ESTUDO DO EFEITO DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL SOBRE O PLEXO MIENTÉRICO DO DUODENO DE RATOS *WISTAR*

Anne Caroline Santa Rosa (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Julia Estuani, Carmem Patrícia Barbosa Lopes, Nilza Cristina Buttow (Orientadora), e-mail: ncbuttow@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá/ Centro de Ciências Biológicas/ Maringá, PR.

Ciências Biológicas: Morfologia/ Histologia.

Palavras-chave: glia entérica, Sistema Nervoso Entérico, análise quantitativa.

Resumo:

Estudos tem demonstrado a inter-relação do cérebro com o sistema nervoso entérico sendo esta denominada eixo cérebro-intestino. Injúrias cerebrais podem afetar o trato gastrointestinal e vice-versa. A isquemia e reperfusão (I/R) é caracterizada, respectivamente, pela interrupção e restabelecimento do fluxo sanguíneo a um órgão ou tecido e é considerada um tipo de injúria. Os estudos são limitados quanto aos efeitos da I/R cerebral sobre o SNE. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da isquemia e reperfusão cerebral sobre o plexo submucoso do duodeno de Ratos *Wistar*. Os animais foram distribuídos em dois grupos: Grupo C (n=4): ratos controles e Grupo IR (n=4): ratos submetidos a Isquemia (15 minutos) e Reperfusão Cerebral (60 dias). Após imunofluorescência para população glial (S100-IR) e população geral (HuC/D-IR), foram realizadas análises quantitativas gliais e morfoquantitativas neuronais com o auxílio do programa de análise de imagem Image-Pro Plus. Os resultados demonstraram um aumento significativo de 46% na densidade da população neuronal geral (HuC/D-IR) em relação ao grupo controle, enquanto que o perfil neuronal não apresentou diferença entre os grupos. A densidade glial não mostrou diferença significativa. A medida da área total do intestino delgado mostrou um redução de cerca de 10%. Portanto, conclui-se que a isquêmica e reperfusão cerebral promove aumento na densidade neuronal, no entanto, não afeta a população glial após 60 dias de reperfusão. Novos estudos podem definir os mecanismos destas alterações.

Introdução

O Sistema Nervoso Entérico (SNE) mantêm conexões com o Sistema Nervoso Central, e estas garantem a manutenção adequada da homeostase intestinal, regulando funções e mecanismos como ativação imunológica, reflexo entérico, permeabilidade intestinal e uma sinalização

enteroendócrina, ou seja, envolvem mediadores neuro-imuno-endócrinos (CARABOTTI et al.,2015.)
Injúrias e lesões que ocorrerem no cérebro podem alterar o funcionamento intestinal podendo ocasionar redução no tempo do trânsito gastrintestinal caracterizado muitas vezes por constipação.
A isquemia é uma injúria caracterizada pela redução ou falta de suprimento sanguíneo em um determinado órgão ou tecido, onde o grau de obstrução vascular vai determinar sua intensidade. A reperfusão é usada para restabelecer a circulação afetada, porém o seu sucesso é dependente da duração da isquemia (BRASILEIRO FILHO, 2011).
Embora seja grande a incidência de lesão por I/R cerebral e haja íntima relação cérebro-intestino, ainda são limitados os estudos quanto aos efeitos da I/R cerebral sobre o SNE. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da isquemia cerebral de 15 minutos seguida de 60 dias de reperfusão sobre o plexo submucoso no duodeno de ratos *Wistar*.

Materiais e métodos

Foram utilizados *Rattus novergicus* da linhagem *Wistar*, distribuídos aleatoriamente em dois grupos: Grupo C (n=4): ratos controles nos quais não foram realizados procedimentos cirúrgicos; e Grupo IR (n=4): ratos submetidos a Isquemia cerebral global e transitória (ICGT, modelo 4-VO). Sessenta dias após a isquemia foi realizada a eutanásia com dose letal de 120 mg/kg de peso corporal de Tiopental Sódico®, e foi realizada a coleta do duodeno, lavado em Tampão Fosfato de Sódio (PBS 0,1M, pH 7,4) e fixado por 3 horas em solução de Paraformaldeído 4% (pH 7,4). Para técnicas imunohistoquímicas o intestino foi dissecado, em segmentos menores com cerca de 1 cm, com o auxílio de pinças sob estereomicroscópio. Foram realizadas imunomarcações para neurônios imunorreativos às proteínas HuC/D e células gliais S100. As análises morfoquantitativas foram realizadas por amostragem no preparado total de membrana, através de imagens capturadas por câmera Motican Pro-252 B de alta resolução acoplada a um microscópio de fluorescência (Olimpus BX40) e as imagens foram analisadas através do programa Image-Pro Plus, (v. 4.5.029; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Para quantificação e análise morfométrica, 30 imagens foram capturadas em objetiva de 20X. Os resultados morfométricos foram expressos em μm^2 e a densidade foi expressa como neurônios ou glia por cm^2. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov.* Para dados normais foi usado teste *t* com nível de significância de 95%, com o auxílio do programa GraphPadPrism 5.0.

Resultados e Discussão

Na análise morfométrica observou-se que a isquemia cerebral de 15 minutos seguida de reperfusão não alterou o perfil neuronal após 60 dias(Figura 1) na população geral (HuC/D-IR) no grupo isquêmico (grupo IR) comparado ao

grupo controle ($p > 0.05$). Entretanto, a injúria cerebral promoveu um aumento significativo na densidade da população neuronal geral(Figura 2) de aproximadamente 46% em relação ao grupo controle ($p < 0.05$). Ainda houve uma redução na área total do intestino delgado de cerca de 10% (grupo C: 98,56±1,79, grupo IR: 87,00±2,92). O aumento na densidade neuronal pode ter ocorrido em parte devido a redução da área intestinal, mas também pode ser devido a neurogênese. Segundo LARANJEIRA e colaboradores (2011) células gliais maduras são capazes de gerar neurônios entéricos em cultura e em resposta a uma injúria *in vivo*. Segundo estes autores o aparecimento de novos neurônios ocorre depois de alguns dias após injúria. Nossa análise foi realizada após 60 dias da isquemia, o que seria tempo suficiente para que ocorresse neurogênese. Não observamos diferença significativa na densidade glial (Figura3) ($p > 0.05$). Apesar das células gliais terem a capacidade de proliferar não observamos alterações nas densidades destas células. Isto poderia ocorrer pois as células já estariam em homeostase devido ao tempo após a injúria. Ou ainda, algumas células que proliferaram poderiam ter passado por processo de diferenciação para dar origem a novos neurônios.

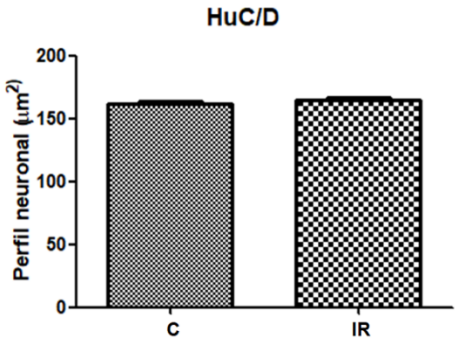

Figura 1- Morfometria da População neuronal (HuC/D) expressos em µm^2.

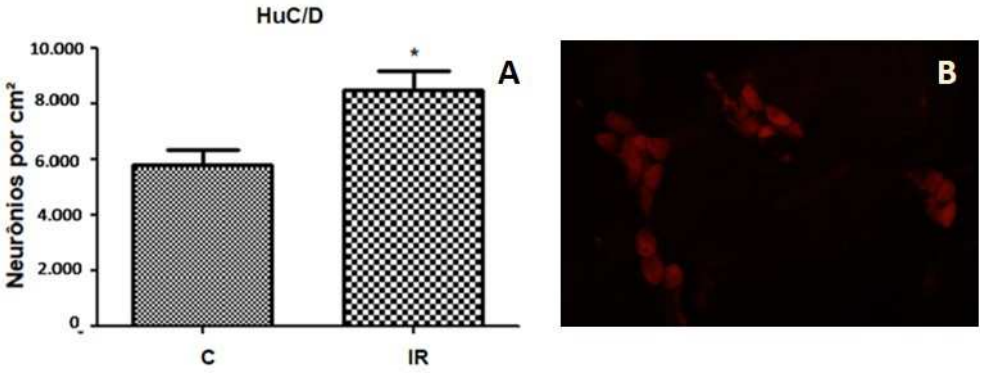

Figura 2- Densidade da População neuronal geral (HuC/D-IR) expressos por cm². Em B imunomarcação para população geral.

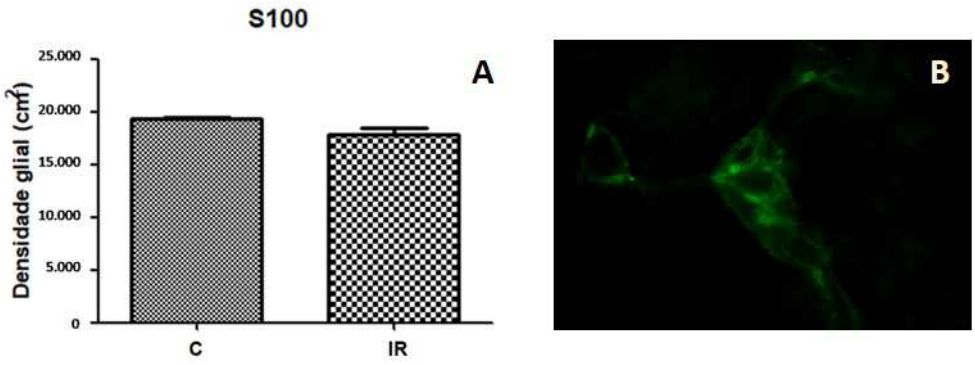

Figura 3- Densidade da glia entérica (S100-IR) expressos por cm². Em B imunomarcação para as células S100-IR.

Conclusões

Nossos resultados demonstram que a isquemia de 15 minutos e reperfusão cerebral de 60 dias promove um aumento na densidade da população neuronal geral podendo caracterizar neurogênese. Entretanto, não houve alteração na glia entérica no plexo submucoso do duodeno de ratos. Contudo, novos estudos com marcadores neurogênicos devem ser realizados visando elucidar este fenômeno.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por financiar esta pesquisa de iniciação científica. A minha professora orientadora Dr. Nilza Cristina Buttow, por todo ensinamento. A minha colega de laboratório Julia Estuani, por toda ajuda com as técnicas utilizadas no experimento. Aos meus pais, Aparecida e Ademir, por todo apoio e paciência.

Referências

BRASILEIRO FILHO, Geraldo**. Bogliolo. Patologia.** 8a Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

CARABOTTI M.; SCIROCCO A.; MASELLI M.A.; SEVERI C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. Annals of Gastroenterology: **Quarterly Publication of the Hellenic Society of Gastroenterology**, v.28, n.2, p.203-209, 2015.

LARANJEIRA C, SANDGREN K, KESSARIS N, RICHARDSON W, POTOCNIK A, VANDEN BERGHE P, PACHNIS V. Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. **J Clin Invest**. 121(9):3412-24. 2011.