

ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL ALTERA PRINCIPALMENTE A SUBPOPULAÇÃO NITRÉRGICA ($nNOS^+$) NO DUODENO DE RATOS *WISTAR*

Julia Calvi Mori (PIBIC/CNPq), Nilza Cristina Butow (co-orientadora),
Carmem Patrícia Barbosa (orientadora)
e-mail: carmemmec1@gmail.com

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

Área e subárea: Morfologia; Histologia.

Palavras-chave: neurônios entéricos; células gliais entéricas; imunohistoquímica.

Resumo

Enquanto a isquemia tecidual é caracterizada pela interrupção do fluxo sanguíneo, a reperfusão é o restabelecimento desse fluxo. Em associação, a isquemia e a reperfusão podem levar a lesões características denominadas lesões por isquemia e reperfusão (I/R). Considerando que o cérebro e o intestino apresentam correlações importantes devido à existência do eixo cérebro-intestino, o objetivo deste estudo foi compreender como a lesão por I/R cerebral pode influenciar os neurônios do plexo mientérico do duodeno de ratos submetidos a este modelo experimental. Para tanto, 10 ratos foram distribuídos em dois grupos ($n=5$): grupo controle e grupo submetido à cirurgia de isquemia cerebral por 15 minutos seguidos de 52 dias de reperfusão. Foram realizadas análises morfoquantitativas para a subpopulação de neurônios mioentéricos (HuC/D^+-nNOS^-), subpopulação de neurônios nitrérgicos (HuC/D^+-nNOS^+), população geral de neurônios mioentéricos (HuC/D^+-nNOS^+) e células gliais entéricas ($S-100^+$). As análises morfométricas demonstraram que a isquemia cerebral promoveu redução significativa da área do perfil neuronal em todas as populações estudadas. Quanto à densidade, todas as subpopulações tiveram aumento. No entanto, somente na subpopulação nitrérgica este aumento foi significativo. Estes resultados nos permitem concluir que a subpopulação nitrérgica é mais afetada pela I/R cerebral.

Introdução

A isquemia é caracterizada pela interrupção do fluxo sanguíneo e pode ocorrer em várias situações como procedimentos cirúrgicos. A reperfusão é o restabelecimento desse fluxo sendo que a associação destas duas condições pode ocasionar lesões por isquemia e reperfusão (I/R) (MENDES, 2013). Sabe-se que a I/R é capaz de desencadear uma resposta inflamatória sistêmica que pode promover lesões celulares e até falência de órgãos. A I/R cerebral é uma patologia relativamente comum. Embora todos os órgãos do corpo sejam suscetíveis à lesão por I/R, recentemente tem-se

relacionado esse tipo de lesão cerebral à disfunção intestinal e à disbiose da microbiota intestinal (SINGH et al., 2016). Isto porque o cérebro e o intestino formam um eixo de comunicação bidirecional denominado eixo cérebro-intestino.

O sistema nervoso entérico (SNE) localizado na parede intestinal controla a motilidade gastrointestinal, as secreções de enzimas, a absorção de nutrientes, o controle do fluxo sanguíneo entre outros aspectos necessários. Apesar da alta prevalência da I/R cerebral e esta promover alterações no funcionamento do trato gastrointestinal, pouco se sabe sobre seus efeitos sobre o SNE. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da I/R cerebral sobre o plexo mientérico do duodeno de ratos.

Materiais e métodos

Este protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (parecer nº 287100816). Foram utilizados 10 *rattus norvegicus* da linhagem Wistar com 70 dias de idade os quais foram divididos em 2 grupos (n=5): Controle (C) e Grupo submetido a isquemia cerebral global transitória (ICGT, modelo 4-VO) por um período de 15 minutos (IRC). Após 52 dias de reperfusão, a eutanásia foi realizada com dose letal de 120 mg/kg de peso corporal de Tiopental Sódico®, o duodeno foi coletado e fixado em Paraformaldeído 4% (pH 7,4). Segmentos de 1 cm foram cortados e as túnicas mucosa e submucosa foram retiradas com a ajuda de pinças e estereomicroscópio. Técnicas imunohistoquímicas foram realizadas para a marcação a subpopulação de neurônios mioentéricos ($\text{HuC/D}^+-\text{nNOS}^-$), subpopulação de neurônios nitrérgicos ($\text{HuC/D}^+-\text{nNOS}^+$), população geral de neurônios mioentéricos ($\text{HuC/D}^+-\text{nNOS}^+$) e células gliais entéricas (S-100^+). Para análises morfométricas as imagens foram analisadas e a área de 100 corpos celulares por animal foi mensurada (resultados expressos como média $\pm$ erro padrão, em μm^2). A quantificação considerou todas as células presentes em 30 imagens capturadas em objetiva de 20X (resultados expressos como média $\pm$ erro padrão, em células/cm²).

Resultados e Discussão

A análise morfométrica evidenciou uma redução significativa da área do perfil celular dos neurônios do grupo IRC em todas as populações analisadas ($\text{HuC/D}^+-\text{nNOS}^+$, $\text{HuC/D}^+-\text{nNOS}^-$ e nNOS^+) (Figura 1).

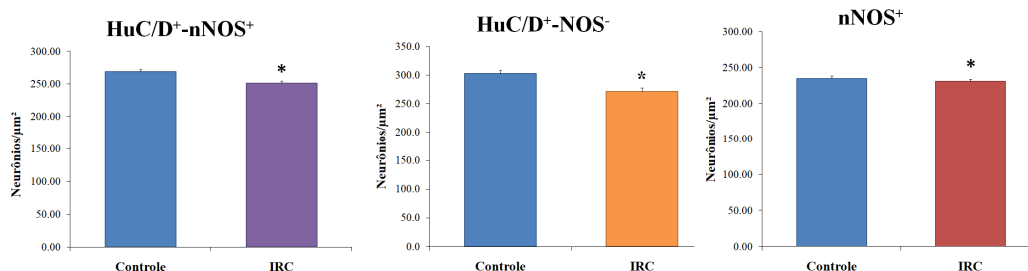


Figura 1. Análises morfométricas de A. $\text{HuC/D}^+-\text{nNOS}^+$; B. $\text{HuC/D}^+-\text{nNOS}^-$; C. nNOS^+ . Resultados em cm². *p≤0,05.

A análise quantitativa evidenciou uma tendência de aumento na população $\text{HuC/D}^+ \text{-nNOS}^+$ e $\text{HuC/D}^+ \text{-nNOS}^-$, mas com diferença significativa apenas na subpopulação de neurônios nitrérgicos (nNOS^+) (Figura 2). Ainda houve redução na área total do intestino delgado em cerca de 15% (grupo C: $98,56 \pm 1,79$; grupo IR: $87,00 \pm 2,92$). Este aumento na densidade neuronal pode ter ocorrido pela redução da área do intestino. No entanto, o aumento da densidade da subpopulação nNOS^+ pode ter ocorrido também devido a uma mudança de fenótipo, ou seja, neurônios que expressavam outro neurotransmissor passaram a expressar nNOS (AUBÉ, 2006). O aumento desta subpopulação nitrérgica pode estar envolvido tanto na defesa como na injúria da mucosa do trato gastrointestinal ocorrida na isquemia e reperfusão cerebral (RUHL, 2006).

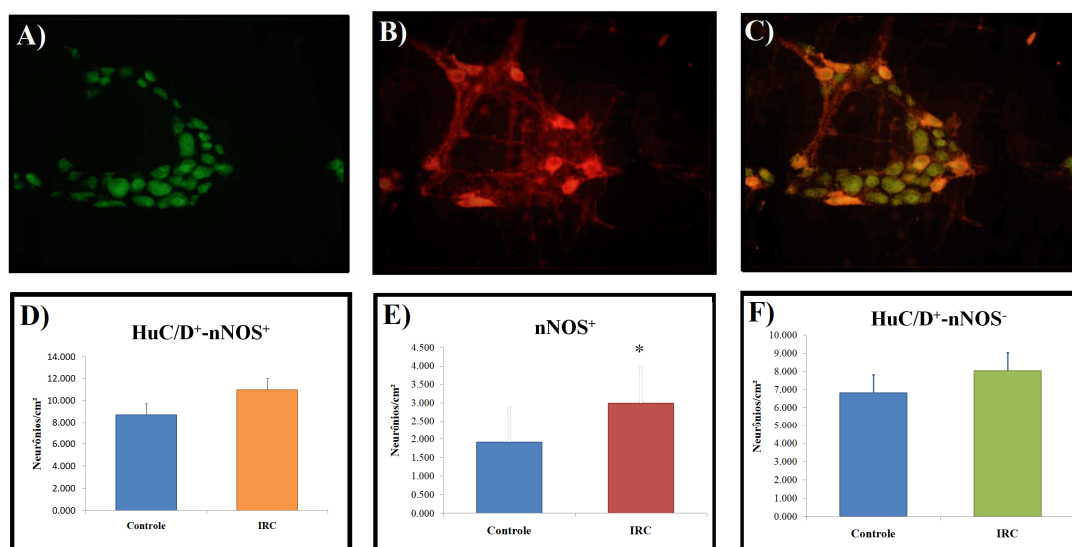


Figura 2. Imagens de imunohistoquímica das marcações: **A.** Anti-HuC/D; **B.** anti-nNOS; **C.** Sobreposição das imagens A e B. Gráficos representativos das análises quantitativas de: **D.** $\text{HuC/D}^+ \text{-nNOS}^+$; **E.** nNOS^+ ; **F.** $\text{HuC/D}^+ \text{-nNOS}^-$. Resultados em cm^2 . * $p \leq 0,05$.

Embora as células gliais tenham apresentado uma tendência à redução morfológica e ao aumento quantitativo, tais resultados não foram estatisticamente significativos (Tabela 3).

Tabela 3. Valores das análises quantitativas (soma $\pm$ erro padrão; cm^2) e morfológicas (média $\pm$ erro padrão; μm^2) das Células Gliais (S-100).

S -100	Quantitativo	Morfométrico
Controle	$27.387 \pm 2,42$	$58,07 \pm 0,71$
IRC	$30.186 \pm 4,49$	$56,94 \pm 0,70$

Conclusões

Pelo exposto pode-se concluir que a isquemia cerebral de 15 minutos seguida de 52 dias de reperfusão afeta principalmente a subpopulação de neurônios nitrérgicos (nNOS⁺) aumentando sua densidade e reduzindo a área do perfil neuronal de todas as populações do plexo mientérico do duodeno de ratos.

Agradecimentos

Ao CNPq.

Referências

AUBÉ, A-C.; CABARROCAS, J.;BAUER, J.;PHILIPPE, D.;AUBERT, P.;DOULAY, F.; LIBLAU, R.;GALMICHE, J.P.;NEUNLIST, M. Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. **Gut**. v.55; no.5; p.630–637; May, 2006.

MENDES, F. F.; RODRIGUES, D.F.; PRADO, Y.C.L.; ARAÚJO, E.G. Isquemia cerebral em cães e gatos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n.16, 2013.

RUHL, A. Glial regulation of neuronal plasticity in the gut: implications for clinicians. **Gut**. v.55; no.5; p.600–602; May, 2006.

SINGH, V. ; ROTH, S.; LLOVERA, G.; SADLER, R.; GARZETTI, D.; STECHER, B.; DICHGANS, M.; LIESZ, A. Microbiota dysbiosis controls the neuroinflammatory response after stroke. **Journal of Neuroscience**, v. 36, p. 7428-40, 2016.