

Análise morfológica do estômago de camundongos distróficos "mdx" - Morphological analysis of the stomach of dystrophic mice "mdx"

Machado Bertassoli, Bruno : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo "FMVZ-USP", Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, CEP 05508-270, São Paulo – SP, Brasil, email: brunobertassoli@gmail.com | **Borges Lessa, Thais** : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo "FMVZ-USP", Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, CEP 05508-270, São Paulo – SP, Brasil | **Cesar dos Santos, Amilton** : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo "FMVZ-USP", Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, CEP 05508-270, São Paulo – SP, Brasil | **Moraes de Oliveira, Daniela** : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo "FMVZ-USP", Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, CEP 05508-270, São Paulo – SP, Brasil | **Feder, David** : Faculdade de Medicina do ABC, Av. Príncipe de Gales, 821- Santo Andre - SP. Brasil | **Eduardo Abrósio, Carlos** : Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (USP). Departamento de Ciências Básicas. Av. Duque de Caxias Norte, 225, Pirassununga–SP, Brasil | **Chaves de Assis Neto, Antônio** : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo "FMVZ-USP", Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, CEP 05508-270, São Paulo – SP, Brasil.

Resumo

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética de caráter recessivo caracterizada por fraqueza muscular progressiva de cintura pélvica e escapular evoluindo para insuficiência respiratória e, ou cardíaca. O camundongo *mdx* é um modelo amplamente utilizado para estudos devido a sua facilidade em reprodução, uniformidade genética, economia, conveniência para experimentos em laboratórios. O estômago apresenta função de armazenamento de alimento e tem sua parede constitída de fibras musculares. Tendo em vista as alterações musculares na DMD objetivou-se realizar um estudo anatômico descritivo do estômago de 5 animais modelo *mdx* comparando estes com os estômagos de 5 camundongos (*Mus musculus*) e 5 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). Os estômagos foram analisados macroscopicamente, por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Os achados sugerem que o modelo *mdx* apresenta na região da submucosa uma concentração de fibras colágenas tipo I, e estes não apresentam diferenças anatômicas dos camundongos (*Mus musculus*), ratos wistar (*Rattus norvegicus*) e de outros mamíferos com estômagos

monocavitários, porém, quando analisado com microscopia de luz polarizada notou-se uma concentração de fibras de colágeno tipo I na região da submucosa sugerindo possível área de fibrose, quando analisado por microscopia eletrônica de varredura, notou-se um afrouxamento na arquitetura das glândulas da camada glandular diferente dos camundongos não distróficos.

Palavras chave: Estômago | histologia | *mdx* | Microscopia eletrônica de varredura

Abstract

The Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a recessive genetic disease characterized by progressive muscle weakness of the pelvic and scapular and progressing to respiratory failure or heart. The *mdx* mice is a model widely used for studies. Was realized a study anatomy from stomach of five animals model *mdx*, to show the differences with five mouse stomach (*Mus musculus*) and five rats wistar (*Rattus norvegicus*). The stomachs were examined macroscopically, by light microscopy and scanning electron microscopy. The findings suggest that *mdx* model has a concentration of collagen type I in submucosal region, and these do not exhibit anatomical differences in relation to mice (*Mus musculus*), Wistar rats (*Rattus norvegicus*) and other mammals with stomachs monocavitários. however, when analyzed with polarized light microscopy it was noted a concentration of type I collagen fibers in submucosal region suggests a possible area of fibrosis. When analyzed by scanning electron microscopy, we noticed a loosening in the architecture of the glands of the layer gland is not different from dystrophic mice murines.

Keywords: Histology | *mdx* | Stomach | Scanning electron microscopy

INTRODUÇÃO

As distrofias musculares são grupos de distúrbios determinados geneticamente e associados à degeneração progressiva dos músculos esqueléticos. São caracterizadas por fraqueza muscular progressiva, deterioração, degeneração e regeneração das fibras musculares (UMPHRED, 2004). A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a segunda doença genética mais comum nos seres humanos e é a forma mais grave das distrofias. É uma doença genética ligada ao cromossomo X que afeta 1 a cada 3500 masculinos nascidos vivos, causado pela mutação do gene que codifica a proteína distrofina (ANDERSON et al., 2002; BOGLIOLO, 2000). Consequentemente ocorre a perda da habilidade de regeneração devido a exaustão das células miogênicas, que sofrem excessivos ciclos de degeneração e regeneração (RUBIN, 2002).

Formas de distrofias musculares associadas ao cromossomo X foram descritas em outras espécies como no camundongo (*mdx*), cães (GRMD) e

felinos (HFMD). Estes animais, por serem homólogos à DMD, vêm sendo amplamente utilizados como modelo de estudo para a doença. O modelo animal *mdx* apresenta mutação no gene da distrofina (FADIC, 2005) e ausência da distrofina no músculo e no cérebro, causando déficits moderados de locomoção reduzida em comparação aos ratos do controle (VAILLEND e UNGERER, 1999).

A falta de proteína distrofina em pacientes com DMD em diferentes graus de envolvimento distrófico tem sido observada nos músculo liso do trato digestivo em *mdx*, (BYERS et al., 1991; LEFAUCHEUR et al., 1995). Diferentes manifestações clínicas incluindo dilatação gástrica e pseudo-obstrução intestinal, também foram reportadas em pacientes com DMD (BAOHN et al., 1988; LUNSHOF e SCHWEIZER, 2000).

A descrição morfológica do estômago de *mdx* na pesquisa científica é de grande importância, pois fornece dados morfológicos essenciais para a fundamentação de experimentos que envolvam a DMD. Portanto o presente estudo objetivou comparar as possíveis alterações morfológicas (macro, micro e ultraestrutural) entre os estômagos de camundongos com distrofia (*mdx*), camundongos não distróficos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*) para fundamentar novas pesquisas que abrangem a DMD.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados cinco camundongos *mdx* provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina do ABC, cinco camundongos (*Mus musculus*) provenientes do Biotério da Patologia FMVZ/USP e cinco ratos (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério da Universidade de Guarulhos-SP. Todos os animais utilizados no experimento foram do sexo masculino e apresentavam seis meses de idade.

Os animais foram eutanasiados utilizando-se uma associação anestésica de 50mg/kg de cloridrato de quetamina (Ketamin-S®, Cristália) e 2mg/kg de cloridrato de xilazina (Calmium®, Agener União), por via intraperitoneal, os estômagos foram coletados após a eutanásia e fixados em solução de paraformaldeído a 4%, sendo posteriormente analisados macroscopicamente.

Para a microscopia de luz os fragmentos foram desidratados em série crescente de etanol (70 % a 100%) e diafanizados em xilol para posterior inclusão em parafina, onde foram realizados cortes de 5µm em micrótomo (Leica RM 2065) coloração com Hematoxilina-Eosina e Picrossirius Red. As lâminas foram fotomicrografadas em Microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc, utilizando-se o software Zeiss® KS 400.

Para a microscopia eletrônica de varredura, foram confeccionados blocos e após estes foram cortados em 10µm em micrótomo (Leica RM 2065) para obtenção das lâminas, e posteriormente desparafinizados em estufa a 60°C por 2 horas. Em seguida as lâminas foram colocadas por 10 minutos no xilol para eliminação da parafina. Estas foram secas no aparelho de ponto crítico (Balzers

CPD020). Na seqüência as lâminas foram cobertas com ouro através do processo de "sputtering" (EMITEC H K550) e a observação ultraestrutural e a fotodocumentação realizaram-se em microscópio eletrônico de varredura (LEO 435VP).

RESULTADO e DISCUSSÃO

Aspectos Anatômicos

Morfologicamente o estômago do camundongo *mdx*, assemelha-se ao de alguns mamíferos domésticos (BANKS, 1992; GEROGÉ et al., 1998; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Quanto ao número de compartimento pode-se classificar como monocavitário (Figura 1), semelhante ao evidenciado em estudos com outros roedores como ratos (VAN et al., 2005; FREIBURG, 2007) e chinchilas (CASTRO et al., 2010).

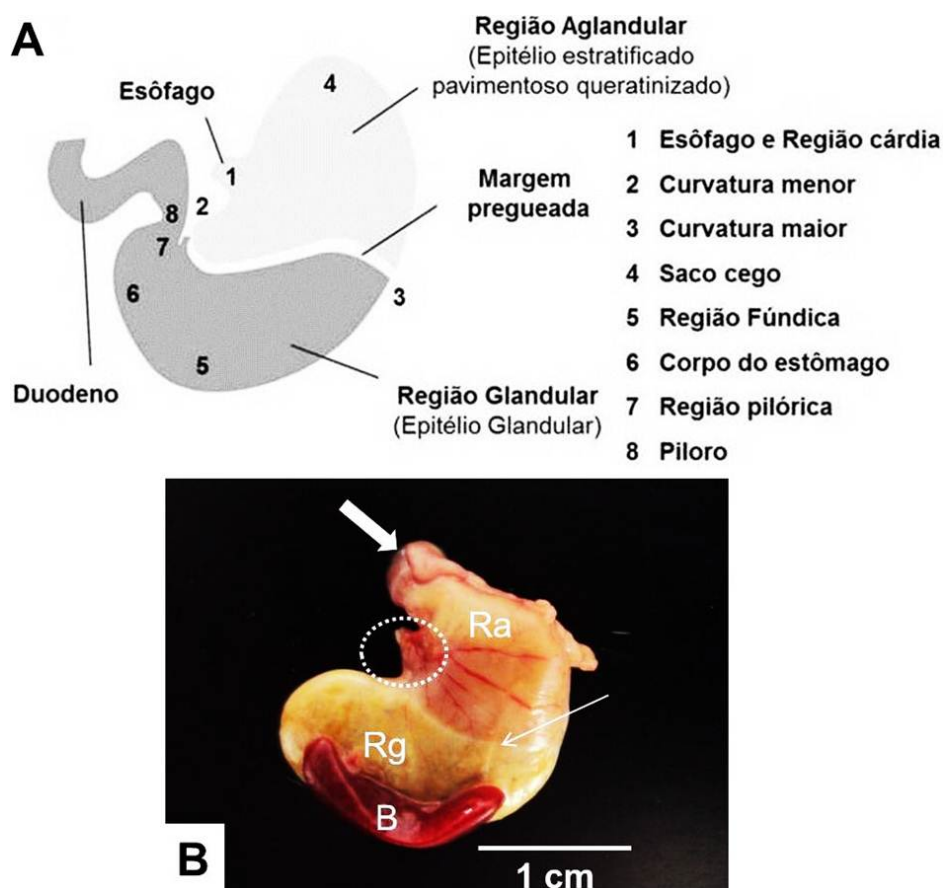


Figura 1 - A) Regiões do estômago de ratos Wistar. Esquema representativo do estômago e suas subdivisões (Adaptado de FREIBURG, 2007). **B)** Visão macroscópica do estômago, onde baço (B), esôfago (seta cheia), píloro (cículo pontilhado), e internamente: região glandular (Rg), região aglandular (Ra) e margem pregueada (seta).

Anatomicamente, o estômago do rato Wistar (*Rattus norvegicus*) está localizado na cavidade abdominal sob a linha mediana ventral, na porção esquerda, caudal ao fígado, com a forma de um C e com uma concavidade

cranial, onde se observa a penetração do esôfago (FREIBURG, 2007; CARVALHO et al., 2011), do mesmo modo encontramos também essas descrições em camundongos distróficos (*mdx*) e em camundongos (*Mus musculus*). Os mesmos autores, supracitados, ainda relatam que o estômago pode ser dividido em várias regiões (Figura 1).

Aspectos histológicos

A parede do estômago do camundongo *mdx* é formada pelas túnicas da mucosa, submucosa, muscular e serosa, da mesma forma que nos outros mamíferos, (BANKS, 1992; BACHA e BACHA; 2000). A constituição da muscular da mucosa do estômago do animal estudado assemelha-se à dos demais mamíferos de estômago simples (DELLMAN e BROWN, 1982).

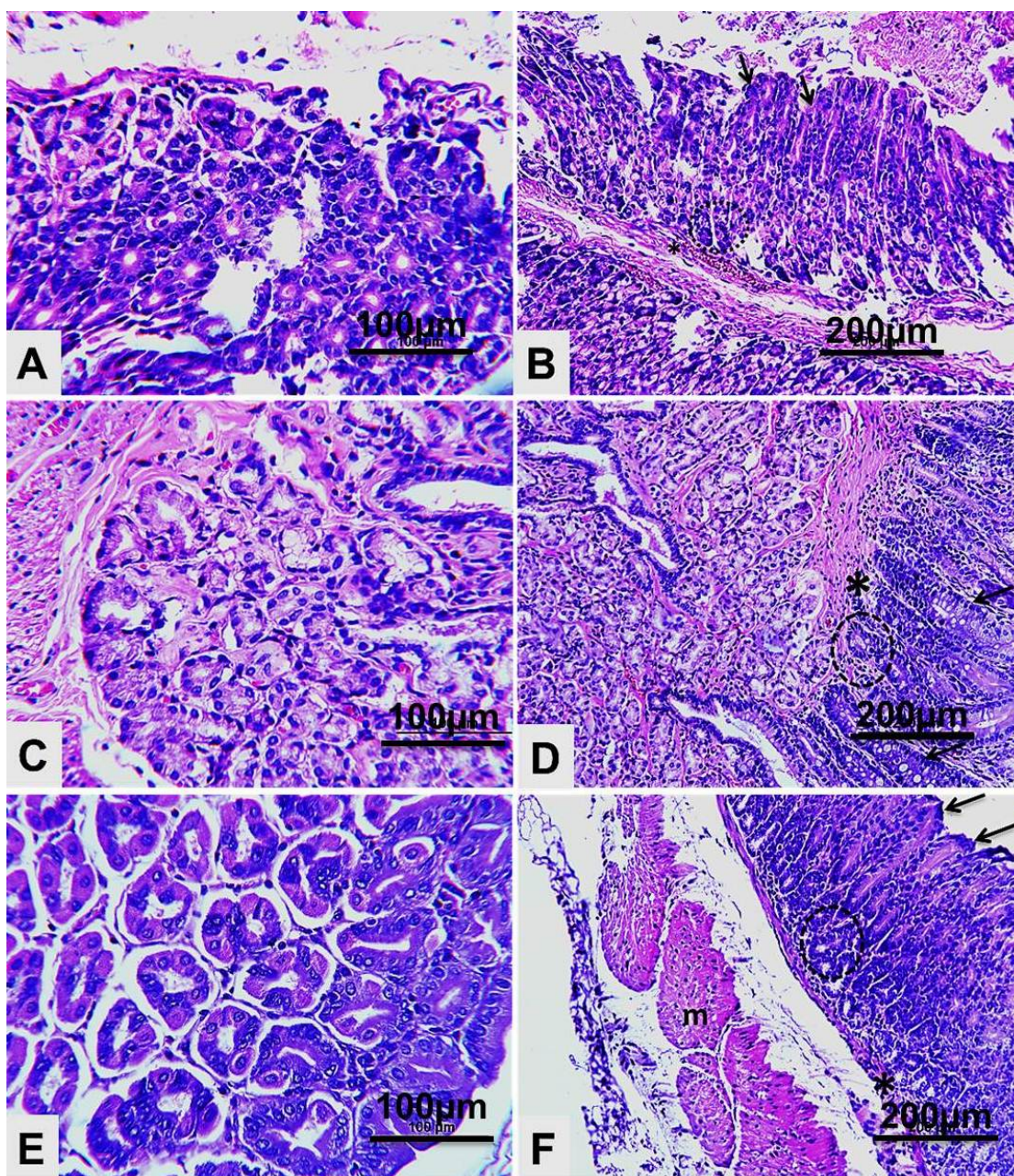


Figura 2 – Região glandular do estômago. A e B) *Mus musculus*. C e D) *Rattus norvegicus*. E e F) camundongos *mdx*. Epitélio colunar simples (Setas); Glândulas fúndicas (círculo pontilhado); Muscular da mucosa (*); Muscular (m). A, C e E) Barra: 100µm; B, D e F) Barra: 200µm.

Quando submetido a microscopia de luz, foi observado um afrouxamento do arranjo glandular (Figura 2, E) na porção glandular do estômago de camundongos *mdx*, corroborando com Baccari et al. (2000), onde este relatou alterações do fundo gástrico e um relaxamento dos músculos desta estrutura em camundongos *mdx*.

A região fundica é composta pela maior parte da mucosa glandular e ocupa a parte ventral do estômago (curvatura maior).

As maiores áreas superficiais do estômago estão revestidas por células mucosas superficiais. Estas células apresentam coloração clara, típica de células produtoras de muco, com núcleo localizado na porção basal. Nos cães, estas glândulas são numerosas, porém, estão presentes em pequenos números nos roedores, incluindo o camundongo distrófico (*mdx*).

O epitélio estratificado pavimentoso queratinizado que reveste a região aglandular se estende do esôfago até a margem pregueada (CARVALHO et al., 2011), sendo esta região semelhante ao epitélio esofágico humano.

Do mesmo modo que na histologia básica, a microscopia eletrônica de varredura evidencia um afrouxamento nos arranjos glandulares na porção glandular do estômago dos camundongos distróficos (*mdx*) (Figura 3A) diferentes dos arranjos glandulares dos camundongos não distróficos (Figura 3B).

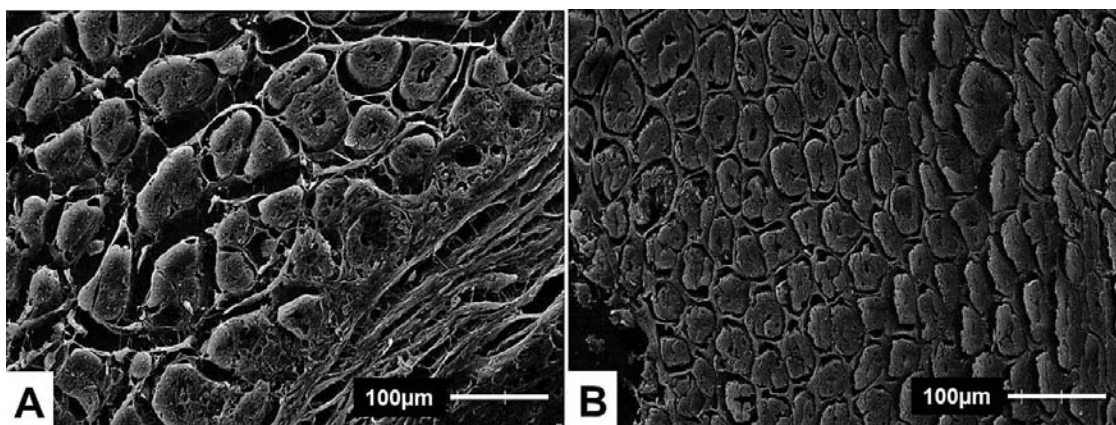


Figura 3 – Eletromicrografia da camada glandular do estômago de camundongos distróficos e não distróficos. A) Estômago de camundongos *mdx*. B) estômago de camundongo não distrófico. Notar que em A as glândulas se apresentam em arranjos frouxos quando comparado com B.

Segundo Cunningham (1993), acredita-se que a região aglandular seja um local onde pequena quantidade de digestão fermentativa possa ocorrer. Sugere-se ainda que esteja relacionado com o hábito alimentar dos roedores, o que favoreceria uma maior proteção às partículas sólidas ingeridas.

Através da técnica de histologia de luz e posterior coloração de Picrossírius Red com a visualização sob luz polarizada, observa-se na região da submucosa a presença de fibras colágenas coradas em laranja e amarela (tipo I), sugerindo áreas de fibrose (Figura 4).

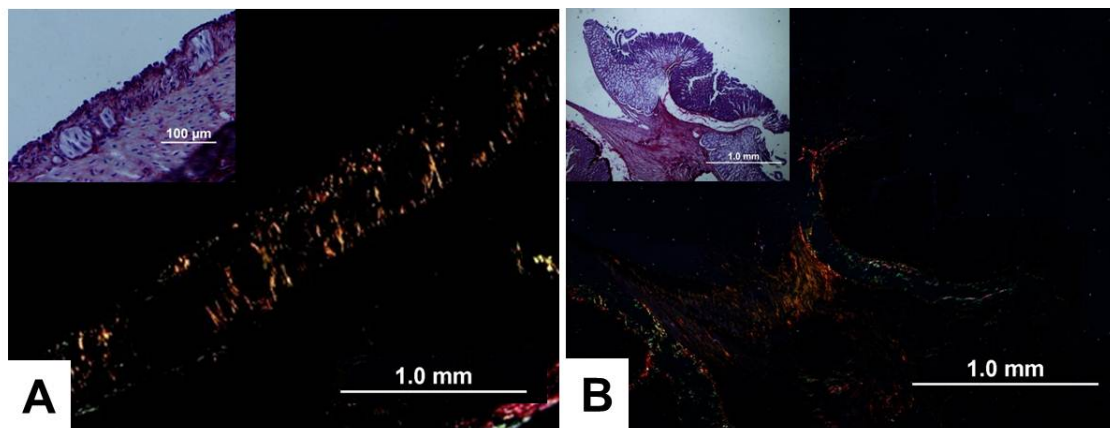


Figura 4 – Fotomicrografia do estômago de camundongos *mdx*. (A e B) Nota-se concentração de fibras colágenas alaranjadas e amarelas na região da submucosa.

CONCLUSÃO

As alterações observadas no estômago do *mdx* sugeriram uma atrofia glandular e, por conseguinte aumento do espaço entre as glândulas diferindo dos outros animais não distróficos comparados neste estudo. Observou-se também, uma concentração de fibras colágenas do tipo I na região da submucosa, demonstrando uma área de possível fibrose.

REFERENCIAS

- ANDERSON, J.L.; HEAD, S. I.; RAE, C.; MORLEY, J. W. Brain function in duchenne muscular dystrophy. **Brain**. 2002; 125: 4-13.
- ANDREW, W.; HICKMAN, C.P. **Histology of the vertebrates**. Saint Louis: The C.V. Mosby Company, 1974. 275 p.
- BACHA JR, W.J.; BACHA, L.M. **Color atlas of veterinary histology**. 2.ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. 318p.
- BANKS, W.J. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manoele, 1992. 256p.
- BAROHN, R.H.; LEVINE, E.J.; OLSON, J.O.; MENDELL, J.R. Gastric hypomotility in Duchenne's muscular dystrophy. **The New England**

- Journal of Medicine.**, 1988; 319: 15–18.
- BOGLIOLO, L; BRASILEIRO, G.F. **Bogliolo patologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1488p.
 - BYERS, T.J.; KUNKEL, L.M.; WATKINS, S.C. The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. **The Journal of Cell Biology.**, 1991; 115: 411–421.
 - CARAKUSHANSKY, G. **Doenças Genéticas em Pediatria**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 522p.
 - CARVALHO, C.A.; FERNANDES, K.M.; MATTA, S.L.T.; FONSECA, C.C.; PINTO, R.; OLIVEIRA, L.L. Aspectos macroscópicos e histológicos da mucosa gástrica de ratos wistar e sua utilização em modelo de úlceras gástricas. **Archives of Veterinary Science.**, 2011;16(1):44-53.
 - CASTRO, T.F.; DUMMER, R.J.; RICKES, E.M.; PEREIRA, M.A.M. Aspectos morfológicos, morfométricos e topográficos do aparelho digestório de *Chinchilla lanígera*. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**. 2010; 47(1):86-94.
 - COOPER, A.J.; JOHNSON, C.D. Animal experimentation. **Brazilian Journal of Surgery**. 1991; 78:1409-1411.
 - CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 596 p.
 - DANI, R.; CASTRO, L.P. **Gastroenterologia clínica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 1993. 1103p.
 - DELLMANN, H.D.; BROWN, E.M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1982. 397p.
 - DUCLOS, F.; STRAUB, V. Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. **Journal of Cell Biology**. 1998; 142(6):1461-1471.
 - SILVA, P.C.O Uso de animais de experimentação biomédica. **Revista Medica Cirurgica**. 1997; 1:71-79.
 - FADIC, R. Cell surface and gene expression regulation molecules in dystrophinopathy: *mdx* vs. Duchenne. **Biology Research**. 2005; 38(4):375-380.
 - FREIBURG, J.L. **Abdominale Sonographie bei der Ratte (*Rattus norvegicus f. domestica*)**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universität München. 2007. 131f.
 - GEROGÉ, L.L.; ALVES, C.E.R.; CASTRO, R.R. L. **Histologia comparada**. 2.ed. São Paulo: Roca, 1998. 286p.
 - JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.
 - LEFAUCHEUR, J.P.; PASTORET, C.; SEBILLE, A. Phenotype of dystrophinopathy in old *mdx* mice. **Anatomical Record**. 1995; 242:70–76.
 - LUNSHOF, L.; SCHWEIZER, J.J. Acute gastric dilatation in Duchenne's muscular dystrophy. **Ned Tijdschr**. 2000; 144:2214–2217.
 - MULE, F.; D'ANGELO, S.; TABACCHI, G.; AMATO, A.; SERIO, R. Mechanical activity of small and large intestine in normal and *mdx* mice:

- a comparative analysis. **Neurogastroenterol Motil.** 1999; 11:133–139.
- MUNTONI, F; MATEDDU, A; SERRA, G. Passive avoidance behaviour deficit in the mdx mouse. **Neuro Disorders.** 1991; 1:121-123.
 - RUBIN, E; FARBER, J.L. **Patologia.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. 1328p.
 - SHARP, P.E.; LA REGINA, M.C. **The Laboratory rat.** Washington: CRC Press, 1998. 214p.
 - UMPHRED, D.A. **Reabilitação neurológica.** 4.ed. São Paulo: Manole, 2004.
 - VAILLEND, C.; RENDON, A.; MISSLIN, R.; UNGERER, A. Influence of dystrophin-gene mutation on mdx mouse behavior. I. Retention deficits at long delays in spontaneous alternation and bar-pressing tasks. **Behavior Genetics.** 1995; 25:569-579.
 - VAILLEND, C.; UNGERER, A. Behavioral characterization of mdx3cv mice deficient in C-terminal dystrophins. **Neuro Disorders.** 1999; 9:296-304.
 - VAN ZYL, A.; RAMBAU, R.V.; VAN DER MERWE, M. Aspects of the anatomy and histology of the alimentary canal of the greater cane rat, *Thryonomys swinderianus*, with reference to its feeding physiology. **African Zoology.** 2005; 40(1):25-36.
 - VANNUCCHI, M.G.; ZIZZO, M.G.; ZARDO, C. Ultrastructural changes in the interstitial cells of Cajal and gastric dysrhythmias in mice lacking full-length dystrophin (mdx mice). **Journal of Cell Physiology.** 2004; 199:293–309.

REDVET: 2013, Vol. 14 N° 3

Recibido 28.06.2012 / Ref. prov. JUN1227_RED VET / Aceptado 28.02.2013
Ref. def. 031305_RED VET / Publicado: 01.03.2013

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030313.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030313/031305.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con **Veterinaria.org®** <http://www.veterinaria.org> y
con **REDVET®**- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>