração da densidade numérica neuronal, um modelo padrão estabelecido em nosso meio, como forma de avaliar os diferentes fatores que podem alterar a estrutura do plexo mioentérico (DE SOUZA et al., 1988). A partir desses dados, o valor do número total de neurônios de cada grupo, foi estimado

para toda a víscera. Uma vez que a densidade é inversamente proporcional a área, fatos importantes a serem considerados durante esse tipo de avaliação é o teor de estiramento da víscera durante o preenchimento dos segmentos (PECK et al., 2009), e também em qual face da víscera (mesentérica, intermediária ou anti-mesentérica) a mensuração é realizada (MIRANDA NETO et al., 2001). No presente estudo, esses cuidados foram tomados, de modo que todos os segmentos foram preenchidos de forma semelhante, e a densidade mensurada a partir da contagem de campos aleatórios de toda a víscera, ou seja, não favorecendo nenhuma das três faces.

Assim, em relação à densidade numérica dos neurônios NADH-d positivos dos grupos de 4 semanas, observou-se que o grupo MDX4 apresentou uma densidade neuronal significativamente menor que seu correspondente C4. No entanto, acredita-se que essa diferença não foi causada diretamente pela DMD. Uma vez que a área total do intestino delgado do grupo MDX4 apresentou um aumento expressivo de 43% em relação ao grupo C4, pode-se inferir que os neurônios do plexo mioentérico desses animais tenham sido diluídos ao longo da víscera, ao invés de ter ocorrido uma perda neuronal. Estatisticamente considera-se esta última hipótese improvável, uma vez que o grupo MDX4, devido a elevada área intestinal, apresentou uma estimativa neuronal total 25% superior ao grupo C4. Entre os grupos de 10 semanas, não foi observado diferença significativa da densidade nem por fatores diretos da DMD, e nem por fatores indiretos, uma vez que as áreas de seus intestinos foram praticamente as mesmas.

Até o momento, na literatura, apenas um estudo comparou o comprimento do intestino delgado de camundongos *mdx* e C57BL/10, não encontrando diferenças entre eles (MULÉ et al., 2010). No entanto, a idade dos animais comparados foi de 12 a 18 meses, não existindo registros a respeito da área do intestino delgado de camundongos *mdx* com 4 semanas de idade. Um ponto importante a saber nesse momento, é a maneira como a distrofia afeta os camundongos *mdx*. É sabido que esta ocorre em sucessivos ciclos de degeneração-regeneração da fibra muscular. Nesses animais, a degeneração atinge seu pico entre a terceira ou quarta semana de vida, sendo em seguida, observado uma intensa regeneração das mesmas (GILLIS 1996; LEFAUCHEUR; SEBILLE, 1996). Na idade adulta o animal apresenta uma musculatura praticamente normal, porém a presença de focos de regeneração

indica que o processo degenerativo é permanente, no entanto em menor intensidade nessa idade do animal.

Feita esta consideração, não estranha os animais dos grupos de 4 semanas apresentarem áreas diferentes de seus intestinos, ao passo que em 10 semanas eles se igualam, assim como observado em 12 meses por Mulè et al. (2010). A questão é por que o intestino dos animais do grupo MDX4 aumentou tanto sua área? Uma hipótese parece estar envolvida com o papel da distrofina nas fibras musculares lisas desses animais. Assim como nos músculos esqueléticos, a distrofina na musculatura lisa conecta-se diretamente ao citoesqueleto da célula e indiretamente a laminina-2 da matriz extracelular, sendo plausível inferir que esta desempenhe funções semelhantes em ambos tecidos (VANNUCCHI et al., 2002). Considerando que os camundongos *mdx* não expressam a distrofina, possíveis alterações podem estar ocorrendo no citoesqueleto das fibras musculares lisas, resultando no alongamento das mesmas. Nos dados aqui expostos sob MET, verificou-se que os limites entre as miofibrilas apresentaram-se mais demarcados nos grupos MDX, podendo ser resultado desse processo.

Uma outra teoria que não pode ser descartada, é a de que, por algum fator ainda não bem definido, o intestino dos animais MDX com 4 semanas tem o seu desenvolvimento acelerado, igualando-se precocemente ao tamanho daqueles em idade mais avançadas, ou seja, os grupos de 10 semanas. Todavia, deve-se ressaltar que estudos complementares acerca da morfologia da mucosa devem ser realizados, uma vez que não se deve dissociar funcionalmente esse componente dos demais constituintes da estrutura da parede visceral.

Os valores referentes à densidade neuronal e estimativa do número total de neurônios para camundongos normais ora apresentados, estão de acordo com os de Gabella (1987). Na pesquisa em questão, o autor utilizou somente o segmento médio do intestino delgado e não especificou a idade dos camundongos utilizados, informando apenas que eram adultos, machos e pesavam 25g. O grupo C10 do presente estudo foi composto por camundongos de 10 semanas, ou seja, adultos, machos e com média de peso igual a 26,7g. Além disso, foram analisados três segmentos ao longo da víscera, inclusive o segmento médio, sendo este portanto, válido para comparações entre os aqui descritos com os de Gabella. A densidade

neuronal do segmento médio do grupo C10 foi de 11.931 neurônios/cm², enquanto a de Gabella foi 10.632. Já a estimativa neuronal total para o grupo C10 foi de 477.772 neurônios, enquanto para Gabella foi de 403.000. Essa diferença pode ser atribuída às medidas de área total da víscera, pois enquanto que para o grupo C10 foi de 43,9cm², para Gabella foi de 38cm².

Nesse mesmo segmento, estudando camundongos de 5 meses de idade, Bor-Seng-Shu et al. (1994), encontraram uma densidade de 21.948 neurônios/cm² e uma estimativa de 690.000 neurônios para toda a víscera. Essas diferenças devem ser atribuídas à metodologia para marcação neuronal utilizada, Giemsa, e também ao valor bastante inferior da área total do intestino, 30,8cm², pois é sabido que esse método reduz em torno de 30% a área visceral (DE SOUZA et al., 1993). Entretanto, deve-se concordar com o autor sobre a existência de um gradiente de densidade crescente no sentido oral-aboral. Nos dados da presente pesquisa, este padrão foi evidente para todos os grupos, não sendo afetado pela distrofia nem pelo fator idade. Santer e Baker (1988) observaram esse mesmo padrão estudando o intestino delgado de ratos Wistar, enquanto, Karaosmanoglu et al. (1996) verificaram exatamente um gradiente oposto em cobaias. Estes correlacionaram diretamente a existência desse gradiente decrescente no sentido oral-aboral, com a atividade motora e secretória ao longo do intestino delgado. Pode-se aqui corroborar com a idéia de que a existência de um gradiente esteja relacionada às atividades metabólicas ao longo da víscera; no entanto, entende-se que a relação para o plexo mioentérico seja proporcionalmente inversa.

De fato, as atividades absortivas, secretoras e vasculares do intestino delgado obedecem um gradiente decrescente no sentido oral-aboral da víscera. Alterações da mucosa são evidentes, e ainda pode-se citar as glândulas duodenais (de Brunner), somente presentes na túnica submucosa do duodeno (KIERSZENBAUM, 2008). No entanto, o controle dessas atividades, principalmente em animais de pequeno porte como os camundongos, é atribuído exclusivamente ao plexo submucoso, e não ao plexo mioentérico. Foram identificados quatro tipos principais de neurônios do plexo submucoso de cobaias, sendo que nenhum deles era do tipo motor da túnica muscular externa (FURNESS et al., 2003). Além disso, Gabella (1987) estudando o plexo submucoso de camundongos ao longo de todo intestino delgado, verificou a existência de um gradiente decrescente de densidade neuronal.

Assim, ao que parece, nos camundongos existe uma relação inversa dos gradientes de densidade neuronal, entre os plexos submucoso e mioentérico.

Ao se avaliar a área do perfil dos corpos dos neurônios dos grupos de 4 semanas, apesar de não haver diferenças significativas entre MDX4 e C4, nem entre os segmentos, chama a atenção a tendência do grupo MDX4 apresentar neurônios maiores (com áreas entre $400\text{-}900\mu\text{m}^2$) e do grupo C4 apresentar neurônios menores, (com áreas entre $100\text{-}300\mu\text{m}^2$). Essa tendência ao aumento do perfil neuronal do grupo MDX4 pode ser atribuída à redução da densidade deste grupo em relação ao grupo C4. Segundo Krishnan et al. (1982) e Gomes et al. (1997), os corpos de neurônios motores aumentam à medida que estes são requisitados a inervar mais fibras musculares do que quando em um estágio anterior. Como a área do grupo MDX4 aumentou 43% comparativamente ao grupo C4, esta hipótese é bastante coerente.

Em relação às idades estudadas, não se pode afirmar que a DMD tenha exercido influências diretas nesse fator relativo aos neurônios, uma vez que tanto o grupo MDX10 como C10 apresentaram reduções semelhantes de suas densidades, quando comparados aos grupos MDX4 e C4. Assim, não é incorreto correlacionar-se esse fato ao aumento da área da víscera de cada grupo, as quais em 10 semanas apresentaram valores parecidos.

Uma possível hipótese seria atribuir a redução da densidade à idade dos animais, como já demonstrado em diversos estudos onde a idade em um estágio avançado gera reduções do número total de neurônios do plexo mioentérico de camundongos (EL-SALHY et al., 1999), ratos (SANTER; BAKER, 1988), cobaias (GABELLA, 1989) e humanos (DE SOUZA et al., 1993; GOMES et al., 1997) e . Entretanto não pode-se inferir que haja algum tipo de relação com os achados da presente pesquisa, uma vez que as idades estudadas correspondem ao camundongo jovem, após o desmame (4 semanas), e ao adulto jovem (10 semanas). O fato das áreas dos intestinos terem aumentado de 4 para 10 semanas, indica que os animais ainda estão em pleno desenvolvimento, longe de um estágio senil, ou até mesmo de uma fase de maturidade.

Em um segundo momento deste trabalho, estudou-se os dois principais grupos neuronais do plexo mioentérico, os neurônios inibitórios (nitrgéricos) e excitatórios (colinérgicos) da túnica muscular externa.

No que diz respeito aos aspectos qualitativos dos componentes NADPH-d positivos do plexo mioentérico, pode-se inferir que estes não foram influenciados pela DMD, uma vez que todos os grupos estudados apresentaram-se semelhantes, ou seja, com gânglios de diferentes tamanhos, formatos e número de neurônios. Além disso, não foi possível estabelecer um padrão segmento-dependente, sendo impossível diferenciar entre si o plexo dos segmentos oral, médio e aboral.

Com maior resolução, observou-se em todos os grupos estudados, que a reatividade dos neurônios ocorreu de maneira homogênea, sendo possível determinar com clareza o contorno dos mesmos, correspondendo ao tipo I de Dogiel. Destaque especial deve ser dado à maior evidenciação das malhas secundárias e terciárias do grupo MDX, em relação ao grupo Controle. Neste momento, cabe ressaltar a importância dessas estruturas, principalmente da malha terciária, na inervação da camada muscular longitudinal do TGI. Em animais de pequeno porte, que apresentam uma delgada camada longitudinal, a malha terciária é a única responsável pela sua inervação. À medida que a camada vai tornando-se espessa, a inervação deixa de ser exclusividade da malha terciária, e conta com a contribuição do plexo muscular longitudinal (LLEWELLYN-SMITH et al., 1993). Essa assertiva foi confirmada por Wilhelm et al. (1998) que, ao estudarem os componentes NADPH-d positivos da camada muscular longitudinal em diferentes espécies, e baseados na espessura da mesma, estabeleceram um gradiente decrescente de intensidade de marcação em diferentes espécies de mamíferos, na seguinte ordem: rato>gato>cobaia>coelho.

Somado a esse fato, foi demonstrado por diversos autores, que a redução significativa da espessura da túnica muscular externa do TGI é uma característica de pacientes com DMD (HUVOS; PRUZANSKI, 1967; DINAN et al., 2003) e , e também de camundongos *mdx* (BOLAND et al., 1995; LEFAUCHEUR; SEBILLE, 1996). Ao ser observada sob MET, as fibras musculares lisas dos intestinos dos animais do grupo MDX apresentaram uma redução, quase que pela metade, da espessura das fibras dos grupos Controles (dado não mostrado). Assim, após essas considerações,

pode-se inferir, que a maior evidenciação das malhas secundárias e terciárias do plexo mioentérico, de animais MDX, é de fato decorrente de uma redução de espessura de suas fibras musculares lisas.

Em relação aos resultados quantitativos referentes aos neurônios NADPH-d positivos, verificou-se que o grupo MDX4 apresentou uma densidade neuronal menor que o grupo C4, em todos os segmentos estudados. Considerando que densidade e área são medidas inversamente proporcionais, e ainda, que suas estimativas neuronais totais foram idênticas, pode-se considerar que o aumento da área do grupo MDX4 determinou uma redução na densidade dos neurônios nitrérgicos, cujo número diluiu-se ao longo da víscera.

Além disso, deve-se acrescentar que a área do perfil neuronal aumentou de maneira significativa no grupo MDX4 em relação ao grupo C4, corroborando a idéia de que os neurônios tendem a um aumento da área do seu corpo celular à medida que são requisitados a innervarem um contingente maior de fibras musculares (KRISHNAN et al., 1982; GOMES et al., 1997).

Uma vez que a área dos intestinos dos grupos MDX10 e C10 foram as mesmas e que ambos os grupos apresentaram a mesma densidade neuronal, e consequentemente a mesma estimativa do número total de neurônios, pode-se dizer que, pelo menos com a metodologia empregada, nessa idade, a DMD não afeta diretamente os componentes NADPH-d positivos do plexo mioentérico.

Ao analisar o comportamento dos grupos nas diferentes idades (4 semanas vs. 10 semanas), o grupo MDX10 apresentou uma densidade de neurônios nitrérgicos apenas 6% inferior do que aquela do grupo MDX4, ou seja, a quantidade de neurônios/mm² praticamente manteve-se estável de 4 para 10 semanas. O grupo Controle, por sua vez, no mesmo intervalo de tempo, apresentou uma redução de 24% na densidade. Todavia, essa porcentagem mais elevada, não significa que o grupo Controle perdeu neurônios. Na verdade, ao olhar para a estimativa neuronal total de ambos os grupos, foi detectado um aumento significativo desse valor, o qual entende-se ter sido corrigido pelo aumento natural da víscera.

Phillips et al. (2010) sugeriram que, em ratos, a perda neuronal decorrente da idade é seletiva para os neurônios colinérgicos. A sua metodologia baseou-se em

uma avaliação indireta dos valores referentes a esses neurônios, ou seja, a partir de uma medida pan-neuronal, e de uma medida específica para neurônios nitrérgicos, o autor atribuiu a diferença aos neurônios colinérgicos. Esse raciocínio poderia ter sido aplicado na presente pesquisa se não fossem os achados de Cserni et al. (2007). No estudo em questão, os autores demonstraram a existência de uma co-localização de neurônios colinérgicos e nitrérgicos alta na fase intrauterina, e decrescendo gradativamente até a idade de adulto jovem. Como as idades estudadas na presente pesquisa representam um período em que os animais ainda são jovens e, portanto, exibem ainda características de co-localização neuronal elevada, acredita-se que suposições acerca de dados quantitativos indiretos não sejam um procedimento correto.

O que efetivamente pode-se afirmar acerca dos neurônios colinérgicos aqui evidenciados, é que no grupo MDX de 4 semanas não foi possível destacar-se com clareza neurônios intensamente reativos à AChE, ao passo que em 10 semanas, essa observação tornou-se evidente para ambos os grupos (MDX10 e C10). Gabella (1987) sugeriu que durante seu desenvolvimento, o SNE apresente diminuição da densidade neuronal, sem estar associado a um processo patológico, mas sim pela simples eliminação de neurônios redundantes e/ou devido a um aumento da eficácia dos neurônios restantes. É provável que a DMD, por alguma razão ainda não sabida, retarde o processo de maturação dos neurônios em decorrência do aspecto alterado que ela gera no intestino, o que poderia ser comparado aos efeitos da desnutrição nos componentes do plexo mioentérico.

Ao que tudo indica, devido as alterações encontradas em 4 semanas, acredita-se que esta idade seja determinante para o camundongo *mdx*, no que diz respeito ao desenvolvimento do intestino delgado e conseqüentemente do plexo mioentérico. Considerando que em 10 semanas todas as alterações foram minimizadas, quando os neurônios sobressalentes já foram eliminados, e os restantes já tenham se diferenciado em colinérgicos ou nitrérgicos, acredita-se que a DMD seja crucial em um estágio de pleno desenvolvimento do animal. No entanto, como a progressão da distrofia em camundongos *mdx* é diferente que em humanos, entende-se que estudos com outros modelos animais, ou até mesmo humanos, devam ser realizados.

6 CONCLUSÕES

De acordo com as proposições, metodologia empregada e os resultados obtidos, é lícito concluir-se que:

- 1) A área total do intestino delgado do grupo MDX4 é maior que a do grupo C4 de maneira significativa; no entanto, não existe diferença estatística entre as áreas dos intestinos delgados dos grupos MDX10 e C10. As áreas dos intestinos dos animais de 10 semanas são estatisticamente maiores que as áreas dos animais de 4 semanas.
- 2) Existe um gradiente crescente de densidade dos neurônios NADH-d e NADPH-d positivos, no sentido oral-aboral, para todos os grupos estudados. Em 4 semanas, o grupo MDX apresentou uma densidade de neurônios NADH-d e NADPH-d positivos inferior a do grupo C4; no entanto, as densidades se igualaram entre os grupos de 10 semanas. A densidade de neurônios NADH-d e NADPH-d positivos dos grupos de 10 semanas é significativamente inferior a densidade dos grupos de 4 semanas.
- 3) O grupo MDX4 apresenta uma estimativa do número total de neurônios NADH-d positivos, superior à estimativa do grupo C4; entre as estimativas dos grupos MDX10 e C10 não existe diferença estatística. As estimativas do número total de neurônios NADH-d positivos dos grupos de 10 semanas são estatisticamente inferiores as estimativas dos grupos de 4 semanas.
- 4) Não existem diferenças significativas entre os grupos MDX4 vs. C4, nem entre os grupos MDX10 vs. C10 no que diz respeito às estimativas do número total de neurônios NADPH-d positivos. Os grupos de 10 semanas apresentaram uma estimativa do número total de neurônios NADPH-d positivos, superior aos grupos de 4 semanas.
- 5) Em todos os grupos estudados não existem diferenças estatísticas acerca das áreas do perfil dos corpos neuronais NADH-d positivos. O grupo MDX4 apresenta uma área do perfil do corpo neuronal (NADPH-d positivos) estatisticamente superior que o C4, no entanto os grupos de 10 semanas se igualam nesse aspecto.
- 6) Os neurônios do grupo MDX4 não apresentam intensa reatividade a AChE, comparativamente ao grupo C4. Em 10 semanas ambos grupos são iguais.
- 7) A ultra-estrutura dos neurônios de todos os grupos encontra-se igualmente preservada. Comparativamente ao grupo Controle as fibras musculares lisas do grupo MDX apresentam alterações morfológicas.

REFERÊNCIAS

AUERBACH, L. Ueber einen Plexus gangliosis myogastricus. **Jahres-Bericht. Abh. Schlesischen. Gesells. Vaterland. Cult.**, v. 39, p. 103-104, 1862.

AUERBACH, L. Fernere vorlaufige Mitteilung uber dn Nervenapparat des Darmes. **Arch. Pathol. Anat. Physiol.**, v. 30, p. 457-460, 1864.

AZZENA, G. B.; MANCINELLI, R. Nitric oxide regenerates the normal colonic peristaltic activity in mdx dystrophic mouse. **Neuroscience Letters**, v. 261, n. 1-2, p. 9-12, 1999.

BAGYÁNSZKI, M.; ROMÁN, V.; FEKETE, E. Quantitative distribution of NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons in different segments of the developing chicken small intestine and colon. **The Histochemical Journal**, v. 32, n. 11, p. 679-684, 2000.

BARBOSA, A. J. Histological technique for intramural ganglia in thick tissue preparation (author's transl). **Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas**, v. 11, n. 2-3, p. 95-97, 1978.

BAROHN, R. J.; LEVINE, E. J.; OLSON, J. O.; MENDELL, J. R. Gastric hypomotility in Duchenne's muscular dystrophy. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 1, p. 15-18, 1988.

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

BELAI, A.; WHEELER, H.; BURNSTOCK, G. Innervation of the rat gastrointestinal sphincters: changes during development and aging. **International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 13, n. 2, p. 81-95, 1995.

BENSEN, E. S.; JAFFE, K. M.; TARR, P. I. Acute gastric dilatation in Duchenne muscular dystrophy: a case report and review of the literature. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 77, n. 5, p. 512-514, 1996.

BERKLEY, H.; BALTIMORE, M. The nerves and nerve endings of the mucous layer of the ileum, as show by the rapid Golgi method. **Anatomischer Anzeiger**, v. 8, p. 12-19, 1893.

BERTORINI, T. E.; BHATTACHARYA, S. K.; PALMIERI, G. M.; CHESNEY, C. M.; PIFER, D.; BAKER, B. Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 32, n. 10, p. 1088-1092, 1982.

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

BILLROTH, T. Einige Beobachtungen uber das ausgedehnte Vorkommen von Nervenastomosen im Tractus Intestinalis. **Arch. Anat. Physiol.** Leipzig, p. 148-158, 1858.

BÓDI, N.; BATTONYAI, I.; TALAPKA, P.; FEKETE, E.; BAGYÁNSZKI, M. Spatial pattern analysis of nitrergic neurons in the myenteric plexus of the duodenum of different mammalian species. **Acta Biologica Hungarica**, v. 60, n. 4, p. 347-358, 2009.

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, n. 1, p. 7-12, 1996.

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

BOR S. S, E.; CHADI, G.; BOR, J. S. F.; FERRAZ, C. A.; SOUZA, R. R. Myenteric neurons of the mouse small intestine. Morphometry and acetylcholinesterase activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 1, p. 101-108, 1994.

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

BRENMAN, J. E.; CHAO, D. S.; XIA, H.; ALDAPE, K.; BREDD, D. S. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. **Cell**, v. 82, n. 5, p. 743-752, 1995.

BRIDGES, L. R. The association of cardiac muscle necrosis and inflammation with the degenerative and persistent myopathy of MDX mice. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 72, n. 2-3, p. 147-157, 1986.

BULFIELD, G.; SILLER, W. G.; WIGHT, P. A.; MOORE, K. J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 4, p. 1189-1192, 1984.

BURNS, A. J.; ROBERTS, R. R.; BORNSTEIN, JOEL C.; YOUNG, HEATHER M. Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and early postnatal stages. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 18, n. 4, p. 196-205, 2009.

CAJAL, S. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Maloine, Paris, 1911.

CAMILLERI, M.; COWEN, T.; KOCH, T. R. Enteric neurodegeneration in ageing. **Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 20, n. 4, p. 418-429, 2008.

CHUNG, B. C.; PARK, H. J.; YOON, S. B.; LEE, H. W.; KIM, K. W.; LEE, S. I.; PARK, I. S. Acute gastroparesis in Duchenne's muscular dystrophy. **Yonsei Medical Journal**, v. 39, n. 2, p. 175-179, 1998.

CIENA, A. P.; LUQUES, I. U.; DIAS, F. J.; YOKOMIZO, S. R. A.; IYOMAZA, M. M.; WATANABE, I. S. Ultrastructure of the myotendinous junction of the medial pterygoid muscle of adult and aged Wistar rats. **Micron Oxford, England: 1993**, v. 41, n. 8, p. 1011-1014, 2010.

COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, n. 4, p. 165-172, 2003.

COOPER, B. J.; WINAND, N. J.; STEDMAN, H.; VALENTINE, B. A.; HOFFMAN, E. P.; KUNKEL, L. M.; SCOTT, M. O.; 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, n. 6178, p. 154-156, 1988.

COSTA, M.; BROOKES, S. J.; HENNIG, G. W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**, v. 47 Supplement 4, p. 15-19, 2000.

- CSERNI, T.; PARAN, S.; PURI, P. The effect of age on colocalization of acetylcholinesterase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase staining in enteric neurons in an experimental model. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 42, n. 2, p. 300-304, 2007.
- DE SOUZA, R. R.; MORATELLI, H. B.; BORGES, N.; LIBERTI, E. A. Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. **Gerontology**, v. 39, n. 4, p. 183-188, 1993.
- DENETCLAW, W. F.; HOPF, F. W.; COX, G. A.; CHAMBERLAIN, J. S.; STEINHARDT, R. A. Myotubes from transgenic mdx mice expressing full-length dystrophin show normal calcium regulation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 5, n. 10, p. 1159-1167, 1994.
- DINAN, D.; LEVINE, M. S.; GORDON, A. R.; RUBESIN, S. E.; ROMBEAU, J. L. Gastric wall weakening resulting in separate perforations in a patient with Duchenne's muscular dystrophy. **AJR. American Journal of Roentgenology**, v. 181, n. 3, p. 807-808, 2003.
- DRASCH, O. Beitrage zur Kenntnis des feineren Baues des Dunndarmes, insbesondere uber die Nerven desselben. **Sitz. Akad. Wiss.**, v. 82, p. 168-198, 1881.
- EL-SALHY, M.; SANDSTRÖM, O.; HOLMLUND, F. Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 107, n. 1, p. 93-103, 1999.
- EMERY, A. E.; EMERY, M. L. Edward Meryon (1809-1880) and muscular dystrophy. **Journal of Medical Genetics**, v. 30, n. 6, p. 506-511, 1993.
- EMERY, A. E.; BURT, D. Intracellular calcium and pathogenesis and antenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. **British Medical Journal**, v. 280, n. 6211, p. 355-357, 1980.
- EMERY, A. E. The muscular dystrophies. **Lancet**, v. 359, n. 9307, p. 687-695, 2002a.
- EMERY, A. E. Muscular dystrophy into the new millennium. **Neuromuscular Disorders: NMD**, v. 12, n. 4, p. 343-349, 2002b.

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

FURNESS, J. B.; ALEX, G.; CLARK, M. J.; LAL, V. V. Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine. **The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 272, n. 2, p. 475-483, 2003.

FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 81, n. 1-3, p. 87-96, 2000.

FURNESS, J. B.; LI, Z. S.; YOUNG, H. M.; FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. **Cell and Tissue Research**, v. 277, n. 1, p. 139-149, 1994.

FURNESS, J. B.; BORNSTEIN, J. C.; MURPHY, R.; POMPOLO, S. Roles of peptides in transmission in the enteric nervous system. **Trends in Neurosciences**, v. 15, n. 2, p. 66-71, 1992.

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

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

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

GÁBRIEL, R.; PÁSZTOR, I.; DÉNES, V.; WILHELM, M. Some neurohistochemical properties of nerve elements in myenteric plexus of rabbit ileum: similarities and dissimilarities to the rodent pattern. **Cell and Tissue Research**, v. 292, n. 2, p. 283-291, 1998.

GAILLY, P.; BOLAND, B.; HIMPENS, B.; CASTEELS, R.; GILLIS, J. M. Critical evaluation of cytosolic calcium determination in resting muscle fibres from normal and dystrophic (mdx) mice. **Cell Calcium**, v. 14, n. 6, p. 473-483, 1993.

GARTNER, L. **Tratado de histologia em cores**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003.

GERSHON, M. **The second brain: the scientific basis of gut instinct and a groundbreaking new understanding of nervous disorders of the stomach and intestine**. 1. ed. New York: HarperCollins, 1998.

GILLIS, J. M. Membrane abnormalities and Ca homeostasis in muscles of the mdx mouse, an animal model of the Duchenne muscular dystrophy: a review. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 156, n. 3, p. 397-406, 1996.

GOMES, O.; GRIZZO, D.; TIRABOSHI, H.; COLÚ, B, S, C.; CHAHUD, F.; SANTOS, H. S. L. Qualitative analysis of striated skeletal muscles in the dystrophinopathy of mdx mice submitted to physical activity. **Journal of Morphological Sciences**, v. 27, n. 2, p. 93-97, 2010.

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

GOTTRAND, F.; GUILLONNEAU, I.; CARPENTIER, A. Segmental colonic transit time in Duchenne muscular dystrophy. **Archives of Disease in Childhood**, v. 66, n. 10, p. 1262, 1991.

HENS, J.; VANDERWINDEN, J. M.; DE LAET, M. H.; SCHEUERMANN, D. W.; TIMMERMAN, J. P. Morphological and neurochemical identification of enteric neurones with mucosal projections in the human small intestine. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, n. 2, p. 464-471, 2001.

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

HSU, Y. D. Muscular dystrophy: from pathogenesis to strategy. **Acta Neurologica Taiwanica**, v. 13, n. 2, p. 50-58, 2004.

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

JACOBS, P. A.; HUNT, P. A.; MAYER, M.; BART, R. D. Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosome translocation: further evidence that the DMD locus is at Xp21. **American Journal of Human Genetics**, v. 33, n. 4, p. 513-518, 1981.

- JAFFE, K. M.; MCDONALD, C. M.; INGMAN, E.; HAAS, J. Symptoms of upper gastrointestinal dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: case-control study. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 71, n. 10, p. 742-744, 1990.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- KARAOSMANOGLU, T.; AYGUN, B.; WADE, P. R.; GERSHON, M. D. Regional differences in the number of neurons in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine and colon: an evaluation of markers used to count neurons. **The Anatomical Record**, v. 244, n. 4, p. 470-480, 1996.
- KARNOVSKY, M. J.; ROOTS, L. A "Direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 12, n. 3, p. 219-221, 1964.
- KIERSZENBAUM, A. **Histologia e biologia celular uma introdução à patologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- KRISHNAN, R. V.; PAL, G. P.; BORADKAR, R. V. Size plasticity of intact motoneurons as reaction to partial denervation of muscle. **The International Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 43-49, 1982.
- KUNKEL, L. M.; MONACO, A. P.; MIDDLESWORTH, W.; OCHS, H. D.; LATT, S. A. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 14, p. 4778-4782, 1985.
- KUNZE, W. A. A.; FURNESS, J. B. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 117-142, 1999.
- LANGLEY, J. N.; MAGNUS, R. Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves. **The Journal of Physiology**, v. 33, n. 1, p. 34-51, 1905.
- LEBOUVIER, T.; CHAUMETTE, T.; PAILLUSSON, S.; DUYCKAERTS, C.; BRULEY DES VARANNES, S.; NEUNLIST, M.; DERKINDEREN, P. The second brain and Parkinson's disease. **The European Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 5, p. 735-741, 2009.

LEFAUCHEUR, J. P.; SEBILLE, A. Features of dystrophy in smooth and skeletal muscles of mdx mice. **Muscle & Nerve**, v. 19, n. 6, p. 793-794, 1996.

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

LLEWELLYN, S. J.; COSTA, M.; FURNESS J. B.; BORNSTEIN J. C. Structure of the tertiary component of the myenteric plexus in the guinea-pig small intestine. **Cell Tissue Research**, v. 272, n. 3, p. 509-516, 1993.

LUNSHOF, L.; SCHWEIZER, J. J. Acute gastric dilatation in Duchenne's muscular dystrophy. **Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde**, v. 144, n. 46, p. 2214-2217, 2000.

MANCINELLI, R.; TONALI, P.; SERVIDEI, S.; AZZENA, G. B. Analysis of peristaltic reflex in young mdx dystrophic mice. **Neuroscience Letters**, v. 192, n. 1, p. 57-60, 1995.

MANZUR, A. Y.; KINALI, M.; MUNTONI, F. Update on the management of Duchenne muscular dystrophy. **Archives of Disease in Childhood**, v. 93, n. 11, p. 986-990, 2008.

MCCONALOGUE, K.; FURNESS, J. B. Gastrointestinal neurotransmitters. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 51-76, 1994.

MEISSNER, G. Über die Nerven der Darmwand. **Z. Ration. Med. N. F.**, v. 8, p. 364-366, 1857.

MENDELSON, D.; TAS, J.; JAMES, J. Cuproline blue: a specific dye for single-stranded RNA in the presence of magnesium chloride. II. Practical applications for light microscopy. **The Histochemical Journal**, v. 15, n. 11, p. 1113-1121, 1983.

MIRANDA, N. M. H.; MOLINARI, S. L.; NATALI, M. R.; SANT'ANA, D. M. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats: a comparison of techniques of the neuronal evidentiatio. **Arquivos De Neuro-Psiquiatria**, v. 59, n. 1, p. 54-59, 2001.

- MIZUNO, M. S.; POMPEU, E.; CASTELUCCI, P.; LIBERTI, E. A. Age-related changes in urinary bladder intramural neurons. **International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 3, p. 141-148, 2007.
- MOENS, P.; BAATSEN, P. H.; MARÉCHAL, G. Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 14, n. 4, p. 446-451, 1993.
- MONACO, A. P.; NEVE, R. L.; COLLETTI, F. C.; BERTELSON, C. J.; KURNIT, D. M.; KUNKEL, L. M. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. **Nature**, v. 323, n. 6089, p. 646-650, 1986.
- MOORE, K.; PERSUAD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- MULÉ, F.; AMATO, A.; SERIO, R. Gastric emptying, small intestinal transit and fecal output in dystrophic (mdx) mice. **The Journal of Physiological Sciences: JPS**, v. 60, n. 1, p. 75-79, 2010.
- MULÉ, F.; VANNUCCHI, M. G.; CORSANI, L.; SERIO, R.; FAUSSONE, P. M. S. Myogenic NOS and endogenous NO production are defective in colon from dystrophic (mdx) mice. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, n. 5, p. G1264-G1270, 2001.
- MULÉ, F.; D'ANGELO, S.; TABACCHI, G.; AMATO, A.; SERIO, R. Mechanical activity of small and large intestine in normal and mdx mice: a comparative analysis. **Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 11, n. 2, p. 133-139, 1999.
- MUNTONI, F.; TORELLI, S.; FERLINI, A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. **Lancet Neurology**, v. 2, n. 12, p. 731-740, 2003.
- 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.
- NOWAK, T. V.; IONASESCU, V.; ANURAS, S. Gastrointestinal manifestations of the muscular dystrophies. **Gastroenterology**, v. 82, n. 4, p. 800-810, 1982.

OBERC, M. A.; ENGEL, W. K. Ultrastructural localization of calcium in normal and abnormal skeletal muscle. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 36, n. 6, p. 566-577, 1977.

PANE, M.; VASTA, I.; MESSINA, S.; SORLETI, D.; ALOYSIUS, A.; SCIARRA, F.; MANGIOLA, F.; KINALI, M.; RICII, E.; MERCURI, E. Feeding problems and weight gain in Duchenne muscular dystrophy. **European Journal of Paediatric Neurology: EJPN: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society**, v. 10, n. 5-6, p. 231-236, 2006.

PECK, C. J.; SAMSURIA, S. D.; HARRINGTON, A. M.; LING, S. K.; HUTSON, J. M.; SOUTHWHEEL, B. R. Fall in density, but not number of myenteric neurons and circular muscle nerve fibres in guinea-pig colon with ageing. **Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 21, n. 10, p. 1075-1085, 2009.

PURVES, D.; SNIDER, W. D.; VOYVODIC, J. T. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. **Nature**, v. 336, n. 6195, p. 123-128, 1988.

RAY, P. N.; BELFALL, B.; DUFF, C.; LOGAN, C.; KEAN, V.; THOMPSON, M. W.; SYLVESTER, J. E.; GORSKI, J. L.; SCHMICKEL, R. D.; WORTON, R.G. Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. **Nature**, v. 318, n. 6047, p. 672-675, 1985.

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

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

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

SCHABADASCH A, L. S.; ARNOLD, L. Z. Zell-forsch. **Intramurale Nervengeflechte des Darmrohrs**, v. 10, p. 320-385, 1930.

SCHEMANN, M.; NEUNLIST, M. The human enteric nervous system. **Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 16 Supplement 1, p. 55-59, 2004.

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

SERIO, R.; BONVISSUTO, F.; MULÈ, F. Altered electrical activity in colonic smooth muscle cells from dystrophic (mdx) mice. **Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 13, n. 2, p. 169-175, 2001.

STEDMAN, H. H.; SWEENEY, H. L.; SHRAGER, J. B.; MAGUIRE, H.C.; PANETTIERI, R. A.; PETROF, B.; NARUSAWA, M.; LEFEROVICH, J.M.; SLADKY, J. T.; KELLY, A. M. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. **Nature**, v. 352, n. 6335, p. 536-539, 1991.

SUGITA, H.; TAKEDA, S. Progress in muscular dystrophy research with special emphasis on gene therapy. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences**, v. 86, n. 7, p. 748-756, 2010.

TAMEYASU, T.; OGURA, S.; OGIHARA, K. The effect of e-, i-, and n-nitric oxide synthase inhibition on colonic motility in normal and muscular dystrophy (mdx) mice. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 54, n. 6, p. 555-566, 2004.

TESTUT, L.; LATARJET, A. **Tratado de anatomía humana**. 9. ed. Madrid: Salvat, 1959.

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

TORRES, F. O. The Golgi silver impregnation method: commemorating the centennial of the Nobel Prize in medicine (1906) shared by Camillo Golgi and Santiago Ramón y Cajal]. **Biomédica: Revista Del Instituto Nacional De Salud**, v. 26, n. 4, p. 498-508, 2006.

VAINZOF, M.; AYUB, G. D.; ONOFRE, P. C. G.; MARTINS, P. C.; LOPES, V. F.; ZILBERZTAJN, D.; MAIA, L. S.; SELL, K.; YAMAMOTO, L. U. Animal models for genetic neuromuscular diseases. **Journal of Molecular Neuroscience: MN**, v. 34, n. 3, p. 241-248, 2008.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; DE LAHUNTA, A.; O'QUINN, R.; BLUE, J. T. Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 88, n. 1-3, p. 69-81, 1988.

VANNUCCHI, M. G.; CORSANI, L.; GIOVANNINI, M. G.; FAUSSONE, P. M. S. Expression of dystrophin in the mouse myenteric neurones. **Neuroscience Letters**, v. 300, n. 2, p. 120-124, 2001.

VANNUCCHI, M. G.; ZARDO, C.; CORSANI, L.; FAUSSONE, P. M. S. Interstitial cells of Cajal, enteric neurons, and smooth muscle and myoid cells of the murine gastrointestinal tract express full-length dystrophin. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 118, n. 6, p. 449-457, 2002.

WHITEHEAD, N. P.; YEUNG, E. W.; ALLEN, D. G. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 33, n. 7, p. 657-662, 2006.

WILHELM, M.; BÁTORI, Z.; PÁSZTOR, I.; GÁBRIEL, R. NADPH-diaphorase positive myenteric neurons in the ileum of guinea-pig, rat, rabbit and cat: a comparative study. **European Journal of Morphology**, v. 36, n. 3, p. 143-152, 1998.

WILLIAMS, PETER.; WARWICK, R. **Gray anatomia**. 37. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

WILSON, A.; LLEWELLYN-SMITH, I.; FURNESS, J. B.; COSTA, M. The source of the nerve fibres forming the deep muscular and circular muscle plexuses in the small intestine of the guinea-pig. **Cell Tissue Research**, v. 247, n. 3, p. 497-504, 1987.

YOUNG, H. M.; FURNESS, J. B.; SEWELL, P.; BURCHER, E. F.; KANDIAH, C. J. Total numbers of neurons in myenteric ganglia of the guinea-pig small intestine. **Cell Tissue Research**, v. 272, p. 197-200, 1993.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 2nd ed. New Jersey: Prentice Hall, 1984.

ZIZZO, M. G.; MULÈ, F.; SERIO, R. Duodenal contractile activity in dystrophic (mdx) mice: reduction of nitric oxide influence. **Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 15, n. 5, p. 559-565, 2003.