Any Kelly Gomes de Lima

Avaliação dos efeitos da suplementação com ácido ascórbico sobre os aspectos morfoquantitativos do plexo mioentérico do jejuno de camundongos mdx com ausência de distrofina

> São Paulo 2013

#### Any Kelly Gomes de Lima

Avaliação dos efeitos da suplementação com ácido ascórbico sobre os

aspectos morfoquantitativos do plexo mioentérico do jejuno de

camundongos mdx com ausência de distrofina

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

### Departamento:

Cirurgia

### Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

São Paulo

2003

Nº CLASSIFICAÇÃO			
Nº	ТОМВО		

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'Àpice da Facuklade de Medicina Veterinana e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

Lina, Any Kelly Gomes de Avaliação dos efeitos da suplementação com ácido ascórbico sobre os aspectos morfoquantitativos do plexo inicia de inicia de la companya de la
moenterico do jejuno de camundongos mox com ausencia de distrolina. Exity Comes de Lina. – 2013. 63 f. : il.
Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2013.
Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres .
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti.
1. Distrofia muscular de Duchenne. 2. Trato gastrointestinal. 3. Jejuno. 4. Plexo mioentérico. 5.

Γ

#### FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

### Comissão de Ética no uso de animais

# CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos efeitos da suplementação com ácido ascórbico sobre os aspectos morfoquantitativos do plexo mioentérico do jejuno de camundongos mdx com ausência de distrofina", protocolado sob o nº 2345/2011, utilizando 48 (quarenta e oito) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Assessment of the effects of ascorbic acid supplementation on aspects morfoquantitativos myenteric plexus of jejunum of mdx mice with absence of dystrophin", protocol number 2345/2011, utilizing 48 (forty eight) 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 8/17/2011.

São Paulo, 26 de fevereiro de 2013.

indino f wine (

Denise Tabacchi Fantoni Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87 Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" São Paulo/SP – Brasil 05508-270 Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904 Fax: +55 11 3032-2224 E-mail: fmvz@usp.br http://www.fmvz.usp.br

# FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Lima, Any Kelly Gomes de

Título: Avaliação dos efeitos da suplementação com ácido ascórbico sobre os aspectos morfoquantitativos do plexo mioentérico do jejuno de camundongos mdx com ausência de distrofina.

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

Data: / / /

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	

"Seja a mudança que você deseja ver no mundo." Mahatma Gandhi.

# DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Vanzuy Gomes e Maria Jácome. Aos meus queridos irmãos, Paulo, Kariny, Aniely e Wilke Max. A vocês, dedico este trabalho!

# AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar os meus caminhos...

Aos animais utilizados neste trabalho, obrigada por tornarem possível esta pesquisa.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, educação, cuidados e crenças durante toda a minha caminhada. Muito obrigada por fazerem de tudo para que os meus sonhos se tornem realidade. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos, pelo apoio, amor, e ajuda nos momentos mais difíceis.

À Patrícia Moura e Kariny Lima, que me acolheram quando eu mais precisei, sem nunca pedirem nada em troca. Não sei se teria conseguido sem a ajuda de vocês.

À família Moura, dona Maria, Mateus e o Bruno, pela amizade e confiança.

Aos meus tios, Jerry e Ariadna Jácome, pelo incentivo e conselhos.

Aos meus primos, obrigada pelo carinho.

À Luciana Camargo Salles e Glenda Giulyanne Freitas por serem as melhores amigas do mundo. Vocês provaram que a distância não é um problema quando a amizade é verdadeira. Muito obrigada por sempre me aturarem! Amo muito vocês duas!

Ao Ênio Fontes, obrigada pelo amor, carinho, companhia e incansável paciência. Por sempre ter me ajudado e apoiado. É sempre bom tê-lo por perto, e poder compartilhar momentos bons e ruins.

à família Camargo Salles, principalmente a Célia Camargo e Robson Leporo, por me receberem carinhosamente como parte da família.

Aos meus grandes amigos, Jodonai Barbosa e Franceliusa Delys, obrigada por me escutarem, me ajudarem e sempre estarem por perto quando eu mais precisei. Vocês são muito importantes para minha vida. São os meus Cabeções preferidos!

À professora Silvia de Campos Boldrini (*in memorian*) por ter acreditado em mim, antes mesmo de me conhecer. Com ela eu aprendi: que todas as pessoas têm o seu lado bom, que devemos ajudar ao próximo antes mesmo de julgá-lo e que nunca devemos desistir dos nossos sonhos. O que parece ter sido pouco tempo, fez toda diferença na minha vida. Nunca vou esquecer o seu choro de alegria quando eu conquistei a minha primeira vitória a respeito deste trabalho. Nunca conheci, e acredito ser impossível conhecer pessoa igual, muito obrigada professora! Saudades eterna. Ao Professor Edson Aparecido Liberti, acredito que não existem palavras nem atitudes suficientes para agradecê-lo. Sem o senhor, não seria possível ter começado este trabalho, muito menos terminado. Obrigada por tornar fácil, o que seria difícil. Obrigada pelo lar, proteção, ajuda, humildade, pelos ensinamentos sobre anatomia, sobre a vida, sobre as pessoas... Enfim, obrigada por tudo que presenciei durante esses dois anos e meio. Desculpe-me qualquer coisa, é que ainda sou jovem!rs. Muito obrigada por tudo Mestre!

À Aline Rosa Marosti Bobna "presuntinho" e Joice Naiara Bertaglia Pereira "cabeção", não sei o que seria das tardes no VQM sem a alegria de vocês duas. Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho. Foram companheiras, me deram força, e me ajudaram muito. Muito obrigada por tudo meninas!

Ao Ricardo Bandeira, "Tevez", nunca me esquecerei de sua ajuda nos momentos mais difíceis deste trabalho. Muito obrigada!

À Liliana Ribeiro "Tiquita", acredito que você seja um anjo que Deus colocou em minha vida, no momento em que eu mais precisei, e quando eu menos acreditei na minha capacidade. Obrigada por me ensinar que a vida é bela, e que tudo só depende de nós. Não saberei como agradecê-la. Obrigada por ter iluminado a minha vida.

À Maria Angélica Machado, pela amizade e força nos momentos que a gente achava que íamos enlouquecer. Demorou, mas conseguimos cabeça!

A Malú Mota, pelo carinho, acolhimento e preocupação. Sua alegria e bondade são contagiantes. Obrigada por tudo! Adoro você!

Aos colegas do LAFACC, Aline Gonçalves, Bruna Cecília Caixeta Oliveira, Cristina de Sousa Bolina, Flávio Silva Tampelini, Gisele Miyamura Martins, Josy Alvarenga Cal Rosa, Josemberg da Silva Batista, Lídia dos Santos Rocha Cruz, Lígia Pelosi Mendonça, Marcelo Arthur Cavalli, Paulo Henrique de Matos Alves, Regina Bolina, Valquiría Mariotti, obrigada pelos ótimos momentos!

Ao Renivaldo, pela amizade, ajuda e toda dedicação.

À Rosana por toda atenção e ajuda.

Aos funcionários da faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia, principalmente ao Maicon e a Jacque.

A todos os funcionários do ICB III, pela atenção e ajuda.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada!

#### RESUMO

LIMA, A. K. G. Avaliação dos efeitos da suplementação com ácido ascórbico sobre os aspectos morfoquantitativos do plexo mioentérico do jejuno de camundongos mdx com ausência de distrofina. [Assessment of the effects of ascorbic acid supplementation on aspects morphoquantitative myenteric plexus of jejunum of *mdx* mice with absence of dystrophin]. 2013. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da suplementação com ácido ascórbico (AA) sobre os aspectos morfológicos do plexo mioentérico de camundongos mdx jovens. Foram utilizados camundongos mdx e controles C57BL/10 machos divididos em seis grupos (n=5): GC30 (Grupo controle com 30 dias de idade); GC60 (Grupo controle com 60 dias de idade); GCS60 (Grupo controle suplementado com ácido ascórbico, com 60 dias de idade); GD30 (Grupo distrófico com 30 dias de idade); GD60 (Grupo distrófico com 60 dias de idade) e GDS60 (Grupo distrófico suplementado com AA, com 60 dias de idade). Após a eutanásia, os segmentos orais do jejuno (SOJ) foram coletados e submetidos a técnicas histoquimicas de evidenciação neuronal: NADH-diaforase, NADPH-diaforase e AChE. Os resultados demonstraram um aumento significativo do peso corporal para os animais distróficos (grupos GD30 e GD60) quando comparados aos seus respectivos controles (grupos GC30 e GC60). A análise quantitativa demonstrou que os animais do grupo GD60 possui área total do intestino delgado significativamente maior que os animais do grupo GC60; Não houve diferenças significativas entre os grupos GCS60 e GDS60. Em todos os grupos de animais com 60 dias, exceto para a densidade de neurônios nitrérgicos que se apresentou maior no grupo GCS60, todos os demais parâmetros (densidade e área do perfil neuronal) foram semelhantes entre os grupos, tanto controle (GC60 e GCS60) como distrófico (GD60 E GDS60), nas duas metodologias de coloração utilizadas (NADH-d e NADPH-d). A análise qualitativa demonstrou que componentes do plexo mioentérico dos animais distróficos suplementados com AA (GDS60) evidenciados positivos a NADPH-d e AChE apresentaram manutenção dos aspectos normais do plexo mioentérico quando comparados aos animais do grupo GD60.

Palavras-chave: Distrofia Muscular de Duchenne. Trato gastrointestinal. Jejuno. Plexo mioentérico. Ácido Ascórbico.

## ABSTRACT

LIMA, A. K. G. Assessment of the effects of ascorbic acid supplementation on aspects morphoquantitative myenteric plexus of jejunum of *mdx* mice with absence of dystrophin. [Avaliação dos efeitos da suplementação com ácido ascórbico sobre os aspectos morfoquantitativos do plexo mioentérico do jejuno de camundongos mdx com ausência de distrofina.]. 2013. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The aim of this study was assessment of the effects of ascorbic acid (AA) supplementation on morphoquantitative aspects of myenteric plexus of jejunum young mdx mice. Dystrophic mdx and control C57BL/10 animals were used and divided in six groups (n = 5): GC30 (control group with 30 days of age); GC60 (control group with 60 days of age); GCS60 (control group supplemented with ascorbic acid, 60 days of age); GD30 (dystrophic group 30 days of age); GD60 (dystrophic group 60 days of age) and GDS60 (dystrophic group supplemented with AA, 60 days of age). After euthanasia, the oral segments of the jejunum (SOJ) were collected and submitted to the histochemical techniques of neuronal evidencing: NADH-diaphorase, NADPHdiaphorase and AChE. The results showed a significant increase of weight in dystrophic mice (groups GD30, GD60 and GDS60) compared to its controls (groups GC30, GC60 and GCS60). The quantitative analysis showed that the GD60 group had a significantly higher small intestine total area than the GC60; no differences significant between GCS60 and GDS60 groups. All groups of animals with 60 days of age, except for the density of nitrergic neurons showed higher in GCS60 group, in all other parameters (the neuronal density and neuronal profile area) were similar between groups, controls (GC60 and GCS60) and dystrophic (GD60 e GDS60), for techniques of the NADH-d e NADPH-d.Morphological analysis of the components of myenteric plexus of dystrophic animals supplemented with AA (group GDS60) and evidenced by the techniques of NADPH-d and AChE, showed repair of the myenteric plexus aspects compared to animals of group no supplemented (GD60).

Keywords: Duchenne muscular dystrophy. Gastrointestinal tract. Jejunum. Myenteric plexus. Ascorbic acid.

# LISTA DE ABREVIATURAS

- AA Ácido ascórbico
- AChE Acetilcolinesterase
- DMD Distrofa Muscular de Duchenne
- NADH-d Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
- NADPH-d Nicotinamida Adenina Dinucleótideo Fosfato
- NBT Azul de nitrotetrazólio
- NO Óxido nitríco
- PBS Tampão fosfato
- SNC Sistema nervoso central
- SNE Sistema nervoso entérico
- SOJ Segmento oral do jejuno
- TGI Trato gastrointestinal

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	.14
2	OBJETIVOS1	177
2.1 GE	OBJETIVO RAL177	
2.2 ES	OBJETIVOS PECÍFICOS177	
3	REVISÃO DE LITERATURA1	188
3.1	DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE	18
3.2	RELAÇÕES ENTRE O TRATO GASTROINTESTINAL E A DMD	19
3.3	SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO	22
3.4	ÁCIDO ASCÓRBICO	25
3.5	MODELO ANIMAL	26
4	MATERIAL E MÉTODO	.28
4.1	MATERIAL	.28
4.2 4 4	METODOLOGIA	29 . <b>29</b> .31 .31 .31 .31
4	<ul> <li>4.2.3.1 Densidade Neuronal</li> <li>4.2.3.2 Área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos</li> <li>4.2.3.3 Análise Estatística</li> </ul>	.34 .34 .36 .36
5	RESULTADOS	.37

5	.1.2	Área do perfil neuronal (μm²) e densidade dos neurônios (mm²) plexo mioentérico	do 38
52	As		40
5	.2.1	Estudo morfológico dos componentes do plexo mioentérico	10
		evidenciados pela técnica de NADH	40
5	.2.2	Estudo morfológico dos componentes do plexo mioentérico	
		evidenciados pela técnica de NADPH-d	43
5	.2.3	Estudo morfológico dos componentes do plexo mioentérico	
		evidenciados pela técnica de Acetilcolinesterase	45
6	DISC	CUSSÃO	48
7	CON	CLUSÃO	53
DE	FEDÊ	NCIAS	55

## 1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é considerada em diversos países a segunda maior desordem genética (EMERY, 2011), e atinge cerca de 1 em cada 3.500 indivíduos do sexo masculino nascidos vivos (JØRGENSEN *et al.*, 2011).

Clinicamente caracterizada por uma progressiva fraqueza muscular com consequente dificuldade de locomoção (CHAMBERLAIN, 2010), a DMD é uma doença considerada fatal que tem início na infância (KIM et al., 2011; SHIN et al., 2011) e com expectativa de vida que não ultrapassa os 30 anos de idade (MOSER, 1984) devido, principalmente, a ocorrência de insuficiência muscular respiratória ou cardíaca (BLAKE; KROGER, 2000).

Membro do grupo das distrofias musculares, a DMD está relacionada a distúrbios no gene da proteína distrofina, localizado no braço curto do cromossomo X (SHERRATT; VULLIAMY; STRONG, 1992). Trata-se, portanto, de uma patologia que decorre da mutação no gene da distrofina (WHITEHEAD; YEUNG; ALLEN, 2006; HEYDEMANN; MCNALLY, 2009), uma proteína fundamental na composição do complexo que liga o citoesqueleto à matriz extracelular (CAMPBELL, 1995), cuja ausência pode acarretar perturbações como a perda de proteínas estruturais e moléculas sinalizadoras, além de causar defeitos em enzimas (NAKAMURA; TAKEDA, 2011; PINES; HALEVY, 2011).

Embora haja avanços a respeito dos efeitos deletérios relacionados com a DMD, sua cura ainda está longe de ser obtida. A maioria dos estudos discorre sobre a expressão da distrofina nos músculos esqueléticos, cardíaco e liso (BYERS; KUNKEL; WATKINS, 1991); porém, alguns detectaram a sua expressão também em

tecidos do sistema nervoso central (BABY et al., 2009), sistema nervoso periférico (DE STEFANO et al.,1997; JANCSIK; HAJOS, 1998) e em neurônios do plexo mioentérico (VANNUCCHI et al., 2001).

Estudos experimentais sobre a DMD são desenvolvidos a partir da utilização de animais distróficos como cães da raça Golden Retriver, gatos, ratos, camundongos e aves (CARPENTER et al., 1989; GASGHEN et al., 1992; KORNEGAY et al., 2011; PUTTEN et al., 2012; PERKINS et al., 1980). Embora apresentem semelhanças nas características gerais da distrofia muscular, esses animais possuem diferentes capacidades de regeneração (SEIXAS et al., 1997). Além de ser considerado entre muitos pesquisadores, um ótimo modelo para avaliar a musculatura estriada esquelética, os mecanismos patogênicos associados com a DMD, o camundongo mdx permite analisar também alterações no músculo liso (MULÈ; AMATO; SERIO, 2010) e nos componentes do trato gastrointestinal (BACCARI; ROMAGNANI; CALAMAI, 2000).

Segundo Nowak, Ionasescu e Anuras, (1982) a DMD gera diferentes graus de comprometimento no trato gastrointestinal (TGI) como a dilatação gástrica aguda (ROBIN; FALEWSKI, 1963; BENSEN; JAFFE; TARR, 1996), má absorção intestinal (PATTERSON; ONG; DRAKE, 1964), disfagia, vômito, constipação crônica (JAFFE et al., 1990) e pseudo-obstrução intestinal (LEON et al.,1986). As anormalidades verificadas no TGI de pacientes com DMD são frequentemente apontadas como consequência de alterações no músculo liso; entretanto, o envolvimento de estruturas neurais como os constituintes do plexo mioentérico não pode ser excluído (LEON et al., 1986; BACCARI; ROMAGNANI; CALAMAI, 2000; VANNUCCHI et al., 2001).

Acredita-se que o processo degenerativo característico da DMD promova um aumento das concentrações de agentes deletérios, como os radicais livres,

responsáveis pelo estresse oxidativo (PERKINS et al., 1980). Assim, com o intuito de atenuar ou mesmo erradicar esses efeitos, Perkins et al. (1980) e Tonon et al. (2012) utilizaram o ácido ascórbico (AA) como um antioxidante capaz de minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo em músculos estriados esqueléticos, e verificaram diminuição na mionecrose, inflamação e peroxidação lipídica.

Todavia, como não foi detectado na literatura à qual se teve acesso, achados científicos que comprovem a eficácia do AA em outros tecidos, mormente aqueles constituintes do sistema nervoso entérico (SNE) de indivíduos portadores da DMD, a presente pesquisa visa avaliar o papel do AA no plexo mioentérico de camundongos mdx, amplamente utilizados em pesquisas sobre DMD.

# 2 **OBJETIVOS**

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos da suplementação com ácido ascórbico sobre os parâmetros morfofuncionais dos neurônios mioentéricos localizados na região oral do jejuno de camundongos mdx por meio de técnicas histoquímicas.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-

- Analisar o peso dos animais;

- Verificar a disposição e o arranjo dos gânglios e feixes nervosos dos neurônios reativos a NADH- diaforase, NADPH- diaforase, Acetilcolinesterase;

- Determinar a densidade e a área do perfil do corpo celular de neurônios reativos a NADH-diaforase e NADPH-diaforase.

# 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Distrofias musculares é um grupo de doenças hereditárias caracterizadas, principalmente, por progressiva e devastadora fraqueza muscular (EMERY; EMERY, 1998). Walton e Nattrass (1954), na década de 50 propuseram uma classificação para este grupo de enfermidades que dependia basicamente de duas coisas, a distribuição predominante de fraqueza muscular (portanto, observava se os músculos comprometidos eram principalmente proximais ou distais, e se os músculos faciais estavam sendo afetados) e o modo de herança. Desta forma, foi possível classificar três distrofias musculares bem comuns para a época (Duchenne, Facio-escápuloumeral e Cintura-membros), e três ditas incomuns para aquela epóca (Distal, Oculofaríngea e Congênita). A maioria das pesquisas relacionadas com tratamentos para as distrofias musculares estão concentradas na Distrofia Muscular de Duchenne, devido a sua grande ocorrência e severidade.

Guillaume Benjamin Amant Duchenne (1806-1875) nascido em Boulogne, República Francesa, foi considerado um neurologista atípico de sua época e um dos primeiros autores a interligar eletricidade e medicina, seus trabalhos foram divididos em quatro partes: estimulação elétrica local, ataxia locomotora, análises eletrofisiológicas da emoção e patologia muscular (RODONT, 2005). Em 1861 e 1868, Duchenne publicou o que dizia ser a primeira e detalhada descrição da doença que mais tarde passou a ter o seu nome (EMERY; EMERY, 1998). Embora os primeiros detalhes clínicos e histológicos do músculo tenham sido atribuídos a Duchenne, um médico Inglês, Edward Meryon, descreveu em 1851 (10 anos antes de Duchenne) detalhes sobre oito garotos que apresentavam os sintomas característicos desta distrofia muscular, e foi o primeiro a publicar a descrição em inglês. Meryon delineou os primeiros sintomas que eram observados (na infância) em diferentes faixas etárias, bem como, a fraqueza progressiva dos portadores e a morte no início da idade adulta. Naquela época não se sabia ao certo os motivos para tais manifestações clínicas, entretanto, acreditava-se que uma boa nutrição poderia melhorar o quadro dos sintomáticos (MERYON, 1852).

Os trabalhos realizados por Meryon e Duchenne tiveram grande contribuição para definição dos aspectos clínicos da Distrofia Muscular de Duchenne (EMERY, 2011). Atualmente sabe-se que a Distrofia Muscular de Duchenne é caracterizada por mutações (MUNTONI et al., 2003), que podem ocorrer através de deleções ou duplicações do gene responsável pela codificação da distrofina (LEE et al., 2012). O gene encontra-se localizado no braço curto do cromossomo X, lócus Xp21 (ANDERSON; KUNKEL, 1992; EMERY, 2002), sabe-se ainda, que a deleção ou a duplicação deste gene pode ocorrer em qualquer lugar da sua estrutura (LEE et al., 2012).

Distrofina é uma grande proteína, peso molecular de 427 kDa (AHN; KUNKEL, 1993), é constituída por uma sequência 3.685 aminoácidos (SHERRATT; VULLIAMY; STRONG, 1992), e pertence a superfamília das espectrinas (KOENIG; MONACO; KUNKEL, 1988). Participa estruturalmente do complexo que liga o citoesqueleto à matriz extracelular (ERVASTI; CAMPBELL, 1991), atua no suporte estrutural também da membrana plasmática (KARP, 2005) e na sinalização de algumas moléculas que agem na interação entre citoesqueleto, membrana plasmática e matriz extracelular (YILMAZ; SECHTEM, 2012).

É importante ressaltar que por se tratar de uma doença recessiva ligada ao cromossomo X, a DMD atinge principalmente os homens, e em dois terços dos casos, o gene da doença é herdado da mãe (WORTON et al., 1988). As mulheres apesar de muitas vezes apresentarem a mutação no gene da distrofina não desenvolvem a doença, já que são portadoras de dois cromossomos X (diferente do homem que possui XY), portanto, um dos cromossomos X não afetado supre a necessidade do outro. Entretanto, portadoras da síndrome de Tuner (XO) ou translocação X-autossômica, possuem um cromossomo X afetado, e desta forma, o desenvolvimento da DMD, com raríssima frequência, torna-se possível em mulheres (SILVA; COSTA; CRUZ, 2003).

Apesar de inicialmente ser tratada como doença do músculo estriado esquelético, sabemos hoje que a presença da proteína distrofina é constatada em diversos tecidos tais como, o tecido muscular estriado cardíaco e tecido muscular liso (BYERS; KUNKEL; WATKINS, 1991); células do sistema nervoso central (BYERS; LIDOV; KUNKEL, 1993) e neurônios entéricos (VANNUCCHI, 2001).

## 3.2 RELAÇÕES ENTRE O TRATO GASTROINTESTINAL E A DMD

O trato gastrointestinal (TGI) está localizado na cavidade torácica, cavidade abdominal e cavidade pélvica. Consiste de um tubo oco que se estende dos lábios ao ânus, possui glândulas anexas (salivares, fígado e pâncreas) que auxiliam na digestão através de secreções lançadas na luz do tubo. É dividido em esôfago,

estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e grosso (GARDNER; GRAY; RAHILLY, 1988).

Os componentes do TGI possuem características estruturais em comuns, suas paredes são revestidas por camadas denominadas (a partir da luz do tubo), mucosa, submucosa, túnica muscular (esta última possui duas subcamadas, longitudinal e circular, denominadas de acordo com a disposição de suas fibras) e serosa que pode ter sua denominação modificada de acordo com local que reveste. As particularidades morfológicas de cada órgão ocorrem de acordo com suas funções (proteção, absorção, produção de hormônios, entre outras) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Uma das principais funções deste trato é utilizar-se do alimento ingerido para sintetizar novas moléculas orgânicas ou prover energia para o organismo (SPENCE, 1929). Desta forma, encontra-se devidamente estruturado para que ocorra digestão, secreção de substâncias que produzem alterações químicas nos alimentos, absorção e eliminação dos resíduos (GARDNER; GRAY; RAHILLY, 1988). Todavia, para que estas funções sucedam é necessário que todo o sistema seja devidamente inervado.

Apesar da Distrofia muscular de Duchenne estar comumente relacionada ao músculo esquelético, o trato gastrointestinal também é acometido pela doença e merece adequada atenção (PATTERSON; RIOS, 1953). O trato gastrointestinal foi investigado inicialmente por Bevans (1945) através da necropsia de 4 pacientes com DMD, onde pôde ser observado anormalidades gastrointestinais.

Com relação ao músculo liso, foi possível verificar perda, atrofia e distribuição irregular das fibras (PATTERSON; RIOS, 1953); edema e fibrose na região distal do esôfago, estômago, intestino delgado e cólon (NOWAK; IONASESCU; ANURAS, 1982; BAROHN et al, 1988; BENSEN; JAFFE; TARR, 1996). Autópsias realizadas após morte em pacientes com Distrofia muscular de Duchenne mostrou que ocorre

substituição do tecido muscular liso por tecido conectivo e adiposo (HUVOS; PRUZANSKI, 1967).

Os sintomas clínicos mais comuns dos pacientes admitidos com DMD eram: vômito, diarreia, impactação fecal (BEVANS, 1945; PATTERSON; RIOS, 1953; NOWAK, IONASESCU E ANURAS, 1982; BOLAND et al, 1996), dores abdominal associado com distensão abdominal, constipação e náusea (LEON et al., 1986). Um estudo realizado com 14 crianças portadores da distrofia muscular constatou que 12 apresentavam dilatação gástrica aguda (ROBIN; FALEWSKI, 1963).

Ainda, foi detectada em pacientes distróficos a má absorção intestinal, condição secundária, possivelmente em resultado da musculatura envolvente (PATTERSON; ONG; DRAKE, 1964). Trabalhos mais recentes avaliaram a atividade mecânica dos intestinos delgado e grosso, e concluem que a falta da distrofina provoca alterações no funcionamento normal da motilidade intestinal (MULÉ et al., 1999).

## 3.3 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO

O controle do trato gastrointestinal é realizado por um sistema neural integrado, no qual, envolvem reflexos entéricos locais, reflexos que passam por gânglios simpáticos e reflexos que vão para os intestinos e voltam para o sistema nervoso central (FURNESS, 2012). O trato gastrointestinal é inervado por projeções de neurônios do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, e neurônios aferentes viscerais (PHILLIPS; POWLEY, 2007). Todavia, sua principal inervação é intrínseca, realizada pelo sistema nervoso entérico (STERNINI, 1988). O sistema nervoso entérico (SNE) é composto por grupos de neurônios e células de suportes (células gliais) com localizados fora do sistema nervoso central (SNC) e capazes de formar circuitos neurais apropriados para realizar atividades reflexas autônomas (FURNESS, 2006); É comumente designado de segundo cérebro, devido a sua alta complexidade e relativa independência em relação ao SNC (FURNESS, 2006).

O SNE está localizado na parede do tubo digestório, é constituído por dois plexos ganglionados, o plexo mioentérico e plexo submucoso; são responsáveis por regular os movimentos peristálticos, secreção e absorção, fluxo sanguíneo, e modulação do sistema imune e endócrino. As células que compõe o SNE são formadas pela migração de células da crista neural (BURNS, 2005).

O plexo mioentérico (de Auerbach) localizado entre as subcamadas longitudinal e circular da camada muscular estende-se do esôfago ao ânus, é o responsável por controlar a motilidade. O plexo submucoso está localizado na camada submucosa dos intestinos delgado e grosso, é o principal responsável pelo controle das secreções (FURNESS, 2000; METZGER, 2010).

O plexo mioentérico forma uma rede continua em torno da circunferência e ao longo do tubo digestório. Os gânglios mioentéricos são interconectados por feixes de fibras nervosas e podem variar em tamanho, forma e orientação (FURNESS, 2006).

Os neurônios mioentérico podem ser classificados de acordo com o seu formato, propriedades eletrofisiológicas, neuroquímicas e função. Foram identificados 15 tipos de neurônios no intestino delgado de cobaias, os quais podem ser distribuídos em quatro classes funcionais, neurônios intrínsecos primário aferente (IPANs), interneurônios, neurônios motores e neurônios intestinofugais (FURNESS, 2001, 2006). Os neurônios entéricos possuem diversos neurotransmissores responsáveis pela execução das funções do trato digestório. É importante lembrar que um neurônio entérico pode ter um ou mais tipos de neurotransmissores, entretanto, sempre parece haver um com o papel dominante na inervação de uma célula ou tecido, e desta forma, esta substância é denominada transmissora primária. Substâncias as quais participam com menor influência sobre a inervação agindo como subsidiárias ou moduladoras, são denominadas de co-transmissoras. Em alguns neurônios o papel da transmissão primária é compartilhado por duas substâncias (MORRIS; GIBBINS, 1991; FURNESS, 2006).

Os neurônios motores entéricos inervam a camada muscular circular e longitudinal do músculo liso e a camada muscular da mucosa do esôfago, estômago, intestinos (grosso e delgado) e vesícula biliar (FURNESS, 2006). O principal neurotransmissor motor excitatório do plexo mioenterico é a acetilcolina, a qual age sobre os receptores muscarínicos (principalmente em M<sub>2</sub> e M<sub>3</sub>) do músculo liso e em células de Cajal (FURNESS, 2006). A substância P também é um importantíssimo neurotransmissor com ação excitatória, o mesmo é um neuropeptídeo muito antigo descoberto por Von Euler (QUIRION; DAM, 1986), no SNE age como transmissor secundário na transmissão neuromuscular excitatória.

Neurônios motores inibitórios do músculo liso liberam peptídeo vasoativo intestinal (VIP), óxido nítrico (NO) e fosfora purine nucleotideo (ATP). O óxido nítrico é um transmissor primário, ele é um subproduto da conversão do aminoacido L-arginina em L-citrulina, reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Ambas formas de NOS- endotelial e neural co-existem com nicotinamida adenina dinucleótideo fosfato reduzida (NADPH-d) nos tecidos. Portanto, um dos métodos utilizado para identificação dos neurônios entéricos que produzem o NO é a reação histoquímicas denominada de NADPH-d, que consiste na transferência do hidrogênio do NADPH para o sal Nitroblue Tetrazolium (NBT), o que forma uma formazana insolúvel (azul escuro). Esta técnica delineia o corpo do neurônio, o dendrito e as redes de axônios (SCHEREN; SINGLER et al., 1983; DORKO, et al. 2000).

Outro método para estudo morfológico dos neurônios mioentéricos muito utilizado, é a técnica histoquímica da nicotinamida adenina dinucleotídeo-diaforase (NADH-d), que consiste na detecção da enzima NADH-d com o receptor de elétrons NBT (GABELA, 1968). Esta é uma reação de oxi-redução catalisada pela enzima mitocondrial NADH-d, onde ao receber os elétrons, o NBT se precipita e forma grânulos de formazana (de cor azul e insolúvel). Portanto, esta técnica evidencia o corpo dos neurônios que possui maior atividade da enzima NADH-d positivos.

## 3.4 ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico (AA) é considerado um antioxidante potente, pouco tóxico e de fácil acesso para a população (WEBER; BENDICH; SCHALCH, 1996); É amplamente discutido em pesquisas que buscam tratamentos para diversas enfermidades (HWANG, 2012; AMANO et al., 2013).

O princípio da atividade antioxidante é baseado na neutralização da ação dos elétrons dos radicais livres. Fica desta forma, evidente o papel destas moléculas neutralizantes em proteger os organismos ou tecidos dos males que provoca o estresse oxidativo (GÜLÇIN, 2011).

Há poucos estudos sobre os efeitos da suplementação com o ácido ascórbico e distrofia muscular de Duchenne, aqueles concretizados apenas analisam os efeitos do AA sobre o músculo esquelético (PERKINS et al., 1980; TONON et al., 2011).

Pesquisa realizada com o músculo diafragma de camundongos mdx mostrou que a suplementação diária com 200mg de ácido ascórbico diminuiu os níveis de creatina kinase, mionecrose e inflamação, sugerindo que o AA age como um atenuante da degeneração característica da Distrofia Muscular de Duchenne (TONON et al., 2012).

Entretanto, os efeitos da suplementação com ácido ascórbico sobre os neurônios entéricos de camundongos mdx ainda são desconhecidos.

#### 3.5 MODELO ANIMAL

Existem diversos modelos animais para o estudo da Distrófia Muscular de Duchenne (PERKINS et al., 1980, CARPENTER et al., 1989; GASGHEN et al., 1992; KORNEGAY et al., 2011; PUTTEN et al., 2012). Para a utilização destes modelos, é crucial o conhecimento de suas características patológicas (WILLMANN, et al., 2009).

O modelo experimental canino da raça Golden Retriever é considerado o melhor modelo de cão caracterizado. Diferentemente do mdx, este modelo sofre uma rápida progressão semelhante à Distrofia muscular de Duchenne. Entretanto, a expectativa de vida não é padronizada, podendo variar de alguns dias ou anos (AMBROSIO et al., 2008).

A ocorrência natural da mutação do gene da distrofina foi descrita pela primeira vez em uma colônia de camundongos C57BL/10 (BULFIELD et al., 1984). Hoje, este camundongo é denominado de C57BL/10-Dmd/mdx (WILLMANN, et al., 2009).

O camundongo mdx possui uma expectativa de vida um pouco menor quando comparado aos animais controles C57BL/10 (CHAMBERLAIN, 2007). É um modelo animal fornecido apenas pela deformação do comprimento normal da distrofina (BULFIELD et al., 1984). O camundongo apresenta desenvolvimento progressivo, rápido e fatal da doença. Seixas et al. (1997) a partir de seus estudos expôs que, logo após o 18º dia de nascimento é possível notar o aparecimento de alterações histológicas, como necrose e intenso filtrado inflamatório, no tecido muscular, e após a 3º semana é possível observar necrose abrupta; já na 5ª semana pós- natal nota-se rápida regeneração do tecido.

# 4 MATERIAL E MÉTODO

#### 4.1 MATERIAL

Foram utilizados 48 camundongos machos C57BL/10-Dmd/mdx, portadores da Distrofia Muscular de Duchenne (grupo experimental) e camundongos machos C57BL/10 (grupo controle) provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo.

De acordo com a idade, os animais de ambos os grupos foram divididos da seguinte forma (n=13):

- GC30 Grupo controle com 30 dias;
- GD30 Grupo distrófico com 30 dias;
- GC60 Grupo controle com 60 dias;
- GD60 Grupo distrófico com 60 dias;
- GDS60 Grupo distrófico suplementado com 60 dias;
- **GCS60** Grupo controle suplementado com 60 dias.

A partir do 31º dia, os animais dos grupos **GDS60** e **GCS60** receberam durante 30 dias, suplementação diária de 0,5 mg/5ml de ácido ascórbico (AA) por animal.

Durante todo o período experimental, os animais de todos os grupos foram mantidos em mini-isoladores (caixas de polisulfona com 32cm comprimento x 20cm largura x 21 cm altura, com capacidade para 5 animais) providos de bebedouro e comedouro, sob condições controladas de temperatura (24±2°C) e de iluminação (ciclo de 12 horas claro/ 12 horas escuro), recebendo ração e água sem restrições.

Findo os respectivos períodos, os animais foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) no Biotério do Departamento de Anatomia – ICB/USP e submetidos à imediata laparotomia, quando, após incisões na região do piloro e da parte terminal do íleo, foi retirado todo o intestino delgado.

### 4.2 METODOLOGIA

#### 4.2.1 Coleta e determinação da área do intestino delgado

O intestino delgado dos animais de todos os grupos foi dissecado, desde o óstio pilórico até a parte terminal do íleo. A determinação da área total (em mm<sup>2</sup>) foi realizada projetando a imagem da víscera na tela do computador, e então, sobrepondo um sistema teste formado por pontos equidistantes 0,5 cm entre si (Figura 1). Em seguida, foram contados os pontos que incidiam sobre o órgão, ampliando a imagem de acordo com o seu tamanho, a fim de contar, no mínimo, 100 pontos em cada espécime. Levando em conta a estrutura tubular do intestino, o número total de pontos contados foi multiplicado por 2. A área do intestino delgado foi então obtida, de acordo com a fórmula preconizada por Howard; Reed (1998):

#### A= SP. a/p

onde, SP é a somatória dos pontos contados e a/p é a área por pontos; esta, calculada de acordo com a ampliação linear final da imagem, com a equação:

$$a/p = \Delta x^2/M^2$$

sendo, Δx a distância entre dois pontos no sistema teste, e M a ampliação, assim calculada:

M= Medida da imagem ampliada Medida da régua de calibração A figura 1 ilustra a obtenção da área do intestino delgado, de acordo com a metodologia empregada.



Figura 1 – Metodologia utilizada para a estimativa da área total do intestino delgado a partir da contagem dos pontos que incidem sobre a estrutura.

Fonte: Lima, A. K. G. (2013)

Em seguida, cerca de 2 cm após a flexura duodenojejunal, retirou-se de cada espécime um segmento de aproximadamente 4cm, denominado segmento oral do jejuno (SOJ).

A fim de se analisar os aspectos morfofuncionais dos componentes do plexo mioentérico sob a influência da DMD e da suplementação com ácido ascórbico, o SOJ de todos os animais foi submetido às diferentes técnicas de histoquímica descritas a seguir.

#### 4.2.2 Técnicas Histoquímicas

#### 4.2.2.1 Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – Diaforase (NADH-d)

A extremidade oral do SOJ de 5 animais de cada grupo foi inicialmente lavada, ligada com fio de sutura e, após preenchimento da luz do segmento com quantidade suficiente de solução de Krebs<sup>1</sup> (pH 7,3), a fim de distender levemente suas paredes, procedeu-se à ligadura da sua extremidade aboral. Em seguida, de acordo com o protocolo estabelecido por Gabella (1971) os espécimes foram imersos na mesma solução por 20 minutos, e posteriormente em uma solução de Krebs e Triton (X-100, Sigma, St. Louis, EUA) a 0,3 % por cinco minutos. Após três lavagens em solução de Krebs durante o período de dez minutos, os espécimes foram imersos durante no mínimo 90 minutos em temperatura ambiente, em um meio de incubação (200 ml) contendo 0,10 g de β-NADH-d (N6005, Sigma, St. Louis, EUA), 0,025 g de Nitroblue Tetrazolium - NBT (N6876, Sigma, St. Louis, EUA) em 50 ml de Tampão fosfato -PBS<sup>2</sup> (0,1M, pH 7,4) e 150 ml de água destilada. A reação foi interrompida com a imersão dos espécimes em solução de formol tamponado a 10%<sup>3</sup>.

### 4.2.2.2 Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato – Diaforase (NADPH-d)

Os SOJs de 5 animais de cada grupo foram lavados, em seguida, tiveram a extremidade oral do segmento ligado com fio de sutura e, após o preenchimento da luz com quantidade suficiente PBS (1M, pH 7,4), a fim de distender levemente a

<sup>1,3</sup> g de Bicarbonato de Sódio (NaHCO<sub>3</sub>), 0,24 g de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O), 0,44 g de Cloreto de Potássio (KCl), 0,165 g de Fosfato de Sódio Bibásico Anidro (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 7,05 g de Cloreto de Sódio (NaCl) e 0, 367 g de Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O) em 1 litro de água destilada.

<sup>8,7</sup> g de Cloreto de Sódio (NaCL), 0,36 g de Fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O), 1,95 g de Fosfato de sódio bibásico anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) em 1 litro de água destilada.

<sup>10</sup> ml de formol (HCHO) 37% P.A e 27 ml de PBS 0,1M pH 7,3.

parede da víscera, procedeu-se à ligadura da extremidade aboral. Posteriormente foram mergulhados em paraformaldeído 4%<sup>4</sup> por um período de 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, passaram por três lavagens em PBS (1M, pH 7,4) durante 10 minutos cada, e então, imersos por 2 horas em um meio de incubação contendo 0,05 g de NBT (N6876, Sigma, St. Louis, EUA) 0,1 g de β-NADPH-d (N7505, Sigma, St. Louis, EUA) e 0,3% de Triton X-100 em tampão Tris-HCl<sup>5</sup> (0,1M; pH 7,6). Logo após o período de incubação, os espécimes passaram por mais três lavagens em PBS com duração de 5 minutos cada. Por fim, foram fixados e armazenados em solução de paraformoldeído a 4% (SCHEREN; SINGLER et al., 1983).

Os espécimes reativos à NADH-d e NADPH-d foram processados como preparados totais de membrana, como descrito a seguir. Inicialmente, sob lupa estereoscópica com transiluminação (Zeiss Stemi SV 6), promoveu-se uma incisão longitudinal na borda mesentérica de cada SOJ, com o auxílio de pinças e tesouras oftalmológicas. Em seguida, realizou-se uma microdissecção das camadas constituintes de suas paredes, que consistiu na retirada das camadas mucosa e submucosa, preservando-se as camadas muscular (circular e longitudinal) e serosa (Figura 2). Cada preparado de membrana assim obtido foi montado entre lâmina e lamínula, com solução de glicerina tamponada.

 $<sup>\</sup>frac{4}{3}$  8 g de paraformaldeído; 50 ml de PBS (0,1M, pH 7,4) e 50 ml de água destilada.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> 3,14g de TRIS-HCL (TRIS hydrochloride) em 160 ml de água destilada.



Figura 2 – Representação do método utilizado para obtenção dos preparados totais de membrana

Fonte: Lima, A. K. G. (2013)

#### 4.2.2.3 Acetilcolinesterase (AChE)

A evidenciação dos neurônios colinérgicos do plexo mioentérico foi realizada de acordo com a técnica descrita por Baluk e Gabella (1989), modificada no Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à Cirurgia (LAFACC), do Departamento de Anatomia do ICB-USP. Desta forma, os SOJs de 3 animais de cada grupo, após lavados com PBS (0,1M, pH 7,3), teveram sua extremidade oral ligada com fio de sutura, preenchida com quantidade suficiente de solução fixadora (paraformoldeído a 4% em PBS) e então, sua extremidade aboral ligada. Os espécimes foram imersos na mesma solução (paraformoldeído a 4% em PBS) por um período de 1 hora, a 4ºC.

Em seguida, os segmentos foram abertos por uma incisão longitudinal na borda mesentérica e submetidos à microdissecção conforme previamente descrito no item 4.2.2.2, e imersos durante um período de 12 horas, em uma solução de Krebs contendo Hialuronidase - 2000 UTR (HYALOZIMA, APSEN, BRASIL), e Tetraisopropil pirofosforamida - iso-OMPA (T1505, Sigma - Aldrich Brasil Ltda). A incubação foi realizada mantendo os espécimes por um período de 24 horas a 4°C, em um meio contendo 5 mg de acetilcolina (lodeto de Acetiltiocolina, A5751, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 6,5ml de tampão fosfato - PBS (0,1M, pH 6,0), 0,5ml de Citrato de sódio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>2H<sub>2</sub>O, 100mM, Synth), 1ml de Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O, 30mM, Synth), 1ml de água destilada e 1ml de Ferricianeto de potássio (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5 mM, Synth), acrescida de iso-OMPA.

Após o período de incubação, os espécimes foram desidratados em duas séries de álcool absoluto durante três minutos, diafanizados em duas passagens de xilol por três minutos e novamente dissecados, quando então tiveram retida a camada muscular circular. Os preparados totais de membrana foram montados como com resina entre lâmina e lamínula.

#### 4.2.3 Morfometria

### 4.2.3.1 Densidade Neuronal

O número de neurônios/mm<sup>2</sup> de cada SOJ foi determinado com o auxílio de um microscópio de luz<sup>6</sup> acoplado a uma câmera de vídeo (AxioCam HRC-ZEISS<sup>®</sup>, Alemanha), com as imagens analisadas através do sistema AxioVision 4.6.3 (ZEISS).

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Carl Zeiss Microimagin<sup>®</sup>, modelo Axioshop 40, Alemanha.

Nas imagens projetadas na tela do computador, foi sobreposto um acetato contendo 4 sistemas-teste sem viés, cada um formado por duas linhas de inclusão (linha pontilhada) e duas linhas de exclusão (linha continua), conforme ilustra a figura 3. Foram analisados 20 campos aleatórios.

Figura 3 – Imagem ilustrativa do sistema-teste utilizado para contagem dos neurônios mioentéricos. Linha vermelha: exclusão, linha verde: inclusão.

Fonte: Lima, A. K. G. (2013)

4.2.3.2 Área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos

A área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos ( $\mu$ m<sup>2</sup>) reativos a NADH e NADPH foram analisadas utilizando o mesmo sistema empregado no item anterior. Onde, para cada técnica foram medidas 100 áreas do perfil do corpo neuronal.

#### 4.2.3.3 Análise Estatística

Foi utilizado análise de variância com dois fatores – ANOVA, seguido por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5% (ZAR, 1984), ou seja, valores foram considerados como significativos quando a probabilidade e índice de significância (p) exibiram valores menores que 0,05 (p<0,05).

#### 5 RESULTADOS

## 5.1 ASPECTOS QUANTITATIVOS

#### 5.1.1 Peso dos animais e área dos intestinos

Na tabela 1 estão expressos os dados relativos a esses parâmetros sob a forma de Média ± Desvio Padrão, obtidos para os diferentes grupos.

GRUPO	PESO (Média ± D.P)	ÁREA INTESTINOS (Média ± D.P)
GC30	15,0 ± 1,0	19,8 ± 2,3
GC60	18,6 ± 0,8 <sup>Σ</sup>	23,1 ± 1,4
GCS60	$23,5 \pm 1,6^{\alpha}$	26,8 ± 1,6 <sup>Ω</sup>
GD30	17,1 ± 1,0*	22,2 ± 1,8
GD60	27,2 ± 1,5 <sup>#</sup>	$30,8 \pm 2,0^{\rm Y}$
GDS60	26,1 ± 1,4 <sup>β</sup>	29,2 ± 2,2

Tabela 1 - Peso dos animais (g) e área dos intestinos (cm<sup>2</sup>)

D.P- Desvio Padrão.  $\Sigma$  comparado ao GC30; <sup>a</sup> comparado ao GC60; <sup>\*</sup> comparado ao GC30; <sup>#</sup> comparado ao GC60; <sup>β</sup> comparado ao GC60; <sup>°</sup> comparado ao GC60 e GD30; <sup>Ω</sup> comparado ao GC60;  $\Sigma$ , <sup>a</sup>, <sup>\*</sup>, <sup>#</sup>, <sup>β</sup>, <sup>Y</sup> <sup>Ω</sup> p<0,05.

A análise desses dados permitiu verificar que os animais distróficos (grupos GD30 e GD60) apresentaram peso corpóreo significativamente maior que seus respectivos controles (grupos GC30 e GC60) (p<0,05). Ainda, em relação aos controles, comparativamente, o ganho de peso foi maior para os animais do grupo GD60 (em torno de 9 gramas) do que o verificado para o grupo GD30 (em média, 2 gramas). Apesar de apresentarem a mesma idade, os animais do grupo com 60 dias suplementados (GCS60) exibiram maior média de peso que os animais do grupo GC60 (p<0,05). Entre os animais distróficos de grupos correspondentes (GDS60 e

GD60), não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas. Ao se comparar os grupos suplementados (GDS60 e GCS60), os animais distróficos demonstraram aumento do peso em relação ao grupo controle (p<0,05).

Quanto à área dos intestinos, na fase de 30 dias e vida, os grupos controle (GC30) e distrófico (GD30) não apresentaram diferenças estatísticas. Ao se avaliar os grupos com 60 dias, a menor área foi verificada nos animais do grupo controle (GC60), e a maior, nos grupos distrófico (GD60) e distrófico suplementado (GDS60). Comparando-se os grupos controle entre si (GC60 e GCS60), a área dos intestinos dos animais suplementados foi ligeiramente maior, porém, estatisticamente menor do que a que se observou para os grupos distróficos dessa fase.

# 5.1.2 <u>Área do perfil neuronal (µm<sup>2</sup>) e densidade dos neurônios (mm<sup>2</sup>) do plexo</u> mioentérico

As tabelas 2 e 3 ilustram as médias e respectivos desvios padrões obtidos para esses parâmetros, nos neurônios evidenciados tanto pela técnica da NADH-diaforase, como pela técnica da NADPH-diaforase.

GRUPO	Densidade NADH (Média ± D.P)	Área do perfil neuronal NADH (Média ± D.P)	Densidade NADPH (Média ± D. P)	Área do perfil neuronal NADPH (Média ± D.P)
GC30	1078 ± 221,1	294,4 ± 28,9	$30,4 \pm 5,5$	232,4 ± 16,6
GD30	$555,6 \pm 46,1^{\circ}$	232,4 ± 24,0	$33,4 \pm 3,6$	223 ± 7,0

Tabela 2 - Densidade (mm<sup>2</sup>) e área do perfil neuronal (μm<sup>2</sup>) dos neurônios NADH – positivos e NADPH – positivos

D.P – Desvio Padrão. <sup>Y</sup> comparado ao GC30; <sup>Y</sup> p<0,05.

Tabela 3 - Densidade (mm²) e área do perfil neuronal (μm²) dos neurônios NADH – positivos e						
NADPH – positivos						
GRUPO	Densidade	Área do perfil	Densidade	Área do perfil		

	GRUPO	Densidade	Area do perfil	Densidade	Area do perfil
		NADH	neuronal NADH	NADPH	Neuronal
		(Média ± D.P)	(Média ± D.P)	(Média ± D. P)	NADPH
					(Média ± D.P)
-	GC60	766,2 ± 128,4	290,3 ± 32,1	35,4 ± 8,3	225,9 ± 13,7
	GD60	618,0 ± 107,8	268,0 ± 19,4	$37,0 \pm 5,6$	209,6 ± 19,3
_	GCS60	$654,4 \pm 62,0$	260,6 ± 25,4	$49,7 \pm 5,6^{\alpha}$	231,5 ± 17,5
	GDS60	685,3 ± 89,5	266, 4 ± 41,2	$38,6 \pm 4,0^{\beta}$	205,7 ± 18,5

D.P- Desvio Padrão. <sup> $\alpha$ </sup> comparado ao GC60; <sup> $\beta$ </sup> comparado ao GCS60; <sup> $\alpha$ ,  $\beta$ </sup> p<0,05.

Nos animais de 30 dias, a média da densidade de neurônios reativos à NADH diminuiu significativamente no grupo distrófico (GD30); para os neurônios nitrérgicos, ou seja, reativos à NADPH, não foram encontradas diferenças na densidade. A média da área neuronal manteve-se semelhante sob o aspecto estatístico, em ambos os grupos nas duas reações utilizadas.

Em todos os grupos de animais com 60 dias, exceto para a densidade de neurônios nitrérgicos que se apresentou maior no grupo GCS60, todos os demais parâmetros foram semelhantes entre os grupos, tanto controle (GC60 e GCS60) como distrófico (GD60 e GDS60), nas duas metodologias de coloração.

### 5.2 ASPECTOS QUALITATIVOS

# 5.2.1 <u>Estudo morfológico dos componentes do plexo mioentérico evidenciados pela</u> <u>técnica de NADH</u>

A análise dos espécimes de todos os grupos submetidos a essa metodologia permitiu verificar que, de maneira geral em todos os grupos, os componentes neuronais agrupam-se preferencialmente em gânglios alongados contendo muitos neurônios, paralelos entre si, e com longo eixo perpendicular ao do intestino. Também foram detectados, embora com menor frequência, gânglios menores e com diferentes contornos, assim como neurônios isolados (Figura 4).



Figura 4 – Imagens ilustrativas da disposição dos gânglios mioentéricos evidenciados pela técnica histoquímica NADH-d

Aspectos gerais dos neurônios mioentéricos dos animais controles (A, C, E) e distróficos (B, D, F). Barra de calibração: 100 µm. Fonte: Lima, A. K. G. (2013)

Relativamente ao fator idade, quando comparados os grupos controle dos períodos de 30 e 60 dias, os gânglios dos animais de GC30 estavam localizados mais próximos entre si, e exibiram maior densidade neuronal.

Quanto aos neurônios mioentéricos, os mesmos apresentaram-se com formatos alongados, ovalados e arredondados, e de tamanhos grandes, médios e pequenos. De maneira geral, os neurônios grandes foram os que exibiram forte intensidade de marcação em seu citoplasma. Alguns raros neurônios apresentaram citoplasma irregular e zonas translúcidas, sugestivas de vacuolização, não sendo estas, todavia, características exclusivas de animais distróficos (Figura 5).

Figura 5 – Aspecto geral dos neurônios NADH-d dos animais controles do grupo GC60 (A) e animais distróficos do grupo GD60 (B)



Em ambos os grupos podem ser observados neurônios com diferentes formatos (alongados, ovalados e arredondados), e de tamanhos grandes, médios e pequenos. Em geral, observar que os neurônios grandes exibem forte intensidade de marcação do citoplasma. Barra de calibração: 50 µm Fonte: Lima, A. K. G. (2013)

# 5.2.2 <u>Estudo morfológico dos componentes do plexo mioentérico evidenciados pela</u> <u>técnica de NADPH-d</u>

Nos grupos GC30, GC60, GCS60 e GDS60, os neurônios nitrérgicos, com citoplasma intensamente reativo, foram evidenciados em número reduzido em gânglios amplos, constituídos em sua maioria por neurônios responsáveis pela liberação de outros tipos de neurotransmissores que, nesse tipo de reação, aparecem somente sob a forma de espectros. Também foram detectados poucos neurônios fracamente reativos, indicativo de células sintetizadores de dois ou mais tipos de neurotransmissores. Quanto às malhas integanglionares, as mesmas estavam bem evidenciadas, com a longa cadeia de varicosidades distribuída ao longo de seus feixes.

Nos animais dos grupos distróficos, esse tipo de neurônio exibiu reatividade menos intensa, apresentando malhas interganglionares pouco reativas e com varicosidades não tão evidentes.

Ao se analisar os grupos suplementados, especialmente os do grupo GDS60, todas as características descritas para os grupos controle foram verificadas, sugerindo uma ação de reparação ou manutenção em animais distróficos submetidos aos efeitos do ácido ascórbico (Figura 6). Figura 6 – Componentes do plexo mioentérico dos animais controles (A) e animais

distróficos (B) e (C) evidenciados pela técnica NADPH-d



Notar (A) a presença de espectros no interior dos gânglios (\*), neurônios fortemente reativos (seta azul) e neurônios fracamente reativos (seta verde) e varicosidades (setas pretas). Barra de calibração: 100 µm Fonte: Lima, A. K. G. (2013)

# 5.2.3 <u>Estudo morfológico dos componentes do plexo mioentérico evidenciados pela</u> <u>técnica de Acetilcolinesterase</u>

Os componentes do plexo mioentérico dos diferentes grupos foram evidenciados por essa metodologia. Inicialmente, quanto ao aspecto geral, e tomando-se como referência os animais do grupo GC60, verificou que os gânglios interconectados por malhas espessas (primárias) e estas, unidas por feixes mais delgados, constituindo as malhas secundárias. Uma densa rede de malhas terciárias pode ser observada, unindo as malhas secundárias entre si. A mesmas características foram notadas para os grupos GC30, GD30, GCS60 e GDS60. Todavia, ao se avaliar essas estruturas no grupo GD60, notou-se uma diminuição na densidade, tanto das malhas secundárias, como das malhas terciárias (Figura 7).

Ainda tomando-se como padrão o grupo GC60 (e que vale, também, para os grupos GC30, GD30 e GCS60), no interior dos gânglios foram observados neurônios intensamente e fracamente reativos à AChE, com o nítido predomínio dos primeiros.

Muito embora não se tenha procedido a uma análise quantitativa dessas células, pode-se afirmar que nos animais do grupo GD60 predominaram no interior dos gânglios os neurônios fracamente reativos. Quanto a esse aspecto, a suplementação pareceu surtir algum efeito, pois nos animais do grupo GDS60, quantidade de neurônios intensamente reativos no interior dos gânglios foi predominante (Figura 8).



Figura 7 – Componentes do plexo mioentérico dos animais controles (A) e distróficos (B, C, D) evidenciados pela técnica da AChE

Notar a presença de malhas primária (seta 1), secundária (seta 2) e terciária (seta 3) (A). Notar em C a escassez de malhas secundárias e terciárias. Barra de calibração: 20 µm. Fonte: Lima, A. K. G. (2013)

Figura 8 – Gânglios do plexo mioentérico dos animais controles (A) e animais distróficos (B, C e D) reativos à AChE



Notar a presença de neurônios fortemente reativos (setas azul) e fracamente reativos (setas vermelhas). Barra de calibração: 100  $\mu$ m Fonte: Lima, A. K. G. (2013)

# 6 DISCUSSÃO

A infiltração de gordura nos diferentes tecidos do organismo tem sido adotada como um marcador da progressão das desordens neuromusculares (KIM et al., 2013). Desta forma, muito embora não se tenha avaliado neste trabalho a infiltração de gordura nos músculos, os dados referentes ao elevado peso corporal dos animais distróficos (GD30, GD60 e GDS60) podem se relacionar com a deposição de gordura verificada em pacientes portadores da DMD, ou ainda, à substituição dos tecidos musculares (esquelético e liso) por tecido adiposo e conjuntivo (BEVANS, 1945; HUVOS; PRUZANSKI,1967; NOWAK; IONASESCU; ANURAS, 1982; KIM et al., 2013). Autores como Hankard et al. (1996) formulam uma outra hipótese para o aumento de peso de animais *mdx*, associando essa situação com a redução do gasto de energia devido, principalmente, à perda da massa muscular, uma vez que o músculo esquelético é a principal fonte de consumo de energia (HANKARD et al., 1996).

A suplementação com ácido ascórbico também determinou uma elevação do peso dos animais do grupo GSC60 (controle do grupo GDS60). Na literatura à qual se teve acesso, não foram detectados trabalhos que expressem dados similares referentes a camundongos; entretanto, estudos com diferentes espécies de peixe demonstraram que a suplementação com ácido ascórbico promove aumento de peso (TOYAMA; CORRENTE; CYRINO, 2000; CHAGAS; VAL, 2003), além de melhorar o desenvolvimento dos animais devido, principalmente, à síntese de proteínas (KOENING, 1984). Assim, se for considerado que, tanto os animais distróficos suplementados (GDS60) como seus respectivos controles (GCS60) tiveram o peso elevado, é possível considerar que esse aumento nos animais distróficos não tenha

ocorrido em decorrência da patologia, mas em decorrência de uma manutenção da massa muscular desses animais, promovida pela suplementação do ácido ascórbico. Estudos avaliando os músculos estriados esqueléticos desses animais, tanto o infiltrado de tecido adiposo, como a área das fibras musculares, podem contribuir para a elucidação dessa teoria.

A área dos intestinos não diferiu entre os animais de 30 dias (GC30; GD30) e também entre os animais de 60 dias suplementados (GCS60; GDS60); todavia, foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos de 60 dias (GC60; GD60). Ao se correlacionar a idade dos camundongos com a idade de humanos, Andreollo et al. (2012) estabeleceram que um animal com 30 dias corresponde a um indivíduo com 3 anos, e que o camundongo com 60 dias tem correspondência com um indivíduo de 6 anos. Se for considerado que as manifestações da DMD começam a ser percebidas entre 3 e 5 anos (SUSSMAN, 2002), pode-se admitir que nos animais de 30 dias os sintomas ainda não apareceram, mas que podem perfeitamente estar instalados nos animais com 60 dias. As afirmativas de Beber (2011) de que a falta da proteína distrofina provoca alterações no citoesqueleto de fibras musculares lisas, e por consequência, determina o alongamento das mesmas, resultando em aumento do tamanho da área intestinal total de animais mdx, corroboram com esses achados. Isso pode justificar a maior área intestinal nos animais GD60 comparativamente aos animais controle (GC60), e levar a admitir que a suplementação com ácido ascórbico atuou de forma efetiva quanto a esse parâmetro, uma vez que, como já mencionado, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos submetidos a esse processo (GCS60 e GDS60).

Relativamente à densidade dos neurônios NADH-d positivos, a única diferença estatística foi observada entre os grupos de 30 dias, onde os animais distróficos

49

exibiram menor densidade. Uma diminuição na densidade de neurônios NADH-d positivos também foi verificada por Beber (2011) em animais distróficos com 4 semanas de vida, e que não foi por ele relacionada à DMD, uma vez que houve aumento da área total do intestino, justificando sido diluição dessas células ao longo da víscera. Todavia, como no presente estudo a área total do intestino dos animais distróficos (GD30) não diferiu daquela dos controles, não se pode admitir que tenha ocorrido uma perda neuronal significativa nos animais distróficos, uma vez que no presente estudo, não se determinou o número total de neurônios mioentéricos.

A redução da densidade dos neurônios NADH-d positivos com a idade observada entre os grupos controle de 30 e 60 dias de idade (GC30 e GC60) é justificada pelo trabalho de Gabella (1971), onde ratos adultos apresentaram diminuição na densidade neuronal quando comparados a animais recém-nascidos, o que provavelmente ocorreu devido à expansão da rede neuronal com o aumento da idade (WARD; TORIHASHI, 1995). Porém, o fato de não ter ocorrido diferenças entre os animais distróficos dos grupos GD30 e GD60, não necessariamente esteja relacionado à perda neuronal, mas à provável diluição dessas células ao longo da víscera como descrito por Beber (2011), uma vez que a área do intestino dos animais distróficos de 60 dias foi a maior verificada entre os diferentes grupos aqui avaliados. Para esse fator, a suplementação não demonstrou efeito.

Sabe-se que o NO tem papel essencial no peristaltismo, e que a sua deficiência, seja na produção ou liberação, pode determinar uma redução da atividade motora intestinal (MULÈ; SERIO, 2002; VANNUCCHI et al, 2004). Ainda, uma produção em excesso pode causar danos nos neurônios entéricos (RIVERA et al., 2011), principalmente naqueles que não estão envolvidos com a sua produção (FREGONESI; MOLINARI; MIRANDA NETO, 2004).

50

A caracterização normal à reação da NADPH-d (presença de neurônios nitrérgicos com citoplasma intensamente reativo, malhas e varicosidades bem evidenciadas) detectada nos grupos controle (GC30, GC60, GCS60), não se confirmou nos animais distróficos (GD30 e GD60), onde ficou patente que os neurônios nitrérgicos exibiram reatividade menos intensa, malhas interganglionares pouco reativas e varicosidades não tão evidentes. Esses resultados estão de acordo com Serio, Bonvissuto e Mulè (2001), que detectaram em animais distróficos, uma diminuição do óxido nítrico, manifestando-se como distúrbios motores do trato gastrintestinal, e com o estudo eletrofisiológico realizado em camundongos mdx, por Baccari, Romagnani e Calamai (2000), que demonstraram respostas anormais no relaxamento do fundo do estômago associadas à neurotransmissão nitrérgica ineficiente (BACCARI; ROMAGNANI; CALAMAI, 2000).

Entretanto, quando se analisou o grupo distrófico suplementado (GDS60), verificou-se as mesmas características dos animais normais, sugerindo que a suplementação com ácido ascórbico é capaz de mantê-las frente à distrofia. Essa afirmação encontra apoio nas pesquisas de Frei (2003) e Kuzkaya et al. (2005) que, ao avaliarem os efeitos do ácido ascórbico no organismo relataram, além da sua ação antioxidante, uma capacidade em manter os níveis - ou mesmo aumentar - a síntese de óxido nítrico (NO).

A reatividade padrão à AChE dos componentes do plexo mioentérico detectada na quase totalidade dos grupos estudados, caracterizada pela distinção das malhas em seus diferentes níveis (primária, secundária, terciária), e pelo predomínio de neurônios intensamente reativos no interior dos gânglios, não se confirmou nos animais distróficos com 60 dias (GD60), onde destacaram-se, principalmente, gânglios com poucos neurônios fortemente positivos. Esse aspecto foi descrito por Greggio et al. (2010) no plexo mioentérico do esôfago de ratos jovens submetidos à desnutrição protéica pré e pós-natal, e no colo de camundongos chagásicos (MAIFRINO et al., 1999). Desta forma, sabendo-se que os neurônios colinérgicos são excitatórios, e estão relacionados com a motilidade gastrointestinal, os achados do presente estudo no grupo distrófico de 60 dias (GD60) podem ser correlacionados à diminuição da motilidade intestinal descrita em pacientes portadores da DMD, por NOWAK et al. (1982), e Gottrand, Gillonneau e Carpentier (1991). Todavia, muito embora não se tenha avaliado na presente pesquisa o grau de comprometimento da motilidade intestinal dos animais distróficos, esse tipo de alteração não necessariamente está relacionado ao retardo no desenvolvimento dos neurônios mioentéricos descrito em animais jovens desnutridos, mas a processos de degeneração neuronal, como observado em animais chagásicos.

O fato de os animais distróficos com 30 dias (GD30) não apresentarem diferenças na análise dos componentes reativos à AChE quando comparados aos animais dos grupos controle (GC30 e GC60), pode ter ocorrido, como já mencionado, devido à faixa etária, uma vez que nessa fase, os sintomas relativos à DMD ainda não se manifestaram. Por último, se for admitida a hipótese de degeneração dos neurônios colinérgicos nos portadores da DMD na fase de 60 dias, é lícito admitir, pelos dados obtidos nos animais do grupo GDS60, que a suplementação com o ácido ascórbico, se não contribuiu para regenerar essas estruturas, em algum tempo atuou na estabilização do processo de degeneração, mantendo os componentes colinérgicos em estado compatível com o verificado para os animais normais.

# 7 CONCLUSÃO

A partir da metodologia empregada e dos resultados obtidos, julgamos poder concluir que:

- os animais distróficos dos grupos GD30, GD60 e GDS60 apresentaram aumento significativo do peso quando comparados aos seus respectivos controles;

- os animais do grupo GCS60 apresentou maior peso quando comparado aos animais do grupo não suplementado GC60;

 não houve diferenças qualitativas dos componentes NADH-d positivos entre os grupos estudados;

- os animais distróficos do grupo GD30 e GD60 submetidos à técnica NADPH-d apresentaram alterações nos componentes do plexo mioentérico na análise qualitativa. Os demais grupos (GC30, GC60, GCS60, GDS60) apresentaram reatividade padrão para esta metodologia.

 - apenas os animais distróficos do grupo GD60 apresentaram alterações no plexo mioentérico, quando submetidos à técnica AChE, permanecendo GC30, GC60, GCS60, GD30 e GDS60 com as características típicas;

- não houve diferenças no tamanho da área do perfil do corpo celular de neurônios reativos NADH-diaforase e NADPH-diaforase dos grupos estudado;

- a densidade dos neurônios totais (NADH-d positivos) dos animais do grupo GD30 foi menor, quando comparada a dos animais do grupo controle GC30;

foram detectadas diferenças para mesma técnica entre os grupos controle
 GC30 e GC60;

-os animais controles suplementados com ácido ascórbico do grupo GCS60 apresentaram densidade de neurônios nitrérgicos maior que os demais grupos estudados.

# REFERÊNCIAS

AHN, A. H.; KUNKEL, L. M. The structural and functional diversity of dystrophin. **Nature Genetics**, v. 3, n. 4, p. 283- 291. 1993.

AMANO, A.; TSUNODA, M.; AIGAKI, T.; MARUYAMA, N.; ISHIGAMI, A. Effect of ascorbic acid deficiency on catecholamine synthesis in adrenal glands of SMP30/GNL knockout mice. **European Journal of Nutrition,** v. 52. 2013.

AMBROSIO, C. E.; VALADARES, M. C.; ZUCCONI, E.; CABRAL, R.; PEARSON, P. L.; GAIAD, T. P.; CANOVAS, M.; VAINZOF, M.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Ringo, a golden retriever muscular dystrophy (grmd) dog with absent dystrophin but normal strength. **Neuromuscular Disorders: NMD,** v.18, n.11, p.892- 893. 2008.

ANDERSON, M. S.; KUNKEL, L. M. The molecular and biochemical basis of Duchenne muscular dystrophy. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 8, p. 289–292. 1992.

ANDREOLLO, N. A.; SANTOS, E. F.; ARAÚJO, M. R.; LOPES, L. R. IDADE DOS RATOS VERSUS IDADE HUMANA: QUAL É A RELAÇÃO? **ABCD Arquivos Brasileiros Cirurgia Digestiva,** v. 25, n.1, p. 49-51, 2012. BACCARI, M. C.; ROMAGNANI, P.; CALAMAI, F. Impaired nitrergic relations in the gastric fundus of dystrophic (mdx) mice. **Neuroscience Letters**, v. 282, p.105-108. 2000.

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.

BEBER, E. H. Caracterização morfoquantitativa do plexo mioentérico do intestino delgado de camundongos mdx: um modelo da distrofia muscular de Duchenne. 2011. 97f Tese (Doutorado em Ciências) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2011.

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, p. 512-514. 1996.

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

BLAKE, D. J.; KRÖGER, S. The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? **Trends in neurosciences**, v. 23, p. 92–99. 2000.

BOLAÑOS, J. P; ALMEIDA, A.; STEWART, V.; PEUCHEN, S.; LAND, J. M.; CLARK, J. B.; HEALES, S. J. R. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain:

mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. **Journal of Neurochemistry** .v. 68, n. 6, p. 2227–2240. 1997.

BUETLER, T.M.; RENARD, M.; OFFORD, E. A.; SCHNEIDER, H.; RUEGG, U. T. Green tea extract decreases muscle necrosis in *mdx* mice and protects against reactive oxygen species. **American Journal Clinic Nutrition**, v. 75, p. 749–53. 2002.

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

BURNS, A. J. Migration of neural crest-derived enteric nervous system precursor cells to and within the gastrointestinal tract. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 49, n. 2-3, p.143-150. 2005.

BYERS, T. J.; KUNKEL, L. M.; WATKINS, S. C. The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. **The Journal of Cell Biology**, v. 115, p. 411-421. 1991.

BYERS, T. J.; LIDOV, H. G. W.; KUNKEL, L. M. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. **Nature Genetics**. v.4, p. 77-78. 1993.

CAMPBELL, K. P. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. **Cell**, v. 80, p. 675-679, 1995.

CARPENTER, J. L.; HOFFMAN, E. P.; ROMANUL, F. C.; KUNKEL, L. M.; ROSALES, R. K.; MA, N. S.; DASBACH, J. J., RAE, J. F.; MOORE, F. M.; MCAFEE, M. B.; PEARCE, L. K. Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. **The American Journal of Pathology,** v.135, n. 5, p. 909–919. 1989.

CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** v. 38, n. 3, p. 397-402, 2003.

CHAMBERLAIN, J. S. Duchenne muscular dystrophy models show their age. **Cell**, v. 143, n. 7, p.1040–1042. 2010.

CHAMBERLAIN, J. S.; METZGER, J.; REYES, M.; TOWNSEND, D.; FAULKNER, J. A. Dystrophindeficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to COMIM, C. M.; CASSOL-JR, O. J.; CONSTANTINO, L. C.; CONSTANTINO, L. S.; PETRONILHO, F.; TUON, L.; VAINZOF, M.; DAL-PIZZOL, F. ; QUEVEDO, J. Differential expression of utrophin-A and -B promoters in the central nervous system (CNS) of normal and dystrophic mdx mice. **Neurochemistry International.** v. 55, n. 8, p. 802-805. 2009.

DE STEFANO, M. E.; ZACCARIA, M. L.; CAVALDESI, M.; PETRUCCI, T. C.; MEDORI, R.; PAGGI, P. Dystrophin and its isoforms in a sympathetic ganglion of normal and dystrophic mdx mice: immunolocalization by electron microscopy and biochemical characterization. **Neuroscience**, v. 80, n. 2, p. 613-624. 1997.

DORKO, F.; KOCISOVÁ, M.; SIROTAKOVÁ, M.; SCHIMIDTOVÁ, K.; LOVÁSOVÁ, K.; DORKO, E. The localization of NADPH- diaphorase positive cells and autonomic innervation of the rat thymus. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 759-762, 2000.

EMERY, A. E. H. The muscular dystrophies. **Lancet**, v. 359, n. 9307, p. 687–695. 2002.

EMERY, A. E. H.; EMERY, M. L. H. **The history of a genetic disease:** duchenne muscular dystrophy or meryon's. 2<sup>a</sup> ed. New York; EUA: Oxford University Press, 2011, p. 1-9. 2011.

EMERY, M. L.; EMERY, A. E. Edward Meryon (1807-1880): his life and Huguenot background. **Journal Medical Biography,** v. 6, n. 1, p. 1-10. 1998.

ERVASTI, J. M.; CAMPBELL, K. P. Membrane organization of the dystrophinglycoprotein complex. **Cell**, v. 66, n. 6, p. 1121–1131. 1991.

FREGONESI, C. E. P. T.; MOLINARI, S. L.; MIRANDA NET, M. H. Avaliação da população de neurônios mioentéricos NADPH-diaforase positivos do corpo do estômago de ratos com diabetes crônico induzido pela estreptozootocina. **Acta Scientiarum. Biological Sciences,** Maringá, v. 26, n. 1, p.107-112, 2004.

FREI, B. To C or Not to C, that is the question! **Journal of the American College of Cardiology**, v. 42, n. 2, 2003.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology Hepatology**, v. 9, n. 5, p. 286-294. 2012.

FURNESS, J. B. **The enteric nervous system.** Massachusetts: Blackwell Publishing, 2006. 274 p.

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.

GABELLA, G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. **Experientia**, v. 25, p. 218-219. 1969.

GABELLA, G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. **Journal Anatomy**. v. 109, n. 1, p. 81-95, 1971.

GARDNER, E.; GRAY, D. J.; O'RAHILLY. **Anatomia.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 1988.

GASCHEN, F. P.; HOFFMAN, E. P.; GOROSPE, J. R.; UHL, E. W.; SENIOR, D. F.; CARDINET, G. H.; PEARCE, L. K. Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 110 n. 1-2, p. 149-159. 1992.

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.

GÜLÇIN, I.; TOPAL, F.; ÇAKMAKÇI, R.; BILSEL, M.; GÖREN, A. C.; ERDOGAN, U. J. Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis, and antioxidant properties of domesticated and 3 wild ecotype forms of raspberries (Rubus idaeus L.). **Journal of Food Science**. v. 76, n. 4, p. C585-593. 2011.

HANKARD, R.; GOTTRAND, F.; TURCK, D.; CARPENTIER, A.; ROMON, M.; FARRIAUX, J. P: Resting energy expenditure and energy substrate utilization in children with Duchenne muscular dystrophy. **Pediatric Research**, v. 40, p. 29-33, 1996.

HEYDEMANN, A.; MCNALLY, E. NO more muscle fatigue. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 3, p. 448–450. 2009.

HNIA, K.; HUGON, G.; RIVIER, F.; MASMOUDI, A.; MERCIER, J.; MORNET, D. Modulation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade and metalloproteinase activity in diaphragm muscle in response to free radical scavenger administration in dystrophindeficient mdx mice. **American Journal of Pathology**, v. 170, p. 633-643, 2007.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased stereology:** three-dimensional measurement in microscopy. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1998. 246 p.

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

HWANG, Y. S.; LEE, J. D.; KIM, H. C.; CHO, Y. J.; YOO, S. H. Effect of ascorbic acid on aiway hyperresponsiveness in bronchial asthma. **The World Allergy Organization Journal.** v. 5, suplemento 2, p. S114. 2012.

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.

JANCSIK, V.; HAJOS, F. Differential distribution of dystrophin in postsynaptic densities of spine synapses. **NeuroReport**, v. 9, p. 2249–2251. 1998.

JØRGENSEN, L. H.; BLAIN, A.; GREALLY, E.; LAVAL, S. H.; BLAMIRE, A. M.; DAVISON, B. J.; BRINKMEIER, H.; MACGOWAN,G. A.; SCHRODER, H. D.; BUSHBY, K.; STRAUB, V.; LOCHMULLER, H. Long-term blocking of calcium channels in mdx mice results in differential effects on heart and skeletal muscle. **The American journal of pathology**, v. 178, n. 1, p. 273–283. 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KARP, G. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos.** MANOLE, 2005.

KIM, H. K.; MERROW, A. C.; SHIRAJ, S.; WONG, B. L; HORN, P. S.; LAOR, T. Analysis of fatty infiltration and inflammation of the pelvic and thigh muscles in boys with Duchenne muscular dystrophy (DMD): grading of disease involvement on MR imaging and correlation with clinical assessments. **Pediatric Radiology**, v. 43, n. 10, p.1327-1335. 2013.

KIM, M. H.; KAY, D. I.; RUDRA, R. T.; CHEN, B. M.; HSU, N.; IZUMIYA, Y.; MARTINEZ, L.; SPENCER, M. J.; WALSH, K.; GRINNELL, A. D.; CROSBIE, R. H. Myogenic Akt signaling attenuates muscular degeneration, promotes myofiber regeneration and improves muscle function in dystrophin-deficient mdx mice. **Human Molecular Genetics**. v. 20, n. 7, p.1324–1338. 2011.

KOENIG, M.; MONACO, A. P.; KUNKEL, L. M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. **Cell**, vol. 53, p. 219–228. 1988.

KOENING, J. Importance of vitamin C in ichthyophysiology and practice of pisciculture. **Ichtyophysiologica Acta**, Lion, v. 8, p. 41-57, 1984.

KORNEGAY, J.N.; BOGAN, J. R.; BOGAN, D. J.; CHILDERS, M. K.; GRANGE, R. W. Golden retriever muscular dystrophy (GRMD): Developing and maintaining a colony and physiological functional measurements. **Methods in Molecular Biology**, v. 709, p.105-123, 2011.

KUZKAYA, N.; WEISSMANN, N.; HARRISON, D. G.; DIKALOV, S. Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: Implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, p. 343–354. 2005.

LEE, B. L.; NAM, S. H.; LEE, J. H. ; KI, C. S.; LEE, M.; LEE, J. Genetic analysis of dystrophin gene for affected male and female carriers with Duchenne/Becker muscular dystrophy in Korea. **Journal Korean Medical Science**, v. 27, n. 3, p. 274-280. 2012.

LEON, S. H.; SCHUFFER, M. D.; KETTLER, M.; ROHRMANN, C. A. Chronic intestinal pseudo-obstruction as a complication of Duchenne's muscular dystrophy. **Gastroenterology**, v. 90, p. 455-499, 1986.

MAIFRINO, L. B. M.; LIBERTI, E. A.; WATANABE, I. S.; SOUZA, R. R. Morphometry and acetylcholinesterase activity of the myenteric neurons of the mouse colon in the chronic phase of experimental trypanosoma cruzi infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 5, p. 721-725, 1999.

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

METZGER, M. Neurogenesis in the enteric nervous system. Archives Italiennes de Biologie, v. 148, p. 73-83, 2010.

MOSER, H. Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. **Human Genetics**, v. 66, n.1, p. 17–40, 1984.

MULÈ F., SERIO R. Spontaneous mechanical activity and evoked responses in isolated gastric preparations from normal and dystrophic (*mdx*) mice. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 14, p. 667–675, 2002.

MULÈ, F.; AMATO, A.; SERIO, R. Gastric emptying, small intestinal transit and fecal output in dystrophic (mdx) mice. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 60, n. 1, p. 75–79, 2010.

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**, 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.

NOWAK, T. V.; IONASESCU, V.; ANURAS, S. Gastrointestinal manifestations of the muscular dystrophies. **Gastroenterology**, v. 82, n. 4, p. 800-10. 1982.

PATTERSON, M.; ONG, H.; DRAKE, A. Intestinal absorption in muscular dystrophy patients. **Archives of Internal Medicine**, v. 114, n. 1, p. 67-70, 1964.

PATTERSON, M.; RIOS, G.; Disturbed gastrointestinal motility- an unusual manifestation of a systemic muscular disorder: plomyositis or progessive muscular dystrophy. **Gastroenterology,** v. 36, p. 261. 1959.

PERKINS, R. C.; BETH, A. H.; WILKERSON, L. S.; SERAFIN, W.; DALTONT, L. R.; PARK, C. R.; AND PARK, J. H. Enhancement of free radical reduction by elevated concentrations of ascorbic acid in avian dystrophic muscle (redox status/electron paramagnetic resonance/muscular dystrophy/peroxides). **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. v. 77, n. 2, p. 790-794, 1980.

PHILLIPS, R. J.; POWLEY, T. L. Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. **Autonomic Neuroscience**, v. 136, n.1-2, p. 1–19. 2007.

PINES, M.; HALEVY, O. Halofuginone and muscular dystrophy. **Histology Histopathology**, v. 26, n. 1, p.135-46. 2011.

PUTTEN, M. V.; HULSKER, M.; NADARAJAH, V. D.; HEININGEN, S. H. V.; HUIZEN, E. V.; ITERSON, M. V.; ADMIRAAL, P.; MESSEMAKER, T.; DUNNEN, J. T. D.; HOEN, P. A. C.; AARTSMA-RUS, A.The effects of low levels of dystrophin on mouse muscle function and pathology. **PloS one**, v. 7, n. 2, 2012.

QUIRION, R. ; DAM, T. Ontogeny of substance P receptor binding sites in rat brain **The Journal of Neuroscience.** v. 6, n. 8, p. 2187-2199. 1986.

RIVERA, L. R.; PONTELL, L.; CHO, H. J.; CASTELUCCI, P.; THACKER, M.; POOLE, D. P.; FRUGIER, T.; FURNESS, J. B. Knock out of neuronal nitric oxide synthase

exacerbates intestinal ischemia/reperfusion injury in mice. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 2, p. 565-576 2012.

RIVERA, L. R.; POOLE, D. P.; THACKER, M. FURNESS, J. B. The involvement of nitric oxide synthase neurons in enteric neuropathies. **Neurogastroenterology Motility**, v. 23, n. 11, p. 980-988. 2011.

ROBIN, G. C.; FALEWSKI, G. L. Acute gastric dilation in progressive muscular dystrophy. **The Lancet**, v. 186, n. 3, p. 227. 1963.

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

SANDER, M.; CHAVOSHAN, B.; HARRIS, S. A.; LANNACCONE, S. T.; STULL, J. T.; THOMAS, G. D.; VICTOR, R. G. Funcional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with duchenne muscular dystrophy. **Proceedings of the National Academy of Science, USA,** v. 97, n. 25. p. 13818-13823, 2000.

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

SEIXAS, S. L.; LAGROTA-CANDIDO, J.; SAVINO, W.; QUIRICO-SANTOS, T. "The importance of mdx mouse in the physiopathology of Duchenne's muscular dystrophy". **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 55, n. 3B, p. 610-617. 1997.

SERIO, R.; BONVISSUTO, F.; MULÈ, F. Altered eletrical activity in colonic smooth muscle cells from dystrophic (mdx) mice. **Neurogastroenterology Motility**, v. 13, p. 169–175, 2001.

SHERRATT, T. G.; VULLIAMY, T.; STRONG, P. N. Evolutionary conservation of the dystrophin central rod domain. **The Biochemical Journal**, v. 287, n. 3, p.755–759. 1992.

SHIN, J.-H.; HAKIM, C. H.; ZHANG, K.; DUAN, D. Genotyping mdx, mdx3cv, and mdx4cv mice by primer competition polymerase chain reaction. **Muscle & nerve**, v. 43, n. 2, p. 283–6. 2011.

SILVA, J. D. M.; COSTA, K. S.; CRUZ, M. C. Distrofia muscular de Duchenne: um enfoque cinesioterapêutico. Lato & Sensu, v. 4, n. 1, p. 3-5, 2003.

SPENCE, A. P. Anatomia humana básica. São Paulo: Manole, 1991.

spontaneous rhabdomyosarcoma. FASEB Journal. v. 21, n. 9, p. 2195- 2204, 2007.

STERNINI, C. Structural and chemical organization of the myenteric plexus. **Annual Review of Physiology**, v. 50, p. 81-93, 1988.

SUSSMAN, M. Duchenne muscular dystrophy. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, v. 10, n. 2. p. 138-151. 2002.

TONON, E.; FERRETTI, R.; SHIRATORI, J. H.; NETO, H. S.; MARQUES, M. J.; MINATEL, E. Ascorbic acid protects the diaphragm muscle against myonecrosis in *mdx* mice. **Nutrition**, v. 28, p. 686–690, 2012.

TOYAMA, G. N.; CORRENTE, J. E.; CYRINO, J. E. P. Suplementação de vitamina c em rações para reversão sexual da tilápia do Nilo. **Scientia Agricola**, v.57, n.2, p. 221-228, 2000.

VANNUCCHI, M. G.; CORSANI, L.; AZZENA, G. B.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S.; MANCINELLI, R. Functional activity and expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in muscle of the isolated distal colon of mdx mice. Muscle & Nerve, v. 29, n. 6, p. 795–803, 2004.

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

WALTON, J. N.; NATTRASS, F. J. On the classification, natural history and treatment of the myopathies. **Brain**, v. 77, p. 169-231. 1954.

WARD, S.; TORIHASHI, S. Morphological charges during ontogeny of the canine proximal colon. **Cell and Tissue Reseach**, v. 282, n.1, p. 93-108, 1995.

WEBER, P.; BENDICH, A.; SCHALCH, W. Vitamin C and human health: a review of recent data relevant to human requirements. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research, Bern**, v. 66, n. 1, p. 19-30, 1996.

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 and Physiology**, v. 33, p. 657-662, 2006.

WILLIAMS, I. A.; ALLEN, D. G. The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-deficient mdx mice. **Heart and Ciculatory Physiology- American Journal of Physiology**, v. 293, p. H1969-H1977, 2007.

WILLMANN, R.; POSSEKEL, S.; DUBACH-POWELL, J.; MEIER, T.; RUEGG, M. A. Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular disordes:NMD.** v. 19, n. 4, p. 241-249, 2009.

WORTON, R. G.; RAY, P. N.; BODRUG, S.; BURGHES, A. H. M.; HU, X.; THOMPSON, M. W.; BOBROW, M.; EMERY, A. E. H.; RYDER-COOK, A. The problem of duchenne muscular dystrophy [and discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Serie B, Biological Sciences**, v. 319, n. 1194, p. 275–284. 1988.

YILMAZ, A.; SECHTEM, U. Republished education in heart: cardiac involvement in muscular dystrophy: advances in diagnosis and therapy. **Postgratuate Medical Journal.** v. 88, n. 1039, p. 290-299. 2012.

YOUNG, H. M.; FURNESS, J. B.; SHUTTLEWORTH, C. W. R.; BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Co-localization of nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH diaphorase staining in neurons of the guinea-pig intestine. **Histochemistry**, v. 97, p. 375–378. 1992.