



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL
Av. Senador Salgado Filho - Cidade Universitária
59072-970 - Natal - RN – BRASIL
Fone: +55-84-3215-3431 Fax: +55-84-3211-9207
E-mail: pgbioef@cb.ufrn.br



MARCELO JOSÉ SANTIAGO LISBOA

Suplementação de antioxidante ácido ascórbico na dieta de camundongos MDX
(Um modelo de Distrofia Muscular de Duchenne): Repercussões morfológicas
no músculo liso (estrutura primária) e no plexo mioentérico (estrutura
secundária) do íleo

Natal-RN

2015

MARCELO JOSÉ SANTIAGO LISBOA

Suplementação de antioxidante ácido ascórbico na dieta de camundongos MDX
(Um modelo de Distrofia Muscular de Duchenne): Repercussões morfológicas
no músculo liso (estrutura primária) e no plexo mioentérico (estrutura
secundária) do íleo

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Biologia
Estrutural e Funcional da Universidade Federal
do Rio Grande do Norte para a obtenção do
título de Mestre em Morfologia.

Área de Concentração:
Ciências Morfológicas

Orientadora:
Profa. Dra. Naianne Kelly Clebis

Natal-RN

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de Biociências

Lisboa, Marcelo José Santiago.

Suplementação de antioxidante ácido ascórbico na dieta de camundongos MDX (um modelo de Distrofia Muscular de Duchenne): repercussões morfológicas no músculo liso (estrutura primária) e no plexo mioentérico (estrutura secundária) do íleo / Marcelo José Santiago Lisboa. – Natal, RN, 2015.

80 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Naianne Kelly Clebis.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional.

1. Ácido ascórbico. – Dissertação. 2. Antioxidante. – Dissertação. 3. Distrofia muscular de Duchenne. – Dissertação. I. Clebis, Naianne Kelly. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 547.475.2

Nome: LISBOA, Marcelo José Santiago

Título: Suplementação de antioxidante ácido ascórbico na dieta de camundongos MDX (Um modelo de Distrofia Muscular de Duchenne): Repercussões morfológicas no músculo liso (estrutura primária) e no plexo mioentérico (estrutura secundária) do íleo

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Norte para a obtenção do título de Mestre em Morfologia pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional.

Aprovado em: 26/092015,

Banca Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. NAIANNE KELLY CLEBIS

Instituição: UFRN

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof^ª. Dr^ª. SANDRA REGINA STABILLE

Instituição: UEM

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof^ª. Dr^ª. JACQUELINE NELISIS ZANONI

Instituição: UEM

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A força maior em nossas vidas (Deus) por me conceder a oportunidade de cumprir mais esta etapa na vida.

A minha família pelo amor, paciência e incentivo, sempre presentes em minha vida.

A professora Dr^a. Naianne Kelly Clebis, por ter aceitado me orientar e ter acreditado em meu potencial, pelo incentivo dado para eu enfrentar os desafios, enfim, pelos anos de convivência que em muito contribuíram para meu crescimento científico e intelectual.

Aos meus queridos e estimados amigos pela cumplicidade sempre existente e compreensão da minha ausência física em alguns momentos.

Aos que compõem o Departamento de Morfologia, o Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional da UFRN e o Departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo pela colaboração e apoio na realização deste trabalho.

Aos colegas de curso, pela amizade nestes anos de convivência e por tudo o que juntos conquistamos.

"Eu pedi forças e Deus me deu dificuldades
para me fazer forte.
Eu pedi sabedoria e Deus me
deu problemas para resolver.
Eu pedi amor e Deus me deu pessoas
com problemas para ajudar.
Eu pedi favores e Deus me deu oportunidades.
Eu não recebi nada que pedi,
mas tive tudo o que precisava..."

Autor Desconhecido

RESUMO

LISBOA, M.J.S. **Suplementação de antioxidante ácido ascórbico na dieta de camundongos MDX (Um modelo de Distrofia Muscular de Duchenne): Repercussões morfológicas no músculo liso (estrutura primária) e no plexo mioentérico (estrutura secundária) do íleo.** 2015. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença de caráter hereditário onde ocorre a ausência da proteína distrofina, levando a quadros de lesão e miopatia grave decorrentes do aumento do estresse oxidativo e influxo de Ca^+ . Lesões na musculatura lisa intestinal podem comprometer a motilidade local devido a alterações da estrutura da própria túnica muscular, bem como, a mudanças morfofuncionais das estruturas do plexo mioentérico. Este trabalho teve por objetivo avaliar as mudanças ocorridas na túnica muscular e nos neurônios mioentéricos acetilcolinesterase reativos do íleo de camundongos mdx e, os efeitos da suplementação com ácido ascórbico (AA) nestes dois componentes. Foram utilizados 30 camundongos machos C57BL/10 e 30 C57BL/10Mdx separados em grupos de acordo com a idade e tratamento (n=10): controle com 30 dias de idade (**C30**); distrófico com 30 dias de idade (**D30**); controle com 60 dias de idade (**C60**); distrófico com 60 dias de idade (**D60**); controle com 60 dias de idade suplementados com ácido ascórbico (200 mg/kg de peso corporal) (**CS60**) e, distrófico com 60 dias de idade suplementados com ácido ascórbico (200 mg/kg de peso corporal) (**DS60**). Após o período experimental, os animais foram eutanasiados e os íleos foram coletados e processados seguindo a rotina histológica e corados pela técnica de Tricrômico de Masson e, para técnica histoquímica da Acetilcolinesterase em preparados totais de membrana. Os dados demonstraram que a espessura da túnica muscular (μm) e a área de músculo liso (μm^2) do íleo foi menor nos grupos distróficos, especialmente no grupo D30. Nos animais de DS60 a espessura da túnica muscular foi semelhante aos de C60. Houve redução da densidade neuronal acetilcolinesterase reativos do plexo mioentérico do íleo nos animais D30, porém esta foi semelhante nos animais de 60 dias sem tratamento (C60 e D60) e, maior nos animais DS60. Área do perfil do corpo celular (μm^2) foi semelhante nos animais de C30-D30 e C60-D60, porém esta foi maior em DS60. A razão área nuclear/área citoplasmática foi menor em D30 e DS60 e, maior em D60. Desta forma podemos concluir que em camundongos mdx ocorrem alterações significativas na morfologia da túnica muscular e, conseqüentemente, mudanças morfológicas e funcionais dos neurônios colinérgicos do plexo mioentérico do íleo, bem como, que a suplementação com AA teve efeito neuroprotetor nestes animais pois preveniu a perda neuronal.

Palavras-chave: Distrofia Muscular de Duchenne; Antioxidante; Ácido Ascórbico; Tecido Muscular; Plexo Mioentérico; Aspectos Morfofuncionais; Íleo.

ABSTRACT

LISBOA, M.J.S. **Suplementação de antioxidante ácido ascórbico na dieta de camundongos MDX (Um modelo de Distrofia Muscular de Duchenne): Repercussões morfológicas no músculo liso (estrutura primária) e no plexo mioentérico (estrutura secundária) do íleo.** 2015. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

The Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a hereditary disease where there is a lack of dystrophin protein, leading to severe injury myopathy frames resulting from increased oxidative stress and Ca⁺ influx. Lesions on intestinal smooth muscle can compromise the local motility due to changes in the very muscular layer structure as well as the morphological and functional changes in the myenteric plexus structures. This study aimed to evaluate changes in the muscular wall and myenteric cholinergic neurons of the ileum of mdx mice, and the effects of supplementation with ascorbic acid (AA) in these two components. 30 male C57BL / 10 and 30 C57BL / 10Mdx separated into groups according to age and treatment (n = 10) were control at 30 days old (**C30**); dystrophic 30 days of age (**D30**); control with 60 days of age (**C60**); dystrophic with 60 days of age (**D60**); control at 60 days of age supplemented with ascorbic acid (200mg / kg body weight) (**CS60**) and dystrophic 60 days of age supplemented with ascorbic acid (200mg / kg body weight) (**DS60**). After the trial period the animals were euthanized and ileus have been collected and processed following the histological routine and stained by Masson's technique of Masson and for immunohistochemical technique of acetylcholinesterase in total membrane prepared. The data demonstrated that the thickness of the muscularis (μm) and smooth muscle area (μm^2) of the ileum was lower in dystrophic groups, especially Group D30. In animal DS60 the thickness of the muscular layer was similar to the C60. Decreased cholinergic neuronal density of the myenteric plexus of the ileum was lower in D30 animals, but this was similar in animals 60 days without treatment (C60 and D60) and higher in DS60 animals. Cell body profile area (μm^2) was similar in animals of C30-C60 and D30-D60, but is was higher in DS60. The nuclear area ratio / cytoplasmic area was lower in D30 and DS60 and higher in D60. Thus we conclude that mdx mice occur in significant changes in the morphology of the muscular layer and, consequently, morphological and functional changes of cholinergic neurons of the myenteric plexus of the ileum and that supplementation with AA had neuroprotective effects in these animals as preventing loss Neuronal.

Keywords: Duchenne Muscular Dystrophy; Antioxidant; Ascorbic Acid; Muscular Tissue; Myenteric Plexus; Morphofunctional Aspects; Ileum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Ilustração da estrutura da proteína distrofina.....	05
Figura 2:	Ilustração da distrofina realizando a conexão entre a actina e a matriz extracelular através do DAP.....	06
Figura 3:	Imagem histológica do íleo saudável de rato Wistar	08
Figura 4:	Ilustração da estrutura do AA e reação de oxidação em L-dehidroascórbico.....	14
Figura 5:	Elaboração do preparado total de membrana.....	21
Figura 6:	Ilustração do método de análise dos preparados de membrana.....	21
Figura 7:	Micrografias óticas representativas de secções com 6- μm do íleo corado com Tricrômico de Masson.....	25
Figura 8:	Correlação entre a espessura da camada muscular e a área ocupada por este tecido de músculo liso	27
Figura 9:	Neurônios mioentéricos do íleo de camundongos C57BL/10 identificados pela técnica de Acetilcolinesterase.....	28
Figura 10:	A) Densidade de neurônios colinérgicos (neurônios/ mm^2) do íleo. B) Área do perfil celular dos neurônios mioentéricos (μm^2).....	29
Figura 11:	A) Área nuclear e citoplasmática (μm^2) de neurônios mioentéricos colinérgicos do íleo. B) Área nuclear: Razão da área citoplasmática.....	31

Figura 12: Correlação entre a densidade neuronal e a razão: área nuclear/citoplasmática (μm^2).....	33
Figura 13: Correlação entre a densidade neuronal e a área da camada muscular (μm^2).....	35
Figura 14: Correlação entre a área da camada muscular (μm^2) e área nuclear: razão da área citoplasmática.....	36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Peso Inicial (PI), Peso Final (PF) e Área Intestinal (AI). Grupos: controle com 30 dias de idade (C30), distrófico com 30 dias de idade (D30), controle com 60 dias de idade (C60), distrófico com 60 dias de idade (D60), controle suplementado com AA e com 60 dias de idade (CS60) e distrófico suplementado com AA e com 60 dias de idade (DS60)..... 23
- Tabela 2. Parâmetros morfológicos da parede do íleo: Espessura da Camada Muscular (ECM) e Área da Camada Muscular (ACM). Grupos: controle com 30 dias de idade (C30), distrófico com 30 dias de idade (D30), controle com 60 dias de idade (C60), distrófico com 60 dias de idade (D60), controle suplementado com AA e com 60 dias de idade (CS60) e distrófico suplementado com AA e com 60 dias de idade (DS60)..... 24

LISTA DE ANEXOS

Anexo 01: Parecer da CEUA da USP-SP.....	55
Anexo 02: Parecer de isenção da CEUA da UFRN.....	57
Anexo 03: Rotina histológica e desparafinação.....	59
Anexo 04: Protocolo de coloração.....	62
Anexo 05: Guia para autores – Cell and Tissue Research.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido ascórbico
ACHE	Enzima Acetilcolinesterase
ACHE-r	Acetilcolinesterase reativo
Ca ²⁺	Cálcio
CT	Células-tronco
DAP	Complexo de proteínas associadas à distrofina
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
EROs	Espécies reativas de oxigênio
MDX	Distrofia tipo Duchenne
PM	Plexo mioentérico
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
SNP	Sistema nervoso periférico
TGI	Trato gastrointestinal
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, 4

- 1.1 A DMD e a deficiência/ausência de Distrofina, 4
- 1.2 O Trato gastrointestinal na DMD, 6
- 1.3 O SNE, PM e Acetilcolinesterase, 9
- 1.4 A DMD e sua relação com o Ca^{2+} e EROs, 10
- 1.5 Terapia com antioxidantes na DMD e o efeito neuroprotetor, 11
- 1.6 O Ácido Ascórbico, 13
- 1.7 Uso do camundongo *mdx* como modelo animal, 15

2 PROPOSIÇÃO, 17

- 2.1 Objetivo Principal, 17
- 2.2 Objetivos específicos da pesquisa, 17

3 MATERIAL E MÉTODO, 18

- 3.1 Material, 18
- 3.2 Metodologia, 18
 - 3.2.1 *Protocolo experimental, 18*
 - 3.2.2 *Suplementação com AA, 19*
 - 3.2.3 *Análise qualitativa da túnica muscular, 19*
 - 3.2.4 *Técnica para análise do PM: ACHE-r, 20*
 - 3.2.5 *Obtenção do preparado de membrana, 20*
 - 3.2.6 *Obtenção das imagens, 21*
 - 3.2.7 *Análise quantitativa dos neurônios mioentéricos, 22*
 - 3.2.8 *Área do perfil do corpo celular dos neurônios mioentéricos (μm^2), 22*
 - 3.2.9 *Área citoplasmática dos neurônios mioentéricos (μm^2), 22*
 - 3.2.10 *Análise Estatística, 22*

4 RESULTADOS, 23

- 4.1 Peso corporal e área intestinal, 23
- 4.2 Mensurações da parede do íleo, 24
- 4.3 Neurônios ACHE-r do PM, 27

4.4 Correlações entre a área da túnica muscular, mensurações neuronais e densidade neuronal, 33

5 DISCUSSÃO, 37

5.1 Peso corporal e área intestinal, 37

5.2 Mensurações da parede do íleo, 37

5.3 Neurônios ACHE-r do PM, 38

5.4 Correlações entre a área da túnica muscular, mensurações neuronais e densidade neuronal, 39

6 CONCLUSÕES, 41

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, 42

ANEXOS, 54

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença de caráter hereditário recessivo ligado ao braço curto do cromossomo X, locus Xp21 (ABDEL-SALAM et al., 2009; KOENIG et al., 1987), que resulta em miopatia grave, caracterizada por progressiva degeneração muscular que compromete a qualidade e a expectativa de vida do indivíduo (ABDEL-SALAM et al., 2009; BACCARI et al., 2007; BUSHBY et al., 2010), afetando musculatura estriada, estriada cardíaca e a musculatura lisa que é o elemento primário dos órgãos tubulares do trato digestório. A doença evolui também com outras alterações histopatológicas importantes como aumento do tecido conjuntivo fibroso intersticial, múltiplos focos de necrose, intenso infiltrado inflamatório entre outras (SEIXAS et al., 1997).

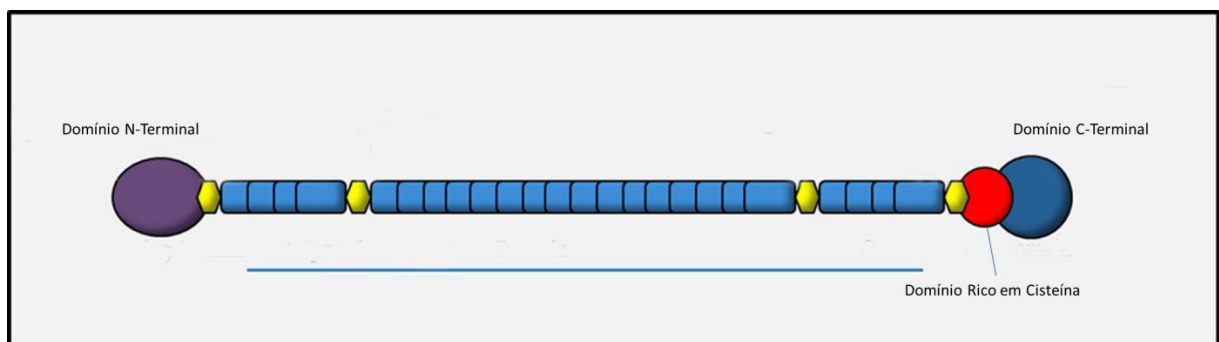
1.1 A DMD e a deficiência/ausência de Distrofina

Dentre as doenças conhecidas com o nome de “*Distrofia Muscular*” existe uma chamada de DMD que ocorre com maior frequência e tem origem em um distúrbio genético ligado ao cromossomo X no locus Xp21 e sub-banda Xp212 (KOENIG et al., 1987) que atinge em média 1 em cada 3.500 indivíduos do sexo masculino nascidos vivos (BUSHBY et al., 2010; JORGENSEN et al., 2011; VOISIN; DE LA PORTE, 2004), sendo que esta mutação pode não estar presente na mãe do paciente em cerca de um terço dos casos (AARTSMA-RUS et al., 2006). As mulheres portadoras geralmente são assintomáticas, porém em cerca de 10% dos casos podem desenvolver uma cardiomiopatia isolada (BUSHBY; MUNTONI; BOURKE, 2003), ou ainda podem apresentar fraqueza muscular leve, espasmos musculares e elevação dos níveis séricos de creatina-quinase (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

As mutações que ocorrem no cromossomo X em pacientes com DMD interrompem a estrutura de leitura para transcrição do RNAm em proteína (HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1987; VAN PUTTEN et al., 2014), resultando numa perda importante ou mesmo ausência de produção da proteína *distrofina* funcional, a qual tem papel fundamental para o bom funcionamento do tecido muscular por se tratar de um componente estrutural deste tecido que liga o citoesqueleto da fibra muscular (actina) à matriz extracelular (AARTSMA-RUS et al., 2006; NAKAMURA; TAKEDA, 2011). A molécula de distrofina não funcional quando sintetizada apresenta-se com deleções na carboxila terminal e na região rica em cisteína, o que

impede a ligação efetiva com o DAP na membrana celular, conferindo assim o fenótipo da DMD (MATSUMURA; CAMPBELL, 1994; WORTON, 1995).

Nos portadores de DMD, a diminuição ou mesmo a falta da expressão da proteína distrofina leva a redução do complexo de proteínas a ela ligadas, causando alterações e/ou destruição entre o citoesqueleto e a matriz extracelular, determinando a ruptura e necrose das fibras musculares (ALVES et al., 2014; MATSUMURA; CAMPBELL, 1994; TINSLEY et al., 1994; VAN PUTTEN et al., 2014) esqueléticas, cardíacas e do músculo liso (HOFFMAN et al., 1987).

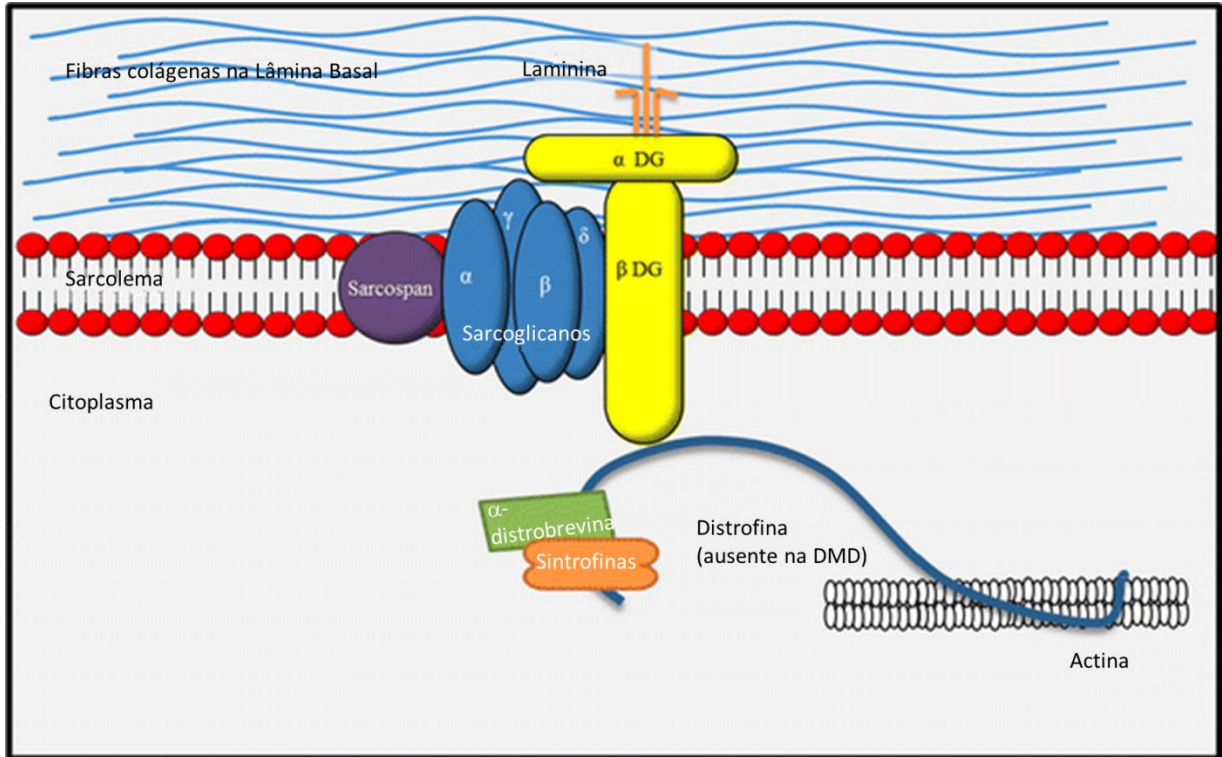


FONTE: adaptado de MANNING; O'MALLEY, 2015.

FIGURA 1: Ilustração da estrutura da proteína distrofina. A distrofina que é constituída por uma extremidade carboxila (domínio C-terminal) que se liga às proteínas do complexo de proteínas associadas à distrofina (DAP), o segundo domínio em forma de haste é composto por 24 repetições de espectrina e 109 aminoácidos, um terceiro domínio rico em cisteína e o domínio N-terminal que faz conexão com a actina

A distrofina está presente em todos os tipos de músculos; localiza-se no sarcoplasma que é a superfície interna do sarcolema (MIYATAKE et al., 1991) e acredita-se que ela exerça função estrutural, reforçando o sarcolema durante o estresse mecânico da contração muscular (ALVES et al., 2014; VAN PUTTEN et al., 2014) evitando a lise osmótica, podendo atuar na maturação dos receptores de membrana nas junções neuromusculares (PILGRAM et al., 2010), e ainda desempenhar um papel menor mas importante em relação a capacidade de resposta contrátil da musculatura do intestino (ALVES et al., 2014; MULÈ; AMATO; SERIO, 2010).

É sabido que existem várias isoformas da distrofina, segundo Saudolet-Puccio; Kunkel (1996), porém as distrofinas presentes nas fibras musculares e no tecido cerebral são bastante semelhantes, proporcionando alterações citomorfológicas em sua ausência ou deficiência.



FONTE: adaptado de MANNING; O'MALLEY, 2015 ajustado de (ERVASTI, 2004).

FIGURA 2: Ilustração da distrofina realizando a conexão entre a actina e a matriz extracelular através do DAP. O DAP é um composto de proteínas ligadas a distrofina no lado da membrana subsarcolemal incluindo os complexos de distroglicanos (α -, β -) e de sarcoglicanos (α -, β -, γ -, δ), além de sintrofinas, α -distrobrevina, sarcospan e laminina.

Além da distrofina, encontramos no sarcoplasma a sintrofina e a distrobrevina, já na região transmembranar são identificadas as glicoproteínas distroglicanos, sarcoglicanos e sarcospan (KIERSZENBAUM; TRES, 2012). A ausência da distrofina em pacientes com DMD causa a perda significativa das sarcoglicanos e de outros componentes do complexo DAP (KIERSZENBAUM; TRES, 2012) produzindo alterações histopatológicas progressivas que vão de necrose aguda, infiltrado celular inflamatório, deposição de gordura, entre outros, até a fibrose com atrofia muscular (KORNEGAY et al., 2014).

1.2 O trato gastrointestinal na DMD

Estudos realizados nos componentes do sistema digestório de pacientes com DMD demonstram que estes indivíduos apresentam dificuldades no processo de deglutição que se manifestam nas primeiras décadas de vida, e tendem a se agravar com o avançar da idade

(PANE et AL., 2006). Contribuindo para o quadro da disfagia e, conseqüentes distúrbios alimentares, em decorrência de alterações estruturais e neurológicas envolvidas no complexo processo da deglutição, sendo possível também detectar a diminuição de força da musculatura da mastigação (UEKI et al., 2007). A DMD compromete o funcionamento do trato gastrointestinal (TGI), atingindo principalmente a musculatura lisa de suas paredes, acarretando distúrbios sérios na motilidade dos componentes do sistema digestório (ABDEL-SALAM et al., 2009; BACCARI et al., 2005).

Sabe-se que a falta de distrofina leva, principalmente, à necrose do músculo estriado esquelético e, conseqüentemente, enfraquecimento da musculatura. Quando esses danos atingem a musculatura da mastigação ou da expressão facial, pode ocorrer um desequilíbrio entre elas (PENARROCHA et al., 1990) acarretando alterações no desenvolvimento craniofacial de portadores de DMD (CUDNY, 1978; ECKARDT; HARZER, 1996; MATSUYUKI et al., 2006), ou seja, alterações estruturais da cartilagem do processo condilar da mandíbula, uma vez, que esta sofre ação direta da musculatura facial, em especial do músculo masseter (GHAFARI; COWIN, 1989), podendo, conseqüentemente, levar a quadros de disfagia ou a dificuldades para se alimentar (AMERICAN SPEECH-LANGUAGE-HEARING ASSOCIATION, 2004).

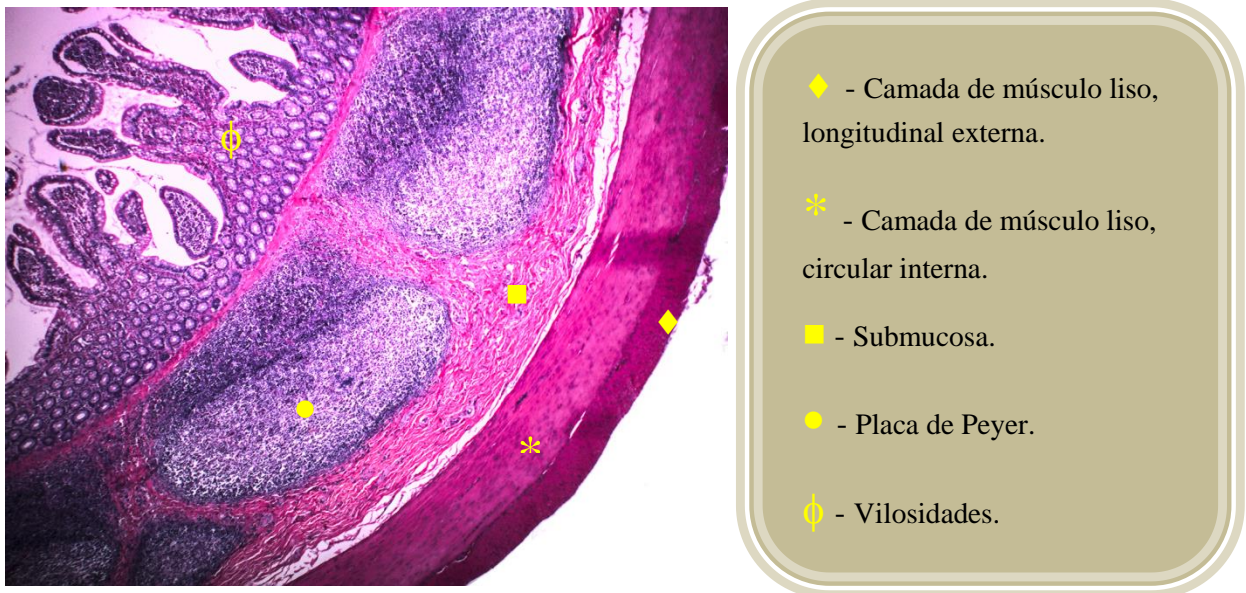
Além disso, a DMD compromete o funcionamento do TGI principalmente da musculatura lisa da parede dos órgãos desse trato levando a distúrbios na motilidade gastrointestinal (BOLAND et al., 1996; MANCINELLI et al., 1995; WILLIG, 1991), entre os quais, disfagia, náuseas e vômitos (BOLAND et al., 1996), além de distensão e dor abdominal, constipação, hipomotilidade no trânsito gastrointestinal e impactação fecal (MULÈ; AMATO; SERIO, 2010).

Segundo Alves et al. (2014), em camundongos mdx a ausência de distrofina leva a uma redução de 27% da espessura da camada longitudinal do íleo devido a algumas mitocôndrias apresentarem interrupções internas na membrana, além de lesão parcial na camada mucosa, promovendo alterações na resposta contrátil do intestino.

Por ser esta musculatura lisa controlada pelo plexo mioentérico (PM), componente do sistema nervoso entérico (SNE) (COSTA et al., 1994; FURNESS, 2000; STERNINI, 1988), acredita-se que as alterações evidenciadas na motilidade do TGI em portadores de DMD podem estar relacionadas não apenas a lesões deste tecido muscular, mas também a alterações dos próprios neurônios mioentéricos localizados entre as camadas musculares longitudinal e circular da túnica muscular.

O intestino desempenha junto com o estômago um importante papel regulador do processamento e absorção dos nutrientes ingeridos, além disso, representam uma das maiores unidades neuroendócrinas do corpo humano (KUO; RAYNER; HOROWITZ, 2007).

O íleo no ser humano corresponde a terceira porção do intestino delgado, sendo a continuação do jejunum, com aproximadamente 3,5 m de comprimento e finalizando na junção ileocecal; é o principal responsável pela reabsorção de água e eletrólitos no intestino delgado, tendo seu epitélio de superfície renovando-se a cada 5-6 dias, com células tronco (CT) dispostas na base das glândulas mucosas, vilosidades mais curtas e nódulos linfáticos formando aglomerados chamados de placas de Peyer (KIERSZENBAUM; TRES, 2012; ROSS; PAWLINA, 2008).



FONTE: Acervo próprio, 2015.

FIGURA 3: Imagem histológica do íleo saudável de rato wistar. Demonstração das estruturas histológicas características deste órgão.

Sabe-se que o mecanismo de contração do músculo liso é desencadeado por um estímulo que aumenta o nível dos íons de cálcio (Ca^{2+}) citoplasmático proveniente do meio externo, promovendo a fosforilação da cadeia leve de miosina que se liga aos filamentos de actina proporcionando a contração da célula, quando os níveis de Ca^{2+} baixam a cadeia leve de miosina é enzimaticamente desfosforilada e o músculo relaxa (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

Muitas são as hipóteses para o aparecimento dessas lesões musculares. De acordo com Jung et al. (2008) e Whitehead et al. (2006), a elevação dos níveis de Ca^{2+} intracelular promove o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são poderosos agentes oxidantes que explicaria os danos nas fibras musculares.

1.3 O SNE, PM e Acetilcolinesterase

Nas últimas décadas fisiologistas tem descrito uma intrincada rede neuronal nas paredes do TGI responsáveis pelo controle da motilidade digestória e vascular, levando-os a propor uma terceira parte do sistema nervoso autônomo chamada de gastroentérica ou SNE (LENT, 2010). A rede multissináptica do SNE é composta por uma grande variedade de tipos de neurônios, neurotransmissores e receptores (MACHADO;HAERTEL, 2014), sob o comando próprio e modulado pelos sistemas simpático e parassimpático (FURNESS, 2000).

Compondo o SNE temos o PM ou plexo de Auerbach formado por uma rede de gânglios e nervos que se estendem do esôfago ao canal anal, está localizado entre a camada circular e longitudinal da túnica muscular e desempenha um importante papel no peristaltismo (MOREIRA et al., 2008; PHILLIPS; POWLEY, 2007), o plexo submucoso ou plexo de Meissner disposto na camada submucosa responsável principalmente pela secreção gastrointestinal e o fluxo sanguíneo local (FURNESS, 2012), e ainda o plexo da mucosa (LLEWELLYN-SMITH et al., 1983).

Os corpos neuronais no PM estão dispostos formando gânglios ou isolados e seus filamentos axonais apresentam-se formando malhas (MIRANDA-NETO et al. 2001).

O TGI recebe inervação do nervo vago (BERTHOUD, 2008), suas fibras aferentes formam uma extensa rede envolvendo o plexo mioentérico, a mucosa e o músculo liso, já a inervação motora é restrita ao PM (PHILLIPS, RHODES; POWLEY, 2006) e segundo Berthoud (2008) juntamente com o sistema nervoso simpático e mecanismos hormonais, co-determina a taxa de absorção de nutrientes, partição, armazenamento e mobilização.

O PM é formado por neurônios nitrérgicos e neurônios colinérgicos (PHILLIPS; POWLEY, 2007; THRASIVOULOU et al., 2006). Os neurônios nitrérgicos são os neurônios inibitórios do intestino (THRASIVOULOU et al., 2006). Os neurônios colinérgicos podem ser subdivididos em calretinina e calbindina. Os neurônios positivos para calretinina formam a

maior população de neurônios do plexo mioentérico comparados com os neurônios calbindina positivos (THRASIVOULOU et al., 2006).

O óxido nítrico funciona como um importante neurotransmissor inibitório no intestino (KUO; RAYNER; HOROWITZ, 2007), enquanto a acetilcolina é um dos principais neurotransmissores excitatórios do SNE (GUYTON; HALL, 2002).

A acetilcolina é produzida pela ação da enzima colina acetiltransferase no axoplasma, é armazenada nas vesículas das terminações nervosas até que seja liberada nas junções neuromusculares, onde irá ocorrer a sua degradação pela enzima acetilcolinesterase (ACHE) (GUYTON; HALL, 2002). De acordo com Gabella (1994), a ACHE pode ainda ser usada como um marcador de atividade colinérgica no TGI dos neurônios acetilcolinesterase reativos (ACHE-r).

1.4 A DMD e sua relação com Ca²⁺ e EROs

Estudos histopatológicos realizados em biópsias de músculos de pacientes com DMD demonstraram que os níveis de Ca²⁺ estão mais elevados nestes do que em outras miopatias (BODENSTEINER; ENGEL, 1978). Alves et al. (2014) também em seus estudos com camundongos mdx demonstraram haver alteração no controle da entrada de Ca²⁺ nas células das fibras musculares lisas do íleo. Segundo alguns autores, os danos no tecido muscular ocorrem pelo aumento das concentrações de Ca²⁺ no interior das fibras musculares (BROOKES et al., 2004), sendo esta concentração por sua vez, estimulada pela ativação de canais iônicos mecanossensíveis (WHITEHEAD et al., 2006; YEUNG et al., 2005) por EROs (ALLEN et al., 2010).

A produção aumentada de EROs pode ser responsável pela degeneração muscular tanto em pacientes de DMD e como também em camundongos mdx (DISATNIK et al., 2000). De acordo com Allen et al. (2010), Jung et al. (2008) e Whitehead et al. (2006), a elevação dos níveis de Ca²⁺ no interior da célula também é responsável pelo aumento na produção de EROs, o que explicaria os danos detectados nas fibras musculares, visto que, segundo Allen et al. (2010) e Godin et al. (2012), a patogênese da DMD está implicada na associação e atuação em conjunto do aumento das EROs e dos níveis alterados de Ca²⁺ com disfunção mitocondrial e falha no metabolismo energético.

Em Disatnik et al. (1998) verificaram que o estresse oxidativo ocorre antes dos danos musculares, ou seja, pela terceira semana de vida dos camundongos mdx, sugerindo que a produção aumentada de EROs é uma das principais causas de lesão da fibra muscular distrófica e não um efeito secundário da degeneração muscular causada por outros mecanismos, fato este comprovado por outros pesquisadores que verificaram que as EROs produzidas pela NADPH oxidase provocam o aumento da concentração do Ca^{2+} e não o contrário (JUNG et al., 2008).

Apesar da grande incidência e do rápido avanço no conhecimento da genética da DMD, até o momento nenhuma medida terapêutica, seja ela medicamentosa ou não, obteve grandes resultados que pudessem levar a cura da doença, fazendo com que a expectativa de vida dessas pessoas não ultrapasse as primeiras décadas de vida idade (BAUMGARTNER; RUIZ, 2008; BUSHBY et al., 2010; EAGLE et al., 2002), em média de 30-40 anos de idade (BUSHBY et al., 2010; RAHBK et al., 2005). Contudo, muitos estudos experimentais têm sido desenvolvidos utilizando os modelos animais distróficos como os cães da raça Golden Retriever e os camundongos mdx, sendo este último o modelo animal mais comum por não apresentar tanta variação fenotípica (BANKS; CHAMBERLAIN, 2008).

1.5 Terapia com antioxidantes na DMD e o efeito neuroprotetor

Com a intenção de minimizar os efeitos da DMD, tem sido aplicadas as mais diferentes terapias que vão desde a fisioterapia (DE ARAÚJO LEITÃO et al., 1995) e a prática de atividades físicas (LAI et al., 2009; WOODDELL et al., 2010), até aquelas que utilizam medicamentos (RUEGG, 2013), CT (JAZEDJE et al., 2009; KERKIS et al., 2008) e terapia genética (WANG; LI; XIAO, 2000).

Considerando pesquisas que não observaram sinais evidentes de lesão muscular em modelos experimentais em fases iniciais de vida (como o camundongo mdx), mas que detectaram indícios de estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento dos produtos de oxidação lipídica, diminuição na geração de força e da produção de enzimas antioxidantes, têm-se focado no estresse oxidativo como alvo das terapias, registrando o emprego de metodologias que defendem a administração de agentes antioxidantes (BORNMAN et al., 1998; BUETLER et al., 2002; PASSAQUIN et al., 2002; PULIDO et al., 1998; WILLIAMS; ALLEN, 2007; WHITEHEAD et al. 2006), ainda que os estudos atuais tenham apresentados dados inconsistentes (LAWLER, 2011) e, dependendo da idade em que se encontra o portador

de DMD, a administração de antioxidantes pode não promover resultados positivos, o que foi caracterizado em experimentos cujo tratamento iniciou-se em estágios avançados da doença (RANDO, 2002).

Desta forma, podemos inferir que a administração de agentes antioxidantes como, por exemplo, o ácido ascórbico (AA), em camundongos mdx com 30 e 60 dias de idade poderiam minimizar os danos causados pelas EROs decorrentes da ausência de distrofina nas fibras musculares, bem como, em outros tecidos relacionados diretamente com o tecido muscular, como é o caso do PM.

Conforme descreve Rando (2002), alguns estudos foram realizados com antioxidantes em pacientes com DMD, mas os resultados não foram positivos talvez pelo tratamento ter sido iniciado em estágios avançados da doença, fato este que não seria repetido neste projeto, uma vez que nele se propõe o estudo experimental em animais jovens.

Como em estudo *in vivo* demonstraram diminuição de lesões musculares em camundongos mdx suplementados com antioxidantes derivados do chá verde (BUETLER et al., 2002; NAKAE et al., 2012); com N-Acetilcisteína diminuição das lesões musculares esqueléticas (HNIA et al., 2007; WHITEHEAD et al., 2002) e redução das lesões no músculo cardíaco (WILLIAMS; ALLEN, 2007; WHITEHEAD et al., 2008), e com idebenona (BUYSE et al., 2011), entre outros exemplos de compostos, pode-se inferir que a administração de AA na dieta dos animais empregados no presente estudo, contribua para minimizar os danos causados pelas EROs decorrentes da ausência de distrofina nas fibras musculares, bem como, em outros tecidos diretamente relacionados, como é o caso dos neurônios do PM.

É visto atualmente na literatura investigações sobre a existência de uma associação entre a DMD e ocorrência de lesões no SNC (YAMAMOTO et al., 2014), assim como potenciais deficiências sensoriais e atraso no desenvolvimento motor conforme sugerido por Troise et al. (2014).

Tem sido relatado em estudos que o AA desempenha um papel importante na neuroproteção (CLEBIS, 2003; MULÈ et al., 2006; VEIT; ZANONI, 2012) neurotransmissão e neuromodulação (CHEN et al., 2012), revertendo os efeitos deletérios do estresse oxidativo (HARRISON; BOWMAN; POLIDORI, 2014) sobre o cérebro (MORETTI et al., 2014) e neurônios mioentéricos do estômago (CLEBIS, 2013), por exemplo, além de possuir um papel importante na maturação e função neuronal (HARRISON; MAY, 2009).

Já é conhecido na literatura o papel do AA como co-fator enzimático da dopamina β -hidroxilase, nas células cromafins, para a produção de noradrenalina (MAY; QU; MEREDITH, 2012).

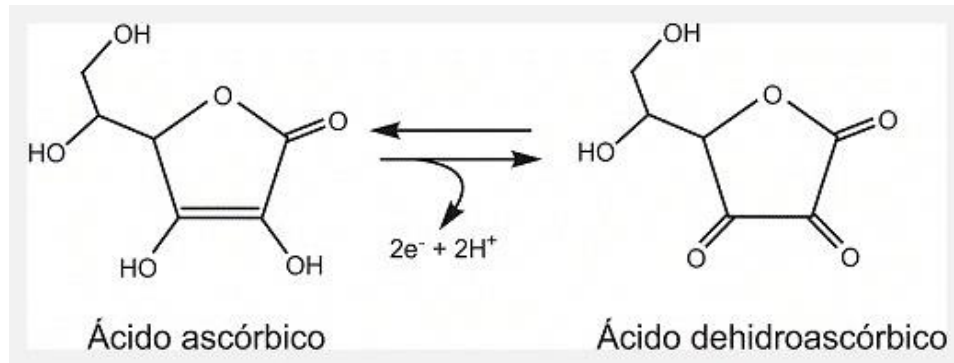
Segundo Nualart et al. (2012), o AA também pode atuar benéficamente na regulação do resultado de terapia com CT em doenças neurodegenerativas protegendo as CT de radicais livres, favorecendo a sobrevivência e proliferação celular e, ainda numa segunda etapa, modulando a diferenciação das CT em neurônios integrados a rede neuronal, anteriormente com defeito, por vias ainda desconhecidas.

Desde décadas atrás, o AA tem mostrado efeitos importantes também sobre o sistema nervoso periférico (SNP) como o forte efeito mielinizante em células de Schwann na raiz do gânglio dorsal, além de ser considerado de grande potencial para uso em outras neuropatias periféricas (GESS; RÖHR; YOUNG, 2013). Já tendo sido comprovada a interação entre o AA e o sistema colinérgico, atribuindo um efeito neurotrófico em neurônios colinérgicos do íleo (ZANONI; FREITAS, 2005), e respostas motoras alteradas de componentes colinérgicos em camundongos knockout/-Gulo (HARRISON et al., 2008).

1.6 O Ácido Ascórbico

O AA ou vitamina C é o nome comum dado ao ácido 2,3-enediol-L-gulônico, um notável antioxidante solúvel em água (MANDL; SZARKA; BÁNHEGYI, 2009) e em etanol absoluto, em forma de sólido branco ou amarelado, com sabor ácido e semelhante ao gosto de suco de laranja (BOBBIO; BOBBIO, 2003), sendo encontrado em uma grande variedade de alimentos e formulações de suplementos. Apresenta a capacidade de doação de elétrons e, desta forma, neutraliza as EROs (ARAÚJO, 2015) que em níveis elevados induziriam ao colapso da membrana mitocondrial e potencialmente levaria a apoptose celular (SICILIANO et al., 2007), além de atuar como sinergista na regeneração de antioxidantes primários como a vitamina E (MANDL; SZARKA; BÁNHEGYI, 2009), sendo classificado como removedor de oxigênio.

O AA ($C_6H_8O_6$) é cristalino com ponto de fusão de 190 a 192 °C, massa molecular 176,13 g/mol, densidade 1,65 g/cm³, acidez (pKa): 4,17 (primeira), 11,6 (segunda) insolúvel nos solventes orgânicos comuns, como clorofórmio, benzeno e éter, sendo facilmente oxidado por reações hidrolíticas, oxidação enzimática, fotoxidação e autooxidação em ácido L – dehidroascórbico (BOBBIO; BOBBIO, 2003; KUTSKY, 1981).



FONTE: Hevia, 2011.

FIGURA 4: Ilustração da estrutura do AA e reação de oxidação em L-dehidroascórbico. A reação óxido-redução se dá: na oxidação pela retirada de dois átomos de hidrogênio da molécula, e na redução pela adição de dois átomos de hidrogênio recompondo o AA.

Os seres humanos são incapazes de produzir AA devido a ausência da enzima L-gulonolactona oxidase que converte glicose em AA (MANDL; SZARKA; BÁNHEGYI, 2009), sendo dependente de fontes dietéticas. A absorção do AA no intestino se dá no jejuno e no íleo na presença de sódio na luz intestinal (GUGLIELMUCCI; SOTO; LOWENSTEIN *apud* SOTO, 1992). A concentração do AA no plasma sanguíneo em humanos é regulada pela ingestão oral e absorção intestinal, acúmulo nos órgãos e tecidos, reabsorção renal, e taxa de utilização decorrente de alguma patologia (LEVINE; PADAYATTY; ESPEY, 2011).

O AA é amplamente distribuído em todos os tecidos do organismo e estes podem apresentar reservas variáveis, sendo, por exemplo, altos teores encontrados no SNC (MAY, 2012) mais especificamente no cérebro (BOWMAN, 2012), e teores menores nos músculos (GUILLAND; LEQUEU, 1995). No homem, as reservas corporais de AA podem variar de 0 até 3000 mg em caso de ingestão maior de 1 g/dia de AA, com média de 1500 mg para ingestão média de 45-75 mg de AA (GUILLAND; LEQUEU, 1995). A suplementação de AA não interfere na expectativa de vida dos pacientes, segundo Paganini-Hill, Kawas e Corrada (2015).

Na insuficiência de AA, seja por ingestão insuficiente, absorção deficitária ou necessidades aumentadas, as estruturas colagenosas são primeiramente afetadas, causando, entre outros problemas, deficiência na produção de colágeno e prejuízo na reparação tecidual (Peterkofsky, 1991), levando a síndromes clínicas como o escorbuto quando as reservas estão abaixo de 300mg de AA (GUILLAND; LEQUEU, 1995).

Os efeitos de altas dosagens de AA não têm demonstrado comprometimentos graves, visto que vitaminas hidrossolúveis tem seu excesso no organismo eliminado através de depuração renal (FUCHS; WANNMACHER, 2010). Geralmente, os efeitos adversos são debelados pela suspensão da suplementação extra de AA, porém pacientes com problemas de acúmulo de oxalato de cálcio tendem, conforme estudos recentes, a formação de cálculos renais (BUEHNER et al., 2015; FUCHS; WANNMACHER, 2010).

1.7 O uso do camundongo mdx como modelo animal

No âmbito da DMD, o uso de modelo animal para se identificar os determinantes genéticos e avaliar a eficácia de novas terapêuticas tem sido bastante amplo. Estes modelos podem ainda advir de forma espontânea ou ser gerados por manipulação genética (KORNEGAI et al., 2014). Existem modelos animais não mamíferos como os peixe-zebra e a *Drosophila* (PLANTIÉ et al., 2015), além de vários animais mamíferos como: camundongos (LEFAUCHEUR; PASTORET; SEBILLE, 1995), gatos (GASCHEN et al., 1998), suínos (HOLLINGER et al., 2013), e cães (SMITH et al., 2011).

De acordo com Bridges (1986), os camundongos mdx não expressam o fenótipo característico da DMD; uma vez que as alterações/lesões musculares são reparadas a partir da oitava semana (McARDCE et al., 1995). Entretanto, outros pesquisadores descreveram que é possível observar em camundongos mdx da terceira até a oitava semana de vida fraqueza muscular progressiva, comprometimento do coração (músculo cardíaco) e do trato digestório (LEFAUCHEUR; PASTORET; SEBILLE, 1995), além de níveis séricos elevados de enzimas sarcoplasmáticas e alterações compatíveis com as encontradas em pacientes portadores da DMD (BULFIELD et al., 1984).

Na presente pesquisa, optou-se por utilizar camundongos mdx, conforme recomendação de Kornegay et al. (2014) e Willmann et al. (2012), que colocam o modelo supracitado como excelente para estudos patológicos e terapêuticos da DMD; com genética e bioquímica homóloga à DMD humana, já sendo usado como modelo pré-clínico há quase três décadas (SPURNEY et al., 2009).

Os camundongos mdx foram descritos pela primeira vez em 1984 de acordo com Sicinski et al. (1989) e surgiram de uma mutação espontânea do gene responsável pela sintetização da proteína distrofina (BULFIELD et al., 1984), sendo inicialmente identificados em uma colônia de camundongos C57BL10/ScSn (LEFAUCHEUR; PASTORET; SEBILLE, 1995).

Apesar deste modelo experimental apresentar reparos teciduais e recuperação significativa das disfunções clínicas por volta dos 18 meses de idade (BRIDGES, 1986; LEFAUCHEUR; PASTORET; SEBILLE, 1995), eles continuam a apresentar alterações histopatológicas progressivas que reduzem em cerca de 20% a expectativa de vida dos animais (CHAMBERLAIN et al., 2007).

O início do processo de degeneração e alterações histológicas no tecido muscular destes animais ocorre por volta do 18º dia pós-natal (QUÍRICO-SANTOS; RIBEIRO-CARVALHO; SAVINO, 1995) ou em torno da 3ª-4ª semanas de vida (LEFAUCHEUR; PASTORET; SEBILLE, 1995). Segundo Grounds (2008), os camundongos mdx apresentam uma fase aguda de manifestações celular e molecular da doença por volta da 4ª-6ª semanas de vida, correspondendo no humano à faixa etária de 10 anos a 16-18 anos de idade, sendo considerados jovens em ambos os casos; estabilizando-se e tornando-se crônica após este período, o camundongo com mais de 6 semanas de vida é considerado adulto e com 8 semanas de vida corresponderia a um humano com cerca de 20 anos de idade.

Desta forma, neste projeto foram estudados animais, camundongos mdx, com 30 e 60 dias de idade (4 e 8 semanas, respectivamente) a fim de se verificar os efeitos da suplementação do AA nos danos causados pela DMD na fase aguda e crônica, e no favorecimento dos reparos teciduais descritos na literatura em função da capacidade regenerativa desses animais.

2 PROPOSIÇÃO

Tendo em vista que a DMD promove alterações em todo o tecido muscular (músculo estriado esquelético, músculo estriado cardíaco e músculo liso e, em outros tecidos com ele relacionados e, observando os achados na literatura científica dos efeitos dos antioxidantes em portadores de DMD, a realização desta pesquisa é justificada.

O AA é conhecido como um antioxidante de custo relativamente baixo e que a maioria da população tem acesso, quer seja, por meio de remédios, suplementos vitamínicos ou através da alimentação com a ingestão de alimentos ricos em vitamina C.

Busca-se, então, elucidar os efeitos da DMD sobre a morfofisiologia da musculatura lisa e do PM do íleo, assim como, a ação da suplementação com ácido ascórbico sobre diferentes aspectos morfológicos em animais com ausência de distrofina a fim de se obter melhor entendimento sobre esta doença e, conseqüentemente, vir a propor novos estudos e/ou terapêuticas que possam ser expandidos à população e propiciar no futuro uma melhoria da qualidade de vida de pacientes portadores de DMD.

2.1 Objetivo geral

Este estudo tem por objetivo principal avaliar os efeitos da suplementação com AA sobre a túnica muscular do íleo e, conseqüentemente, sobre a morfofisiologia do PM em camundongos mdx.

2.1 Objetivos específicos

- Analisar a morfologia da túnica muscular (camadas circular e longitudinal) do íleo;
- Quantificar a densidade neuronal (neurônios marcados por ACHE) do íleo de animais normais e com ausência de distrofina, submetidos ou não a suplementação de ácido ascórbico;
- Mensurar a área do perfil do corpo neuronal, área nuclear e área citoplasmática (neurônios marcados com ACHE) do íleo de animais normais e com ausência de distrofina, submetidos ou não a suplementação de ácido ascórbico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Neste trabalho foram utilizados 60 animais, sendo 30 camundongos *mdx* machos, portadores de distrofia muscular (C57BL/10-Dmd^{mdx}) e 30 camundongos machos normais (C57BL/10) provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (animais controle) e do Biotério da Fiotec da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro – FIOCRUZ (animais distróficos).

Ressaltamos que este projeto foi encaminhado a CEUA do ICB/USP (Parecer nº 164/2011 da CEUA/ICB/USP) (anexo 01). Da carcaça dos animais utilizados no projeto inicial desenvolvido na USP foram coletados os segmentos intestinais usados nesta pesquisa e, portanto, após encaminhado o referido projeto de pesquisa para a análise da CEUA da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Parecer Isento nº 057/2013) (anexo 02).

Os animais foram distribuído em seis grupos com 10 animais cada como segue:

- **C30** – controle com 30 dias de idade;
- **D30** – distrófico com 30 dias de idade;
- **C60** – controle com 60 dias de idade;
- **CS60** – controle suplementado com AA, com 60 dias de idade;
- **D60** - distrófico com 60 dias de idade;
- **DS60** – distrófico suplementado com AA, com 60 dias de idade.

3.2 Metodologia

3.2.1 Protocolo experimental

Durante o período experimental os animais foram pesados e permaneceram acomodados em caixas de polipropileno (5 animais por caixa) providas de bebedouro e comedouro mantidas em condições controladas de temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e de iluminação (ciclo de 12 horas claro/ 12 horas escuro) e, receberam ração (Nuvital[®]) e água *ad libitum*.

Após o período experimental, os animais dos grupos C30 e D30 (com 30 dias de idade) e, os animais dos grupos C60, CS60, D60 e DS60 (com 60 dias de idade) foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO₂) no Biotério do Departamento de Anatomia – ICB.

Em seguida, foi retirado o jejuno-íleo da cavidade abdominal e colocado sobre uma folha de papel milimetrado e fotografado. As imagens obtidas foram analisadas pelo software Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) para determinação da área (cm²).

O íleo foi então separado do jejuno por secção transversal, tendo como limite cranial o início da inserção da prega ileocecal, e limite caudal a junção ileocecal. Em cada grupo foram abstraídos 5 animais para a análise histológica do íleo e os outros 5 animais foram utilizados para análises quantitativas e morfométricas dos neurônios mioentéricos ACHE-r do íleo. Sendo submetido às diferentes técnicas como segue:

- Técnicas para análise da túnica muscular: após fixação em solução de Bouin por 24 horas, os íleos foram processados seguindo-se a rotina histológica, e incluídos em parafina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983; TOLOSA et al., 2003) (anexo 03). Para a análise deste tecido foram confeccionadas 6 lâminas com quatro cortes transversais de 6µm (cortes semi-seriados com distância entre eles de 18 µm) e coradas através do seguinte método: Tricrômico de Masson (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983; TOLOSA et al., 2003) (anexo 03).

- Técnicas para análise do plexo mioentérico: Técnica de Acetilcolinesterase (marca a população neuronal ACHE-r).

3.2.2 Suplementação com AA

Os animais dos grupos CS60 e DS60, a partir do 31º até o 60º dias de vida, foram suplementados, por meio de gavagem, diariamente com 200 mg/kg de peso do animal, diluído em água (GUIDO, et al., 2010; TONON et al., 2012).

3.2.3 Análise Qualitativa da Túnica Muscular

Para esta análise foi utilizada coloração de Tricrômico de Masson nas secções histológicas do íleo para evidenciar a citoarquitetura tecidual.

Para a análise qualitativa, levamos em conta a morfologia dos animais controle e, a partir daí foram realizadas comparações com a morfologia dos animais distróficos e suplementados.

Para cada uma das 30 imagens capturadas foram realizadas três mensurações em cada campo microscópico para análise da espessura da túnica muscular (µm) e calculada a área ocupada pelo músculo liso da túnica muscular (µm²) usando o programa de computador Image-Pro Plus 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

3.2.4 Técnica para a Análise do PM: ACHE-r

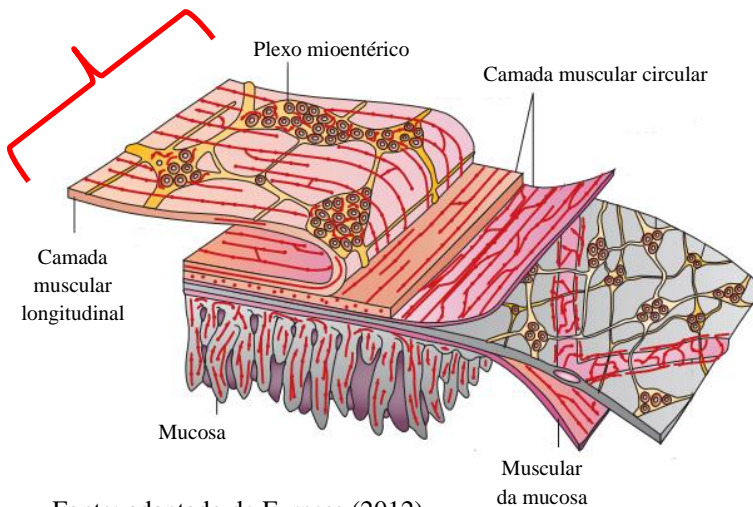
Esta técnica, desenvolvida por Karnovsky e Roots (1964), consistiu inicialmente no preenchimento dos íleos com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato, este preenchimento foi realizado pela mesma pessoa em todas as amostras para se manter o mesmo grau de distensão do tecido e não comprometer a análise; e em seguida, foi realizada a ligadura das extremidades, sendo identificada a porção oral com linha de uma determinada cor e porção aboral com linha de outra cor, e imersão no mesmo fixador por um período de 30 minutos a 4° C.

Depois de imersos durante 12 horas em solução uma **solução A** (Krebs contendo hialuronidase -2000 UTR- e tetraisopropil pirofosforamida - iso-OMPA), os espécimes foram mantidos por um período de 24 horas a 4° C, em um meio de incubação (**solução B**) contendo 0,17 M de acetilcolina, 6,5 mL de tampão fosfato (0,1M, pH 7,1), 0,5ml de citrato de sódio (100 mM), 1 mL de sulfato de cobre (30 mM), 1 mL de água destilada e 1ml de ferricianeto de potássio (5 mM), à qual foi acrescentada a solução A, na proporção de 2:1.

Após a incubação, o íleo foi transferido e mantido em solução fixadora de paraformaldeído tamponado 4% por 48 horas, em seguida as amarras das extremidades foram removidas e o íleo foi seccionado ao longo do seu eixo longitudinal a partir da porção aboral, para garantir que vai ser usado o íleo e não o jejuno, em fragmentos de 1 cm de comprimento, abertos na borda mesentérica e submetidos a microdissecção para obtenção dos preparados totais de membrana.

3.2.5 Obtenção dos preparados de membrana

Os íleos fragmentados para a elaboração de preparados totais de membrana tiveram cada segmento submetido à microdissecação sob estereomicroscópio com transiluminação, para a retirada da camada mucosa e da tela submucosa, com preservação das túnicas muscular e serosa (Figura 5) (CLEBIS, 2006).



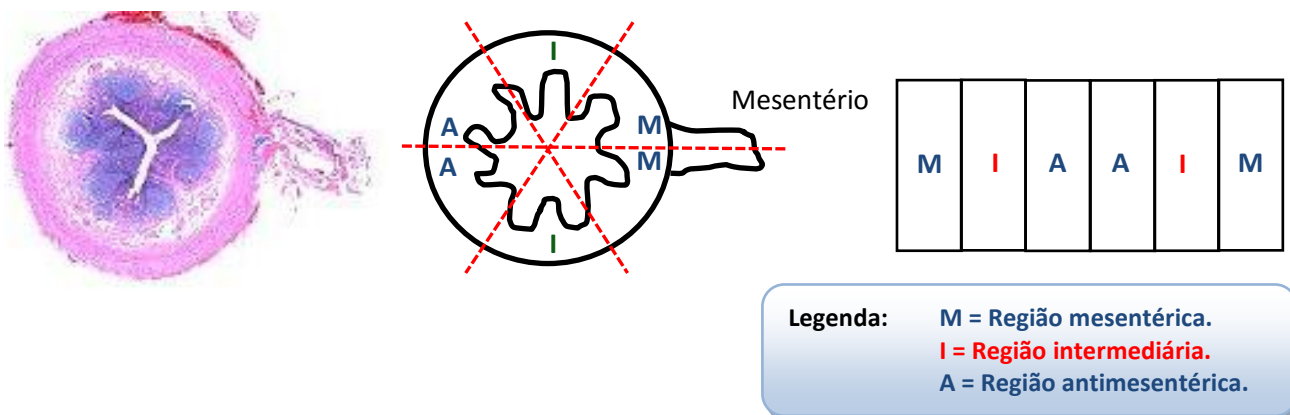
No espaço delimitado pela chave “{” temos o preparado de membrana propriamente dito.

Fonte: adaptado de Furness (2012).

FIGURA 5: Elaboração do preparado total de membrana.

3.2.6 Obtenção das imagens

A documentação fotográfica dos resultados obtidos foi realizada no Laboratório Microcelt do departamento de Morfologia da UFRN através de um microscópio trinocular (BA-410, Motic), acoplado a uma câmera de vídeo (Moticam 5) e, conectados a um computador e a um monitor colorido de 17 polegadas, utilizando a objetiva de 40x (área do campo fornecida pelo microscópio de $0,165\text{mm}^2$). Para cada preparado de membrana foram analisados 30 campos microscópicos da área intermediária, totalizando uma área de $4,97\text{mm}^2$ (Figura 6).



Legenda: M = Região mesentérica.
I = Região intermediária.
A = Região antimesentérica.

FIGURA 6: Ilustração do método de análise dos preparados de membrana.

3.2.7 Análise quantitativa dos neurônios mioentéricos

Para a quantificação dos neurônios foram contados todos os neurônios presentes nos 30 campos microscópicos das regiões intermediárias dos preparados de membrana, visto que, segundo Miranda-Neto et al. (2001) no íleo existe uma densidade neuronal maior na região mesentérica e menor densidade neuronal na região antimesentérica. A área analisada total foi de 4,97mm² e os dados foram expressos como neurônios/mm² (densidade neuronal).

3.2.8 Área do perfil do corpo celular e área nuclear dos neurônios mioentéricos (μm^2)

A mensuração da área do perfil do corpo celular e área nuclear dos neurônios mioentéricos foram realizadas pelo programa de análise de imagem Image-Pro Plus 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Para tanto, os campos utilizados para a quantificação neuronal foram novamente analisados, sendo mensurados os 100 primeiros neurônios presentes nas imagens de cada animal, que é a quantidade mínima necessária para se ter uma boa amostra segundo os princípios da estereologia/morfometria, totalizando 500 neurônios por grupo.

3.2.9 Área citoplasmática dos neurônios mioentéricos (μm^2)

O cálculo da área citoplasmática dos neurônios mioentéricos foi realizado com os valores obtidos nas mensurações da área do perfil do corpo celular e da área nuclear, conforme Moreira et al. (2012), sendo a área citoplasmática resultado da subtração do valor aferido da área do perfil do corpo celular pelo valor da área nuclear mensurada.

3.2.10 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através do software GraphPad Prism 5.1, levando-se em consideração os princípios de amostragem sistemática e uniformemente aleatória (GUNDERSEN et al., 1999) onde para as variáveis que apresentaram distribuição simétrica e com igualdade de variância (homocedasticidade), foi utilizado o teste one way ANOVA seguido por comparações múltiplas pelo método de Tukey e o teste de Person para verificar as correlações entre as diferentes variáveis. 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) foram menores que 0,05 (p<0,05).

4 RESULTADOS

4.1 Peso corporal e área intestinal (jejuno-íleo)

O peso corporal inicial dos animais de todos os grupos ao desmame era semelhante (Tabela 1).

Tabela 1. Peso Inicial (PI), Peso Final (PF) e Área Intestinal (AI). Grupos: controle com 30 dias de idade (C30), distrófico com 30 dias de idade (D30), controle com 60 dias de idade (C60), distrófico com 60 dias de idade (D60), controle suplementado com AA e com 60 dias de idade (CS60) e distrófico suplementado com AA e com 60 dias de idade (DS60).

Grupos	PI (g)	PF (g)	AI (cm ²)
C30	18,51±1,08 ^a	18,51±1,08 ^a	17,22±1,85 ^a
D30	18,37±1,90 ^a	18,37±1,90 ^a	17,44±0,47 ^a
C60	18,41±1,02 ^a	22,39±3,87 ^b	17,86±1,08 ^a
D60	18,39±1,22 ^a	26,31±1,09 ^c	18,15±1,48 ^a
CS60	18,48±1,71 ^a	22,29±1,27 ^b	20,2±1,45 ^b
DS60	18,49±1,32 ^a	21,78 ± 1,62 ^b	18,41±2,49 ^a

Resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Valores de medias seguidos por diferentes letras na mesma coluna são estatisticamente diferentes. (p < 0,05). n = 5 camundongos por grupo.

Em relação ao peso corporal ao final do experimento (Tabela 1), os animais dos grupos com 60 dias de idade apresentaram peso corporal maior (p<0,05) do que aqueles com 30 dias de idade: C60 (16,2%); D60 (30,17%); CS60 (16,95%); e DS60 (15,65%). O maior peso corporal verificado nos animais mais velhos era esperado uma vez que estes passaram por período maior de crescimento do desmame até os 60 dias de idade.

Entre os grupos C30 e D30, não ocorreu diferença significativa (p<0,05) no peso final, demonstrando que a DMD não afetou o peso corporal dos animais entre a fase do desmame até os 30 dias de idade (Tabela 1).

Nos animais não suplementados de 60 dias de idade, aumento de 14,89% no peso corporal (p<0,05) foi verificado no grupo D60 em relação ao C60 (Tabela 1). Já, entre os animais suplementados (grupos CS60 e DS60) não foi verificada diferença significativa (p>0,05) no peso corporal final, indicando que o AA foi eficaz na manutenção do peso

corporal dos animais distróficos (grupo DS60) em relação ao respectivo grupo controle (CS60) (Tabela 1).

A área total (cm²) do jejuno-íleo foi mensurada em todos os grupos para determinar possíveis alterações decorrentes da distrofia muscular (Tabela 1). Apenas o grupo CS60 apresentou aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) neste parâmetro em relação aos demais grupos.

4.2 Mensurações da parede do íleo

Nesta etapa foram mensuradas a espessura da túnica muscular do íleo (μm) e a área ocupada por tecido muscular liso (μm^2) na parede do íleo (Tabela 2 e Fig. 7).

Tabela 2. Parâmetros morfológicos da parede do íleo: Espessura da Camada Muscular (ECM) e Área da Camada Muscular (ACM). Grupos: controle com 30 dias de idade (C30), distrófico com 30 dias de idade (D30), controle com 60 dias de idade (C60), distrófico com 60 dias de idade (D60), controle suplementado com AA e com 60 dias de idade (CS60) e distrófico suplementado com AA e com 60 dias de idade (DS60).

Grupos	ECM (μm)	ACM (μm^2)
C30	14,73 \pm 1,14 ^a	12,947.0 \pm 1,019.0 ^a
D30	9,73 \pm 1,22 ^b	6,172.1 \pm 994.5 ^b
C60	12,06 \pm 1,52 ^{ab}	13,339.2 \pm 1,911.0 ^a
D60	11,71 \pm 1,54 ^b	9,730.9 \pm 1,266.1 ^c
CS60	11,75 \pm 1,07 ^{ab}	13,875.3 \pm 2,177.9 ^a
DS60	12,25 \pm 1,11 ^a	8,885.1 \pm 1,098.2 ^{bc}

Resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Valores de medias seguidos por diferentes letras na mesma coluna são estatisticamente diferentes. ($p < 0,05$). n = 5 camundongos por grupo.

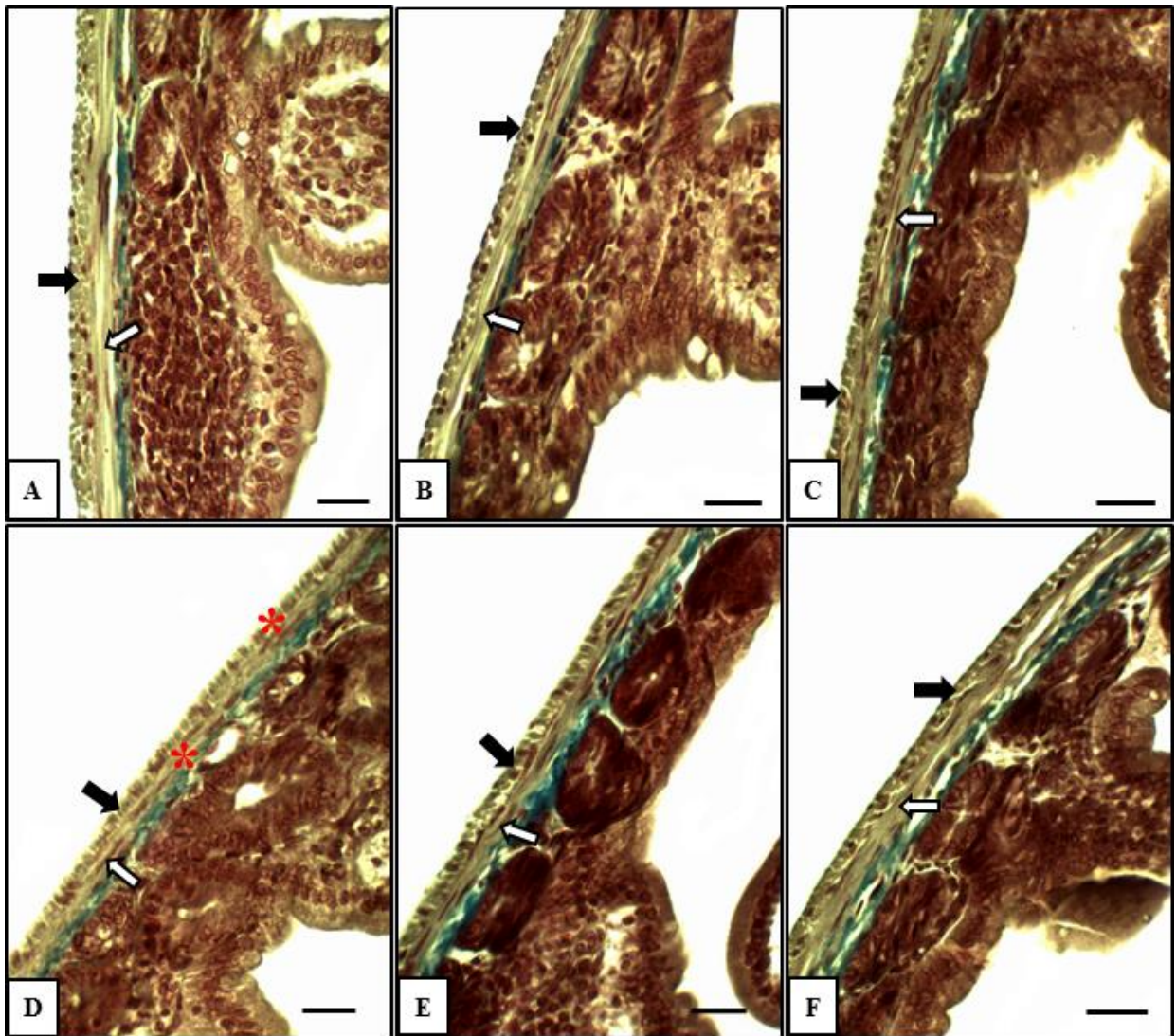


Figura 7: Micrografias ópticas representativas de seções com 6- μ m do íleo corado com Tricrômico de Masson. Sendo os grupos: *controle* (A: C30, B: C60 e C: CS60) e *mdx* (D: D30, E: D60 e F: DS60). Observar a camada muscular circular (CMC), a camada muscular longitudinal (CML) e a redução da espessura da camada muscular (*). Objetiva de 40x. Barra de escala: 100 μ m.

Para determinar a espessura da túnica muscular, foram obtidas três medidas em cada imagem obtida de 30 campos microscópicos/animal). A área da túnica muscular ocupada por músculo liso foi determinada numa área total de 4,97 mm² equivalente a 30 campos microscópicos. Para ambas as análises, as amostras foram coradas pela técnica de Tricrômico de Masson (Tabela 2 e Fig. 7).

No grupo D30, a espessura da túnica muscular do íleo foi 33,94% menor ($p < 0,05$) do que no grupo C30. Entre os animais de 60 dias de idade não suplementados (C60 e D60) não foram identificadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) neste parâmetro. Apesar do

grupo DS60 apresentar o aumento de 4,08% na espessura da túnica muscular, esta diferença também não foi significativa ($p < 0,05$) (Tabela 2 e Fig. 7).

Na comparação entre os animais de 30 e 60 dias de idade não suplementados, a espessura da túnica muscular foi 18,18% menor nos animais mais velhos (grupo C60) em relação aos animais mais jovens (grupo C30). No grupo D60 a espessura foi 16,98% maior ($p < 0,05$) do que no grupo D30 (Tabela 2, Fig. 7).

Já, entre os animais de 60 dias de idade suplementados comparados com os seus respectivos controles não suplementados e de mesma idade (grupos C60 e D60), a espessura da túnica muscular do íleo não diferiu significativamente ($p < 0,05$) nos grupos sem suplementação e nos grupos suplementados houve um aumento da espessura da túnica muscular no grupo DS60 em relação ao grupo D60 (Tabela 2, Fig. 7).

O tecido muscular liso nos animais de 60 dias não suplementados (grupo C60) aumentou em relação aos animais controles de 30 dias (grupo C30), porém sem significância estatística ($p < 0,05$). Já entre os animais distróficos ocorreu o aumento de 36,57% no grupo D60 ($p < 0,05$) em relação a D30 (Tabela 2).

A comparação entre animais de 60 dias suplementados e os seus controles evidenciou aumento de 3,86% do tecido muscular no grupo CS60 em relação ao C60 ($p < 0,05$). Já, o grupo DS60 apresentou diminuição de 8,69% deste tecido quando comparado com o grupo D60 ($p < 0,05$) (Tabela 2).

A área ocupada pelo tecido muscular no íleo comparada entre os grupos distróficos e animais não distróficos foi: 52,32% menor ($p < 0,05$) no D30 em relação ao grupo C30; 27,05% menor nos animais do grupo D60 quando comparados com os animais do grupo C60 ($p < 0,05$); e no grupo DS60 foi 35,96% menor ($p < 0,05$) do que em CS60 (Tabela 2).

Também foram verificadas as correlações entre essas duas variáveis (Fig. 8).

A análise da correlação entre a espessura da túnica muscular do íleo (μm^2) e a área desta túnica ocupada por tecido muscular liso (μm^2) de camundongos controle e distrófico detectou os seguintes coeficientes de correlação de Person (r): -0,22 em C30 ($p = 0,72$); 0,27 em D30 ($p = 0,66$); 0,65 em C60 ($p = 0,24$); 0,97 em D60 ($p = 0,01^{**}$); 0,75 em CS60 ($p = 0,14$) e, 0,26 em DS60 ($p = 0,68$) (Fig. 8).

Apesar do grupo CS60 apresentar $r = 0,75$, que representaria correlação moderada, esta não foi significativa. Desta forma, apenas em D60 foi verificada correlação positiva forte e significativa entre as duas variáveis (Fig. 8).

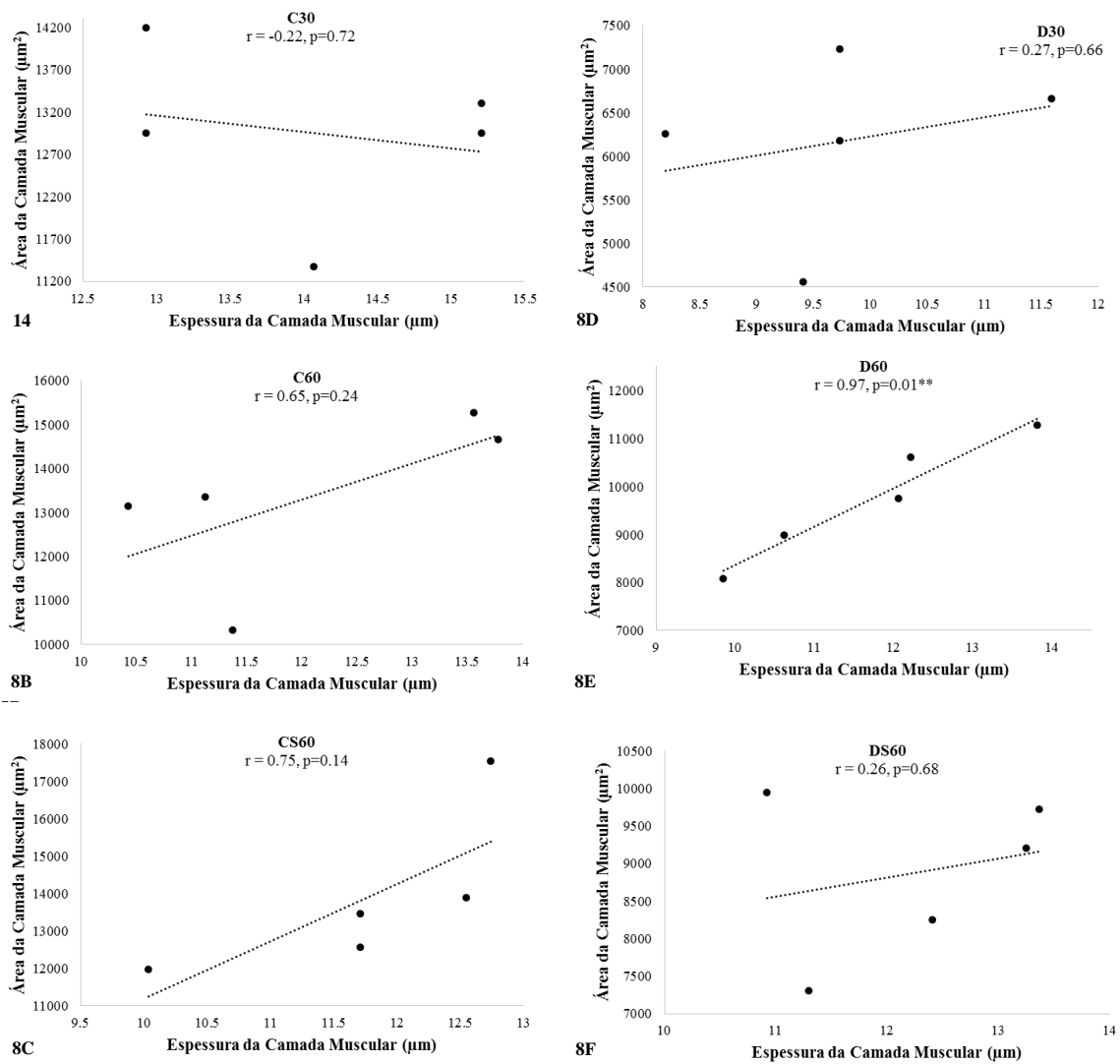


Figura 8: Correlação entre a espessura da camada muscular e a área ocupada por este tecido de músculo liso, nos animais dos grupos: controle (A: C30, B: C60 e C: CS60) e *mdx* (D: D30, E: D60 e F: DS60). r = coeficiente de Person; p (nível de significância).

4.3 Neurônios ACHE-r do PM

Não foram identificadas diferenças quanto a organização e disposição dos neurônios mioentéricos ACHE-r do íleo em quaisquer grupos analisados (Fig. 9).

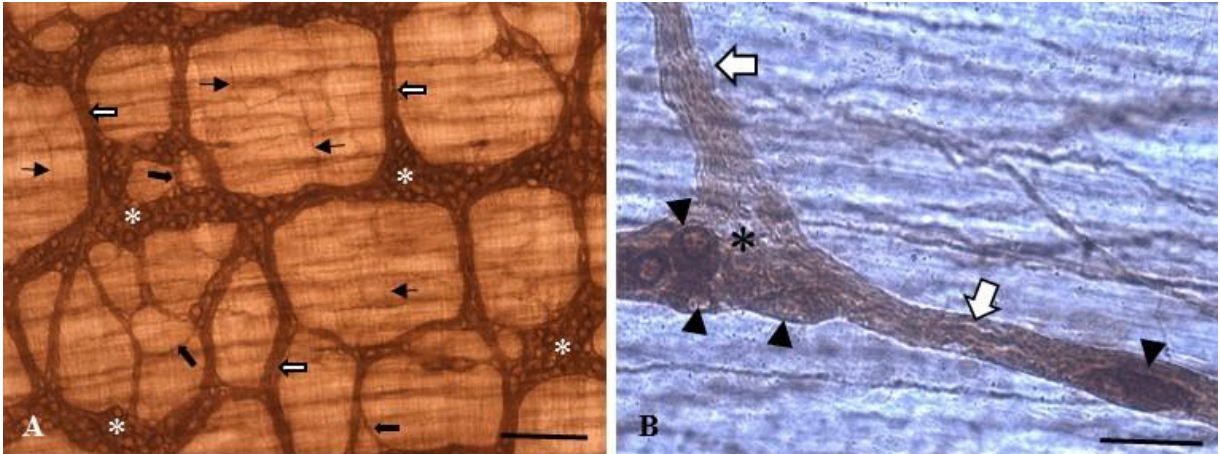


Figura 9: Neurônios mioentéricos do íleo de camundongos C57BL/10 identificados pela técnica de Acetilcolinesterase. A) Morfologia e coloração dos componentes do SNE: gânglio (*), fibras primárias (⇐), fibras secundárias (⇨) e fibras terciárias (→). B) Mostrando gânglio (*) e corpos neuronais (▶) fibras primárias (⇐). Objetiva de 20x (barra de escala: 100 μm); objetiva de 40x (barra de escala: 50 μm).

Em relação a densidade de neurônios ACHE-r (neurônios/mm²) os resultados estão apresentados na Fig. 10.

Reduções ($p < 0,05$) de 42,16% na densidade neuronal no grupo C60 em comparação ao C30, e de 3,14% em CS60 em relação ao C60 ($p < 0,05$) foram constatadas. Nos animais distróficos, ao contrário, houve aumento progressivo na densidade de neurônios ACHE-r entre os grupos analisados.

Entre os animais distróficos, a densidade neuronal foi 28,33% maior no grupo D60 em relação ao grupo D30 ($p < 0,05$), e 53,04% maior no grupo DS60 do que em D60 ($p < 0,05$).

Já, no grupo D30, a densidade neuronal foi 56,42% menor ($p < 0,05$) em relação ao C30. Nos animais de 60 dias sem suplementação (D60) houve aumento de 4,89% quando comparado a C60 ($p < 0,05$). Nos animais suplementados o aumento foi de 56,75% no grupo DS60 em relação ao CS60 ($p < 0,05$).

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas nas dimensões da área intestinal dos animais sem suplementação, sendo assim é possível inferir que a distrofia muscular promoveu redução no grupo D30 em relação ao seu respectivo controle C30, assim como, que houve uma reversão deste quadro nos animais distróficos não suplementados D60 em comparação com C60.

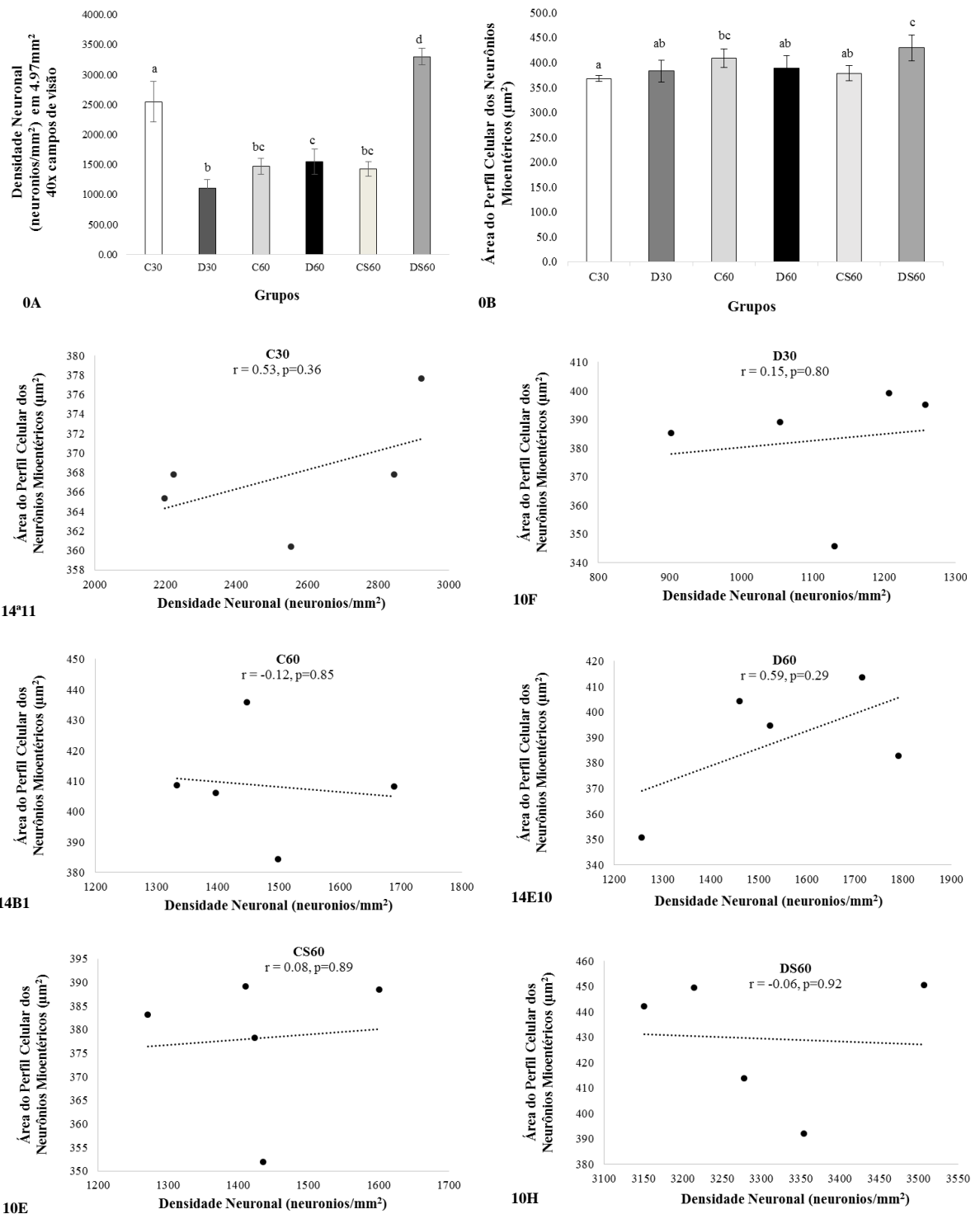


Figura 10: A) Densidade de neurônios colinérgicos (neurônios/mm²) do íleo. B) Área do perfil celular dos neurônios mioentéricos (μm²). Correlação entre a densidade neuronal e a área do perfil celular em animais dos grupos: *controle* (C: C30, D: C60 e E: CS60) e *mdx* (F: D30, G: D60 e H: DS60). r = coeficiente de Person; p (nível de significância).

Porém, quando os animais suplementados foram analisados, observou-se aumento significativo na área intestinal de 8,86% nos animais do grupo CS60 em relação ao DS60. Se esta diferença for considerada como um fator de correção para densidade neuronal no grupo CS60, pode-se inferir a presença de aproximadamente 1554,3 neurônios/mm² neste grupo, ou seja, a densidade neuronal média no grupo CS60 continuaria sendo significativamente menor (52,91%) daquela observada nos animais de DS60.

A análise morfométrica do perfil celular (Fig. 10) apresentou aumento de 9,96% na área do perfil do corpo celular dos neurônios ACHE-r do plexo mioentérico do íleo nos animais do grupo C60 em relação ao C30 ($p < 0,05$) e redução de 7,41% em CS60 quando comparado ao C60 ($p < 0,05$). Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos D30 e D60 ($p < 0,05$), porém em DS60 houve aumento de 9,4% em relação ao D60 ($p < 0,05$) (Fig. 10B).

Quando comparadas a área do perfil do corpo celular entre os animais distróficos e respectivos controles dentro da mesma faixa etária e tratamento, verificou-se aumento de 3,92% em D30 em relação ao C30 ($p < 0,05$). No grupo D60 este parâmetro foi 4,75% menor do que no C60 ($p < 0,05$), e em DS60 foi 11,94% maior que CS60 ($p < 0,05$) (Fig. 10B).

A correlação entre a densidade neuronal e a área do perfil do corpo celular evidenciou os seguintes resultados: C30 ($r = 0,53$, $p = 0,36$); C60 ($r = -0,12$, $p = 0,85$), CS60 ($r = 0,08$, $p = 0,89$), D30 ($r = 0,15$, $p = 0,81$), D60 ($r = 0,59$, $p = 0,29$) e DS60 ($r = -0,06$, $p = 0,92$). Não houve correlação significativa ($p < 0,05$) entre estas duas variáveis em todos os grupos estudados (Fig. 10C-H).

Em relação a análise morfométrica do núcleo à área nuclear (μm^2) (Fig. 11A), não ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os animais dos grupos C30 e C60. Contudo, aumento ($p < 0,05$) de 9,02% neste parâmetro em CS60 foi verificado quando comparado ao C60.

Nos animais distróficos do grupo D60, a área nuclear foi 8,95% maior do que em D30 ($p < 0,05$). No grupo DS60 a área do núcleo foi 3,7% menor do que em D60 ($p < 0,05$) (Fig. 11A).

Redução de 5,42% na área nuclear foi verificada em D30 em comparação a C30 ($p < 0,05$), aumento de 4,34% em D60 em relação ao seu controle C60 ($p < 0,05$), e diminuição de 8,5% desta área nos animais DS60 em comparação a CS60 ($p < 0,05$) (Fig. 11A).

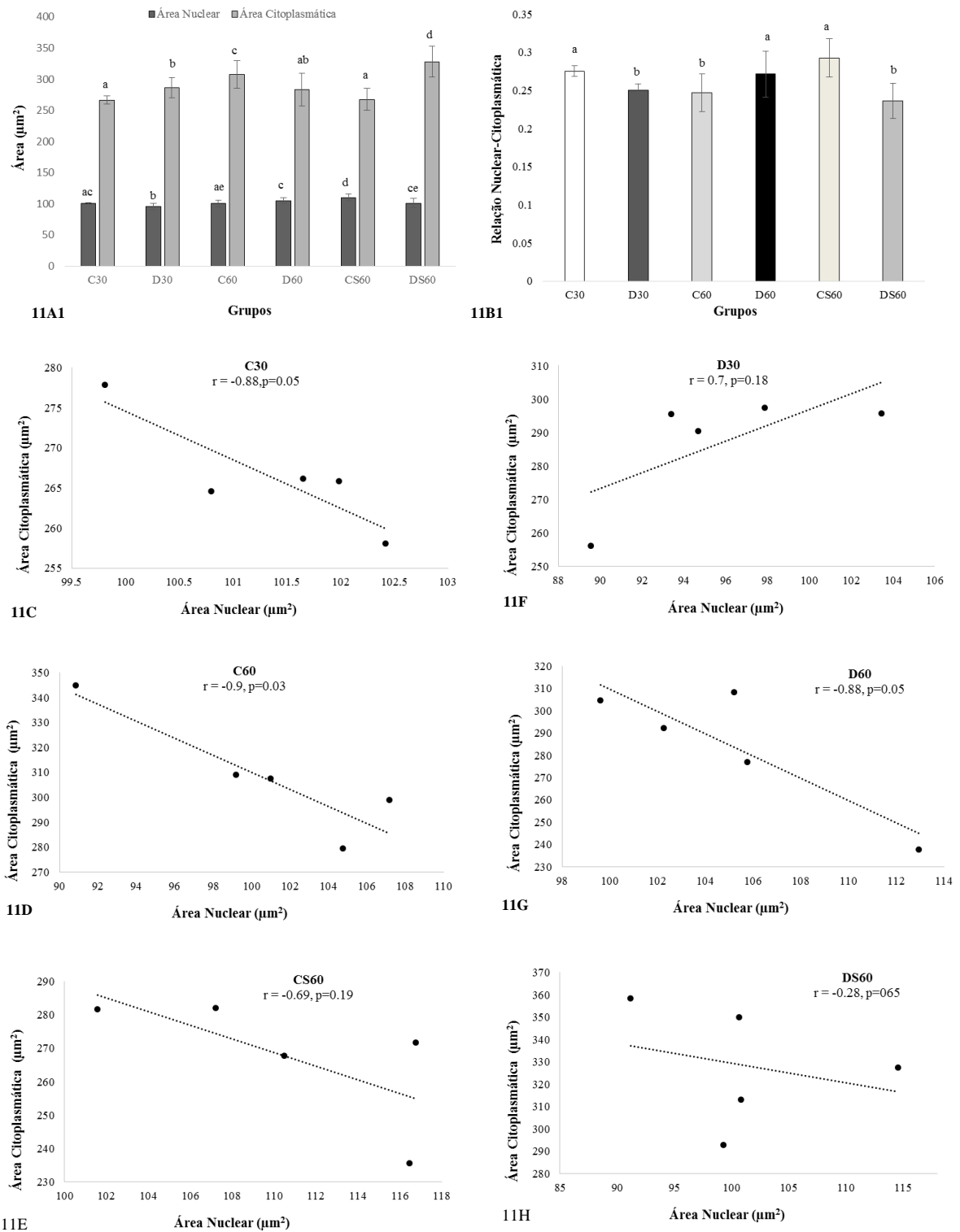


Figura 11: A) Área nuclear e citoplasmática (μm^2) de neurônios mioentéricos colinérgicos do íleo. B) Área nuclear: Razão da área citoplasmática. Correlação entre a área nuclear e a área citoplasmática nos animais dos grupos: *controle* (C: C30, D: C60 e E: CS60) e *mdx* (F: D30, G: D60 e H: DS60). r = coeficiente de Person; p (nível de significância).

A análise morfométrica para a área citoplasmática (μm^2) (Fig. 11A) dos animais do grupo C60 foi 13,44% e 13,05% maior do que as verificadas em C30 ($p<0,05$) e em CS60 ($p<0,05$), respectivamente. Os animais distróficos dos grupos D30 e D60 apresentaram áreas citoplasmáticas semelhantes ($p<0,05$) entre si. Já, no grupo DS60 a área citoplasmática foi 13,49% maior que no D60 ($p<0,05$) (Fig. 11A).

Quando comparados animais distróficos com seus respectivos controles de mesma faixa etária, constatou-se que a área citoplasmática foi: 7,1% maior em D30 do que em C30 ($p<0,05$); 7,79% menor em D60 do que no grupo C60 ($p<0,05$); e 18,43% maior em DS60 do que em CS60 ($p<0,05$) (Fig. 11B).

A análise da correlação entre a área nuclear (μm^2) e a área citoplasmática (μm^2) dos neurônios ACHE-r do plexo mioentérico do íleo de camundongos controle e distrófico evidenciou os seguintes resultados: C30 ($r=-0,88$, $p=0,051$); C60 ($r=-0,69$, $p=0,20$); CS60 ($r=-0,88$, $p=0,052$); D30 ($r=-0,90$, $p=0,03$); D60 ($r=0,70$, $p=0,18$); e DS60 ($r=-0,28$, $p=0,65$) (Fig. 11C-H). Apesar da forte correlação verificada nos grupos C30 e CS60, apenas o grupo D30 apresentou correlação estatisticamente significativa ($p<0,05$).

Quanto à razão entre a área nuclear/área citoplasmática (Fig. 11B), ocorreu diminuição de 13,15% em C60 em relação a C30 ($p<0,05$) e aumento de 21,42% em CS60 comparado a C60 ($p<0,05$). Nos animais distróficos, a razão área nuclear/área citoplasmática foi 13,15% maior em D60 em comparação ao D30 ($p<0,05$) e 18,42% menor em DS60 em relação a D60 ($p<0,05$).

Quando comparados os animais distróficos e controle de mesma idade e tratamento constatou-se que a razão área nuclear/área citoplasmática em D30 foi 13,15% menor do que em C30 ($p<0,05$). No grupo D60 a referida relação foi 13,15% maior do que em C60 ($p<0,05$) e no grupo DS60 foi 26,19% menor do que no CS60 ($p<0,05$) (Fig. 11B).

Na relação entre a densidade neuronal (neurônios/ mm^2) e a razão área nuclear/área citoplasmática (Fig. 12), não houve correlação estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre estas duas variáveis em todos os grupos analisados como segue: C30 ($r=-0,41$, $p=0,49$); C60 ($r=-0,05$, $p=0,94$); CS60 ($r=0,51$, $p=0,38$); D30 ($r=0,45$, $p=0,45$); D60 ($r=-0,56$, $p=0,33$); e DS60 ($r=-0,21$, $p=0,74$) (Fig. 11A-F).

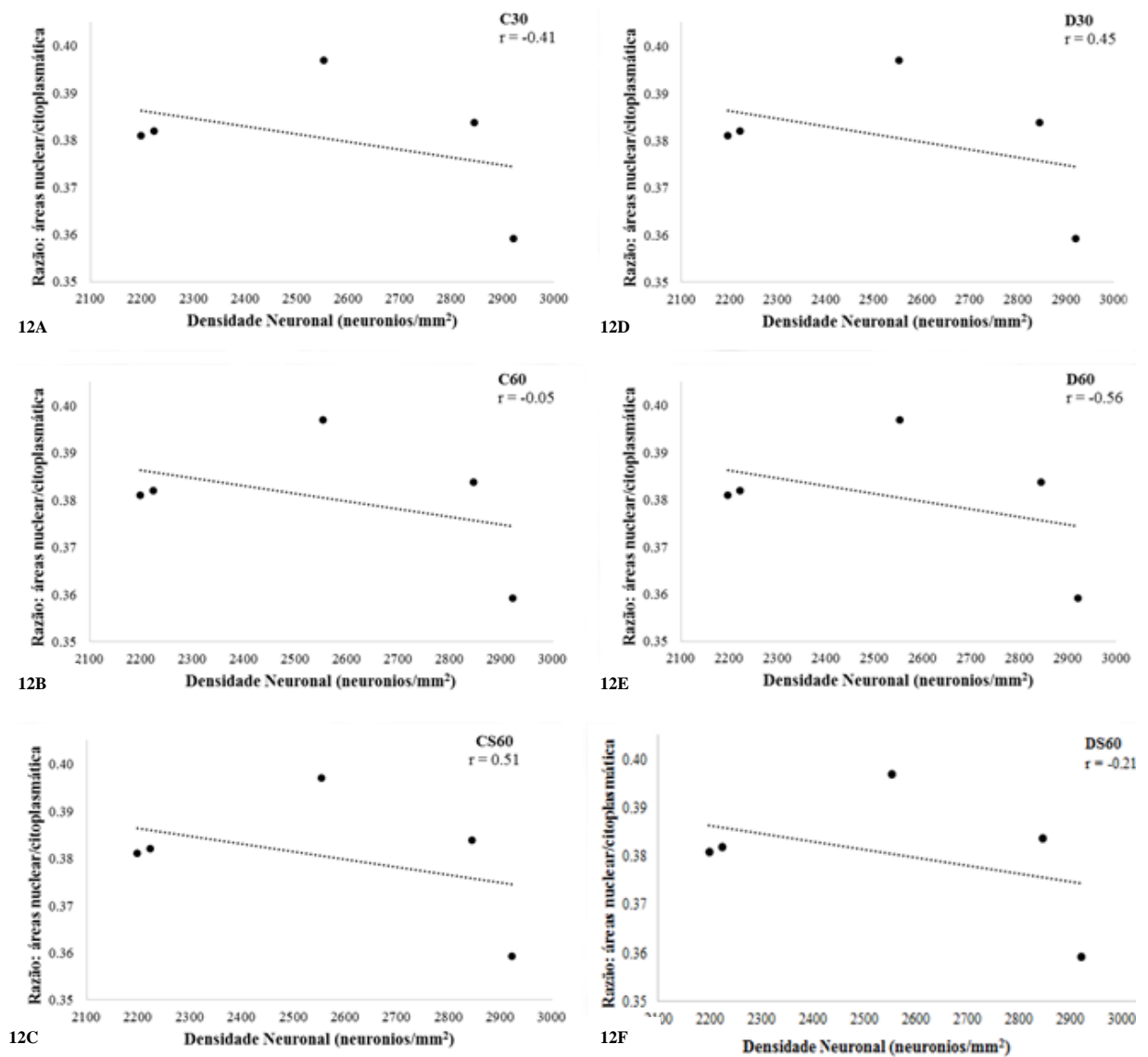


Figura 12: Correlação entre a densidade neuronal e a razão: área nuclear/citoplasmática (μm^2), nos animais dos grupos: *controle* (A: C30, B: C60 e C: CS60) e *mdx* (D: D30, E: D60 e F: DS60). r = coeficiente de Person; p (nível de significância).

4.4 Correlações entre área da túnica muscular, mensurações neuronais e densidade neuronal

A fim de se estabelecer a relação entre as alterações da morfologia da túnica muscular com as constatadas no plexo mioentérico (população neuronal ACHE-r), as correlações entre

a área da túnica muscular ocupada por fibras musculares lisas (μm^2) e a densidade neuronal (neurônios/ mm^2) (Fig. 12A-F) e com a razão área nuclear/área citoplasmática, foram verificadas (Fig. 13A-F).

A correlação entre a densidade neuronal e a área muscular do íleo nos diferentes grupos foi: C30 ($r=0,24$, $p=0,69$); C60 ($r=0,23$, $p=0,71$); CS60 ($r=0,01$, $p=0,98$); D30 ($r=-0,74$, $p=0,15$); D60 ($r=-0,64$, $p=0,25$); e DS60 ($r=-0,02$, $p=0,98$). Em nenhum dos grupos a correlação foi estatisticamente significativa (Fig. 12).

A correlação entre a razão área nuclear/área citoplasmática e a área muscular foi: C30 ($r=-0,94$, $p=0,02$); C60 ($r=-0,11$, $p=0,87$); CS60 ($r=-0,10$, $p=0,88$); D30 ($r=0,14$, $p=0,82$); D60 ($r=-0,27$, $p=0,6$); e DS60 ($r=0,66$, $p=0,22$). Apenas o grupo C30 apresentou diferença estatística significativa ($p<0,05$).

Apesar das correlações entre a área do músculo liso, a densidade neuronal e a razão área nuclear/área citoplasmática não serem estatisticamente significativas ($p<0,05$), os resultados obtidos sugerem significantes interações entre elas, pois entre alguns parâmetros nos grupos estudados houve moderada correlação negativa: a densidade neuronal e a razão área nuclear/área citoplasmática em D60 ($r=-0,56$) (Fig. 11G); correlação negativa moderada entre a densidade neuronal e a área de músculo liso em D30 ($r=-0,74$) (Fig. 13D) e em D60 ($r=-0,64$) (Fig. 13E); e moderada correlação positiva entre a razão área nuclear/área citoplasmática e a área de músculo liso maior em DS60 ($r=0,66$) (Fig. 13F).

Esses resultados indicam que os danos na parede intestinal podem alterar a densidade neuronal e, conseqüentemente, a atividade neuronal observada pela razão área nuclear/área citoplasmática em animais distróficos (grupos D30 e D60), bem como é sugestivo de efeito benéfico, ainda que discreto, da suplementação com AA na manutenção da musculatura intestinal e da população de neurônios ACHE-r em animais distróficos suplementados (grupo DS60).

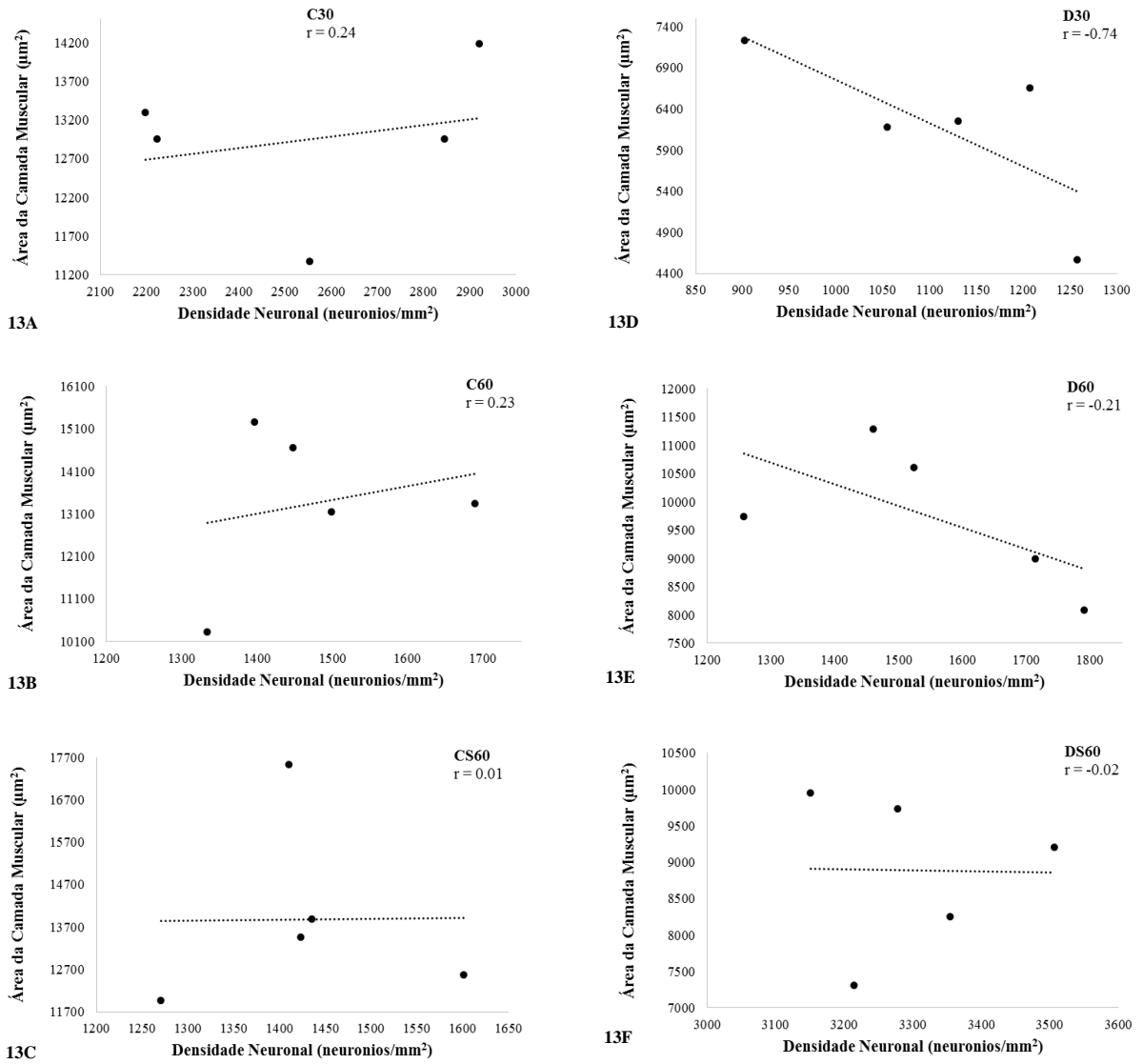


Figura 13: Correlação entre a densidade neuronal e a área da camada muscular (μm^2), nos animais dos grupos: *controle* (A: C30, B: C60 e C: CS60) e *mdx* (D: D30, E: D60 e F: DS60). r = coeficiente de Person; p (nível de significância).

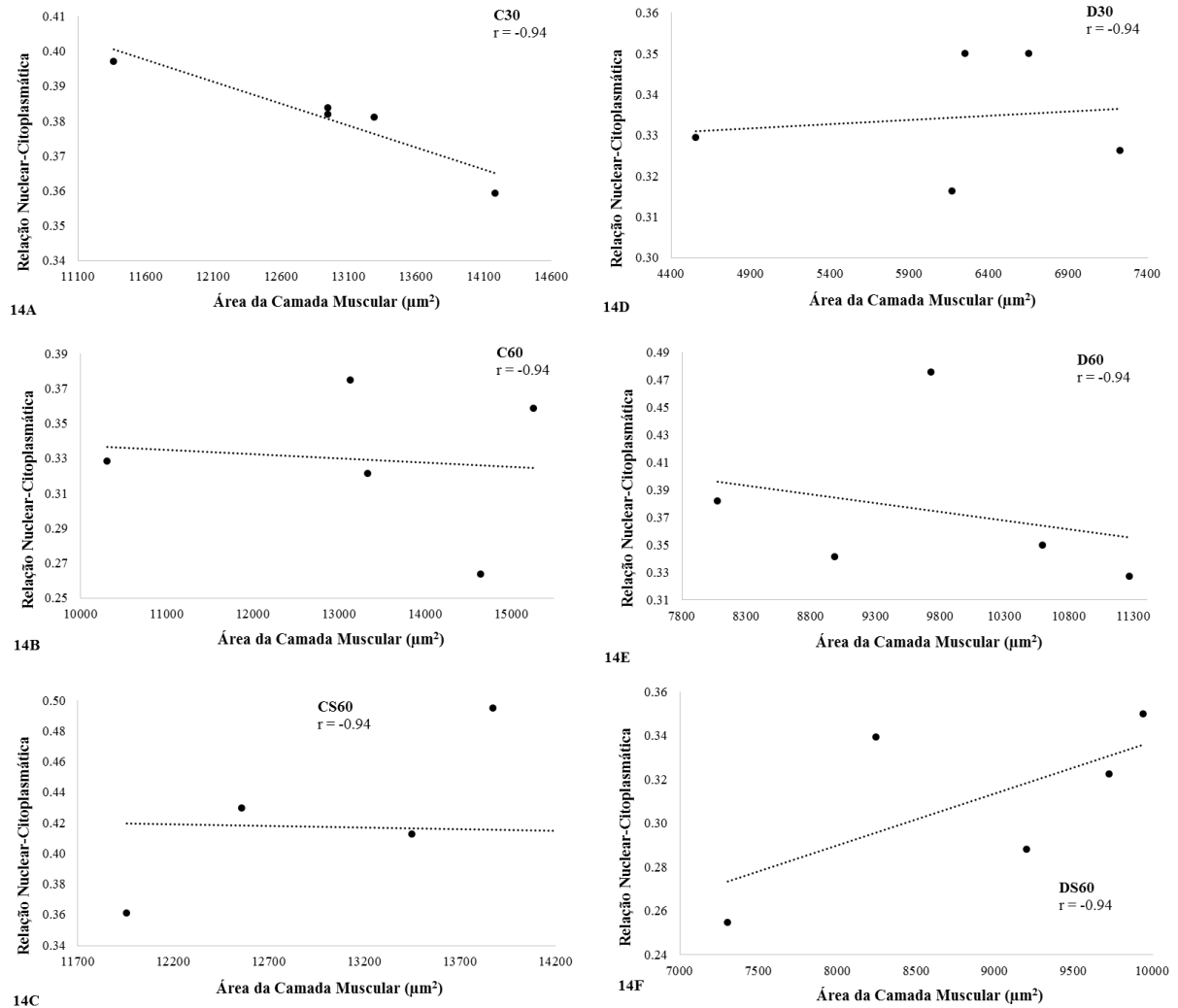


Figura 14: Correlação entre a área da camada muscular (μm^2) e área nuclear: razão da área citoplasmática, nos animais dos grupos: *controle* (A: C30, B: C60 e C: CS60) e *mdx* (D: D30, E: D60 e F: DS60) r = coeficiente de Person; p (nível de significância).

5 DISCUSSÃO

5.1 Peso corporal e área intestinal

O aumento do peso corporal nos animais distróficos (D60) em relação ao controle (C60) evidenciado neste trabalho corrobora os relatos de Blain et al. (2013) no estudo realizado com camundongos de 24 semanas de idade. Duas hipóteses podem justificar este aumento de peso: a existência de diminuição da atividade física em animais distróficos e, conseqüentemente, menor perda de massa muscular (HANKARD et al., 1996) e, semelhantemente como observado em humanos, poderia ocorrer acúmulo de gordura e de tecido conjuntivo nos animais com DMD (DE LUCA, 2012; HOFFMAN; DRESSMAN, 2001; KIM et al., 2013; TERRILL et al., 2013). Porém, a suplementação com AA impediu o aumento de peso dos animais DS60, mantendo-os semelhantes aos animais do grupo C60.

Em relação a área total (cm²) do jejuno-íleo não foram observadas diferenças na área intestinal decorrentes da distrofia muscular ou do tratamento com AA, como também constatado por Mulè, Amato e Serio. (2010).

5.2 Mensurações da parede do íleo

Diminuição da espessura da túnica muscular nos animais distróficos de 30 e 60 dias também foi relatada por Alves et al. (2014) e, segundo estes pesquisadores, esta diminuição poderia levar a alterações na resposta contrátil intestinal. No presente estudo, resultados semelhantes foram encontrados, e a suplementação com AA contribuiu para a melhoria deste parâmetro nos animais DS60 em comparação aos D60.

As alterações musculares observadas em animais distróficos poderiam levar a mudanças do peristaltismo local (AZZENA; MANCINELLI, 1999; MANCINELLI et al., 1995; MULÈ; AMATO; SERIO, 2010; SERIO et al., 2001; WILLIG, 1991).

Na comparação entre animais distróficos e controles foi observada redução da área ocupada por tecido muscular. Opostamente ao descrito por Kornegay et al. (2014), no presente estudo não foram constatados em quaisquer grupos indícios de infiltrado inflamatório ou de fibrose, porém a atrofia muscular também foi encontrada.

Os estudos de Lefaucher; Pastoret; Sebille (1995) não demonstraram alterações nas fibras musculares lisas do TGI de camundongos mdx. Kim et al. (2013) e Brolio et al. (2014) sugerem que, em substituição ao tecido muscular, é possível observar o acúmulo de tecidos

adiposo e conjuntivo, porém os referidos pesquisadores não verificaram fibrose ou outras alterações no íleo em seus estudos.

Em camundongos mdx, Ozawa et al. (1999) relataram alterações morfológicas que caracterizam degeneração muscular a partir da terceira semana de vida.

Alterações dos níveis de Ca^{2+} na musculatura do íleo foram descritas por Alves et al. (2014). Tais alterações podem ocorrer pela ativação de canais iônicos mecanossensíveis (WHITEHEAD et al., 2006; YEUNG et al., 2005) devido ao aumento de EROs ou vice-versa, já que a patogênese da DMD não está esclarecida. Porém, sabe-se que existe a ação conjunta do aumento das EROs e dos níveis alterados de Ca^{2+} com disfunção mitocondrial e falha no metabolismo energético (ALLEN et al., 2010).

5.3 Neurônios ACHE-r do PM

Além da integridade da túnica muscular, outro elemento importante para o funcionamento do intestino é o SNE. Alterações nos componentes do plexo mioentérico localizado entre as camadas circular e longitudinal da túnica muscular do TGI podem aumentar ou diminuir o peristaltismo intestinal (DEMEDTS et al., 2013; FURNESS, 2012; FURNESS et al., 2014; TAMEYASU et al., 2004).

Diferentes neurotransmissores são expressos no plexo mioentérico, entre eles a acetilcolina que estimula a contração da musculatura lisa intestinal (ERICKSON et al., 2014; FUNG et al., 2014; QU et al., 2008).

Por meio da técnica histoquímica da Acetilcolinesterase em preparados totais de membrana (KARNOVISKY; ROOTS, 1964), a população neuronal ACHE-r do plexo mioentérico do íleo que inclui neurônios colinérgicos foi analisada, sendo que nos resultados apresentados não houve diferenças quanto a organização e disposição dos neurônios mioentéricos ACHE-r do íleo em quaisquer grupos analisados. Conforme Gabella (1994) os corpos neuronais apresentavam-se, geralmente, formando gânglios e alguns sendo observados em disposição isolada, e ainda de acordo com Miranda-Neto et al (2001) os filamentos axonais formaram malhas neuronais classificadas como primárias, secundárias e terciárias.

A retração ou a dilatação do tecido ou do órgão, neste caso o intestino, pode influenciar a densidade neuronal. Na retração, os neurônios tendem a ficar menos dispersos aumentando a densidade neuronal/área. O contrário ocorreria com a dilatação ou aumento da área intestinal, permitindo maior dispersão dos neurônios e, conseqüentemente, menor densidade neuronal/área. Como não foram observadas diferenças estatísticas significativas nas

dimensões da área intestinal dos animais sem suplementação que pudessem indicar retração e/ou dilatação do intestino, constatou-se que a distrofia muscular promoveu, na fase inicial de vida dos camundongos mdx (grupo D30), redução da densidade neuronal em relação aos seus controles (grupo C30), bem como, reversão deste quadro nos animais distróficos não suplementados (grupo D60) em comparação aos animais controles (grupo C60).

Em relação ao aumento da área do perfil do corpo celular verificados no grupo DS60 em comparação a D60 e CS60, é possível inferir que isto se deva ao efeito neurotrófico do AA, corroborando com o estudo de Zaroni e De Freitas (2005).

De acordo com Natali e Miranda-Neto (1996), quanto maior a razão área nuclear/área citoplasmática, maior será a atividade celular, pois indica que a célula está em anabolismo. Desta forma, pode-se inferir que os animais dos grupos C30, D60 e CS60 encontravam-se em atividade anabólica maior. Sendo uma possível razão para o aumento anabólico no animais C30 o fato deles serem jovens e ainda não terem atingido a maturidade neuronal (GAGLIARDO; RIBEIRO, 2005), para o grupo D60 é possível que tenha ocorrido como forma de suprir a ocorrência de morte celular (ZANONI et al. 2002) e no grupo CS60, como o AA ativa o metabolismo, pode ter exercido um papel neurotrófico (ZANONI et al. 2005).

5.4 Correlações entre área da túnica muscular, mensurações neuronais e densidade neuronal

Os resultados demonstraram que os danos na parede intestinal podem influenciar a densidade neuronal interferindo na atividade neuronal observada pela razão área nuclear/área citoplasmática em animais distróficos (grupos D30 e D60), como já apresentado, assim como é sugestivo de efeito benéfico, ainda que discreto, da suplementação com AA na manutenção da musculatura intestinal e da população de neurônios ACHE-r em animais distróficos suplementados (grupo DS60).

Entre os neurônios evidenciados pela histoquímica da acetilcolinesterase, encontram-se neurônios colinérgicos que são excitatórios para a musculatura (AL-QUDAH et al., 2014; CHEN et al., 2015; ERICKSON et al., 2014; FUNG et al., 2014; FURNESS, 2012; WILHELM et al., 2015) e, por esta razão, quaisquer alterações nestes poderiam comprometer o peristaltismo local.

Os resultados desta pesquisa indicam que alterações morfológicas na parede intestinal (túnica muscular) e, conseqüentemente, na população neuronal ACHE-r do íleo de camundongos mdx, ocorreram nos animais de 30 dias de idade (grupo D30). As alterações histológicas na musculatura estriada esquelética em camundongos mdx têm início por volta do 18º dia de vida (QUÍRICO-SANTOS et al., 1995), ou em torno da 3ª a 4ª semanas de vida (LEFAUCHEUR; PASTORET; SEBILLE, 1995), corroborando os resultados relatados.

Segundo Grounds (2008), os camundongos mdx apresentam uma fase aguda de manifestações celulares e moleculares da doença por volta da 4ª-6ª semanas de vida, correspondendo, em humanos, à faixa etária dos 10 anos aos 16-18 anos de idade.

Algumas pesquisas fomentam a utilização de antioxidantes como forma de tratamento complementar em camundongos mdx, já que existem indícios de que o estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento dos produtos de oxidação lipídica, diminuição na geração de força e da produção de enzimas ocorrem nestes animais (BORNMAN et al., 1998; BUETLER et al., 2002; PASSAQUIN et al., 2002; PULIDO et al., 1998; WHITEHEAD et al., 2006; WILLIAMS; ALLEN, 2007).

Diversos estudos têm demonstrado os efeitos benéficos no uso de diferentes antioxidantes na proteção dos neurônios dos plexos entéricos em processos naturais e patológicos que envolvam o aumento do estresse oxidativo como, por exemplo, o envelhecimento (KORSAK et al., 2012; MELO et al., 2013; VEIT et al., 2012) e o diabetes mellitus (FERREIRA et al., 2013; LOPES et al., 2012; TRONCHINI et al., 2012).

Em um estudo in vivo, Buetler et al. (2002) e Nakae et al. (2012) evidenciaram diminuição de lesões musculares em camundongos mdx suplementados com antioxidantes derivados do chá verde. O uso da N-Acetilcisteína promoveu a diminuição das lesões na musculatura estriada esquelética (HNIA et al., 2007; WHITEHEAD et al., 2008) e redução de lesões no músculo cardíaco (WILLIAMS; ALLEN, 2007; WHITEHEAD et al., 2008).

Pesquisas relatam que o AA desempenha importante ação na neuroproteção (CLEBIS, 2003; MULÈ et al., 2006; VEIT et al., 2012), neurotransmissão e neuromodulação (CHEN et al., 2012), revertendo os efeitos deletérios do estresse oxidativo (HARRISON et al., 2014) sobre o cérebro (MORETTI et al., 2014) e neurônios mioentéricos do estômago (CLEBIS, 2013), além de importante atuação na maturação e função neuronais (HARRISON; MAY, 2009).

6 CONCLUSÕES

- Em relação a morfologia da túnica muscular do íleo constatamos **indícios de lesões em camundongos mdx de 30 dias**, uma vez que foram observadas:
 - diminuição da espessura da camada muscular;
 - diminuição da área ocupada por músculo liso nos animais D30.
- A densidade neuronal foi menor nos animais distróficos de 30 dias quando comparado ao seu controle.
- A suplementação com **AA teve efeito neuroprotetor** nos animais do grupo DS60, impedindo a perda neuronal constatada nos animais D30.
- A área do perfil do corpo celular foi maior nos animais distróficos de 30 dias e, em DS60 manteve-se semelhante a C60.
- A área nuclear nos animais distróficos foi maior enquanto que a área citoplasmática foi menor no grupo D60 em relação ao seu controle, levando a maior razão área nuclear/área citoplasmática neste grupo.
- Os dados indicam que as **lesões musculares podem influenciar a densidade dos neurônios reativos a acetilcolinesterase**, uma vez que:
 - em animais controle sem suplementação houve correlação positiva moderada entre a densidade neuronal e a área ocupada por músculo liso ($P > 0,05$);
 - enquanto que em animais distróficos sem suplementação esta correlação foi moderada e negativa ($P > 0,05$).
- Esses fatos permitem inferir que a suplementação com AA é benéfica para minimizar os efeitos degenerativos resultantes do DMD em camundongos mdx.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTSMA-RUS, A.; VAN DEUTEKOM, J. C. T.; FOKKEMA, I. F.; VAN OMMEN, G. J.; DEN DUNNEN, J. T. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. **Muscle Nerve**, 34(2):135 – 44, 2006.
- ABDEL-SALAM, E.; ABDEL-MEGUID, I.; KORRAA, S. S. Markers of degeneration and regeneration in Duchenne muscular dystrophy. **Acta Myol**, 28:94-100, 2009.
- AL-QUDAH, M.; ANDERSON, C. D.; MAHAVADI, S.; BRADLEY, Z. L.; AKBARALI, H. I.; MURTHY, K. S.; GRIDER, J. R. Brain-derived neurotrophic factor enhances cholinergic contraction of longitudinal muscle of rabbit intestine via activation of phospholipase C. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 306:328–337, 2014.
- ALLEN, D. G.; GERVASIO, O. L.; YEUNG, E. W.; WHITEHEAD, N. P. Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy. **Can J Physiol Pharmacol**, 88(2):83-91, 2010.
- ALVES, G. A.; SILVA, L. R.; ROSA, E. F.; ABOULAFIA, J.; FREYMULLER-HAAPALAINEN, E.; SOUCCAR, C.; NOUAILHETAS, V. L. Intestine of dystrophic mice presents enhanced contractile resistance to stretching despite morphological impairment. **Am j Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 306:191-199, 2014.
- ARAÚJO, J. M. **Química de alimentos: teoria e prática**. 6ª ed. Viçosa: Editora UFV, 2015. 668p.
- American Speech-Language-Hearing Association. Model Medical Review Guidelines for Dysphagia Services. 2001 FTRP. **Revision to DynCorp**, October 2004.
- AZZENA, G. B.; MANCINELLI, R. Nitric oxide regenerates the normal colonic peristaltic activity in mdx dystrophic mouse. **Neurosci Lett**, 261:9-12, 1999.
- BACCARI, M. C.; CALAMAI, F.; CHIAPPINI, L.; VANNUCCHI, M. G.; BANI, D. Relaxin restores altered ileal spontaneous contractions in dystrophic (mdx) mice. **Ann N Y Acad Sci**, 1041:308-310, 2005.
- BACCARI, M. C.; NISTRI, S.; VANNUCCHI, M. G.; CALAMAI, F.; BANI, D. Reversal by relaxin of altered ileal spontaneous contractions in dystrophic (mdx) mice through a nitric oxide-mediated mechanism. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 293:662–668, 2007.
- BANKS, G. B.; CHAMBERLAIN, J. S. The value of mammalian models for duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. **Curr Top Dev Biol**, 84:431-53, 2008.
- BARBOSA, A. J. A. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, 11:95-7, 1978.
- BAUMGARTNER, M.; RUIZ, D. A. Distrofia muscular de Duchenne (Revisión Bibliográfica). **Revista Medica de Costa Rica y Centroamerica**, 586:315-318, 2008.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Edusp, 241p, 1975.

- BERTHOUD, H. The vagus nerve, food intake and obesity. **Regulatory Peptides**, 149:15-25, 2008.
- BLAIN, A.; GREALLY, E.; LAVAL, S.; BLAMIRE, A.; STRAUB, V.; MACGOWAN, G. A. Beta-blockers, left and right ventricular function, and in-vivo calcium influx in muscular dystrophy cardiomyopathy. **PLoS One**, 8: e57260 , 2013.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2003. 238p.
- BODENSTEINER, J. B.; ENGEL, A. G. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. **Neurology**, 28(5):439-439, 1978.
- 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. **Pediatr Neurol**, 14:7-12, 1996.
- BORNMAN, L.; ROSSOUW, H.; GERICKE, G. S.; POLLA, B. S. Effects of iron deprivation on the pathology and stress protein expression in murine Xlinked muscular dystrophy. **Biochem Pharmacol**, 56:751-7,1998.
- BOWMAN, G. L. Ascorbic acid, cognitive function, and Alzheimer's disease: a current review and future direction. **Biofactors**, 38(2):114-122, 2012.
- BRIDGES, L. R. The association of cardiac muscle necrosis and inflammation with the degenerative and persistent myopathy of MDX mice. **J Neurol Sci**, 72 (2-3):147-57, 1986.
- BROLIO, M. P.; CIMA, D. S.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E. Histological comparison of the smooth uterine muscle of healthy golden retriever bitches, carriers of the progressive muscular dystrophy (GRMD) gene, and GRMD-affected bitches. **Anim Reprod Sci**, 150: 56-61, 2014.
- BROOKES, P. S.; YOON, Y.; ROBOTHAM, J. L.; ANDERS, M. W.; SHEU, S. S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **Am J Physiol Cell Physiol**, 287:817-833, 2004.
- BUEHNER, M.; PAMPLIN, J.; STUDER, L.; HUGHES, R. L.; KING, B. T.; GRAYBILL, J. C.; CHUNG, K. K. Oxalate Nephropathy After Continuous Infusion of High-Dose Vitamin C as an Adjunct to Burn Resuscitation. **J Burn Care Res**, 2015.
- BUYSE, G. M.; GOEMANS, N.; VAN DEN HAUWE, M.; THIJS, D.; DE GROOT, I.J.; SCHARA, U.; CEULEMANS, B.; MEIER, T.; MERTENS, L. Idebenone as a novel, therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy: results from a 12 month, double-blind, randomized placebo-controlled trial. **Neuromuscul Disord**, 21(6):396-405, 2011.
- BUSHBY, K.; MUNTONI, F.; BOURKE, J. P. 107th ENMC international workshop: the management of cardiac involvement in muscular dystrophy and myotonic dystrophy. 7th-9th June 2002, Naarden, the Netherlands. **Neuromuscul Disord**, 13(2): 166-72, 2003.
- BUSHBY, K.; FINKEL, R.; BIRNKRANT, D. J.; CASE, L. E.; CLEMENS, P. R.; CRIPE, L.; KAUL, A.; KINNETT, K.; MCDONALD, C.; PANDYA, S.; POYSKY, J.; SHAPIRO, F.; TOMEZSKO, J.; CONSTANTIN, C. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. **Lancet Neurol**, 9 (1): 77-93, 2010.

- 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. **Am J Clin Nutr**, 75: 749–53, 2002.
- BULFIELD, G.; SILLER, W. G.; WIGHT, P.A.; MOORE, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. **Proc Natl Acad Sci**, 81:1189–1192, 1984.
- CHAMBERLAIN, J. S.; METZGER, J.; REYES, M.; TOWNSEND, D.; FAULKNER, J. A. Dystrophin-deficient *mdx* mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. **FASEB J**, 21:2195-2204, 2007.
- CHEN, Y.; CURRAN, C. P.; NEBERT, D. W.; PATEL, K. V.; WILLIAMS, M. T.; VORHEES, C. V. Effect of vitamin C deficiency during postnatal development on adult behavior: functional phenotype of *Gulo*^{-/-} knockout mice. **Genes Brain Behav**, 11(3):269-77, 2012.
- CHEN, D.; XIONG, Y.; LIN, Y.; TANG, Z.; WANG, J.; WANG, L.; YAO, J. Capsaicin alleviates abnormal intestinal motility through regulation of enteric motor neurons and MLCK activity: Relevance to intestinal motility disorders. **Mol. Nutr. Food Res**, 0:1-9, 2015.
- CLEBIS, N. K. **Avaliação quantitativa e morfométrica dos neurônios mioentéricos nadh-diaforase reativos do estômago de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e suplementados com ácido ascórbico**. Dissertação (mestrado). São paulo: Universidade de São Paulo; 2003.
- CLEBIS, N. K. **Influência da atividade física sobre o envelhecimento inicial do plexo mioentérico do jejuno em ratos Wistar**. Tese (Doutorado). São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2006.
- CLEBIS, N. K.; ZANONI, J. N.; STABILLE, S. R.; LISBOA, M. J. S.; OLIVEIRA, M. F. P.; MOLINARI, S. L.; MIRANDA-NETO, M. H.; GAGLIARDO, K. M.; SOUZA, R. R. Efeitos da suplementação com ácido ascórbico sobre os neurônios mioentéricos do estômago de ratos diabéticos. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, 17(3): 175-181, 2013.
- COSTA, M.; SIMON, F. A. A.; BROOKS, J. H. The enteric nervous system. **The American Journal of Gastroenterology**, 89 (8): 125-137, 1994.
- CUDNY, D. Delayed mental development and peculiar shape of the base of the skull and of the occlusion in boys with Duchenne's muscular dystrophy. **Czasopismo Stomatologiczne**, 31: 565–69, 1978.
- DE ARAUJO LEITÃO, A. V.; DURO, L. A.; DE ANDRADE PENQUE, G. M. Progressive muscular dystrophy--Duchenne type. Controversies of the kinesitherapy treatment. **Sao Paulo Med J.**, 113(5):995-9, 1995.
- DE LUCA, A. Pre-clinical drug tests in the *mdx* mouse as a model of dystrophinopathies: an overview. **Acta Myol**, 31:40-7, 2012.
- DEMEDTS, I.; MASAOKA, T.; KINDT, S.; DE HERTOOGH, G.; GEBOES, K.; FARRÉ, R.; VANDEN BERGHE, P.; TACK, J. Gastrointestinal motility changes and myenteric plexus alterations in spontaneously diabetic biobreeding rats. **J Neurogastroenterol Motil**, 19:161-70, 2013.
- DISATNIK, M. L.; CHAMBERLAIN, J. S.; RANDO, T. A. Dystrophin mutations predict cellular susceptibility to oxidative stress. **Muscle Nerve**, 23: 784–792, 2000.

- EAGLE, M.; BAUDOUIN, S. V.; CHANDLER, C.; GIDDINGS, D. R.; BULLOCK, R.; BUSHBY, K. Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. **Neuromuscul Disord**, 12(10): 926–9, 2002.
- ECKARDT, L.; HARZER, W. Facial structure and functional findings in patients with progressive muscular dystrophy (Duchenne). **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, 110: 185–190, 1996.
- ERICKSON, C. S.; LEE, S. J.; BARLOW-ANACKER, A. J.; DRUCKENBROD, N. R.; EPSTEIN, M. L.; GOSAIN, A. Appearance of cholinergic myenteric neurons during enteric nervous system development: comparison of different ChAT fluorescent mouse reporter lines. **Neurogastroenterol Motil**, 26:874-84, 2014.
- ERVASTI, J. M.; CAMPBELL, K. P. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. **Cell**, 66(6):1121-31, 1991.
- FERREIRA, D.; ROCHA, H. C.; KREUTZ, L. C.; LORO, V. L.; MARQUEZE, A.; KOAKOSKI, G.; DA ROSA, J. G.; GUSSO, D.; OLIVEIRA, T. A.; DE ABREU, M. S.; BARCELLOS, L. J. Bee products prevent agrichemical-induced oxidative damage in fish. **PLoS One**, 8:e74499, 2013.
- FUNG, C.; UNTERWEGER, P.; PARRY, L. J.; BORNSTEIN, J. C.; FOONG, J. P. P. VPAC1 receptors regulate intestinal secretion and muscle contractility by activating cholinergic neurons in guinea pig jejunum. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver**, 306:748-758, 2014.
- FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional**. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
- FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **Journal of the Autonomic Nervous System**. v. 81, pp. 87-96, 2000.
- FURNESS, J. B. **The enteric nervous system**. John Wiley & Sons, 2008.
- FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, 6;9(5):286-94, 2012.
- FURNESS, J. B.; CALLAGHAN, B. P.; RIVEIRA, L. R.; CHO, H. The Enteric Nervous System and Gastrointestinal Innervation: Integrated Local and Central Control. **Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease Advances in Experimental Medicine and Biology**, 817:39-71, 2014.
- GABELLA, G. **Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract**. In: **JONHNSON, L. D. Physiology of the gastrointestinal tract**. 3 ed. New York: Raven Press, 1994. p.381-422.
- GAGLIARDO, K. M.; RIBEIRO, A. A. C. M. Estudo morfométrico dos neurônios do gânglio mesentérico caudal de cães durante o desenvolvimento pós-natal (maturação e envelhecimento). **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, 43(1): 57-64, 2005.
- GASCHEN, F.; GASCHEN, L.; SEILER, G.; WELLE, M.; BORNAND JAUNIN, V.; GONIN JMAA, D.; NEIGER-AESCHBACHER, G.; ADÉ-DAMILANO, M. Lethal peracute rhabdomyolysis associated with stress and general anesthesia in three dystrophin-deficient cats. **Veterinary Pathology Online**, 35(2): 117-123, 1998.

- GESS, B.; RÖHR, D.; YOUNG, P. Ascorbic Acid and Sodium-Dependent Vitamin C Transporters in the Peripheral Nervous System: From Basic Science to Clinical Trials. **Antioxidants & Redox Signaling**, 19(17): 2105-2114, 2013.
- GHAFFARI, J.; COWIN, D. H. Condilar cartilage in the muscular dystrophic mouse. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, 95; 107-14, 1989.
- GODIN, R.; DAUSSIN, F.; MATECKI, S.; LI, T.; PETROF, B. J.; BURELLE, Y. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator1- gene α transfer restores mitochondrial biomass and improves mitochondrial calcium handling in post-necrotic mdx mouse skeletal muscle. **J Physiol**, (21): 5487-502, 2012.
- GROUNDS, M. D. Two-tiered hypotheses for Duchenne muscular dystrophy. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 65(11): 1621-1625, 2008.
- GUIDO, A. N.; ROCHA CAMPOS, G. E.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M. J.; MINATEL, E. Fiber Type Composition of the Sternomastoid and Diaphragm Muscles of DystrophinDeficient mdx Mice. **Anatomical RecordAdvances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, 293(10): 1722-1728, 2010.
- GUNDERSEN, H. J.; JENSEN, E. B.; KIEU, K.; NIELSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology – reconsidered. **J Microsc**, 193:199–211, 1999.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002.
- 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. **Pediatr Res**, 40:29-33, 1996.
- HARRISON, F. E.; BOWMAN, G. L.; POLIDORI, M. C. Ascorbic Acid and the Brain: Rationale for the Use against Cognitive Decline. **Nutrients**, 6(4): 1752-1781, 2014.
- HARRISON, F. E.; MAY, J. M. Vitamin C Function in the Brain: Vital Role of the Ascorbate Transporter (SVCT2). **Free Radic Biol Med**, 46(6): 719–730, 2009.
- HARRISON, F. E.; YU, S. S.; VAN DEN BOSSCHE, K. L.; LI, L.; MAY, J. M.; MCDONALD, M. P. Elevated oxidative stress and sensorimotor deficits but normal cognition in mice that cannot synthesize ascorbic acid. **J Neurochem**, 106(3):1198-208, 2008.
- HEVIA, E. M. Instituto del Metabolismo Celular. Vitamina C. Miércoles, 2011. Disponível em: <<http://www.metabolismo.biz/web/vitamina-c/>>. Acesso em: 18 mai 2015.
- 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 dystrophin-deficient mdx mice. **Am J Pathol**, 170:633-643, 2007.
- HOLLINGER, K.; YANG, C. X.; MONTZ, R. E.; NONNEMAN, D.; ROSS, J. W.; SELSBY, J. T. Dystrophin insufficiency causes selective muscle histopathology and loss of dystrophin-glycoprotein complex assembly in pig skeletal muscle. **The FASEB Journal**, 28(4): 1600-1609, 2014.
- HOFFMAN, E.P.; BROWN, R.H. Jr.; KUNKEL, L.M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, 51(6): 919–28, 1987.

JAZEDJE, T., SECCO, M., VIEIRA, N.M., ZUCCONI, E., GOLLOP, T.R., VAINZOF, M., ZATZ, M. Stem cells from umbilical cord blood do have myogenic potential, with and without differentiation induction in vitro. **J Transl Med**, 14:7:16, 2009.

JUNG, C., MARTINS, A. S., NIGGLI, E., SHIROKOVA, N. Dystrophic cardiomyopathy: amplification of cellular damage by Ca²⁺ signalling and reactive oxygen species-generating pathways. **Cardiovascular Research**, 77: 766–773, 2008.

JUNQUEIRA, L. C. U., BIGNOLAS, G., BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy – a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**, 11:447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. 1ª ed. São Paulo: Livraria Santos, 1983.

KARNOVSKY, M. J.; ROOTS, L. A. "DIRECT-COLORING" THIOCHOLINE METHOD FOR CHOLINESTERASES. **J Histochem Cytochem**, 12:219-21, 1964.

KERKIS, I.; AMBROSIO, C. E.; KERKIS, A.; MARTINS, D.S.; ZUCCONI, E.; FONSECA, S. A.; CABRAL, R. M.; MARANDUBA, C. M.; GAIAD, T. P.; MORINI, A. C.; VIEIRA, N. M.; BROLIO, M. P.; SANT'ANNA, O. A.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? **J Transl Med**, 3:6-35, 2008.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KIM, J. H.; KWAK, H. B.; THOMPSON, L. V.; LAWLER, J. M. Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy. **Journal of muscle research and cell motility**, 34:1-13, 2013.

KOENIG, M.; HOFFMAN, E. P.; BERTELSON, C. J.; MONACO, A. P.; FEENER, C.; KUNKEL, L. M. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. **Cell**, 50 (3): 509–17, 1987.

KORNEGAY, J. N.; SPURNEY, C. F.; NGHIEM, P. P.; BRINKMEYER-LANGFORD, C. L.; HOFFMAN, E. P.; NAGARAJU, K. Pharmacologic Management of Duchenne Muscular Dystrophy: Target Identification and Preclinical Trials **ILAR J.**, 55(1): 119–149, 2014.

KORSAK, K.; DOLATSHAD, N. F.; SILVA, A. T.; SAFFREY, M. J. Ageing of enteric neurons: oxidative stress, neurotrophic factors and antioxidant enzymes. **Chem Cent J**, 6:80, 2012.

KUO, P.; RAYNER, C.K.; HOROWITZ, M. Gastric Emptying, Diabetes, and Aging. **Clin Geriatr Med**, 23: 785-808, 2007.

KUTSKY, R. J. **Handbook of vitamins, minerals and hormones**. 2.ed. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1981. 492p.

LAI, Y., THOMAS, G. D., YUE, Y., YANG, H. T., LI, D., LONG, C., BOSTICK, L. J., CHAMBERLAIN, J. S., TERJUNG, R. L., DUAN, D. Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. **J Clin Invest**, 119:624–635, 2009.

LAWLER, J. M. Exacerbação da patologia por estresse oxidativo em músculos respiratórios

- e locomotores com distrofia muscular de Duchenne. **J Physiol**, 589 (9): 2161-70, 2011.
- LEFAUCHEUR, J. P.; PASTORET, C.; SEBILLE, A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. **Anat Rec**, 242(1):70-6, 1995.
- LENT, Roberto. **Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociência**. 2^a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.
- LEVINE, M.; PADAYATTY, S. J.; ESPEY, M. G. Vitamin C: a concentration-function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries. **Adv Nutr**, 2(2):78-88, 2011.
- LLEWELLYN-SMITH, I J.; FURNESS, J. B.; WILSON, A. J.; COSTA, M. Organization and fine structure of enteric ganglia. In: ELEVIN, L. **Autonomic ganglia**, 145-182, 1983.
- LOPES, C. R. P.; FERREIRA, P. E. B.; ZANONI, J. N.; ALVES, A. M. P.; ALVES, E. P. B.; BUTTOW, N. C. Neuroprotective Effect of Quercetin on the Duodenum Enteric Nervous System of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Digestive Diseases and Sciences**, 57:3106-3115, 2012.
- MACHADO, A. B. M.; HAERTEL, L. M. **Neuroanatomia funcional**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014.
- MANCINELLI, R.; TONALI, P.; SERVIDEI, S.; AZZENA, G.B. Analysis of peristaltic reflex in young mdx dystrophic mice. **Neurosci Lett.**, 192: 57-60, 1995.
- MANDL, J.; SZARKA, A.; BÁNHEGYI, G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. **Br J Pharmacol**, 157(7): 1097–1110, 2009.
- MANNING, J.; O'MALLEY, D. What has the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy contributed to our understanding of this disease? **J Muscle Res Cell Motil**, Feb 11, 2015.
- MATSUMURA, K., CAMPBELL, K. P. Dystrophin-glycoprotein complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. **Muscle Nerve**, 17: 2–15, 1994.
- MATSUYUKI, T., KITAHARA, T., NAKASHIMA, A. Developmental changes in craniofacial morphology in subjects with Duchenne muscular dystrophy. **European Journal of Orthodontics**, 28: 42–50, 2006.
- MAY, J. M. Vitamin C transport and its role in the central nervous system. **Subcell Biochem.**, 56:85-103, 2012.
- MAY, J. M.; QU, Z.; MEREDITH, M. E. Mechanisms of ascorbic acid stimulation of norepinephrine synthesis in neuronal cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 426: 148–152, 2012.
- McARDCE A., EDWARDS, R. H. T.; JACKSON, M. J. How does dystrophin deficiency lead to muscle degeneration? – Evidence from the *mdx* mouse. **Neuromusc Disord**, 5:445–456, 1995.
- MELO, J. U.; MELO, R. B.; SANTOS, J. M.; CAMPOS JÚNIOR, M. M.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. Effects of bioflavonoid ternatin on liver regeneration and oxidative stress in rats. **Acta Cir Bras**, 28:435-40, 2013.
- MIRANDA-NETO, M. H.; MOLINARI, S. L.; NATALI, M. R. M.; SANT'ANA, D. M. G. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of de ileum of rats. **Arq. Neuropsiquiatr**, 59(1): 54-59, 2001.

- MIYATAKE, M.; MIIKE, T.; ZHAO, J. E.; YOSHIOKA, K.; UCHINO, M.; USUKU, G. Dystrophin: localization and presumed function. **Muscle Nerve**, 14(2): 113-9, 1991.
- MOREIRA, N. M.; HERMES, C.; ALMEIDA, C. S. L.; SANTANA, E. C.; SANT'ANA, D. M. G.; ARAÚJO, E. J. A. Quantitative analysis of the neurons from the myenteric plexus in the ileum of rats submitted to severe protein deficiency. **Arq Neuropsiquiatr**, 66: 242-245, 2008.
- MORETTI, M.; COLLA, A.; BALEN, G. O.; DOS SANTOS, D. B.; BUDNI, J.; DE FREITAS, A. E.; FARINA, M.; RODRIGUES, A. L. S. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of Psychiatric Research**, 46(3): 331-340, 2012.
- MULÈ, F., AMATO, A., SERIO, R. Gastric emptying, small intestinal transit and fecal output in dystrophic (mdx) mice. **J Physiol Sci**, 60: 75-79, 2010.
- MULÈ, F., AMATO, A., VANNUCCHI, M. G., FAUSSONE-PELLEGRINI, M. S., SERIO, R. Altered tachykinergic influence on gastric mechanical activity in mdx mice. **Neurogastroenterology & Motility**, 18(9), 844-852, 2006.
- NAKAE, Y.; DORCHIES, O. M.; STOWARD, P. J.; ZIMMERMANN, B. F.; RITTER, C.; RUEGG, U. T. Quantitative evaluation of the beneficial effects in the mdx mouse of epigallocatechin gallate, an antioxidant polyphenol from green tea. **Histochem Cell Biol**, 137(6):811-27, 2012.
- NAKAMURA, A.; TAKEDA, S. Mammalian models of Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. **J Biomed Biotechnol**, 1-8, 2011.
- NATALI, M. R. M.; MIRANDA-NETO, M. H. Effects of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of duodenum of rats. **Arquivos de Neuropsiquiatria** 54:273-279, 1996.
- NUALART, F.; SALAZAR, K.; OYARCE, K.; CISTERNAS, P.; JARA, N.; SILVA-ÁLVAREZ, C.; PASTOR, P.; MARTÍNEZ, F.; GARCÍA, A.; GARCÍA-ROBLES, M. L.; TAPIA, J. C. Typical and atypical stem cells in the brain, vitamin C effect and neuropathology. **Biol Res**, 45(3):243-56, 2012.
- OZAWA, E.; HAGIWARA, Y.; YOSHIDA, M. Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 31:143-151, 1999.
- PAGANINI-HILL, A.; KAWAS, C. H.; CORRADA, M. M. Antioxidant vitamin intake and mortality: the Leisure World Cohort Study. **Am J Epidemiol**, 181(2):120-6, 2015.
- PANE, M., VASTA, I., MESSINA, S., SORLETI, D., ALOYSIUS, A., SCIARRA, F., MANGIOLA, F., KINALI, M., RICCI, E., MERCURI, E. Feeding problems and weight gain in Duchenne muscular dystrophy. **Eur J Paediatr Neurol**, 10: 231-236, 2006.
- PASSAQUIN, A. C.; RENARD, M.; KAY, L., CHALLET, C., MOKTHARIAN, A., WALLIMANN, T., RUEGG, U. T. Creatine supplementation reduces skeletal muscle degeneration and enhances mitochondrial function in *mdx* mice. **Neuromuscul Disord**, 12: 174-82, 2002.
- PENARROCHA, M., BAGAN, J. V., VILCHEZ, J., MILLIAN, MA. FERNANDOZ, S. Oral alterations in Steinert's myotonic dystrophy: a presentation of two cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, 69: 698-700, 1990.

- PETERKOFISKY, B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. **Am J Clin Nutr**, 54(6):1135S–1140S, 1991.
- PHILLIPS, R. J.; POWLEY, T. L. Innervation of the gastrointestinal tract: Patterns of aging. **Auton Neurosci**, 136: 1-19, 2007.
- PHILLIPS, R.J.; RHODES, B.S.; POWLEY, T.L. Effects of age on sympathetic innervations of the myenteric plexus and gastrointestinal smooth muscle of Fischer 344 rats. **Anat Embryol (Berl)**, 211: 673-683, 2006.
- PILGRAM, G. S. K., POTIKANOND, S., BAINES, R. A., FRADKIN, L. G., NOORDERMEER, J.N. The Roles of the Dystrophin-Associated Glycoprotein Complex at the Synapse. **Mol Neurobiol**, 41:1–21, 2010.
- PLANTIE, E.; MIGOCKA-PATRZALEK, M.; DACZEWSKA, M.; JAGLA, K. Model Organisms in the Fight against Muscular Dystrophy: Lessons from Drosophila and Zebrafish. **Molecules**, 20 (4): 6237-6253, 2015.
- PULIDO, S. M.; PASSAQUIN, A. C.; LEIJENDEKKER, W. J.; CHALLET, C.; WALLIMANN, T.; RUEGG, U. T. Creatine supplementation improves intracellular Ca²⁺ handling and survival in *mdx* skeletal muscle cells. **FEBS Lett**, 439: 357–62, 1998.
- QU, Z. D.; THACKER, M.; CASTELUCCI, P.; BAGYÁNSZKI, M.; EPSTEIN, M. L.; FURNESS, J. B. Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. **Cell and tissue research**, 334:147–161, 2008.
- QUÍRICO-SANTOS, T.; RIBEIRO-CARVALHO, M. M.; SAVINO, W. Increased deposition of extracellular matrix components in the thymus gland of mdx mouse: correlation with the muscular lesion. **Journal of Neuroimmunology**, 59(1-2): 9-18, 1995.
- RAHBEK, J.; WERGE, B.; MADSEN, A.; MARQUARDT, J.; STEFFENSEN, B. F.; JEPPESEN, J. Adult life with Duchenne muscular dystrophy: observations among an emerging and unforeseen patient population. **Pediatr Rehabil**, 8(1): 17–28, 2005.
- RANDO, T. A. Oxidative stress and the pathogenesis of muscular dystrophies. **Am J Phys Med Rehabil**, 81: 175–186, 2002.
- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas. Em correlação com a biologia celular e molecular**. 5ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- RUEGG, U. T. Pharmacological prospects in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. **Current Opinion in Neurology**, 26(5): 577–584, 2013.
- SAGRADO, E.; LOLI, C., PEREIRA, J. N. B.; GUIMARÃES, J. P.; MARI, R. B. de. Influência do envelhecimento sobre a densidade de neurônios mioentéricos naph-diafore positivo do duodeno de ratos. **Arq Ciênc. Saúde Unipar**, 16(1), 27-31, 2012.
- SADOULET-PUCCIO, H. M.; KUNKEL, L. M. Dystrophin and its isoforms. **Brain Pathol**, 6(1): 25-35, 1996.
- SCHERER-SINGLER, U.; VICENT, S. R.; KIMURA, H.; MCGEER, E. G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. **J Neurosci Methods**, 9:229-234, 1983.
- SEIXAS, S. L.; LAGROTA-CÂNDIDO, J.; SAVINO, W.; QUIRICO-SANTOS, T. Importância do camundongo mdx na fisiopatologia da distrofia muscular de Duchenne. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, 55(3B), 610-617, 1997.

- SERIO, R.; BONVISSUTO, F.; MULÈ, F. Altered electrical activity in colonic smooth muscle cells from dystrophic (mdx) mice. **Neurogastroenterol Motil**, 13:169-175, 2001.
- SICILIANO, G.; VOLPI, L.; PIAZZA, S.; RICCI, G.; MANCUSO, M.; MURRI, L. Functional diagnostics in mitochondrial diseases. **Biosci Rep**, 27:53–67, 2007.
- SICINSKI, P.; GENG, Y.; RYDER-COOK, A. S.; BARNARD, E. A.; DARLISON, M. G.; BARNARD, P. J. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdxmouse: a point mutation. **Science**, 244(4912): 1578-80, 1989.
- SMITH, B. F.; YUE, Y.; WOODS, P. R.; KORNEGAY, J. N.; SHIN, J. H.; WILLIAMS, R. R.; DUAN, D. An intronic LINE-1 element insertion in the dystrophin gene aborts dystrophin expression and results in Duchenne-like muscular dystrophy in the corgi breed. **Laboratory investigation**, 91(2): 216-231, 2011.
- SOTO, A.D. Nutrición en el anciano: necesidades nutricionales. In: CONGRESO LATINO AMERICANO DE NUTRICIONISTAS DIETISTAS, 9., 1992, La Paz, Bolivia. **Libro de Resúmenes**. La Paz, Bolivia, 1992. p.88-94.
- SPURNEY, C. F.; GORDISH-DRESSMAN, H.; GUERRON, A. D.; SALI, A.; PANDEY, G. S.; RAWAT, R.; NAGARAJU, K. Preclinical drug trials in the mdx mouse: assessment of reliable and sensitive outcome measures. **Muscle & nerve**, 39(5): 591-602, 2009.
- STERNINI, C. Strutral and chemical organization of the myenteric plexus. **Annals Review Physiology**, 50: 81-93, 1988.
- 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. **Jpn J Physiol**, 54:555-566, 2004.
- TERRILL, J. R.; BOYATZIS, A.; GROUNDS, M. D.; ARTHUR, P. G. Treatment with the cysteine precursor 1-2-oxothiazolidine-4-carboxylate (OTC) implicates taurine deficiency in severity of dystropathology in mdx mice. **Int J Biochem Cell Biol**, 45:2097-2108, 2013.
- TINSLEY, J.; BLAKE, D. J.; ZUELLIG, R. A.; DAVIES, K.E. Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. **Proc Natl Acad Sci**, 91: 8307–8313, 1994.
- THRASIVOULOU, C.; SOUBEYRE, V.; RIDHA, H.; GIULIANE, D.; GIARONI, C.; MICHAEL, G. J.; SAFFREY, M. J.; COWEN, T. Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. **Ageing Cell**, 5: 247-257, 2006.
- TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histología normal e patológica**. 2ª ed. Barueri, SP: Manole, 2003.
- TONON, E.; FERRETTI, R.; SHIRATORI, J. H.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M. J.; MINATEL, E. Ascorbic acid protects the diaphragm muscle against myonecrosis in mdxmice. **Nutrition**, 28(6): 686-690, 2012.
- TROISE, D.; YONEYAMA, S.; RESENDE, M. B.; REED, U.; XAVIER, G. F.; HASUE, R. The influence of visual and tactile perception on hand control in children with Duchenne muscular dystrophy. **Developmental Medicine & Child Neurology**, 56(9): 882–887, 2014.
- TRONCHINI, E. A.; TREVIZAN, A. R.; TASHIMA, C. M.; PEREIRA, R. V.; ZANONI, J. N. Supplementation with 0.1% and 2% vitamin E in diabetic rats: analysis of myenteric neurons immunostained for myosin-V and nNOS in the jejunum. **Arq Gastroenterol**, 49: 284-90, 2012.

- UEKI, K.; NAKAGAWA, K.; YAMAMOTO, E. Bite force and maxillofacial morphology in patients with Duchenne-type muscular dystrophy. **J Oral Maxillofac Surg**, 65 (1): 34-39, 2007.
- VAN PUTTEN, M.; YOUNG, C.; VAN DEN BERG, S.; PRONK, A.; HULSKER, M.; KARNAOUKH, T. G.; VERMUE, R.; VAN DIJK, K. W.; DE KIMPE, S.; AARTSMARUS, A. Preclinical studies on intestinal administration of antisense oligonucleotides as a model for oral delivery for treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. **Molecular Therapy—Nucleic Acids**, 3, e211, 2014.
- VEIT, A. P.; ZANONI, J. N. Age-related changes in myosin-V myenteric neurons, CGRP and VIP immunoreactivity in the ileum of rats supplemented with ascorbic acid. **Histology and histopathology**, 27 (1): 123-132, 2012.
- VOISIN, V.; DE LA PORTE, S. Therapeutic strategies for Duchenne and Becker dystrophies. **Int Rev Cytol**, 240:1-30, 2004.
- WANG, B.; LI, J.; XIAO, X. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97(25): 13714-9, 2000.
- WHITEHEAD, N. P.; PHAM, C.; GERVASIO, O. L.; ALLEN, D. G. N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. **J Physiol**, 586.7: 2003-2014, 2008.
- 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**, 33, 657-662, 2006.
- WILHELM, M.; LAWRENCE, J. J.; GÁBRIEL, R. Enteric plexuses of two choline-acetyltransferase transgenic mouse lines: Chemical neuroanatomy of the fluorescent protein-expressing nerve cells. **Brain Research Bulletin**, 111:76–83, 2015.
- WILLIAMS, I. A.; ALLEN, D. G. The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-deficient mdx mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 293: 1969-1977, 2007.
- WILLIG, T.N. Gastroenterologie et maladies neuromusculaires. **Med Chir Dig**, 20: 337-338, 1991.
- WILLMANN, R.; DE LUCA, A.; BENATAR, M.; GROUNDS, M.; DUBACH, J.; RAYMACKERS, J. M.; NAGARAJU, K. Enhancing translation: guidelines for standard pre-clinical experiments in mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, 22(1): 43-49, 2012.
- WOODDELL, C. I.; ZHANG, G.; GRIFFIN, J. B.; HEGGE, J. O.; HUSS, T.; WOLFF, J. A. Use of evans blue dye to compare limb muscles in exercised young and old mdx mice. **Muscle Nerve**, 41: 487–499, 2010.
- WORTON, R. Muscular dystrophies: Diseases of the dystrophin-glycoprotein complex. **Science**, 270(5237):755-756, 1995.
- YAMAMOTO, T.; HIROI, A.; OSAWA, M.; SHIBATA, N. The muscular dystrophies associated with central nervous system lesions: a brief review from a standpoint of the localization and function of causative genes. **Curr Pediatr Rev**, 10(4): 282-91, 2014.
- YEUNG, E. W.; WHITEHEAD, N. P.; SUCHYNA, T. M.; GOTTLIEB, P. A.; SACHS, F.; ALLEN, D. G. Effects of stretch-activated channel blockers on $[Ca^{2+}]_i$ and muscle damage in the *mdx* mouse. **J. Physiol.**, 562, 367-380, 2005.

ZANONI, J. N.; FREITAS, P. de. Effects of ascorbic acid on the vasoactive intestinal peptide synthesis in the ileum submucous plexus of normal rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, 42(3): 186-190, 2005.

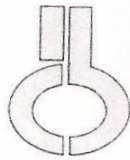
ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. Prentice-Hall, New Jersey, 1984.

ZANONI, J. N.; DE FREITAS, P. Effects of ascorbic acid on the vasoactive intestinal peptide synthesis in the ileum submucous plexus of normal rats. **Arq. Gastroenterol**, 42(3): 186-190, 2005.

ZANONI, J. N.; HERNANDES, L.; BAZOTTE, R. B.; MIRANDA-NETO, M. H. Terminal ileum submucous: Study of the VIP-ergic neurons of diabetic rats treated with ascorbic acid. **Arq Neuropsiquiatr**, 60(1): 32-37, 2002.

ANEXOS

Anexo 01 – Parecer da CEUA da USP-SP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **164** nas fls. **113** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Edson Aparecido Liberti**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Suplementação com o antioxidante ácido ascórbico na dieta de camundongos mdx (um modelo de distrofia muscular de Duchenne): Repercussões morfológicas no plexo mioentérico do intestino grosso*" do qual participam o(s) aluno(s) **Naianne Kelly Clebis, Any Kelly Gomes de Lima, Jodonai Barbosa da Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **11.11.2011, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 18 de novembro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

RECEBI ORIGINAL
23/11/11
[Handwritten signature]

Anexo 02 – Parecer de Isenção da CEUA da UFRN



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Natal (RN), 24 de outubro de 2013

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que os projetos de pesquisa n° **055/2013** “AÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA C NA MORFOLOGIA DO TECIDO CARDÍACO DE CAMUNDONGOS MDX”, n° **056/2013** “AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA C SOBRE OS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO TENDÃO CALCÂNEO”, n° **057/2013** “SUPLEMENTAÇÃO COM O ANTIOXIDANTE ÁCIDO ASCÓRBICO NA DIETA DE CAMUNDONGOS MDX (UM MODELO DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE): REPERCUSSÕES MORFOLÓGICAS NO MÚSCULO LISO (ESTRUTURA PRIMÁRIA) E NO PLEXO MIOENTÉRICO (ESTRUTURA SECUNDÁRIA) DO ÍLEO”, n° **058/2013** “EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM O ANTIOXIDANTE ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE OS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO MÚSCULO TRÍCEPS DE CAMUNDONGOS MDX (UM MODELO DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE)”, n° **059/2013** “INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO COM O ANTIOXIDANTE ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE OS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO MÚSCULO DIAFRAGMA DE CAMUNDONGOS MDX”, n° **060/2013** “AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO TECIDO RENAL EM CAMUNDONGOS MDX SUPLEMENTADOS COM VITAMINA C”, e n° **061/2013** “ANÁLISE MORFOLÓGICA DO PLEXO MIOENTÉRICO DO DUODENO DE CAMUNDONGOS MDX TRATADOS COM VITAMINA C” estão **ISENTOS** da aprovação por esta comissão para sua execução. Tal isenção deve-se ao fato de não haver nenhuma implicação ética e moral na execução de um projeto cujo sujeito experimental já está morto.

Sob o ponto de vista legal, não existe nenhuma lei ou resolução que faça menção sobre a necessidade de aprovação pelas CEUAs de projetos de pesquisa que empregam sujeitos experimentais já mortos.

É importante destacar, no entanto, que se a eutanásia do sujeito fizesse parte do protocolo experimental, tal projeto obrigatoriamente deveria ser aprovado pela CEUA anteriormente a sua execução.

Agradecemos a atenção e colocamo-nos a disposição para ulteriores esclarecimentos.

Cordialmente,


John Fontenele Araujo
Coordenador da CEUA

Anexo 03 – Rotina histológica e desparafinação

PROCESSAMENTO DE MATERIAL PARA HISTOTÉCNICA (EMBLOCAMENTO E CORTE)

1. Desidratação:

Álcool 70% - 1h

Álcool 80% - 1h

Álcool 90% - 1h

Álcool Absoluto I (100%) – 1h

Álcool Absoluto II (100%) – 1h

Álcool Absoluto III (100%) – 1h

2. Diafanização:

Xilol I - 1h

Xilol II - 1h

Xilol III - 1h

3. Impregnação:

Parafina I - 1h

Parafina II - 1h

Parafina III - 1h

4. Emblocamento:

- Colocar parafina derretida no molde;
- Inserir o material na posição de corte desejada;
- Pode usar a pinça levemente aquecida para ao material não aderir;
- Colocar a identificação (escrever sempre com grafite);
- Deixar esfriar naturalmente (se colocar na geladeira o bloco pode rachar).

5. Corte do Material no Micrótomo:

- Antes de realizar os cortes no micrótomo, deixar os blocos no congelador da geladeira por 24h e retirar apenas no momento de fazer os cortes;
- Dependendo material a espessura do corte pode variar, geralmente, os cortes são em torno de 4µm, 5µm, ou mais.
- Os cortes são colocados em água com um pouco de álcool 70% para distender o tecido que tenha enrugado durante o corte no micrótomo;
- Depois os cortes são colocados em recipiente chamado de Banho Maria com água aquecida a 42°C para completar a distensão e são pescados em seguida com a lâmina.
- Após esse processo, aguarda-se a secagem da lâmina com o material e dá início ao procedimento de desparafinização para ser realizada a técnica de coloração.

Protocolo de Desparafinação

Realizar a sequência abaixo com o material na lâmina, já previamente desparafinado na estufa (60°C) por 24h.

10 min – Xilol 1

10 min – Xilol 2

10 min – Xilol 3

5 min – Álcool Absoluto 1

5 min – Álcool Absoluto 2

5 min – Álcool Absoluto 3

5 min – Álcool 90%

5 min – Álcool 80%

5 min – Álcool 80% com amônia *

* Para tecidos fixado com Bouin.

Anexo 04 – Técnica de Coloração

Protocolo de Coloração com Tricrômico de Masson

Realizar a sequência de baterias do Protocolo de Desparafinação, para em seguida realizar o protocolo de coloração descrito abaixo:

Realizar a hidratação com álcool até 70° na sequência da desparafinação – 5 min

Água destilada – 5 min

Mordentar em solução de Bouin por uma noite em temperatura ambiente

Água destilada – 5 min

Corar com hemotoxilina férrica de Weigert – 5 min

Lavar em água corrente por 5' ou 10'

Corar com fucsina ácida-escarlata de Biebrich – 5 min

Lavar em água destilada – 10 min

Tratar em solução de ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico – 10 min

Sem lavar, corar em solução de azul de anilina acética – 15 min

Passar em água destilada

Lavar em solução de ácido acético 1% (5ml de ácido acético + 995ml de água) – 3 min

Passar pela água destilada

Desidratar (só passar p/ não descolorar - Álcool 80%; 5 min – Álcool 90%; 5 min – Álcool Absoluto 1; 5 min – Álcool Absoluto 2; 5 min – Álcool Absoluto 3)

Diafanizar (5 min – Xilol 1; 5 min – Xilol 2; 5 min – Xilol 3)

Enfim, realizar a montagem da lâmina com Permount ou Ethelan e lamínula, e aguardar a secagem por no mínimo 24h.

Anexo 05 – Guia para Autores - Cell and Tissue Research

Instructions for Authors

Cell and Tissue Research

General

Cell & Tissue Research publishes reports on novel results in any area of experimental biology. The work should be of high significance within its field, but also of interest to researchers outside the immediate area. Papers should be as concise as possible.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles. Open Choice does not apply to Society Journals.

Editorial procedure

Paper submissions will no longer be accepted. Authors are requested to submit papers in English online in order to facilitate quick and efficient processing. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times.

To submit your manuscript log directly onto the site at the following link and upload your manuscript following the onscreen instructions <http://mc.manuscriptcentral.com/ctr>

Co-authors should note that they have the responsibility to read and edit manuscripts bearing their name.

For further information contact the Editorial Office: ctr@springer.com

Organization and General Style of Research Articles

Articles need to be efficient and concise. Authors are requested to submit a cover letter explaining the significance of the work and its contribution to the field.

Abstract:

A single paragraph of fewer than 250 words.

Keywords:

Up to five.

Introduction:

Succinct, no subheadings.

Materials and methods:

Should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work.

Results and Discussion:

May each be divided by subheadings. Symbols and names for genetic loci, alleles, DNA and RNA should be italicized. Nonstandard abbreviations should be defined when first used in the text. All text should be double spaced.

References:

Include only articles that have been published or are in press. Personal communications should be documented by a letter of permission.

Please use the following style:

Bornstein JC, Furness JB, Smith TK, Trussell DC (1991) Synaptic responses evoked by mechanical stimulation of the mucosa in morphologically characterized myenteric neurons of the guinea pig ileum. *J Neurosci* 11:505–518

Furness JB, Costa M (1987) *The enteric nervous system*. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Unsicker K, Suter-Crazzolara C, Kriegstein K (1999) Neurotrophic roles of GDNF and related factors. In: Hefti F (ed) *Handbook of experimental pharmacology*, vol 134. Neurotrophic factors. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 189–224

Artwork Guidelines

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS office files are not acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Line drawings should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs or paintings with fine shading.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves (without lettering).

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftone plus line drawing, halftone with extensive lettering, color diagrams.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color illustrations if meaningful are free of charge.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, we request to use Arial.

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 12 -16 pt.

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions into your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures must always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts must be denoted by lowercase roman letters (a, b, c, etc.) Type Arial, size 12-16 pt. Please use always letters of the same size for the principal lettering inside your figures.

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc."

Figure Captions

Each figure should have a caption describing accurately what the figure depicts.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Authors must prepare their illustrations to match following sizes:

- 1 subcolumn width (3.9 cm)
- 1 column width (8.4 cm)
- 1.5 column width (12.9 cm)
- the whole page width (17.4 cm)
- length can vary, but must not exceed 23.4 cm

When submitting a panel, all parts should be arranged as one figure and saved in a single file. Panels should not be boxed in by borderlines. The vertical and horizontal space between the individual parts of a figure should be consistently 1mm.

Cover figures

Cover figures are chosen by the Coordinating Editor. Suggestions for cover illustrations are welcome (the author must own copyright to the image). The image must be sharp enough to allow magnification to the size of 13 cm (length) x 18 cm (width).

Publication Schedule

We try to let authors have the reviewers' comments in less than a month. After acceptance, articles will be published electronically within approximately 6 weeks on the net (<http://www.springerlink.com>) and in the journal in less than three months.

One complimentary copy is supplied. Orders for offprints can be placed by returning the order form with the corrected proofs.

Paper types

Reviews (up to 20 printed pages including illustrations) and Minireviews (no more than 5 printed pages, line drawings only) should address issues relevant to a wide readership and intelligible to non-specialists. Minireviews must focus on topics of recent experimental research. Proposals for reviews/ minireviews should be submitted to the Coordinating Editor.

At-a-glance articles are a new format in Cell & Tissue Research and highlight a topic of high general interest. Typically, an At-a-glance article is 2 printed pages in length (8500 characters), with 2 figures and approx. 15 literature references. It does not have abstract or keywords.

Brief accounts containing new and interesting results may be published as Short communications (up to 4 printed pages, including figures and tables).

Electronic Supplementary Material

Authors are free to submit supplementary material and, if the manuscript is accepted for publication, such material will be published online at the publisher's website, linked to the article.

All supplementary material can be submitted in standard file formats including in each file the following information: article title, journal name, author names. To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Submission formats:

- for text and presentations submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability
- a collection of figures may also be combined in a PDF file - spreadsheets should be converted to PDF

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables. For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file. Name the files consecutively, e.g. "Figure S1", "Figure S2", "Table S1", "Table S2" and refer to the supplementary files as "Electronic Supplementary Material", e.g. "s. Electronic Supplementary Material, Fig. S1".

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Homepage

For more information concerning submissions to Cell & Tissue Research consult

<http://springer.com>



<http://www.springer.com/journal/441>

Cell and Tissue Research
Managing editor: Unsicker, K.
ISSN: 0302-766X (print version)
ISSN: 1432-0878 (electronic version)
Journal no. 441