

# CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

Renan Monteiro do Nascimento  
(Organizador)



# CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

Renan Monteiro do Nascimento  
(Organizador)



### **Editora Chefe**

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

### **Assistentes Editoriais**

Natalia Oliveira

Bruno Oliveira

Flávia Roberta Barão

### **Bibliotecária**

Janaina Ramos

### **Projeto Gráfico e Diagramação**

Natália Sandrini de Azevedo

Camila Alves de Cremo

Luiza Alves Batista

Maria Alice Pinheiro

### **Imagens da Capa**

Shutterstock

### **Edição de Arte**

Luiza Alves Batista

### **Revisão**

Os Autores

2021 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2021 Os autores

Copyright da Edição © 2021 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná

Prof. Dr. Américo Junior Nunes da Silva – Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Crisóstomo Lima do Nascimento – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Daniel Richard Sant’Ana – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Dilma Antunes Silva – Universidade Federal de São Paulo  
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá  
Prof. Dr. Elson Ferreira Costa – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima  
Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ivone Goulart Lopes – Instituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Jadson Correia de Oliveira – Universidade Católica do Salvador  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Pontifícia Universidade Católica de Campinas  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Luzia da Silva Santana – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Carla Cristina Bauermann Brasil – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia  
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jael Soares Batista – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará  
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido

Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfnas

### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras

Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco

Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto

Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. Cleiseano Emanuel da Silva Paniagua – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás

Prof. Dr. Douglas Gonçalves da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof<sup>ª</sup> Dra. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá  
Prof. Dr. Marco Aurélio Kistemann Junior – Universidade Federal de Juiz de Fora  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Priscila Tessmer Scaglioni – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Linguística, Letras e Artes**

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Carolina Fernandes da Silva Mandaji – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará  
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza  
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Dr. Adilson Tadeu Basquerote Silva – Universidade para o Desenvolvimento do Alto Vale do Itajaí  
Prof. Dr. Alex Luis dos Santos – Universidade Federal de Minas Gerais  
Prof. Me. Aleksandro Teixeira Ribeiro – Centro Universitário Internacional  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Aline Ferreira Antunes – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Andréa Cristina Marques de Araújo – Universidade Fernando Pessoa  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Andrezza Miguel da Silva – Faculdade da Amazônia  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Anelisa Mota Gregoleti – Universidade Estadual de Maringá  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Anne Karynne da Silva Barbosa – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais  
Prof. Me. Armando Dias Duarte – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar

Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos  
Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Me. Christopher Smith Bignardi Neves – Universidade Federal do Paraná  
Prof. Ma. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo  
Profª Drª Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas  
Prof. Me. Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Profª Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília  
Profª Ma. Daniela Remião de Macedo – Universidade de Lisboa  
Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás  
Prof. Me. Edevaldo de Castro Monteiro – Embrapa Agrobiologia  
Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases  
Prof. Me. Eduardo Henrique Ferreira – Faculdade Pitágoras de Londrina  
Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil  
Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
Prof. Me. Ernane Rosa Martins – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás  
Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí  
Prof. Dr. Everaldo dos Santos Mendes – Instituto Edith Theresa Hedwing Stein  
Prof. Me. Ezequiel Martins Ferreira – Universidade Federal de Goiás  
Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora  
Prof. Me. Fabiano Eloy Atilio Batista – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas  
Prof. Me. Francisco Odécio Sales – Instituto Federal do Ceará  
Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo  
Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária  
Prof. Me. Givanildo de Oliveira Santos – Secretaria da Educação de Goiás  
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Me. Gustavo Krahl – Universidade do Oeste de Santa Catarina  
Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro  
Profª Ma. Isabelle Cerqueira Sousa – Universidade de Fortaleza  
Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College  
Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará  
Prof. Dr. José Carlos da Silva Mendes – Instituto de Psicologia Cognitiva, Desenvolvimento Humano e Social  
Prof. Me. Jose Elyton Batista dos Santos – Universidade Federal de Sergipe  
Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay  
Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco  
Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás  
Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFPA  
Prof. Dr. Kárpio Márcio de Siqueira – Universidade do Estado da Bahia  
Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis  
Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR

Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Lillian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe  
Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Luana Ferreira dos Santos – Universidade Estadual de Santa Cruz  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Luana Vieira Toledo – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Luma Sarai de Oliveira – Universidade Estadual de Campinas  
Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos  
Prof. Me. Marcelo da Fonseca Ferreira da Silva – Governo do Estado do Espírito Santo  
Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior  
Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Maria Elanny Damasceno Silva – Universidade Federal do Ceará  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Prof. Me. Pedro Panhoca da Silva – Universidade Presbiteriana Mackenzie  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Poliana Arruda Fajardo – Universidade Federal de São Carlos  
Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Me. Renato Faria da Gama – Instituto Gama – Medicina Personalizada e Integrativa  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof. Me. Robson Lucas Soares da Silva – Universidade Federal da Paraíba  
Prof. Me. Sebastião André Barbosa Junior – Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Silene Ribeiro Miranda Barbosa – Consultoria Brasileira de Ensino, Pesquisa e Extensão  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Taiane Aparecida Ribeiro Nepomoceno – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana  
Prof<sup>ª</sup> Ma. Thatianny Jasmine Castro Martins de Carvalho – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Me. Tiago Silvio Dedoné – Colégio ECEL Positivo  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista



**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira  
**Bibliotecária:** Janaina Ramos  
**Diagramação:** Luiza Alves Batista  
**Correção:** Giovanna Sandrini de Azevedo  
**Edição de Arte:** Luiza Alves Batista  
**Revisão:** Os Autores  
**Organizador:** Renan Monteiro do Nascimento.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

C569 Ciências morfofuncionais / Organizador Renan Monteiro do Nascimento. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5706-838-0

DOI 10.22533/at.ed.380212202

1. Corpo humano. 2. Organismos vivos. I. Nascimento, Renan Monteiro do (Organizador). II. Título.

CDD 612

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

**Atena Editora**  
Ponta Grossa – Paraná – Brasil  
Telefone: +55 (42) 3323-5493  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br

## DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa.

## APRESENTAÇÃO

A coleção “Ciências Morfofuncionais” é uma obra que tem como foco principal a apresentação de trabalhos científicos diversos que compõe seus capítulos relacionados aos mecanismos envolvidos na estrutura e no funcionamento do corpo dos organismos vivos. O volume apresenta um compilado de 7 artigos distribuídos em temáticas que abordam de forma categorizada e interdisciplinar trabalhos, pesquisas, relatos de casos e/ou revisões que transitam nas diversas áreas de aplicação da Anatomia e Fisiologia.

O objetivo central desta coletânea é apresentar de forma categorizada e clara estudos desenvolvidos em diversas instituições de ensino e pesquisa do país. Em todos esses trabalhos a linha condutora foi o aspecto relacionado à Biologia Celular, Biologia Molecular, Bioquímica, Genética, Histologia, Embriologia, Imunologia, Anatomia, Fisiologia, Medicina, Medicina Veterinária, Saúde e áreas correlatas.

O avanço tecnológico e científico tem contribuído com inúmeras pesquisas que analisam a morfologia dos organismos e buscam entender o funcionamento e a interação das moléculas, células, tecidos, órgãos e dos sistemas do corpo. O estudo das Ciências Morfofuncionais pode auxiliar na prevenção e no combate a patologias/doenças que podem afetar a saúde humana e dos demais seres vivos, além de contribuir com o diagnóstico e tratamento de diversas doenças, como o câncer e a diabetes.

Temas diversos e interessantes são deste modo, discutidos aqui com a proposta de fundamentar o conhecimento de Graduados, Mestres, Doutores e todos aqueles que de alguma forma se interessam pelas Ciências Biológicas e pelas Ciências da Saúde em seus aspectos anatômicos e fisiológicos. Possuir um material que demonstre a aplicação da Morfofisiologia em várias áreas do conhecimento, de forma temporal e com dados substanciais de regiões específicas do país tem sido relevante, bem como, abordar temas atuais e de interesse direto da sociedade.

Este livro “Ciências Morfofuncionais” apresenta uma teoria bem fundamentada nos resultados práticos obtidos por vários pesquisadores, professores e acadêmicos que arduamente desenvolveram seus estudos que aqui estão apresentados de maneira concisa e didática. Sabemos o quão importante é a divulgação científica, por isso evidenciamos também a estrutura da Atena Editora, que é capaz de oferecer uma plataforma consolidada e confiável, permitindo que esses pesquisadores exponham e divulguem seus trabalhos científicos.

Desejo a todos uma ótima leitura.

**Renan Monteiro do Nascimento**

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO 1..... 1**

#### **ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS SISTEMAS CORPORAIS**

Micheline Machado Teixeira  
Thais Caroline Fin  
Lucca Rassele  
Hellany Karolliny Pinho Ribeiro  
Fernanda Michel Fuga  
Eidimara Ferreira  
Maykon de Oliveira Felipe  
Luciana da Silva Michel  
Milene Fernandes Briskiewicz

**DOI 10.22533/at.ed.3802122021**

### **CAPÍTULO 2..... 10**

#### **AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DAS JUNÇÕES NEUROMUSCULARES EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE PARALISIA CEREBRAL**

Daniele Cristina Brandoli  
Mylena de Campos Oliveira  
Ariadne Barbosa  
Mikael Gerson Kuhn  
Marcia Miranda Torrejais

**DOI 10.22533/at.ed.3802122022**

### **CAPÍTULO 3..... 20**

#### **MORFOMETRIA DAS CÉLULAS HIPOCAMPAIS EM RATOS DIABÉTICOS APÓS TRATAMENTO COM EXTRATO DA CASCA DE *POUTERIA RAMIFLORA***

Larissa Fernandes Garcia  
Victor Antonio Ferreira Freire  
Gustavo Siconello dos Santos  
Foued Salmen Espindola  
Luciana Karen Calábria

**DOI 10.22533/at.ed.3802122023**

### **CAPÍTULO 4..... 30**

#### **MATRIZ EXTRACELULAR PANCREÁTICA DESCELULARIZADA PARA CRIAÇÃO DE UM BANCO E FUTURA UTILIZAÇÃO EM ENGENHARIA TECIDUAL**

Marluce da Cunha Mantovani  
Tatiane Vieira Fonseca  
Nilsa Regina Damaceno-Rodrigues  
Elia Tamaso Espin Garcia Caldini  
Mari Cleide Sogayar

**DOI 10.22533/at.ed.3802122024**

### **CAPÍTULO 5..... 44**

#### **NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS NADH-DIAFORASE POSITIVOS DO JEJUNO DE RATOS**

**VELHOS SUPLEMENTADOS COM *AGARICUS BLAZEI* MURRILL**

Wesley Ladeira Caputo  
Ana Paula de Santi Rampazzo  
Rosane Marina Peralta  
Adelar Bracht  
Maria Raquel Marçal Natali  
João Paulo Ferreira Schoffen

**DOI 10.22533/at.ed.3802122025**

**CAPÍTULO 6..... 54**

**INFLUENCE OF PEQUI OIL IN REORGANIZATION OF GERBIL PROSTATIC COMPARTMENTS AFTER SURGICAL CASTRATION**

Sergio Marcelino de Oliveira  
Thayna Alves Tabori

**DOI 10.22533/at.ed.3802122026**

**CAPÍTULO 7..... 64**

**MONITORIA: ESTRATÉGIA PARA SUPERAR DESAFIOS DA DISCIPLINA DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA EM UMA UNIVERSIDADE INTERNACIONAL**

Letícia Pereira Felipe  
Davide Carlos Joaquim  
Nicásio Urinque Mendes  
Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona  
Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha  
Ana Caroline Rocha de Melo Leite  
Juliana Jales de Hollanda Celestino

**DOI 10.22533/at.ed.3802122027**

**SOBRE O ORGANIZADOR..... 73**

**ÍNDICE REMISSIVO..... 74**

# CAPÍTULO 1

## ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS SISTEMAS CORPORAIS

Data de aceite: 01/03/2021

Data de submissão: 28/01/2021

### **Micheline Machado Teixeira**

Universidade de Passo Fundo  
Passo Fundo-Rio Grande do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/4932713043346407>

### **Thais Caroline Fin**

Universidade de Passo Fundo  
Passo Fundo-Rio Grande do Sul  
<https://orcid.org/0000-0002-2384-0905>

### **Lucca Rassele**

Universidade de Passo Fundo  
Passo Fundo-Rio Grande do Sul

### **Hellany Karolliny Pinho Ribeiro**

Universidade Federal do Piauí  
Passo Fundo-Rio Grande do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/7856998046944535>

### **Fernanda Michel Fuga**

Universidade de Passo Fundo  
Passo Fundo-Rio Grande do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/7907081905861395>

### **Eidimara Ferreira**

Universidade de Passo Fundo  
Passo Fundo-Rio Grande do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/6353182178217617>

### **Maykon de Oliveira Felipe**

Universidade de Passo Fundo  
Passo Fundo-Rio Grande do Sul  
<http://lattes.cnpq.br/9183716110409095>

### **Luciana da Silva Michel**

Hospital de Clínicas de Passo Fundo  
Passo Fundo-Rio Grande do Sul

### **Milene Fernandes Briskiewicz**

Hospital de Clínicas de Passo Fundo  
Passo Fundo-Rio Grande do Sul

**RESUMO:** O corpo humano é uma máquina perfeita e que funciona a partir da atuação conjunta de diversos sistemas. Como todos os seres vivos, com exceção dos vírus, os seres humanos possuem seu corpo formado por células, que formam tecidos, os quais formam órgãos, que, por sua vez, formam sistemas. Dessa forma, é formado pelos sistemas: cardiovascular, respiratório, digestório, nervoso, sensorial, endócrino, excretor, urinário, reprodutor, esquelético, muscular, imunológico, linfático, tegumentar. Cada um deles envolve órgãos que atuam para a realização das funções vitais do organismo. Assim, no corpo humano existem órgãos e complexos sistemas que interagem uns com os outros, de forma a garantir que as funções vitais do organismo estejam em funcionamento. Homeostase é o equilíbrio que esses sistemas devem ter para a realização dessas funções.

**PALAVRAS-CHAVE:** Corpo, fisiologia, morfologia.

## MORPHOLOGICAL ASPECTS OF BODY SYSTEMS

**ABSTRACT:** The human body is a perfect machine and it works from the joint performance of several systems. Like all living beings, with the exception of viruses, human beings have their bodies formed by cells, which form tissues, which form organs, which in turn form systems. Thus, it is formed by the following systems: cardiovascular, respiratory, digestive, nervous, sensory, endocrine, excretory, urinary, reproductive, skeletal, muscular, immune, lymphatic, integumentary. Each of them involves organs that act to carry out the vital functions of the organism. Thus, in the human body there are organs and complex systems that interact with each other, in order to ensure that the vital functions of the organism are functioning. Homeostasis is the balance that these systems must have to carry out these functions.

**KEYWORDS:** Body, physiology, morphology.

O sistema esquelético humano tem a função de atuar na sustentação do corpo e na proteção de órgãos vitais (como o encéfalo e os pulmões, por exemplo). Ainda, é por meio do sistema esquelético em conjunto com o muscular que o corpo se locomove. Também, o sistema esquelético é reserva de gorduras e de minerais (cálcio e fósforo) e o centro de produção de células sanguíneas (medula óssea vermelha). (AMABIS, MARTHO, 2016)

O esqueleto humano é formado por mais de duzentos ossos de diferentes tipos (ossos longos, chatos ou planos, curtos, irregular e sesamoide) unidos uns aos outros de maneira articulável (articulações) ou fixa. Ainda, o esqueleto é dividido em axial (ossos da cabeça e tronco, formando um eixo, o que inclui a costelas e coluna vertebral, totalizando 80 ossos) e apendicular (ossos dos membros anteriores e posteriores e as cinturas articulares pélvica e escapular, num total de 126 ossos). (LOPES, ROSSO, 2013)

Outro sistema, chamado sistema muscular humano, tem a função de estabilizar as posições do corpo, produzir movimentos, regular o volume dos órgãos, movimentar substâncias dentro do corpo e produzir calor. Embora os ossos forneçam força mecânica (de alavanca) e formem o arcabouço do corpo, não podem mover, sozinhos, partes do corpo. O movimento resulta da alternância entre contração e relaxamento dos músculos, que constituem 40 a 50% do peso total do corpo adulto. A força muscular reflete a função básica do músculo - a transformação da energia química em energia mecânica para gerar força, realizar trabalho e produzir movimento. O estudo científico dos músculos é conhecido como miologia. (FAVARETTO, 2016)

É formado por mais de 600 músculos classificados como: músculos esqueléticos: os responsáveis pela movimentação voluntária do esqueleto (músculos da perna, do braço, da face); músculos lisos: responsáveis pelos movimentos involuntários da maioria dos órgãos e estruturas internas do corpo humano (bexiga, pulmão, estômago, veias); músculo cardíaco (músculo do coração, chamado miocárdio): composto por células alongadas, cilíndricas e estriadas com um ou dois núcleos em sua porção central, faz movimentos rápidos, vigorosos e ritmados promovendo o bombeamento do sangue para todo o corpo. (AMABIS, MARTHO, 2016)

O coração é formado por células musculares estriadas cardíacas (miocárdio) que se contraem involuntariamente realizando o bombeamento do sangue para todas as partes do corpo. Com aproximadamente o tamanho de 12 cm de comprimento por 9 cm de largura, localiza-se sobre o músculo diafragma em uma região chamada de mediastino. O coração apresenta quatro cavidades: dois átrios (câmaras receptoras do sangue) e dois ventrículos (câmaras de bombeamento). O átrio direito e comunica com o ventrículo direito pela valva atrioventricular direita (válvula tricúspide). (LOPES, ROSSO, 2013)

A comunicação entre o átrio esquerdo o ventrículo esquerdo se dá pela valva atrioventricular esquerda (válvula bicúspide ou mitral). Não ocorre mistura de sangue do lado direito (sangue venoso: rico em gás carbônico vindo de todas as partes do corpo) com o sangue do lado esquerdo (sangue arterial: rico de oxigênio vindo do pulmão), que é bombeado por dois caminhos: grande circulação (circulação sistêmica) e pequena circulação (circulação pulmonar). Vasos sanguíneos (veias e vênulas, artérias e arteríolas, capilares): servem para fazer o sangue circular por todo o corpo partindo do coração e irrigando cada uma de suas células, realizando a troca de materiais. (AMABIS, MARTHO, 2016)

As veias, com calibre menor, partem dos diversos órgãos do corpo e chegam ao coração no átrio direito (pela veia cava superior e veia cava inferior). As artérias, de calibre maior e paredes espessas, musculosas e elásticas, partem do ventrículo esquerdo do coração (pela artéria aorta). Sangue: é um tecido conjuntivo líquido formado, a partir da medula óssea vermelha, por 45% de células (hemácias ou glóbulos vermelhos ou eritrócitos, leucócitos ou glóbulos brancos e plaquetas), também chamados de elementos figurados. (LOPES, ROSSO, 2013)

Ainda, 55% de uma matriz extracelular líquida (plasma), composta por 91,5% de água, 7% de proteínas (albuminas, globulinas, fibrinogênio, dentre tantas) e 1,5% de outros solutos (eletrólitos, nutrientes, gases, substâncias reguladoras e produtos residuais). O sangue tem especialmente três funções: transporte de gases e outras substâncias (hemácias); regulação do pH, temperatura e conteúdo hídrico das células; e, por fim, proteção contra a perda sanguínea pela coagulação (plaquetas) e defesa do organismo (leucócitos). (LOPES, ROSSO, 2013)

A energia (ATP) para o funcionamento de cada uma das células do corpo humano provém das reações de respiração celular que necessitam de O<sub>2</sub> e liberam CO<sub>2</sub>. Assim, o sistema respiratório humano tem a função de contribuir com a homeostasia do organismo (equilíbrio), possibilitando as trocas gasosas (oxigênio [O<sub>2</sub>] e gás carbônico [CO<sub>2</sub>]) entre o ar atmosférico e o corpo (por meio do sangue e do sistema cardiovascular). Também tem a função de regular o pH do sangue e possibilitar a sensação do olfato, filtrar o ar inspirado, produzir sons vocais (fonação) e eliminar pequena quantidade de água e de calor. O sistema respiratório humano é formado pelos seguintes órgãos: nariz e faringe (sistema respiratório



superior) e laringe, traqueia, brônquios e pulmões (sistema respiratório inferior). (AMABIS, MARTHO, 2016)

A energia (ATP) para o funcionamento de cada uma das células do corpo humano provém, também, da glicose extraída dos alimentos. Assim, o sistema digestório humano contribui com a homeostasia do organismo (equilíbrio), decompondo os alimentos em formas que são absorvidas e usadas pelas células, ou seja, promove a digestão deles possibilitando a absorção de água, sais minerais, vitaminas, proteínas, carboidratos (dentre eles a glicose), lipídios e ácidos nucleicos. São, então, funções do sistema digestório: ingestão, mistura e propulsão do alimento; secreção de substâncias (água, ácidos, enzimas, entre outros); digestão (química e mecânica do alimento); absorção (passagem de produtos digeridos do sistema digestório para o sangue e depois para as células); defecação (eliminação dos restos alimentares que não foram absorvidos). (AMABIS, MARTHO, 2016)

Todos os outros sistemas do corpo humano operam controlados pelo sistema nervoso, formado especialmente por tecido nervoso que é composto por dois tipos de células: neurônios e neuróglias. Junto com o sistema endócrino, mantém a homeostasia do organismo. Para isso, o sistema nervoso controla a geração de impulsos nervosos (potenciais de ação) que produzem a regulação e a comunicação entre a maioria dos tecidos. Dessa forma, o sistema nervoso tem função: sensorial (detecta estímulos internos e externos); integrativa (processa a informação sensorial, analisa, armazena e toma decisões e respostas apropriadas); e, motora (provoca uma resposta motora apropriada ativando os efetores, que são os músculos ou glândulas). Para assim atuar, o sistema nervoso se divide em Sistema Nervoso Central (SNC) - formado pelo encéfalo e pela medula espinal e recoberto pelas meninges - e Sistema Nervoso Periférico (SNP) - formado pelos nervos e gânglios e dividindo-se em SNP autônomo (simpático e parassimpático) e SNP somático. (FAVARETTO, 2016)

Fazendo parte do SNC, o encéfalo é o centro integrador que recebe, processa e armazena informações, tomando decisões e produzindo atividades motoras. Protegido pelo crânio (osso), é formado por aproximadamente 100 bilhões de neurônios e pesa em torno de 1,3 Kg em adultos. O encéfalo adulto consiste em quatro partes principais: tronco encefálico, cerebelo, diencéfalo e cérebro, cada um com funções específicas e várias outras subdivisões. (FAVARETTO, 2016)

A medula espinal (ou espinhal): localizada dentro do canal vertebral na coluna vertebral, consiste de um delicado tecido nervoso que se estende da base do encéfalo até a margem superior da segunda vértebra lombar, medindo cerca de 42 a 45cm. Dela partem 31 pares de nervos espinais que, de acordo com sua localização, se dividem em nervos cervicais (oito pares entre vértebra cervical 1 e 8), nervos torácicos (12 pares entre vértebras torácicas 1 e 12), nervos lombares (cinco pares entre vértebras lombares 1 e 5), nervos sacrais (cinco pares entre vértebras sacrais 1 e 5) e nervos coccígeos (um par na região do cóccix). (AMABIS, MARTHO, 2016)

Já os nervos são filamentos esbranquiçados formados por feixes de axônios envoltos por camada de tecido conjuntivo que se classificam em sensitivos (ou aferentes, conduzem o impulso nervoso das células sensoriais para o SNC), motores (ou eferentes, conduzem o impulso do SNC para os órgãos efetores) e mistos ou associativos (possuem tanto axônios de neurônios sensitivos como de motores). (MENDONÇA,2016)

Os nervos podem ser classificados, ainda, em espinais (partem da medula espinal) ou cranianos (partem do encéfalo). Gânglios: são pequenas massas de tecido nervoso, contendo basicamente corpos de células neuronais, que estão localizados fora do encéfalo e da medula espinal. Os gânglios estão intimamente associados com os nervos espinais e cranianos. (NETTER,2014)

O sistema límbico humano é a unidade responsável pelas emoções e comportamentos sociais. É uma região constituída de neurônios, células que formam uma massa cinzenta denominada de lobo límbico. O sistema límbico é, algumas vezes, chamado de encéfalo emocional, circundando a parte superior do tronco encefálico e o corpo caloso, apresenta-se como um anel de estruturas, na margem interna do cérebro e no assoalho do diencefalo. Os principais componentes do sistema límbico são o lobo límbico, o giro denteado, tonsila, núcleos septais, corpos mamilares do hipotálamo, núcleos do tálamo, bulbos olfatórios e outras estruturas (fórnice, estriais terminais, estrias medulares, fascículo medial do telencéfalo e o trato mamilotalâmico). Com a atuação conjunta desses elementos o sistema límbico exerce uma função primária em uma gama de emoções (prazer, dor, docilidade, afeto, medo e raiva). (LOPES, ROSSO, 2013)

O sistema também está implicado na olfação (odor) e na memória. Por exemplo, a estimulação da tonsila em experimentos com gatos produz medo e um padrão comportamental de raiva. Ao contrário, quando é lesada ou removida o animal torna-se dócil e sem medo. Em humanos, lesões na tonsila faz com que não reconheçam expressões de medo em outras pessoas ou não expressem medo em situações apropriadas. (AMABIS, MARTHO, 2016)

Já o sistema endócrino humano, por meio da produção e liberação dos hormônios pelas glândulas, controlam a homeostasia do organismo, ou seja, coordena todas as atividades do organismo (juntamente com o sistema nervoso). Assim, são funções do sistema endócrino/hormônios: a regulação da composição química e do volume do líquido intersticial (entre as células); regulação do metabolismo e do equilíbrio energético do organismo; regulação da contração dos músculos lisos e cardíaco; regulação das secreções glandulares; regulação de algumas atividades do sistema imune. (MENDONÇA,2016)

Ainda, controla o desenvolvimento e o crescimento humano, o funcionamento do sistema reprodutor e os ritmos circadianos (como, por exemplo, a digestão, o estado de vigília, o sono, a regulação das células e a temperatura corporal). Para tais atuações, os principais órgãos que compõem esse sistema são as glândulas endócrinas, que secretam seus produtos (hormônios) no líquido intersticial que envolve as células secretoras e, após,

difundem-se pelos capilares sanguíneos até as células-alvo (onde vai atuar efetivamente). (FAVARETTO,2016)

As glândulas endócrinas incluem a hipófise, a tireoide, a paratireoide, a suprarrenal e a pineal. Além disso, diversos órgãos e tecidos não são assim classificados mas secretam hormônios (hipotálamo [principal elo de ligação entre o sistema nervoso e o endócrino, timo, pâncreas, ovários, testículos, rins, estômago, fígado, intestino delgado, pelo, coração, tecido adiposo e placenta). Em conjunto, todas as glândulas endócrinas e essas estruturas formam o sistema endócrino. A ciência que o estuda é a endocrinologia. (FAVARETTO,2016)

O sistema urinário humano contribui para a homeostasia do corpo alterando a composição, o pH, o volume e a pressão sanguínea. Ainda, mantendo a osmolaridade do sangue e excretando resíduos e substâncias estranhas e produzindo hormônios. Tais funções são exercidas em razão de que os rins filtram o sangue (plasma), fazendo retornar grande parte da água e dos solutos para a corrente sanguínea e o restante vai formar a urina (que passa pelos ureteres e é armazenada na bexiga até ser excretada do corpo pela uretra). O sistema consiste em dois rins, dois ureteres, uma bexiga urinária e uma uretra. (AMABIS, MARTHO, 2016)

Para produzir urina, ocorrem três processos básicos: filtração glomerular (primeiro estágio da formação da urina que ocorre na cápsula de Bowman, a partir da filtração do plasma sanguíneo produzindo o filtrado glomerular); reabsorção tubular (retorno de água [99%] e solutos úteis do filtrado à corrente sanguínea à medida que passam pelo túbulo renal) e secreção tubular (à medida que o líquido flui ao longo do túbulo e ducto coletor, estes secretam substâncias removidas do sangue, como resíduos, fármacos e excesso de íons).(NETTER,2014)

Ademais, o sistema reprodutor humano (feminino e masculino) contribui para a reprodução sexuada, gerando a prole, e garantindo a perpetuação da espécie. Assim, proporciona condições físicas e hormonais para a formação e amadurecimento dos gametas (óvulo e espermatozoide), a fecundação e a manutenção e crescimento do embrião e feto (gravidez) e o nascimento dos bebês, além de possibilitar o prazer sexual. Ginecologia é o ramo especializado da medicina relacionada ao diagnóstico e tratamento de doenças do sistema genital feminino, enquanto a urologia trata do masculino.(FAVARETTO,2016)

A Genitália externa ou pudendo é localizada na região do baixo ventre, forma-se pelos *pequenos e grandes lábios* que se constituem em dobras cutâneas extremamente irrigadas por sangue que se estendem da região inferior do púbis até a proximidade do ânus, protegendo a uretra e o canal vaginal. Revestida por *pelos pubianos*, nessa região também encontra-se o *clitóris*, estrutura homóloga ao pênis, que é responsável por grande parte do prazer sexual feminino. Também encontra-se a *entrada da vagina* (ou *óstio vaginal*, recoberto pelo *hímen*, que se rompe, geralmente, após as primeiras relações sexuais, permite a relação sexual e a saída do bebê pelo parto normal) e a *saída da uretra* (permite a passagem e eliminação da urina). (LOPES, ROSSO, 2013)

A imunidade ou resistência do organismo humano é a capacidade deste de precaver-se contra dano ou doença, por intermédio de suas próprias defesas. As substâncias ou seres estranhos ao organismo são conhecidos como antígenos. Assim, a imunidade pode ser classificada em: 1) imunidade inata (ou inespecífica) que refere-se às defesas presentes desde o nascimento, estando sempre disponíveis a fornecer respostas rápidas de proteção - são as barreiras físicas e químicas da pele e mucosas e as defesas internas (dentre elas, a febre e a inflamação); 2) imunidade adaptativa (adquirida ou específica) que refere-se às defesas que envolvem a identificação específica de um micróbio, quando aquelas da imunidade inata foram vencidas. (AMABIS, MARTHO, 2016)

Tem resposta mais lenta e um componente de memória - ocorre pela ação de células, linfócitos T e B (tipo de glóbulos brancos/leucócitos do sangue), ou por meio de substâncias, os anticorpos. Considerando essas atuações, a imunidade humana adaptativa e parte da inata são estreitamente exercidas pelo sistema linfático, por meio de seus *órgãos primários* (medula óssea vermelha e timo) e *órgãos* (linfonodos e baço) e *tecidos* (nódulos linfáticos) *secundários*. (NETTER,2014)

As barreiras físicas formam a primeira linha de defesa do sistema imunitário humano, as defesas inatas conferidas pela epiderme da pele, túnicas mucosas, muco, pelos, cílios, lágrima, saliva, urina, defecação e vômitos. Barreiras químicas formam a primeira linha de defesa do sistema imunitário humano, as defesas inatas auferidas pelo sebo, lisozima (substância antimicrobiana presente na perspiração, lágrimas, saliva, secreções nasais e líquidos teciduais), suco gástrico e secreções vaginais. As defesas internas formam a segunda linha de defesa do sistema imunitário humano, as defesas inatas auferidas por substâncias antimicrobianas como os interferons, sistema do complemento, proteínas de ligação ao ferro, proteínas antimicrobianas e, ainda, as células citotóxicas naturais, como os fagócitos (neutrófilos e macrófagos especialmente) que induzem o processo inflamatório e a febre.(MENDONÇA,2016)

Existe os linfócitos T CD4 que reconhecem o antígeno e produzem as interleucinas que ativam a produção dos linfócitos T CD8 que produzem perforinas que destroem a célula infectada. Constituem grande parte da memória imunológica. Já os Linfócitos/células B são células sanguíneas (glóbulos brancos ou leucócitos) especializadas na resposta imune humoral, ativados por um antígeno se diferenciam em plasmócitos que produzem os anticorpos ou se diferenciam em células da memória (0,5%). (FAVARETTO,2016)

O sistema tegumentar humano ou tegumento comum forma-se a parte de órgãos como a pele (maior e mais pesado órgão humano) e os anexos: pelos, glândulas sebáceas e sudoríparas, unhas e receptores sensitivos. Assim, esse sistema contribui com a homeostasia protegendo o corpo (barreira física), auxiliando na regulação da temperatura e permitindo a sensação do tato, basicamente. Em virtude de sua visibilidade, a pele reflete emoções (desagrado, rubor) e alguns aspectos da fisiologia normal (como a transpiração, alteração na cor, na textura). Esteticamente também é importante esse sistema, sendo

que a dermatologia é a especialidade médica que lida com o diagnóstico e o tratamento de doenças do tegumento comum. (NETTER,2014)

A pele, também conhecida como *cútis* ou tegumento, recobre a superfície externa do corpo, em um adulto perfaz uma área de cerca de 2m<sup>2</sup>, equivalendo a 16% do peso corporal total e variando de 4,5 a 5 Kg, com espessura entre 0,5mm nas pálpebras e 4 mm nos calcanhares. Estruturalmente a pele compõe-se de duas partes principais: a epiderme e a derme que assentam-se sobre a hipoderme (tecido adiposo e areolar). A epiderme é formada por tecido epitelial estratificado queratinizado, composto por quatro tipos principais de células: queratinócitos (produzem a queratina), melanócitos (produzem a melanina), células de Langerhans (participam de respostas imunes) e células de Merkel (detectam sensações táteis).(MENDONÇA,2016)

A epiderme é avascular, ou seja, os nutrientes e o oxigênio se difundem para ela a partir da derme. A derme, por sua vez, é a camada mais profunda da pele, composta por tecido conjuntivo resistente, contendo fibras elásticas e colágenas que lhe conferem resistência e a capacidade de esticar e retrair facilmente. Nela se encontra grande número de vasos sanguíneos, nervos, glândulas e folículos pilosos. As funções da pele são: termorregulação (regulação homeostática da temperatura corporal liberando suor na superfície e ajustando o fluxo de sangue na derme), reservatório de sangue (a derme abriga uma extensa rede de vasos sanguíneos que transportam de 8 a 10% do fluxo total de sangue no adulto em repouso), proteção (por meio da queratina, dos lipídios, do sebo, do pH ácido da transpiração, da melanina e pela ação das células de Langerhans). (NETTER,2014)

Ainda, é função da pele a sensibilidade cutânea (tátil – toque, pressão, vibração e cócegas - e de dor, em função das inúmeras terminações nervosas e receptores presentes na derme), excreção (embora impermeável, a pele exerce funções menores de excreção [água, suor, sais, CO<sub>2</sub>, amônia e ureia] e absorção (vitaminas lipossolúveis, solventes orgânicos e sais de metais pesados), também, a síntese de vitamina D. Pelos: com a função de proteção e percepção, estão presentes na maior parte das superfícies cutâneas, com exceção das palmas e faces palmares dos dedos das mãos e pés. Nos adultos, o pelo é, em geral, mais densamente distribuído no couro cabeludo, nas sobrelanceiras, nas axilas e em torno do genitais externos, sendo afetados em sua quantidade, espessura e padrão de distribuição por influências hormonais e genéticas.(LOPES, ROSSO, 2013)

A combinação das secreções das glândulas sebáceas (sebo) e ceruminosa (“cera”) forma um material amarelado chamado **cerume**. Este, junto com os pelos, no meato acústico externo, fornece uma barreira viscosa que impede a entrada de corpos estranhos e insetos. Ainda, impermeabiliza o canal e inibe a entrada de bactérias e fungos nas células. As unhas são placas de células epidérmicas queratinizadas, mortas, duras e firmemente compactadas, que formam uma cobertura sólida e clara sobre as superfícies dorsais das partes distais dos dedos. Cada unha consiste de um corpo, uma margem livre e uma raiz,

tendo a função de segurar e manipular pequenos objetos de várias maneiras, proteger contra trauma às extremidades dos dedos e coçar. (MENDONÇA,2016)

O crescimento da unha ocorre pela transformação das células superficiais da matriz em células da unha, sua velocidade é determinada por fatores como idade, saúde e condição nutricional da pessoa. O crescimento médio no comprimento das unhas das mãos é de aproximadamente 1mm por semana, para as unhas dos pés esse processo é mais lento.(LOPES, ROSSO, 2013)

## REFERÊNCIAS

AMABIS, José Mariano; MARTHO, Gilberto Rodrigues. **Biologia moderna**: volume 2: ensino médio. São Paulo: Moderna, 2016.

FAVARETTO, José Arnaldo. **Biologia**: unidade e diversidade: volume 2. São Paulo: FTD, 2016.

LOPES, Sônia; ROSSO, Sergio. **Bio**: volume 2. 2.ed. São Paulo: Saraiva, 2013.

MENDONÇA, Vivian L. **Biologia**: ensino médio: volume 3. 3.ed. São Paulo: AJS, 2016.

NETTER, Frank H. **Atlas de anatomia humana**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

TORTORA, Gerard J.; DERRICKSON, Bryan. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

# CAPÍTULO 2

## AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DAS JUNÇÕES NEUROMUSCULARES EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE PARALISIA CEREBRAL

Data de aceite: 01/03/2021

Data de submissão: 05/01/2021

### **Daniele Cristina Brandoli**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Cascavel-Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/0412676086326559>

### **Mylena de Campos Oliveira**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Cascavel-Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/9395722821849634>

### **Ariadne Barbosa**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Cascavel-Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/7900798582111763>

### **Mikael Gerson Kuhn**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Cascavel-Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/9197639483878066>

### **Marcia Miranda Torrejais**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Cascavel-Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/6079757636423339>

**RESUMO:** A Paralisia cerebral (PC) é uma doença crônica, caracterizada por disfunção sensorio-motora que envolve distúrbios no tônus muscular, na postura e na movimentação voluntária. O objetivo deste estudo foi avaliar a morfologia e morfometria das junções neuromusculares (JNMs) do músculo tibial

anterior de ratos *Wistar* submetidos a um modelo de PC. Ratas prenhas foram injetadas intraperitonealmente com solução salina ou lipopolissacarídeo (LPS) durante a gestação. Os filhotes machos compuseram: Grupo controle (GC, n=7) - filhotes de mães injetadas com solução salina; e Grupo PC (GPC, n=7) - filhotes de mães injetadas com LPS, submetidos à anóxia perinatal (dia do nascimento - P0) e restrição sensorio motora (P1 ao P30). No 48º dia pós-natal os animais foram pesados, eutanasiados e o músculo tibial anterior coletado. O antímero esquerdo do músculo foi submetido à técnica de Esterase Inespecífica para a mensuração da área, diâmetros maior e menor das JNMs. As análises dos dados corporais mostraram que os animais PC apresentaram menor peso corporal, peso e comprimento do músculo tibial anterior quando comparados ao GPC. A área, diâmetros maior e menor das JNMs do músculo também foram menores nos animais do GPC. A PC promoveu alteração nos parâmetros corporais e nas JNMs, sendo ocasionadas por deficits motores, relacionados a restrição sensorio-motora.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lipopolissacarídeo, morfologia, restrição sensorio-motora.

### MORPHOLOGICAL AND MORPHOMETRIC EVALUATION OF NEUROMUSCULAR JUNCTIONS IN RATS SUBMITTED TO A CEREBRAL PALSY MODEL

**ABSTRACT:** Cerebral palsy (CP) is a chronic disease, characterized by sensorimotor dysfunction that involves disorders in muscle

tone, posture and voluntary movement. The objective of this study was to evaluate the morphology and morphometry of the neuromuscular junctions (NMJs) of the anterior tibial muscle of Wistar rats submitted to a PC model. Pregnant Wistar rats were injected intraperitoneally with saline or lipopolysaccharide (LPS) during pregnancy. The male puppies composed: Control group (CG, n = 7) - puppies of mothers injected with saline solution; and PC Group (GPC, n = 7) - puppies of mothers injected with LPS, submitted to perinatal anoxia (day of birth - P0) and motor sensory restriction (P1 to P30). On the 48th postnatal day, the animals were weighed, euthanized and the anterior tibial muscle was collected. The left antimere of the muscle was subjected to the Unspecified Esterase technique to measure the area, larger and smaller diameters of the NMJs. The analysis of body data showed that the CP animals had lower body weight, and length of the anterior tibial muscle when compared to the GPC. The area, larger and smaller diameters of the muscle NMJs were also smaller in the GPC animals. CP promoted changes in the body parameters and in the NMJs, caused by motor deficits, related to sensorimotor restriction.

**KEYWORDS:** Lipopolysaccharide, morphology, sensorimotor restriction.

## 1 | INTRODUÇÃO

A paralisia cerebral (PC), conhecida também como encefalopatia crônica não progressiva da infância, é definida como, grupo não progressivo de desordens do desenvolvimento, postura e movimento, descrito como síndromes do desenvolvimento motor (Zanini *et al.*, 2009).

Os seus principais sintomas são comprometimento do tônus muscular, das funções motoras, equilíbrio, reflexos, postura, déficits auditivos e visuais, convulsões, dificuldades de aprendizagem e transtornos de linguagem (DODGE, 2008; KRIGGER, 2006; ROTTA, 2002). As alterações musculoesqueléticas incluem atrofia ou hipertrofia das fibras musculares, aumento do tecido conjuntivo na musculatura, malformação óssea e degeneração da cartilagem (COQ *et al.*, 2008).

Diversos modelos experimentais em PC são encontrados, podendo utilizar-se da administração de lipopolissacarídeo (LPS) (Roberson *et al.*, 2006), anóxia perinatal (Zhuravin *et al.*, 2004), e restrição sensorio motora pós-natal (Strata *et al.*, 2004). Pois acredita-se que a restrição sensorio-motora imita a imobilidade induzida pela espasticidade, enquanto a associação com LPS e anóxia perinatal desempenham um papel importante na reprodução de um fenótipo mais complexo de PC. (Stigger *et al.*, 2011), Além de que quando utilizados em conjunto, causaram déficits de equilíbrio e coordenação além de alterações na morfologia dos músculos, redução na área de secção transversal das fibras, aumento do comprimento e diminuição da densidade do sarcômero. (STIGGER *et al.*, 2011).

As junções neuromusculares (JNMs) são regiões sinápticas, responsáveis pela transmissão dos impulsos nervosos e geração da contração muscular (Wu *et al.*, 2010).

O objetivo deste estudo foi avaliar a morfologia e morfometria das JNMs do músculo tibial anterior de ratos *Wistar* submetidos a um modelo de PC.



## 1.1 Paralisia cerebral

A paralisia cerebral (PC) conhecida também como encefalopatia crônica não progressiva da infância é definida como, grupo não progressivo de desordens do desenvolvimento, postura e movimento, ditos como síndromes do desenvolvimento motor, secundárias a lesões ocorridas no encéfalo em seu período de desenvolvimento (Zanini *et al.*, 2009; Pin *et al.*, 2013). Ela é caracterizada principalmente por ocorrência de disfunção motora, distúrbios no tônus muscular e alterações neuromusculares, sendo geralmente acompanhados por outras desordens como retardo mental, defeitos sensoriais e epilepsia (Assis-Madeira & Carvalho, 2009). Estes distúrbios levam a falta de controle sobre os movimentos, modificações no comprimento muscular e em alguns casos deformidades ósseas (Oliveira *et al.*, 2013).

Dados mostram que sua incidência estimada é de 1,5 a 2,5 para cada 1.000 nascidos vivos nos países desenvolvidos e de sete para cada 1.000 nascidos vivos em países em desenvolvimento, sendo que no Brasil o número é de 30 a 40 mil novos casos por ano (Lima *et al.*, 2014).

## 1.2 Modelos experimentais de PC

Na tentativa de mimetizar as características encontradas em pacientes com PC, modelos experimentais são utilizados. Para tanto, levam-se em conta os fatores pré e pós-natais responsáveis pela síndrome. Estes podem ser reproduzidos de forma isolada ou em conjunto, na indução da PC. Desta forma, há na literatura modelos experimentais utilizando-se de administração de LPS (Roberson *et al.*, 2006), anóxia perinatal (Zhuravin *et al.*, 2004), restrição sensório motora pós-natal (Strata *et al.*, 2004), bem como a utilização da administração de LPS e anóxia perinatal (Stigger *et al.*, 2013) e anóxia perinatal associada à restrição sensório-motora pós-natal (Marcuzzo *et al.*, 2008) para a indução da síndrome.

Stigger *et al.*, (2011) estudaram os efeitos da exposição pré-natal ao LPS, anóxia perinatal e restrição sensório-motora, tanto de forma isolada quanto todas as combinações possíveis entre eles. E observaram que em todas as tentativas os ratos expostos apresentaram redução do equilíbrio e coordenação no teste de Rotarod. Nos animais submetidos a restrição sensório-motora foram encontradas alterações motoras mais graves e na associação dos três insultos foi observado redução na área de secção transversal das fibras do músculo tibial anterior (Stigger *et al.*, 2011).

Em estudo de Buratti *et al.*, (2019) a PC foi induzida através da administração de LPS durante a gestação, anóxia perinatal e restrição sensório-motora pós-natal, sendo observado nos ratos com PC redução do peso corporal, peso e comprimento muscular e, quanto às características morfológicas do músculo plantar, os animais apresentaram redução nas relações núcleo/fibra e capilar/fibra, menor área das fibras musculares e JNMs.

Sendo assim, observa-se que a combinação mais eficaz na indução da PC é a associação administração de LPS no período gestacional, anóxia perinatal e restrição

sensorio-motora de acordo com literatura consultada e nos modelos experimentais envolvendo PC.

### 1.3 Junções neuromusculares

Os músculos estriados esqueléticos têm suas contrações comandadas através de estímulos vindos do sistema nervoso, através das junções neuromusculares (JNMs) (Junqueira & Carneiro, 2013), que são, portanto, a conexão sináptica entre os neurônios motores e as fibras musculares (Wu *et al.*, 2010). Elas são formadas por uma parte pré-sináptica, chamada terminação nervosa, responsável pela síntese dos neurotransmissores, que neste caso é a acetilcolina (ACh) que fica armazenada em vesículas (Bloch-Gallego, 2015).

Quando um potencial de ação chega até a terminação nervosa, ocorre a abertura de canais de cálcio (Ca<sup>2+</sup>), desencadeando a migração das vesículas para a superfície nervosa, que se rompem e liberam a ACh para a fenda sináptica (Martym *et al.*, 2009). Já a parte pós-sináptica é constituída por receptores de ACh, que são ativados e respondem ao estímulo abrindo canais de sódio, promovendo a amplificação do sinal, garantindo a propagação da atividade elétrica e promovendo a contração muscular (Fangerlund & Ericksson, 2009).

### 1.4 Efeitos da PC nas JNMs

Embora a PC seja uma doença que acometa principalmente o sistema muscular, afetando a função motora do indivíduo, ainda são poucos os trabalhos que avaliam seus efeitos na morfologia da musculatura esquelética e nas JNMs.

Buratti *et al.*, (2019) realizaram um estudo com modelo experimental de PC e observaram que o músculo plantar de ratos com PC apresentou redução de 20% na área das fibras tipo I e 25% na área, 11% no diâmetro maior e 11% no diâmetro menor das JNMs.

No estudo experimental desenvolvido por Covatti *et al.*, (2018) observou-se que o músculo extensor longo dos dedos de ratos com PC apresentou aumento da área das fibras tipo IIB e aumento de 22% e 11% na área e diâmetro maior das JNMs respectivamente.

Devido ao fato de ainda não estarem estabelecidas quais alterações a PC pode causar na estrutura das JNMs, torna-se estritamente importante o desenvolvimento de novos estudos para compreender melhor os efeitos desta síndrome.

## 2 | OBJETIVOS

Avaliar a morfologia e morfometria das JNMs do músculo tibial anterior de ratos submetidos a PC.

### 3 I MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais utilizados neste estudo foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) N° 24/16 da Unioeste.

#### 3.1 Obtenção dos animais e indução do modelo experimental de PC

Para a realização do experimento foram utilizadas ninhadas de ratos *Wistar* com três meses de idade (11 fêmeas e 06 machos). Onde foram acondicionados em caixas de policarbonato (27 x 26 x 31 cm) forradas com maravalha e mantidos sob condições controladas de temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h), com água e ração padrão *ad libitum*.

Inicialmente, as fêmeas foram submetidas a exames colpocitológicos para o acompanhamento do ciclo estral. Quando estas se encontrarem em fase receptiva (*proestro*), foram colocadas em caixas individuais (19 x 11 x 10 cm) com um macho para pareamento. Após confirmação da prenhez, através do exame colpocitológico, será injetado intraperitonealmente solução salina estéril (100  $\mu\text{L}$ ) ou com LPS (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LPS em 100  $\mu\text{L}$  de solução salina estéril) nas fêmeas prenhas. Estas injeções serão realizadas a cada 12 horas, a partir do 17° dia gestacional até o final da gestação (21° dia gestacional) (Stigger *et al.*, 2011).

No dia do nascimento (dia pós-natal 0 - P0) foi realizada a padronização das ninhadas. Filhotes machos, oriundos de pelo menos quatro ninhadas foram separados em dois grupos: Grupo controle (GC,  $n = 7$ ), filhotes de ratas injetadas com solução salina durante a gestação; e Grupo PC (GPC,  $n = 7$ ), filhotes de ratas injetadas com LPS durante a gestação, que serão submetidos à anóxia perinatal e também à restrição sensório-motora.

A anóxia perinatal foi realizada no P0, colocando os filhotes do GPC em câmara fechada, parcialmente imersa em água a  $37^\circ\text{C} \pm 1$ , com fluxo de 9 L/min de nitrogênio (100%) durante 20 minutos. Em seguida, os filhotes foram rapidamente removidos, mantidos em condições atmosféricas normais e observados até retornarem ao seu padrão respiratório normal (Stigger *et al.*, 2011). Os filhotes do GC foram submetidos a um procedimento idêntico, sendo mantidos durante o mesmo período de tempo na câmara, a qual permaneceu aberta e com fluxo normal de ar atmosférico.

A partir do primeiro dia pós-natal (P1) até o 30° dia pós-natal (P30), os animais do GPC foram submetidos à restrição sensório-motora durante 16 horas/dia. Os membros pélvicos dos animais foram unidos com fita microporosa adesiva. O quadril, joelho e tornozelo foram mantidos em posição estendida com auxílio de molde de epóxi devidamente posicionado e ajustado ao tamanho do animal. Os animais do GC receberam manipulação nos membros pélvicos por aproximadamente 2 minutos, período semelhante ao utilizado para colocar os aparatos de imobilização no GPC (Strata *et al.*, 2004).

## 3.2 Coleta do músculo tibial anterior

Aos 48 dias de idade os animais foram pesados em balança analítica (Shimadzu UX620H, São Paulo, Brasil) e em seguida anestesiados com injeções intraperitoneais com cloridrato de quetamina (50 mg/kg, ip; Cristália, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg; Cristália, Brasil). A pele dos membros pélvicos foi rebatida para permitir a coleta do músculo tibial anterior. Posteriormente, foi realizada a mensuração do comprimento (mm) do antímero muscular direito (ventre muscular) com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess®, São Paulo, Brasil) e pesagem em balança analítica (Shimadzu UX620H, São Paulo, Brasil). Em seguida, o antímero muscular esquerdo foi coletado para realização do estudo histoquímico das JNMs.

## 3.3 Estudo histoquímico e morfométrico das JNMs

Para o estudo das JNMs, um fragmento do antímero esquerdo do músculo tibial anterior foi removido e fixado em Karnovski (Karnovski, 1965). Posteriormente foi realizada, com a utilização de lâminas de inox, a secção longitudinal deste fragmento em várias fatias e os cortes obtidos foram submetidos à reação Esterase Inespecífica (Lehrer & Ornstein, 1959).

## 3.4 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram analisados estatisticamente com auxílio do programa GraphPad Prism® (La Jolla, USA), levando-se em consideração os resultados do teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*. Para os dados que se encontrarem da normalidade, o teste estatístico empregado foi o teste *t de Student*. Enquanto que para as análises não paramétricas foiz utilizado o teste *Mann-Whitney*. Considerando valores de  $p < 0,05$  significativos.

# 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises macroscópicas mostraram que os parâmetros de peso corporal ( $p=0,0056$ ), peso ( $p=0,0007$ ) e comprimento do músculo ( $p=0,0003$ ) foram menores no GPC quando comparados ao GC (Tabela 1). Sugere-se que isso ocorreu devido aos déficits no padrão sensório-motor da mastigação (Lacerda, 2016), pois crianças com PC geralmente apresentaram dificuldades na alimentação. Pois apresentam uma deglutição ineficiente ou até mesmo ausente, uma fase oral inadequada, por conta da lesão neurológica, que interfere no seu desempenho. (Graziela *et al.*, 2007). Além disso acredita-se que somado aos déficits na mastigação, os achados também sofram influência de alguma atrofia muscular e/ou menor densidade óssea causada pela restrição sensório-motora (Marcuzzo *et al.*, 2010). Pois foi visto que a longo prazo, a combinação da asfíxia perinatal com desuso dos membros pélvicos gera atrofia das fibras musculares, alterações da matriz extracelular do

músculo e degeneração articular, além de alterações do córtex somatossensorial primário. Essa desorganização é maior quando são associados o ao desuso e a asfixia perinatal (COQ et al., 2008). Além disso, em estudo de (MARCUIZZO et al., 2010). a restrição sensório-motora no período pós-natal produziu redução do peso corporal e da densidade óssea além de prejuízos no desempenho motor em testes de caminhada e em escadas. Onde a atrofia muscular do m. tibial anterior somente foi observada no grupo onde houve associação dos três insultos. (Stigger et al. 2011)

Quanto a morfologia, foram observadas JNMs com formato oval, elíptico e redondo em ambos os grupos estudados (Figura 1).

São as junções neuromusculares (JNMs) que permitem a comunicação entre o sistema nervoso periférico e as fibras musculares, tendo como função transmitir os impulsos elétricos. A integridade estrutural das JNMs influencia a transmissão neuromuscular e consequentemente na sua função muscular (Pratt *et al.*, (2013). O músculo depende da fibra nervosa para suas funções. Por isso, a integridade dessas estruturas é fundamental.

As JNMs são funcionais ao nascimento, mas sofrem modificações no período pós-natal. Essas estruturas se mantem de forma estável, mas são suscetíveis à remodelação. As JNMs possuem ainda capacidade de regeneração após lesão do nervo periférico ou músculo (SANES;LICHTMAN, 1999).

Com relação aos parâmetros morfométricos, foi observado que medidas de área ( $p=0,0007$ ), diâmetro maior ( $p=0,0050$ ) e diâmetro menor ( $p=0,0014$ ) das JNMs foram menores nos animais do GPC quando comparados ao GC (Tabela1). Sugere-se que a redução da área e diâmetros das JNMs, esteja relacionada a restrição sensório-motora, pois o exercício físico possui grande importância na manutenção da funcionalidade física das JNMs (Peretti *et al.*, 2019). Também foi visto que, a interrupção da atividade motora durante o desenvolvimento resulta em modificações no sistema nervoso periférico (Marcuzzo *et al.*, 2008). mostrando que a imobilidade durante o início da vida pode contribuir para um fenótipo motor mais complexo em ratos, sendo compatíveis aos déficits motores dos pacientes. (Stigger *et al.*, 2011) Foi visto também, a existência de um período de plasticidade que dependente da atividade do sistema nervoso, em que o processo apoptótico e a sinaptogênese dos neurônios motores pode ser alterado pelo desuso. (Augustin *et al.*, 2013).

Sendo assim, é visto que, este modelo de PC, pode auxiliar na compreensão de tal patologia. Onde o conhecimento dessas alterações, que ocorrem na musculatura é essencial para o entendimento da capacidade funcional dos pacientes com PC (DIAS et al., 2013). Possibilitando, contribuir para uma investigação mais aprofundada, com relação as alterações causadas sobre músculos e junções neuromusculares (JNMs), podendo assim auxiliar em sua terapêutica.

Parâmetros (n=7)	GC	GPC
Peso corporal (g)	185,9 ± 7,9	172,7 ± 7,5*
Peso do músculo (mg)	0,36 ± 0,04	0,28 ± 0,03*
Comprimento do músculo (mm)	17,5 ± 0,8	14,6 ± 0,6*
Área das JNMs (µm <sup>2</sup> )	674,5 ± 74,2	512,8 ± 30,5*
Diâmetro maior das JNMs (µm)	43,5 ± 2,9	39,70 ± 2,9*
Diâmetro menor das JNMs (µm)	20,3 ± 1,6	16,2 ± 8*

Valores expressos como média ± desvio padrão. Comprimento do músculo tibial anterior: teste de *Mann Whitney*, demais parâmetros teste *t Student*. \* indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Tabela 1- Parâmetros macroscópicos e microscópicos do músculo tibial anterior de ratos aos 48 dias de idade dos grupos controle (GC) e submetido a PC (GPC)

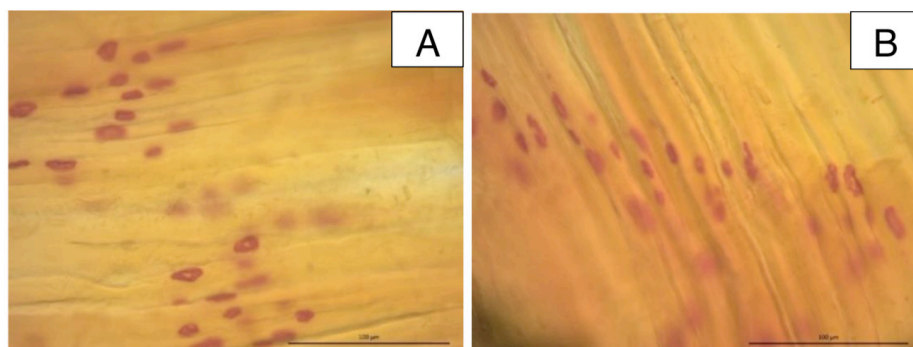


Figura 1- Fotomicrografias das junções neuromusculares (JNMs) do músculo tibial anterior de ratos aos 48 dias de idade. Secção longitudinal. Reação Esterase Inespecífica. **A:** Grupo controle (GC) e **B:** Grupo submetido ao modelo de paralisia cerebral (GPC).

## 5 | CONCLUSÕES

A PC promoveu alteração tanto nos parâmetros corporais, quanto na morfometria das JNMs. Sendo ocasionados por déficits motores, relacionados a restrição sensorio-motora, podendo assim causar alterações na funcionalidade muscular, devido a importância das JNMs para a neurotransmissão e consequentemente sua função muscular.

## REFERÊNCIAS

AUGUSTIN A.O., MARCUZZO S. **Expressão de Sinaptofisina e Caspase – 3 em segmentos lombares de medula espinhal de ratos após restrição sensorio – motora combinada ou não com treinamento em esteira no período pós – natal.** In: Salão de Iniciação Científica. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2013.

Assis-Madeira, E.A. & Carvalho, S.G. **Paralisia cerebral e fatores de risco ao desenvolvimento motor: uma revisão teórica.** Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento, 2009.

Bloch-Gallego, E. **Mechanisms controlling neuromuscular junction stability.** Cellular and Molecular Life Science, 2015.

Buratti, P., Covatti, C., Centenaro, L.A., Brancalhão, R.M.C. & Torrejais, M.M. **Morphofunctional characteristics of skeletal muscle in rats with cerebral palsy.** International Journal of Experimental Pathology, 2019.

COQ, J.O.; STRATA, F.; RUSSIER, M.; SAFADI, F. F.; MERZENICH, M. M.; BYL, N.N.; BARBE, M. F. **Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: Implications for cerebral palsy.**Exp. Neurol., v.210, p.95-108, 2008.

Covatti, C.; Ulsenheimer, B. H.; Buratti, P.; Centenaro, L. A.; Guimaráes, A. T. B.; Brancalhão, R. M. C. & Torrejais, M. M. An evaluation of an animal model of cerebral palsy: **The effects on the morphology of the extensor digitorum longus muscle.** International Journal of Morphology, 2018.

DIAS, C.P.; ONZI, E.S.; GOULART, N.B.A.; VAZ, M.A. **Adaptações morfológicas musculares na espasticidade: revisão de literatura.** Scientia Médica, v. 23, p. 102-107, 2013.

DODGE, N. N. **Cerebral Palsy: Medical Aspects.** Pediatr. Clin. N. Am., v.55, p.1189-1207, 2008.

Fangerlund, M.J. & Eriksson, L.I. **Current concepts in neuromuscular transmission.** British Journal of Anaesthesia, 2009.

Junqueira, L.C. & Carneiro, J. **Histologia Básica.** Rio de Janeiro: Guanabara Kooban, 2013.

Karnovski, M.J. **A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy.** Journal of Cell Biology, 1965.

KRIGGER, K.W. **Cerebral Palsy: An Overview.** Am. Fam. Physician., v. 73, n.1,p.91-100, 2006.

Lacerda D.C. **Estudo do padrão sensório-motor da mastigação: implicações da desnutrição perinatal sobre a paralisia cerebral experimental.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

Lehrer, G.M. & Ornstein, L. **A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase.** Biophysical and Biochemical Cytology, 1959.

Lima, R.C., Furlan, J.B., Santos, S.R.G., Barreros, R., Adão, E.E. & Carvalho, R.L. **Os avanços da tecnologia assistiva para pessoas com paralisia cerebral no Brasil: revisão de literatura.** Revista da Universidade Vale do Rio Verde, 2014.

Marcuzzo, S., Dutra, M.F., Stigger, F., Nascimento, P.S., Ilha, J., Kalil-Gaspar, P.I. & Achaval, M. **Beneficial effects of treadmill training in a cerebral palsy-like rodent model: Walking pattern and soleus quantitative histology.** Brain Research, 2008.

Marcuzzo, S., Dutra, M.F., Stigger, F., Nascimento, O.S., Ilha, J., Kalil-Gaspar, P.I., Achaval, M., **Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats.** Brain. Dev. 32, 323-331, 2010.

Martym, J.A.J, Fagerlund, M.J. & Eriksson, L.I. **Basic principles of neuromuscular transmission.** Anaesthesia, 2009.

Peretti, L.A., Kakihata, M.C., Wutzke L.M. & Torrejais, M.M. **Efeitos da vibração mecânica nas junções neuromusculares e tipo de fibra do músculo sóleo de ratas wistar ooforectomizadas.** Revista Brasileira de Ortopedia, 2019.

Pin, T.W., Elmasry, J. & Lewis, J. **Efficacy of botulinum toxin A in children with cerebral palsy in gross motor function classification system levels IV and V: a systematic review.** Developmental medicine & child neurology **55**, 304-311, 2013.

Pratt SJP, Shah SB, Ward CW, Inacio MP, Stains JP, Lovering RM. **Effects of in vivo injury on the neuromuscular junction in healthy and dystrophic muscles.** J. Physiol.; 591 (2): 559-570, 2013.

Roberson, R., Woodard, J.E., Toso, L., Abebe, D., Poggi, S.H. & Spong, C.Y. **Postnatal inflammatory rat model for cerebral palsy: tão different from humans.** American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2006.

Rotta NT. **Paralisia cerebral, novas perspectivas terapêuticas.** J. Pediatr. 2002;

SANES, J.R.; LICHTMAN, J.W. **Development of the vertebrate neuromuscular junction.** Annu. Rev. Neurosci., v.22, n.1, p.389-442, 1999.

Stigger, F., Felizzola, A.L., Kronbauer, G.A., Couto, G.K., Achaval, M. & Marcuzzo, S. **Effects of fetal exposure to lipopolysaccharide, perinatal anoxia and sensorimotor restriction on motor skills and musculoskeletal tissue: implications for an animal model of cerebral palsy.** Experimental Neurology, 2011.

Stigger, F., Lovatel, G., Marques, M., Bertoli, K., Moysés, F., Elsner, V., Siqueira, I.R., Achaval, M. & Marcuzzo, S. **Inflammatory response and oxidative stress in developing rat brain and its consequences on motor behavior following maternal administration of LPS and perinatal anoxia.** International Journal of Developmental Neuroscience, 2013.

Strata, F., Coq, J.O., Byl, N. & Merzenich, M.M. **Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: implications for a rodent model of cerebral palsy.** Neuroscience **129**, 141-156, 2004.

Vivone, P. G., Michelle, M. M.T., Salles R., Nemr k., Chiappetta A.L. **Analysis of alimentary consistency and deglutition time in children with spastic quadriplegic cerebral palsy.** Rev. CEFAC **9**, 504-511, 2007.

Wu, H., Xiong, W.C. & Mei, L. **To construct a synapse signaling pathway in the assembly of the neuromuscular junction.** Developmet **137**, 1017-1033, 2010.

Zanini, G., Cemin, N.F. & Peralles, S.N. **Paralisia Cerebral: causas e prevalencias.** Fisioterapia do Movimento **22**, 375-381, 2009.

Zhuravin, I.A., Dubrovskaya, N.M. & Tumanova, N.L. **Postnatal Physiological Developmental of Rats after Acute Prenatal Hypoxia.** Neuroscience and Behavioral Physiology **34**, 809-816, 2004.



# CAPÍTULO 3

## MORFOMETRIA DAS CÉLULAS HIPOCAMPAIS EM RATOS DIABÉTICOS APÓS TRATAMENTO COM EXTRATO DA CASCA DE *POUTERIA RAMIFLORA*

Data de aceite: 01/03/2021

Data de submissão: 07/12/2020

### **Larissa Fernandes Garcia**

Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal, Campus Pontal Ituiutaba – MG  
0000-0002-7925-2184

### **Victor Antonio Ferreira Freire**

Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal, Campus Pontal Ituiutaba - MG  
0000-0001-9685-4534

### **Gustavo Siconello dos Santos**

Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal, Campus Pontal Ituiutaba - MG  
0000-0002-9479-0220

### **Foued Salmen Espindola**

Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biotecnologia, Campus Umuarama Uberlândia - MG  
0000-0002-6937-1411

### **Luciana Karen Calábria**

Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal, Campus Pontal; e Instituto de Biotecnologia, Campus Umuarama, Uberlândia - MG  
0000-0002-0500-0232

**RESUMO:** Diabetes *mellitus* é uma doença metabólica crônica caracterizada pela hiperglicemia persistente que pode afetar o sistema nervoso central. Extratos de plantas têm sido utilizados para diminuir os níveis de glicose sanguínea e tratar as complicações causadas pelo diabetes. Nesse estudo, os efeitos do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Pouteria ramiflora* foram investigados por meio da morfometria das células hipocampais do cérebro de ratos. Ratos machos Wistar foram divididos em grupos não diabéticos (n=6), diabéticos (n=6) e tratados por 20 dias (n=12) com acarbose 25 mg/kg ou extrato de *Pouteria ramiflora* 500 mg/kg. Os cérebros foram dissecados, as secções coradas com Hematoxilina-Eosina e as células hipocampais quantificadas pelo software ImageJ. A análise morfométrica revelou que o tratamento com o extrato da planta atenuou significativamente a morte celular no hipocampo dos animais diabéticos, afetando a quantidade total de células, em comparação com os outros grupos. Sugere-se que o extrato da casca do caule de *Pouteria ramiflora* possui efeito neuroprotetor no hipocampo. Estudos futuros são necessários para a melhor compreensão do mecanismo de ação do extrato da *Pouteria ramiflora* nos neurônios e no tratamento do diabetes *mellitus*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Diabetes *mellitus*, Neuroproteção, Fitoterapia, Hipocampo.

## MORPHOMETRY OF THE HIPPOCAMPAL CELLS IN DIABETIC RATS AFTER TREATMENT OF STEM BARK EXTRACT OF *POUTERIA RAMIFLORA*

**ABSTRACT:** Diabetes *mellitus* is a chronic metabolic disease characterized by persistent hyperglycemia that can affect the central nervous system. Plant extracts have been used to reduce blood glucose levels and to treat diabetes comorbidities. In this study, the hydroalcoholic extract effects from peel bole of *Pouteria ramiflora* were investigated by means of hippocampal cells morphometry from brain of rats. Male Wistar rats were divided into two groups: non-diabetic (N=6) and diabetic (N=6) and were treated for 20 days (N=12) with acarbose 25 mg/kg or *Pouteria ramiflora* extract 500 mg/kg. The brains were dissected, the sections were stained with Hematoxylin-Eosin and the hippocampal cells were quantified by the software ImageJ. The morphometric analysis revealed that the treatment with plant extract significantly mitigated the hippocampal cell death in diabetic rats, affecting the total amount of cells, when compared with the other group. This study suggests that the extract from peel bole of *Pouteria ramiflora* has neuroprotective effect in hippocampus. Future studies are required to better understand the molecular mechanism of *Pouteria ramiflora* extract in neurons and in the diabetes *mellitus* treatment.

**KEYWORDS:** Diabetes mellitus, Neuroprotective, Phytoterapy, Hippocampus.

### 1 | INTRODUÇÃO

O encéfalo é um órgão de alta demanda energética que utiliza a glicose como fonte de energia. No entanto, o excesso desse monossacarídeo na alimentação pode acarretar no desenvolvimento do diabetes *mellitus* (DM) e trazer complicações para o sistema nervoso central, incluindo alterações na neurotransmissão, mudanças estruturais, distúrbios na aprendizagem e memória, e anormalidades eletrofisiológicas (MOORADIAN, 1988; MCCALL, 1992; BIESSLS et al., 1994; DI MARIO et al., 1995; HELKALA et al., 1995).

Estimativas apontam um aumento significativo na prevalência de DM até 2030, atingindo aproximadamente 417 milhões jovens e adultos na fase produtiva e 195 milhões de idosos (IDF, 2019). O DM é classificado em dois subtipos, o tipo 1 e o 2, no entanto cerca de 90-95% dos casos são diabéticos do tipo 2, o qual apresenta uma etiologia multifatorial e o estabelecimento de resistência insulínica (SOCIEDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2019).

A hiperglicemia a longo prazo, quando não controlada, pode provocar disfunção mitocondrial resultando no aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e danos em diversas biomoléculas e órgãos do corpo, incluindo o cérebro (HURRELE; HSU, 2017; SOCIEDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2019). Além disso, inviabiliza o bom funcionamento dos receptores de insulina, resultando na resistência insulínica (HANÇER et al., 2014). Estudos evidenciam alterações na composição e dano neuronal relacionados ao DM (JACKSON-GUILFORD; LEANDER; NISENBAUM, 2000; PIOTROWSKI; WIERZBICKA; SMIALEK, 2001; ZHEN-GUO et al., 2002). Além disso, o desequilíbrio do metabolismo energético descrito no DM induz a alterações no cérebro, como mudanças na

pressão osmótica plasmática, na função da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, aumento do estresse oxidativo celular, ativação de vias apoptóticas, inflamação e perturbação no balanço de cálcio, dentre outras (GONZÁLEZ-REYES et al., 2016).

A insulina tem um papel estratégico no sistema nervoso central onde atua controlando os níveis de sacarídeo e auxilia na modulação cognitiva, no processo de formação da memória, no aprendizado e na plasticidade sináptica (ZHAO et al., 1999; PARK et al., 2001), em conjunto com o funcionamento adequado dos seus receptores (BAGLIETTO-VARGAS, 2016).

Entre as terapias utilizadas no tratamento do DM estão a de fármacos, como a acarbose, o miglitol e voglibose que possuem ação inibitória sobre enzimas alfa-amilase e as alfa-glicosidase que catalisam o amido e o glicogênio (SOUZA, 2011; ROSA; DIAS, 2014; SALES et al., 2012). A acarbose é um oligossacarídeo complexo pertencente à classe dos antidiabéticos orais que atua retardando a digestão de carboidratos (oligossacarídeos e dissacarídeos) em monossacarídeos (BALFOUR; MCTAVISH, 1993; CLISSOLD; EDWARDS, 1988). No entanto, efeitos colaterais em pacientes dose-dependentes têm sido reportados, tais como desconforto abdominal, anorexia, flatulência, diarreia, dentre outras implicações gastro-intestinais (CHENG; FANTUS, 2005; MARCONDES, 2003), assim como a utilização do miglitol e do voglibose (SHOBANA; SREERAMA; MALLESHI, 2009).

A demanda por fármacos seguros, hipoglicêmicos e antidiabéticos leva à busca por inibidores de origem vegetal, os quais têm mostrado efeitos inibitórios na atividade das enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase e, portanto, podem ser potenciais terapêuticos eficazes no controle da hiperglicemia, apresentando poucos efeitos colaterais (DE SOUZA et al., 2012).

Algumas plantas têm revelado a capacidade de diminuir a atividade da alfa-amilase, como é o caso da *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk da família Sapotaceae, cujo potencial de inibição foi verificado em 75% em testes *in vitro* (GOUVEIA et al., 2013). Além de seu efeito inibitório, da Costa e colaboradores (2013) revelaram um efeito neuroprotetor do extrato das folhas de *Pouteria ramiflora*, prevenindo alterações neuronais no hipocampo do cérebro de ratos diabéticos induzidos.

Na prática popular, tanto as folhas quanto a casca do caule e da raiz da *Pouteria ramiflora* são utilizadas no tratamento do DM. A literatura carece de estudos que elucidem os mecanismos de ação ou os efeitos da utilização dos extratos de *Pouteria ramiflora* na morfofisiologia humana. Neste sentido, o presente estudo buscou avaliar a morfometria de células do hipocampo do cérebro de ratos diabéticos tratados com o extrato da casca do caule de *Pouteria ramiflora*.

## 2 | MATERIAL E MÉTODO

### 2.1 Coleta e preparo do material vegetal

O material vegetal (casca do caule de *Pouteria ramiflora*) foi coletado na Reserva Caça & Pesca Itororó, no município de Uberlândia-MG que logo foi submetida a identificação por autorização do IBAMA 02001.003400/2009-39. Exsicatas foram depositadas no Herbário do Instituto de Biologia da UFU sob o nº HUFU 45.535. O material vegetal foi separado, dessecado em estufa de ventilação forçada a 30-40°C e pulverizado em moinho de facas. O extrato hidroetanólico 1:1 foi preparado por maceração exaustiva por 24 horas, seguida de centrifugação e liofilização (MOURA et al., 2008).

### 2.2 Animais e indução do diabetes mellitus

Ratos Wistar machos com aproximadamente oito semanas (peso: 180–240 g) foram alojados em condições padrão (22±1 °C, umidade 60 ± 5%, 12h luz/12h ciclo escuro) com comida e água ad libitum. Os experimentos animais foram realizados no Centro de Bioterismo e Experimentação da Universidade Federal de Uberlândia, de acordo com a autorização do CBEA/UFU e aprovação pelo Comitê de Ética em uso de animais CEUA/UFU (registro 051/08).

Os ratos foram submetidos a jejum de 24 horas, anestesiados com solução de xilazina (10 mg/Kg) e cetamina (75 mg/Kg) aplicada via intraperitoneal, e o diabetes foi induzido por uma única administração de 40 mg/Kg de estreptozotocina diluída em tampão citrato 0,01 M (pH 4,5) via veia peniana (2 mL/Kg) (CALÁBRIA et al., 2011; DA COSTA et al., 2013). Os ratos não diabéticos receberam injeção do mesmo volume de tampão citrato, nas mesmas condições dos diabéticos induzidos. Dez dias após a indução, a glicemia em jejum foi mensurada usando fitas reativas Biocheck (Bioeasy), e os ratos com glicemia maior ou igual a 200 mg/dL foram considerados diabéticos (DA COSTA et al., 2013).

### 2.3 Grupos e tratamento

Os ratos foram randomicamente divididos em seis grupos (n=6 ratos/grupo), sendo eles, não diabético tratado com acarbose (25 mg/Kg) (NDA), não diabético tratado com extrato de casca de caule de *Pouteria ramiflora* (500 mg/Kg) (NDP), diabético tratado com acarbose (25 mg/Kg) (DA) e diabético tratado extrato de casca de caule de *Pouteria ramiflora* (500 mg/Kg) (DP). Os grupos tratados receberam acarbose ou extrato de planta diluídos em água, enquanto os não tratados receberam apenas água, ambos diariamente por 20 dias, via gavagem, sendo considerados como controle negativo.

### 2.4 Procedimento experimental

Ao final do experimento, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas, e anestesiados com solução de xilazina (10mg/Kg) e cetamina (75 mg/Kg) aplicada via intraperitoneal. O animal foi sacrificado por decapitação e o cérebro foi dissecado e

imediatamente lavado em salina (NaCl 0.9%), sendo fixado em formaldeído 10% por 24 horas e, posteriormente, submetido aos procedimentos de desidratação em uma bateria gradiente de álcool etílico, diafanizado em xilol e emblocado em parafina líquida, à 56°C na estufa. Cortes de 5  $\mu$ m foram montados em lâminas pré-tratadas com gelatina (0,2%).

## 2.5 Análise morfológica

Os cortes foram desparafinizados em estufa a 60° por 20 minutos, seguidos por banhos de xilol, bateria gradiente de álcool etílico (100%, 70%, 50%) e água destilada, por 5 minutos. Após a hidratação, as secções foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E.), na qual os cortes foram imersos em solução de Hematoxilina de Harris comercial por 10 minutos e lavados em água corrente por 15 minutos. Em seguida, foram imersos em solução de Eosina amarelada por 10 minutos e posteriormente imersos em água destilada por 5 minutos.

Uma vez corados, os cortes foram desidratados, seguindo a bateria gradiente de álcool etílico e xilol por 5 minutos. As lâminas foram montadas com Entellan e lamínula para visualização dos cortes em microscópio de luz (Bio Focus). As imagens das regiões do corno de Amon (CA) e do giro denteado que compõem o hipocampo foram capturadas e armazenadas em arquivo do tipo “jpeg” por meio de um tablet associado ao software VMS 3.6, versão 1.0.

Para cada corte, entre 40 e 50 fotomicrografias foram obtidas de forma randômica utilizando a objetiva de 40x. A partir das imagens digitalizadas foi realizada a morfometria das células granulares do giro denteado e das piramidais das sub-regiões CA1, CA2 e CA3 do CA com o uso do software ImageJ, considerando-se o número total de células íntegras no hipocampo, sendo contadas manualmente de forma randômica.

## 2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software BioEstat, aplicando estatística descritiva e inferencial com o teste de Qui-quadrado para comparar os grupos de ratos diabéticos e não diabéticos antes e após o tratamento, com nível de significância de 1% ( $p < 0,001$ ).

# 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O elevado índice glicêmico é característico em indivíduos portadores de DM, podendo induzir ao estresse oxidativo, à alterações em enzimas metabólicas, à glicosilação protéica e à graves alterações estruturais em diversos tecidos (NAIK et al., 2014). O sistema nervoso central é vulnerável aos efeitos desencadeados pelo estresse oxidativo, visto a geração excessiva de EROs a partir da oxidação de níveis elevados de glicose (CALÁBRIA et al., 2013; IBRAHIM; ABD EL-MAKSOUND, 2015). O estresse oxidativo pode desencadear a apoptose celular, o que altera a transmissão sináptica e a morfologia encefálica (ARTOLA, 2008; TOMLINSON; GARDINER, 2008).

A coloração de H.E. é comumente utilizada em estudos experimentais de morfometria celular (DA COSTA et al., 2013; MOREIRA et al., 2011; WOLLMANN et al., 2011). Neste estudo, cortes frontais de cérebro de rato Wistar machos foram analisados por morfometria, quantificando células nervosas da região do corno de Amon (CA1, CA2, CA3) e do giro denteado do hipocampo.

Tratamento	Células hipocampais frequência absoluta (n)
<b>Grupo diabético</b>	
Água	2.226
Acarbose	2.217*
<i>Pouteria ramiflora</i>	3.066*#
<b>Grupo não-diabético</b>	
Água	2.853
Acarbose	2.381*
<i>Pouteria ramiflora</i>	3.480*#

Nota: **Acarbose** (animais tratados com acarbose a 25 mg/kg); **Pouteria ramiflora** (animais tratados com extrato de casca de *Pouteria ramiflora* a 500 mg/kg). Os números de células hipocampais das regiões supracitadas referem-se à quantidade total de células de todo o hipocampo. (\*)  $p < 0,001$ , comparando água com os tratamentos acarbose e *Pouteria ramiflora*. (#)  $p < 0,001$ , comparando os tratamentos acarbose e *Pouteria ramiflora*.

Tabela 1 – Frequência de células hipocampais das regiões do corno de Amon (CA1, CA2, CA3) e do giro denteado de ratos diabéticos induzidos e não-diabéticos tratados com acarbose (25 mg/kg) ou com extrato da casca do caule de *Pouteria ramiflora* (500 mg/Kg)

Fonte: Autoria própria.

No hipocampo encontram-se dois tipos celulares principais, as células granulares do giro denteado e as piramidais das sub-regiões CA1, CA2 e CA3 (TAVARES, 2006; DA SILVA, 2007). Para a análise morfométrica dos cortes de cérebro de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e não diabéticos foram considerados o número absoluto de células granulares e piramidais das sub-regiões CA1, CA2, CA3 e giro denteado do hipocampo.

A análise estatística revelou que o tratamento com extrato de casca de *Pouteria ramiflora* (500 mg/kg) nos animais diabéticos induzidos (3.066 células) pode ter resultado na redução de morte das células hipocampais, quando comparado com o mesmo grupo tratado com acarbose (2.217 células) ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1). Esse perfil também foi observado em animais não diabéticos (Tabela 1).

A partir da redução dos níveis glicêmicos e consequente controle da hiperglicemia persistente, muitas das disfunções metabólicas sistêmicas, como o estresse oxidativo,

podem ser atenuadas, incluindo as complicações neurológicas e comportamentais causadas pela morte neuronal e/ou deformação estrutural do tecido nervoso, alterações na transmissão sináptica, déficit cognitivo e de memória, depressão, hipolocomoção, entre outros (PATEL; UDAYABANU, 2017).

O perfil fitoquímico completo do extrato da casca de *Pouteria ramiflora* foi revelado por Oliveira e colaboradores (2014). As diversas atividades biológicas possíveis para *Pouteria ramiflora* podem estar relacionadas às diferentes classes de metabólitos secundários presentes, como compostos fenólicos, taninos, antraquinonas livres, cumarinas, esteroides, triterpenos, saponinas, glicosídeos cardiotônicos e alcaloides (CORREIA et al., 2016). Além disso, flavonoides foram identificados no extrato da folha desta planta (COSTA et al., 2014), bem como miricetina glicosilados e ácido gálico (SHOBANA; SREERAMA; MALLESHI, 2009).

Considerando que o tratamento com o extrato da folha de *Pouteria ramiflora* estimula alguns mecanismos da capacidade antioxidante (DA COSTA et al., 2013), sugere-se que o tratamento com o extrato da casca também reduza o estresse oxidativo ou dos níveis glicêmicos com resposta direta no cérebro dos ratos diabéticos, podendo resultar em efeito neuroprotetor nas células hipocâmpais.

## 4 | CONCLUSÃO

É possível sugerir, com os dados obtidos, que o extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Pouteria ramiflora* possui efeito neuroprotetor nas células do hipocampo, uma vez que, em comparação com o tratamento com acarbose, houve indicação na redução de perda neuronal de células das subregiões do hipocampo CA1, CA2 e CA3 e do giro denteado. Estudos futuros são necessários para a melhor compreensão do mecanismo de ação do extrato da *Pouteria ramiflora* na biologia molecular das células hipocâmpais e no tratamento do diabetes *mellitus*.

## AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e ao CNPq pelo financiamento de LFG e FSE, e de LKC, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

ARTOLA, A. **Diabetes, stress and ageing-related changes in synaptic plasticity in hippocampus and neocortex - The same metaplastic process?** European Journal of Pharmacology, v. 585, n. 1, p.153–162, 2008.

BAGLIETTO-VARGAS, D. *et al.* **Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk.** Neuroscience and Biobehavioral Reviews, v. 64, p. 272-287, 2016.

- BALFOUR, J. A.; MCTAVISH, D. **Acarbose: An update of its pharmacology and therapeutic use in diabetes mellitus.** *Drugs*, v. 46, n. 6, p. 1025–1054, 1993.
- BIESSELS, G. J. *et al.* **Cerebral function in diabetes mellitus.** *Diabetologia*, v. 37, p. 643–650, 1994.
- CALÁBRIA, L. K. *et al.* **Myosins are differentially expressed under oxidative stress in chronic streptozotocin-induced diabetic rat brains.** *ISRN Neuroscience*, v. 2013, p. 1-10, 2013.
- CALÁBRIA, L. K. *et al.* **Overexpression of myosin-IIb in the brain of a rat model of streptozotocin-induced diabetes.** *Journal of the Neurological Sciences*, v. 303, p. 43–49, 2011.
- CHENG, A. Y. Y.; FANTUS, I. G. **Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus.** *Canadian Medical Association Journal*, v. 172, n. 2, p. 213–226, 2005.
- CLISSOLD, S. P.; EDWARDS, C. **Acarbose: A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential.** *Drugs*, v. 35, n. 3, p. 214–243, 1988.
- CORREIA, A. F. *et al.* **Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*. v.16, 1, n. 203, p. 1-9, 2016.
- COSTA, D. L. M. G da. **Estudo químico e avaliação da atividade mutagênica dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae).** 2014. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, 2014.
- DA COSTA, A. V. *et al.* **Neuroprotective effects of *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) extract on the brains of rats with streptozotocin-induced diabetes.** *Metabolic Brain Disease*, v. 28, n. 3, p. 411–419, 2013.
- DA SILVA, A. V. **O hipocampo normal e patológico.** 2007. Instituto de Ensino e Pesquisa Hospital Israelita Albert Einstein. São Paulo. Disponível em: [http://epilepsia.org.br/lasse/mat\\_didatico/lasse1/textos/alexandre01.html](http://epilepsia.org.br/lasse/mat_didatico/lasse1/textos/alexandre01.html).
- DE SOUZA, P. M. *et al.* **Inhibitory Activity of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase by Plant Extracts from the Brazilian Cerrado.** *Planta Med*, v. 78, p. 393–399, 2012.
- DI MARIO, U. *et al.* **Electrophysiological alterations of the central nervous system in diabetes mellitus.** *Diabetes Metabolism Reviews*, v. 11, n. 3, p. 259–277, 1995.
- GONZÁLEZ-REYES, R. E. *et al.* **Alterations in Glucose Metabolism on Cognition: A Possible Link Between Diabetes and Dementia.** *Current Pharmaceutical Design*, v. 22, p. 812-818, 2016.
- GOUVEIA, N. M. *et al.* ***Pouteria ramiflora* extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 85, n. 3, p.1141–1148, 2013.
- HANÇER, N. J. *et al.* **Insulin and Metabolic Stress Stimulate Multisite Serine/Threonine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 and Inhibit Tyrosine Phosphorylation.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 18, p.12467-12484, 2014.



HELKALA, E. L. *et al.* **Short-term and long-term memory in elderly patients with NIDDM.** *Diabetes Care*, v. 18, n. 5, p. 681–685, 1995.

HURRLE, S.; HSU, W. H. **The etiology of oxidative stress in insulin resistance.** *Biomedical Journal*, v. 40, n. 5, p. 257-262, 2017.

IBRAHIM, D. S.; ABD EL-MAKSoud, M. A. E. **Effect of strawberry (*Fragaria x ananassa*) leaf extract on diabetic nephropathy in rats.** *International Journal of Experimental Pathology*, v. 96, n. 2, p. 87–93, 2015.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (BE). **IDF Diabetes Atlas.** 2019. 9<sup>th</sup> ed. Brussels (BE). Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org>. Acesso em: 30 nov. 2020.

JACKSON-GUILFORD, J.; LEANDER, J. D.; NISENBAUM, L. K. **The effect of streptozotocin-induced diabetes on cell proliferation in the rat dentate gyrus.** *Neuroscience Letters*, v. 293, p. 91-94, 2000.

MARCONDES, J. A. M. **Diabete melito: fisiopatologia e tratamento.** *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, v. 5, n. 1, p.18-26, 2003.

MCCALL, A. L. **The impact of Diabetes on the CNS.** *Diabetes*, v. 41, n. 5, p. 557–570, 1992.

MOORADIAN, A. D. **Diabetic complications of the Central Nervous System.** *Endocrine Reviews*, v. 9, n. 3, p. 346–356, 1988.

MOREIRA, R. D. *et al.* **Dimensão fractal na quantificação do grau de rejeição celular miocárdica pós-transplante cardíaco.** *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, v. 26, n. 2, p.155–163, 2011.

MOURA, V. L. **Fracionamento e caracterização parcial de constituintes químicos do extrato bruto de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) biomonitorados pela inibição *in vitro* da atividade da alfa-Amilase Salivar Humana (HSA).** 2008. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2008.

NAIK, S. R. *et al.* **Protective activity profile of herbomineral medicine in early diabetic nephropathy rats: Restoration of kidney antioxidants, hemodynamics and suppression of proinflammatory mediators.** *Biomedicine Aging Pathology*, v. 4, n. 1, p. 33–41, 2014.

OLIVEIRA, A. K. M. *et al.* **Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface.** *Horticultura Brasileira*, v. 32, n. 1, p. 41–47, 2014.

PARK, C. R. **Cognitive effects of insulin in the central nervous system.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 25, n. 4, p. 311–323, 2001.

PATEL, S. S.; UDAYABANU, M. **Effect of natural products on diabetes associated neurological disorders.** *Reviews in the Neurosciences*, v. 28, n. 3, p. 271–293, 2017.

PIOTROWSKI, P.; WIERZBICKA, K.; SMIALEK, M. **Neuronal death in the rat hippocampus in experimental diabetes and cerebral ischaemia treated with antioxidants.** *Folia Neuropathologica*, v. 39, n. 3, p. 147-54, 2001.

ROSA, M. M.; DIAS, T. **Commonly used endocrine drugs**. Handbook of Clinical Neurology, v. 120, p. 809–824, 2014.

SALES, P. M. *et al.*  **$\alpha$ -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source**. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 15, n. 1, p. 141–183, 2012.

SHOBANA, S.; SREERAMA, Y. N.; MALLESHI, N. G. **Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic amylase**. Food Chemistry, v. 115, n. 4, p. 1268–1273, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2019-2020**. São Paulo: Ciannad, 2019.

SOUZA, P. M. **Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado**. 2011. Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2011.

TAVARES, A. L. A. **Padrões de descarga neuronal na região de CA1 lobo temporal e de ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina: um estudo comparativo**. 2006. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2006.

TOMLINSON, D. R.; GARDINER, N. J. **Glucose neurotoxicity**. Nature Reviews Neuroscience, v. 9, n. 1, p. 36–45, 2008.

WOLLMANN, L. C. F. N. *et al.* Efeito da criopreservação e/ou da descelularização na matriz extracelular de condutos valvados porcinos. **Revista Brasileira Cirurgia Cardiovascular**, v. 26, n. 3, p. 490–496, 2011.

ZHAO, W. *et al.* **Brain Insulin Receptors and Spatial Memory: correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats**. Journal of Biological Chemistry, v. 274, n. 49, p. 34893–34902, 1999.

ZHEN-GUO, L. *et al.* **Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes**. Brain Research, v. 946, n. 2, p. 221–231, 2002.

# CAPÍTULO 4

## MATRIZ EXTRACELULAR PANCREÁTICA DESCELULARIZADA PARA CRIAÇÃO DE UM BANCO E FUTURA UTILIZAÇÃO EM ENGENHARIA TECIDUAL

Data de aceite: 01/03/2021

Data de submissão: 18/12/2020

### **Marluce da Cunha Mantovani**

Núcleo de Terapia Celular e Molecular  
(NUCEL), Faculdade de Medicina  
Departamento de Clínica Médica, Faculdade de  
Medicina  
Universidade de São Paulo  
São Paulo – SP  
<http://lattes.cnpq.br/4012863214487776>  
<https://orcid.org/0000-0001-8502-3970>

### **Tatiane Vieira Fonseca**

Núcleo de Terapia Celular e Molecular  
(NUCEL), Faculdade de Medicina,  
Universidade de São Paulo, São Paulo – SP  
<http://lattes.cnpq.br/9435541508107334>

### **Nilsa Regina Damaceno-Rodrigues**

Laboratório de Biologia Celular (LIM – 59),  
Departamento de Patologia, Faculdade de  
Medicina, Universidade de São Paulo, São  
Paulo – SP  
<http://lattes.cnpq.br/3065171477992476>

### **Elia Tamaso Espin Garcia Caldini**

Laboratório de Biologia Celular (LIM – 59),  
Departamento de Patologia, Faculdade de  
Medicina, Universidade de São Paulo, São  
Paulo – SP  
<http://lattes.cnpq.br/4317050355635223>

### **Mari Cleide Sogayar**

Instituto de Química, Departamento de  
Bioquímica, Universidade de São Paulo  
São Paulo – SP  
Núcleo de Terapia Celular e Molecular  
(NUCEL), Faculdade de Medicina,  
Universidade de São Paulo, São Paulo, 05360-  
130 SP  
<http://lattes.cnpq.br/4887814471318385>  
<http://orcid.org/0000-0003-4805-4609>

**RESUMO:** **Introdução:** Estudos mostram que a matriz extracelular (ECM) desempenha papel fundamental na migração e expressão fenotípica de células residentes, influenciando a proliferação e diferenciação celular através da transdução de sinais. Desenvolvemos estudos visando à obtenção de arcabouços pancreáticos descelularizados, Engenharia de Tecidos e geração de um pâncreas bioartificial. **Objetivos:** Avaliar a estabilidade de matrizes pancreáticas descelularizadas para reconstrução pancreática. **Métodos:** Pâncreas murino (n=12) foram extraídos, descelularizados por perfusão com solução detergente/enzima, caracterizados quanto à ausência de células e preservados sob três condições diferentes: a) tampão salino-fosfato - sem cálcio ou magnésio (PBSA) à 4°C; b) PBSA suplementado com antibióticos e antimicóticos à 4°C (PBSA-AA); c) solução CRIO: meio RPMI 1640 contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 10% de soro fetal bovino (FBS) à -80 °C. Amostras foram retiradas para análise histológica após 1, 2, 4, 8, 12 e 16 semanas de incubação. **Resultados:**

A análise histológica indicou ausência de células e manutenção da arquitetura nativa da ECM pancreática até o final do período de armazenamento avaliado, em todas as condições, bem como a manutenção da rede de colágeno. Observou-se também a perda gradativa da coloração correspondente aos proteoglicanos e glicosaminoglicanos, ao longo deste período, em todos os meios de preservação, sendo menos acentuada na solução CRIO. Esses achados foram confirmados através de avaliação da ultraestrutura das amostras e dosagem de proteínas totais no sobrenadante. **Conclusão:** Durante o período de uma semana, não foram encontradas diferenças significativas nas condições de preservação utilizadas, mas a condição mais favorável foi a manutenção dos arcabouços em meio CRIO à -80°C por um período de até quatro semanas. Conhecendo a melhor condição de preservação e o tempo limite de manutenção destes arcabouços permitirá a criação de um Banco e aperfeiçoamento das tecnologias para geração de um pâncreas bioartificial parcial ou totalmente funcional.

**PALAVRAS-CHAVE:** Descelularização pancreática, Matriz extracelular/arcabouço pancreático, Engenharia Tecidual, Banco de matriz pancreática descelularizada, pâncreas bioartificial.

## DECELLULARIZED PANCREATIC EXTRACELLULAR MATRICES FOR FUTURE BANKING AND TISSUE ENGINEERING

**ABSTRACT: Introduction:** Studies show that the extracellular matrix (ECM) plays a crucial role in cell migration and phenotypic expression, influencing proliferation and differentiation through signal transduction. We undertook studies aiming at generating descellularized pancreatic scaffolds. **Objectives:** To evaluate the stability of descellularized rat pancreatic matrices for pancreatic reconstruction. **Methods:** murine pancreata (n=12) were extracted, decellularized by perfusion with a detergent/enzyme mixture, characterized with respect to cells removal and preserved under three different conditions: a) saline-phosphate without calcium or magnesium (PBSA) at 4°C; b) PBSA supplemented with antibiotics and antimicotic (PBSA-AA); c) CRIO solution: RPMI 1640 medium containing 10% dimethylsulphoxide (DMSO) and 10% fetal bovine serum (FBS) at -80°C for four weeks. Histological analysis was carried out at 1, 2, 4, 8, 12 and 16 weeks of incubation. **Results:** The histological analysis revealed the absence of cells and maintenance of the native pancreatic ECM architecture throughout the observation period, under all conditions, as well as maintenance of the collagen network. Gradual loss of proteoglycans and glycosaminoglycans staining was also observed under all conditions, being less pronounced for the CRIO condition. These findings were confirmed by evaluation of the samples ultrastructure and of the amount of proteins present in the supernatant. **Conclusions:** No significant differences were found among the different preservation conditions during the first week, however, the most favorable condition was maintenance of the scaffolds under the CRIO condition, for a period of up to four weeks. Better understanding of the preservation and time-limit conditions for maintenance of these scaffolds should open the way for construction of a Scaffolds Bank and perfection of the technologies allowing the generation of a functional bioartificial pancreas.

**KEYWORDS:** Pancreatic decellularization, pancreatic extracellular matrix/scaffold, Tissue Engineering, pancreatic extracellular matrix Bank, Bioartificial pancreas.

## 1 | INTRODUÇÃO

A aplicação da Engenharia Tecidual vem sendo aprimorada nos últimos anos, contando com as mais diversas ferramentas, incluindo: arcabouços, biomateriais, enxertos, células-tronco e fatores peptídicos de crescimento e diferenciação celular, que controlam a formação dos tecidos e manipulação de fontes celulares (STOLTZ *et al.*, 2012; FISHER e MAUCK, 2013). Essa nova área do conhecimento vem aprimorando o desenvolvimento de tecidos e órgãos para o tratamento de tecidos injúriados ou degenerados (LANGER e VACANTI, 1993; GRIFFITH e NAUGHTON, 2002; ORLANDO *et al.*, 2010). Além de células, os tecidos e órgãos são constituídos de uma matriz extracelular (MEC) de composição singular, tecido-específica, possuindo microestruturas com propriedades biomecânicas, que mantém sinais distintos no microambiente local (BROWN *et al.*, 2010). O arcabouço (*scaffold*), conhecido como esqueleto celular, de material adequado e moléculas biologicamente ativas desempenham um papel significativo na Engenharia Tecidual. Idealmente, o arcabouço deve prover um microambiente/ nicho igual ou semelhante àquele da matriz extracelular nativa (GILBERT, SELLARO E BADYLAK, 2006).

Dessa forma, no âmbito da Engenharia Tecidual, a combinação apropriada de células com um arcabouço adequado e moléculas biologicamente ativas constitui uma alternativa extremamente atraente para o desenvolvimento de um pâncreas bioartificial. Os métodos descritos na literatura para manutenção de arcabouços provenientes dos mais diversos tecidos variam muito entre os autores, mas, até o momento, não foram relatados protocolos desenhados para a manutenção de arcabouços pancreáticos *in vitro* até o momento de sua utilização.

Este trabalho teve o intuito de escolher a melhor forma de manutenção e armazenamento de arcabouços pancreáticos murinos descelularizados *in vitro*, visando a futura criação de um Banco e sua utilização em Engenharia Tecidual. Este trabalho faz parte da Tese de Doutorado “Descelularização pancreática visando à recelularização como alternativa terapêutica para o *Diabetes mellitus* tipo I” da primeira autora do presente capítulo (MANTOVANI, 2019).

## 2 | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E METODOLOGIA

Este estudo foi realizado no Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL - <http://www.usp.br/nucel>) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), dentro do Programa de Ciências Médicas, na área de concentração de Distúrbios Genéticos, do Desenvolvimento e do Metabolismo. O presente protocolo de pesquisa envolveu o uso de animais (ratos - *Rattus norvegicus*) tendo sido submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMUSP e aprovado sob o Protocolo número 117/15.

Os animais foram mantidos em gaiolas no Biotério e com livre acesso à comida e água, em ambiente de temperatura e luminosidade controladas. Os animais foram

eutanasiados com overdose de anestésico (Tiopental – 45-55mg/Kg do animal) via intraperitoneal, e, em seguida, foi realizada antisepsia com solução de Povidona iodada e tricotomia abdominal, seguida de laparotomia mediana ventral com exposição do pâncreas de ratos Wistar de linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*, desenvolvida no Instituto Wistar na Filadélfia, do sexo masculino, pesando aproximadamente 300-500 gramas. Após a extração dos pâncreas murinos (n=12) os órgãos foram descelularizados.

Após a etapa de descelularização, as matrizes pancreáticas foram caracterizadas e, então, preservadas de sob três condições diferentes, a saber: a) tampão salina-fosfato – sem cálcio ou magnésio (PBSA) à 4°C; b) PBSA suplementado com antibiótico e antimicótico à 4°C; c) meio de criopreservação composto de: meio de cultura RPMI 1640, desenvolvido no *Roswell Park Memorial Institute*, suplementado com 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) e 10% de soro fetal bovino (FBS), à -80°C. Amostras foram retiradas para análise após 1, 2, 4, 8, 12 e 16 semanas.

## 2.1 Descelularização

A descelularização foi realizada através de protocolo adaptado a partir da literatura (TOTONELLI *et al.*, 2006) por meio de perfusão com detergente e enzima (a ser detalhado em um próximo artigo).

## 2.2 Microscopia Óptica - Análises Histológicas

As biópsias coletadas para as análises histológicas por microscopia óptica foram fixadas em solução de paraformaldeído 4%, por, no mínimo, 24h e mantidas em álcool etílico 70%. Após fixação, as biópsias foram desidratadas, através de incubação em etanol de concentrações crescentes (70, 96 e 100%). Após a desidratação, as amostras foram diafanizadas em xilol e, posteriormente, emblocadas em parafina. Cortes histológicos, com espessura de 4 a 5 micrômetros, foram obtidos em micrótomo e depositados em lâminas silanizadas. As lâminas foram submetidas às colorações de: 1) hematoxilina e eosina (H/E), 2) azul de Alcian, e 3) vermelho de Picrosírius. As lâminas foram mantidas à temperatura ambiente até sua avaliação em microscópio óptico Optiphot-2 Nikon, utilizando-se câmera Nikon Digital Sight DS-U1 e programa NIS Elements Nikon® para a documentação.

## 2.3 Análises da Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Biópsias de 3 a 5mm de comprimento, 1mm de largura e 1mm de espessura foram coletadas para as análises da ultra-estrutura através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), fixadas em solução de glutaraldeído a 2% em tampão salino fosfato (PBS) pH 7,2 e 0,1% de ácido tânico, sendo mantidas à 4°C por 2h. Após esse período, as amostras foram acondicionadas em soro fisiológico glicosado 5%, seguido por lavagens em soro fisiológico glicosado 5%, incubação em tetróxido de ósmio à 4°C, lavagens em soro

fisiológico glicosado 5% e incubação em acetato de uranila à 4°C *overnight*. Os materiais foram emblocados em resina e mantidos à temperatura ambiente até a realização dos cortes. Os cortes ultrafinos com espessura de 70 nanômetros foram feitos em micrótomo (Leica®) e montados em tela de cobre. A marcação foi realizada por adição de solução de citrato de chumbo sobre os cortes. As imagens geradas foram capturadas através de microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM.1010 Electron Microscope).

## 2.4 Dosagem de Proteínas Totais

As dosagens de proteínas totais presentes nas amostras foram obtidas após maceração dos arcabouços descelularizados em nitrogênio líquido, utilizando-se gral de porcelana, com auxílio de um pistilo. As amostras foram depositadas em tubos de 1,5mL e pesadas em balança semi-analítica, de forma que todas as alíquotas geradas possuíssem o mesmo peso (0,017g). As dosagens de proteínas totais foram realizadas utilizando-se o Kit *Bio-Rad Protein Assay* (método de Bradford), ao lado de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), de acordo com as especificações do fabricante. As concentrações das proteínas totais foram estimadas através de leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 595nm, utilizando-se o espectrofotômetro SpectraMax® Paradigm®.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora o transplante de pâncreas órgão inteiro tenha sido aperfeiçoado nos últimos anos, permitindo manter a qualidade de vida e sobrevivência dos pacientes, infelizmente, apenas um pequeno grupo de pacientes se beneficia desse procedimento, devido à escassez de órgãos de doadores falecidos. Isto pode ser verificado, por exemplo, quando se constata o número de 2.851 óbitos de pacientes que aguardavam tal procedimento na fila de transplante de órgãos em 2018, no Brasil. Acrescenta-se a este dado outros 30.684 pacientes que ingressaram na lista de espera para transplante de órgãos no mesmo período (RBT, 2018). Opções alternativas de tratamento são urgentes e necessárias para resolver o problema da escassez de órgãos.

No âmbito da Engenharia Tecidual, nos últimos anos, foi aprimorada a tecnologia de desenvolvimento de tecidos e órgãos *in vitro* para o tratamento de tecidos injuriados ou degenerados (LANGER e VACANTI, 1993; GRIFFITH e NAUGHTON, 2002; ORLANDO *et al.*, 2010). A utilização de ferramentas por meio da combinação apropriada de células-tronco ou adultas com um arcabouço adequado e moléculas biologicamente ativas (STOLTZ *et al.*, 2012; FISHER e MAUCK, 2013), constitui uma alternativa extremamente atraente para o desenvolvimento de um pâncreas bioartificial. Nesse contexto, surgiu a pergunta se seria possível a criação de um Banco de Matriz Extracelular Pancreática Descelularizada e qual seria a melhor condição a ser empregada para tanto.

Para responder esse questionamento, a literatura foi avaliada para descobrir as principais formas de armazenamento dos órgãos descelularizados até o momento de sua

utilização. Foi possível constatar o uso de tampão salina fosfato sem cálcio ou magnésio (PBSA), mantido à 4°C e de PBSA suplementado com antibiótico e antimicótico (PBSA-AA) mantido à 4°C (TOTONELLI *et al.*, 2006; MIRMALEK-SANI *et al.*, 2013; GOH *et al.*, 2013; PELOSO *et al.*, 2016; . DE CARLO *et al.*, 2010), sem indicação alguma sobre o período de tempo máximo de armazenamento ou como esses arcabouços se comportam nesses meios. Além destas duas condições, resolvemos avaliar, também, o meio de congelamento de células, contendo RPMI e DMSO à -80°C (CRIO), por ser uma condição interessante, uma vez que à essa temperatura diversas amostras biológicas são mantidas de forma viável por um período maior de tempo. Conforme relatado por alguns autores (SCARRITT, PASHOS e BUNNELL, 2015), a adição do criopreservante DMSO pode evitar que alguns tecidos mantidos à baixa temperatura sofram quebras no arcabouço de sua matriz extracelular.

Dessa forma, os pâncreas murinos foram descclularizados e os arcabouços foram mantidos sob as três condições de armazenamento acima citadas e as amostras foram avaliadas periodicamente durante até 16 semanas.

Por meio de análise histológica e coloração de hematoxilina e eosina (H/E), foi avaliado, de forma qualitativa, a eficiência do processo de descclularização do protocolo adotado, bem como a arquitetura dos arcabouços nos diferentes períodos de tempos e sob as três diferentes condições de armazenamento testadas. No tecido descclularizado, observou-se ausência de células e manutenção da arquitetura nativa da matriz extracelular pancreática até o final do período avaliado de 16 semanas de armazenamento, em todas as condições analisadas (Figura 1). Por meio da coloração de vermelho de Picrosírius, foi observado, de forma qualitativa, a manutenção do arcabouço de colágeno, sendo que todos os tecidos descclularizados mantiveram esse arcabouço de colágeno e, ainda, que as fibras/fibrilas de colágeno, aparentemente, são mantidas no arcabouço descclularizado, de forma íntegra, até o final do período avaliado, ou seja, 16 semanas de armazenamento, em todas as condições avaliadas (Figura 2).



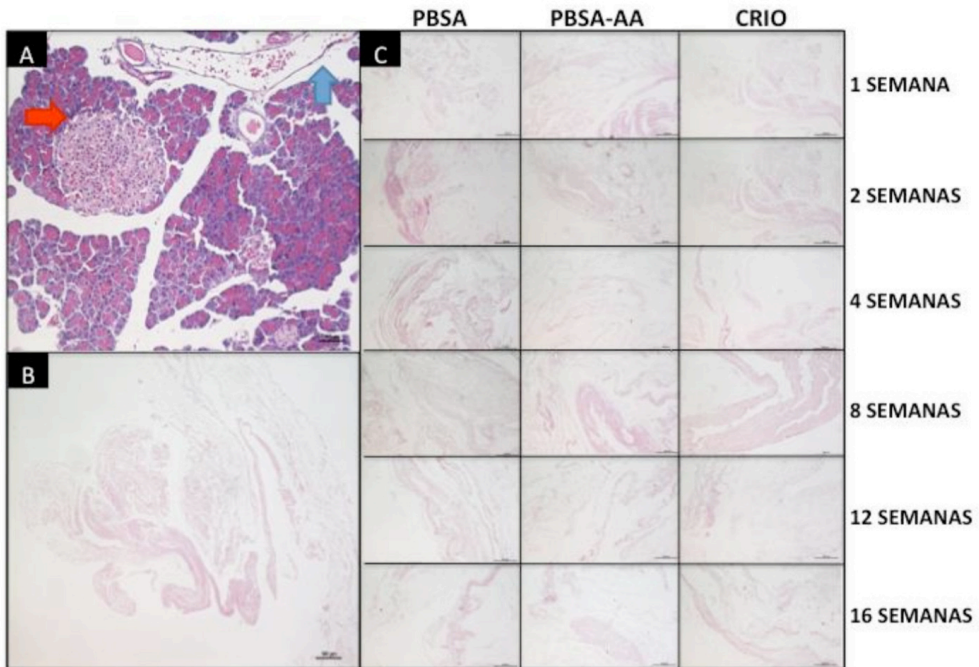


Figura 1.: **Preservação dos Arcabouços - Histologia Pancreática – Hematoxilina/Eosina.**

A) Pâncreas Nativo de rato. A Seta Vermelha indica uma ilhota pancreática e a seta azul indica um vaso sanguíneo. B) Pâncreas Descelularizado de Rato no tempo zero. C) Campos representativos das amostras avaliadas nas diferentes condições de armazenamento e diferentes períodos de tempo. PBSA: tampão salina fosfato sem cálcio ou magnésio. PBSA-AA: PBSA suplementado com antibiótico e antimicótico. CRIO: meio de criopreservação. A barra indica 100µm. Fonte: Mantovani, 2019, p.86.

Em contrapartida, ao analisar a presença de proteoglicanos e glicosaminoglicanos (GAGs) remanescentes, através da coloração com Azul de Alcian, foi possível observar uma perda gradativa na coloração, ao longo das semanas, em todos os meios de preservação avaliados, sendo menos acentuada no meio de criopreservação (Figura 3), o que foi confirmado através de avaliação da ultraestrutura das amostras (Figura 4).

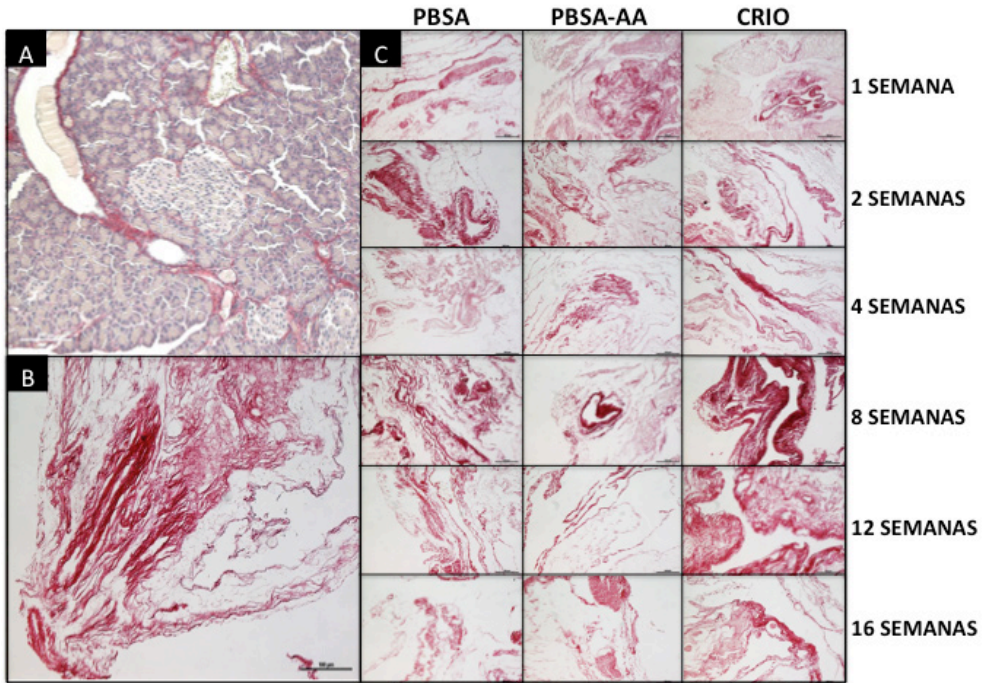


Figura 2.: **Preservação dos Arcabouços - Histologia Pancreática – Vermelho de Picrosírius.** A) Pâncreas Nativo de rato. B) Pâncreas Descelularizado de rato no tempo zero. C) Campos representativos das amostras avaliadas nas diferentes condições de armazenamento e em diferentes períodos de tempo. PBSA: tampão salino fosfato sem cálcio ou magnésio. PBSA-AA: PBSA suplementado com antibiótico e antimicótico. CRIO: meio de criopreservação. A barra indica 100µm. Fonte: Mantovani, 2019, p.88.

A ultraestrutura da matriz descelularizada foi avaliada por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) observando-se, de forma qualitativa, a eficiência do processo de descelularização e a manutenção da arquitetura dos arcabouços nos diferentes períodos de tempo e sob as diferentes condições de armazenamento testados. No tecido nativo, foi possível visualizar núcleos celulares de células de ilhotas pancreáticas, assim como grânulos de insulina, secreções exócrinas, fibras e fibrilas de colágeno, além da presença de proteoglicanos e GAGs. Nos arcabouços descelularizados de todas as amostras, não foram observados células ou remanescentes celulares, apresentando somente proteoglicanos, GAGs e fibras/fibrilas de colágeno,. A avaliação das fibras/fibrilas de colágeno demonstrou que, aparentemente, estas são mantidas no arcabouço descelularizado até o final do período analisado, em todos os meios de preservação. Os proteoglicanos e GAGs apareceram ligados a fibrilas de colágeno na primeira semana, sendo possível observar uma perda gradativa nas semanas posteriores em todos os meios de preservação avaliados, mas essa perda é menos acentuada no meio de criopreservação (Figura 4).

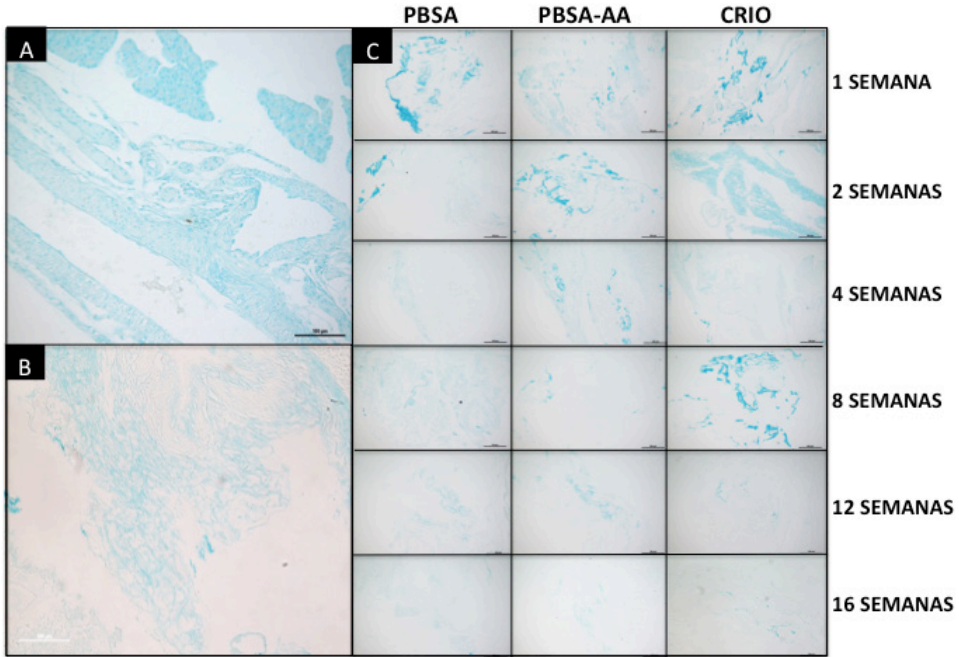


Figura 3.: **Preservação dos Arcabouços - Histologia Pancreática – Azul de Alcian.** A) Pâncreas Nativo de rato. B) Pâncreas Descelularizado de rato no tempo zero. C) Campos representativos das amostras avaliadas nas diferentes condições de armazenamento e após diferentes períodos de tempo. PBSA: tampão salina fosfato sem cálcio ou magnésio. PBSA-AA: PBSA suplementado com antibiótico e antimicótico. CRIO: meio de criopreservação. A barra indica 100 $\mu$ m. Fonte: Mantovani, 2019, p.87.

As proteínas totais presentes nos sobrenadantes das amostras armazenadas sob as diferentes condições e períodos de tempo foram dosadas e os resultados, apresentados na Figura 5, indicam que, gradativamente, todas as amostras apresentam proteínas no sobrenadante de maneira tempo-dependente. As amostras dos sobrenadantes dos arcabouços mantidos em PBSA apresentaram perda de proteínas de, aproximadamente, 24,26 $\mu$ g/mL ( $\pm$ 0,015) na 2<sup>a</sup> semana, com uma perda mais acentuada a partir da 4<sup>a</sup> semana, de aproximadamente 64,9 $\mu$ g/mL ( $\pm$ 1,830) e, ao final da 16<sup>a</sup> semana, um valor de 112,91 $\mu$ g/mL ( $\pm$ 3,630) de proteínas totais no meio. As amostras dos sobrenadantes dos arcabouços mantidos em PBSA-AA apresentaram perda de proteínas de, aproximadamente, 27,04 $\mu$ g/mL ( $\pm$ 5,708) já na 1<sup>a</sup> semana, com uma perda mais acentuada a partir da 2<sup>a</sup> semana de, aproximadamente, 73,37 $\mu$ g/mL ( $\pm$ 9,873) e, ao final da 16<sup>a</sup> semana, um valor de 124,47 $\mu$ g/mL ( $\pm$ 0,040). As amostras dos sobrenadantes dos arcabouços mantidos em CRIO apresentaram perda de proteínas de aproximadamente 7,04 $\mu$ g/mL ( $\pm$ 0,427) na 2<sup>a</sup> semana, apresentando uma perda mais acentuada a partir da 8<sup>a</sup> semana, de, aproximadamente,

74,48 $\mu$ g/mL ( $\pm$ 1,813), e, ao final da 16ª semana, um valor de 93,88 $\mu$ g/mL ( $\pm$ 0,514). Quando comparados os diferentes meios de manutenção dos arcabouços nos mesmos períodos de tempo, foi possível observar diferença entre eles logo na segunda semana (PBSA / PBSA-AA, \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ , PBSA-AA / CRIO, \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ) e na quarta semana (PBSA / CRIO, \*\*\* =  $p < 0,001$ , PBSA-AA / CRIO, \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ). Após a quarta semana todas as condições apresentam quantidades similares de proteínas no sobrenadante, porém, ainda existe diferença estatisticamente significativa entre os meios PBSA-AA e CRIO (8 semanas \*\* =  $p < 0,01$ , 12 semanas, \*\*\* =  $p < 0,001$ , e 16 semanas \* =  $p < 0,05$ ) (Figura 5).

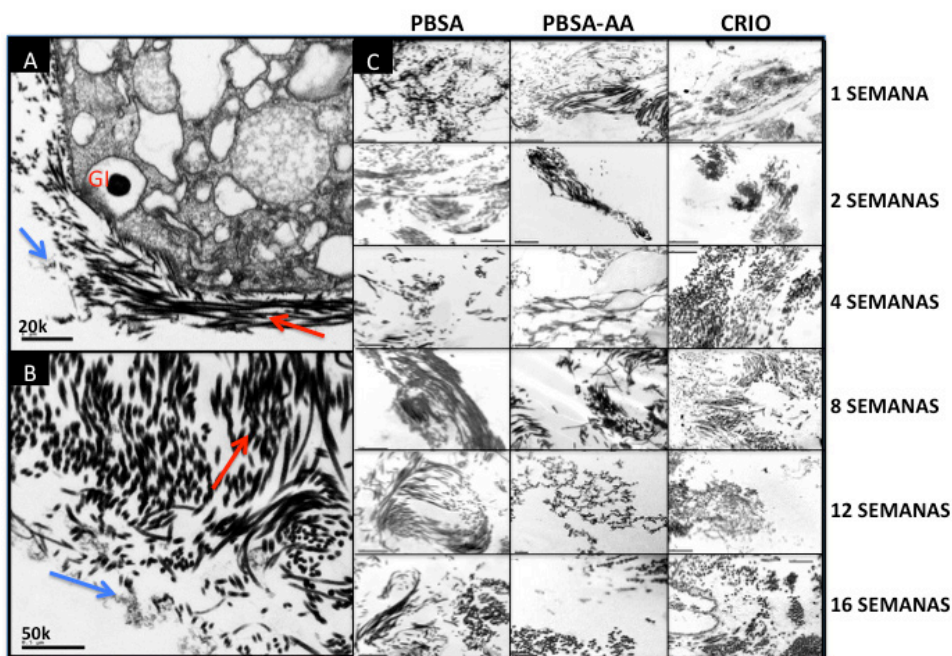


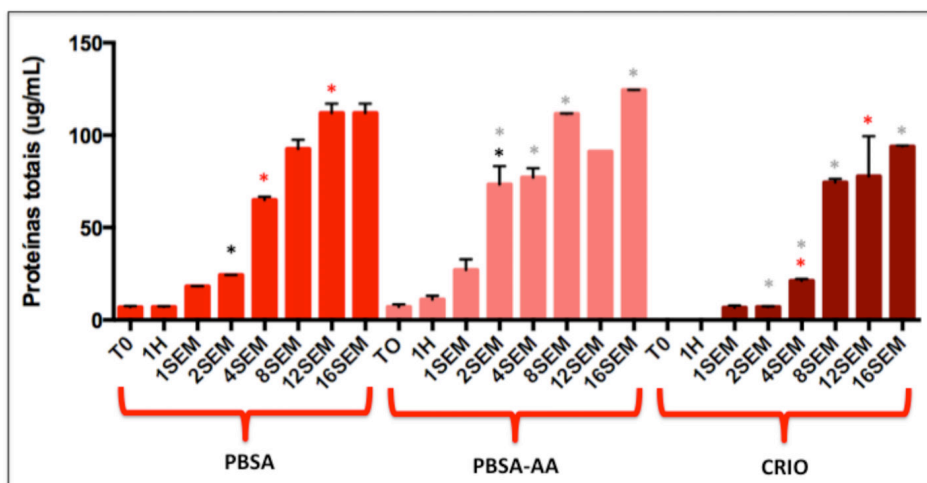
Figura 4.: **Preservação dos Arcabouços - Análise da Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão.** A) Pâncreas Nativo de rato. A seta azul indica os proteoglicanos e glicosaminoglicanos de matriz. A seta vermelha indica as fibras/fibrilas de colágeno. GI - Grânulo de Insulina. B) Pâncreas Descelularizado de rato no tempo zero. PBSA: tampão salina fosfato sem cálcio ou magnésio. PBSA-AA: PBSA suplementado com antibiótico e antimicótico. CRIO: meio de criopreservação. A seta azul indica os proteoglicanos e glicosaminoglicanos de matriz e a seta vermelha indica as fibras/fibrilas de colágeno. Fonte: Mantovani, 2019, p.89.

Portanto, a dosagem de proteínas totais no sobrenadante das amostras corrobora os resultados nas análises histológicas e ultraestruturais, possibilitando uma avaliação quantitativa da possível liberação gradativa desses proteoglicanos e GAGs no meio de preservação, de forma tempo-dependente, sendo menos acentuado na condição CRIO, seguido por PBSA e PBSA-AA.

Assim, foi possível concluir que os arcabouços provenientes de pâncreas descclularizados murinos podem ser estocadas por até uma semana, independente do meio de preservação utilizado e por até, pelo menos, quatro semanas no meio CRIO. Alguns pesquisadores reportam o uso de arcabouços descclularizados mantidos em PBSA e PBSA-AA até o momento do uso (TOTONELLI *et al.*, 2006; MIRMALEK-SANI *et al.*, 2013; GOH *et al.*, 2013; PELOSO *et al.*, 2016; . DE CARLO *et al.*, 2010), mas não indicam o período de tempo utilizado. Nossos achados indicam que a condição denominada CRIO foi a mais eficaz na manutenção das características das matrizes descclularizadas de pâncreas murino, apresentando valores inferiores a 25µg/mL de proteínas dispersas no sobrenadante em até quatro semanas. Valores menores do que 25µg/mL de proteínas foram observados apenas pelo período de até uma semana em PBSA-AA e duas semanas em PBSA (Figura 5).

A manutenção dos proteoglicanos e GAGs nos arcabouços descclularizados desempenha um papel importante para a etapa de recelularização (GOH *et al.*, 2013; SCARRITT, PASHOS e BUNNELL, 2015), portanto, armazenamento por períodos muito prolongados pode interferir diretamente na recelularização dos arcabouços.

Com base nestes resultados, conclui-se que a criação de um Banco de Matriz Pancreática Descclularizada seria mais factível utilizando-se a condição CRIO à -80°C, a qual garante a manutenção das características estruturais por até quatro semanas.



	PBSA ( $\mu\text{g/mL}$ )	PBSA-AA ( $\mu\text{g/mL}$ )	CRIO ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>T0</b>	6,91 $\pm$ 0,616	7,10 $\pm$ 1,330	0
<b>T1H</b>	7,06 $\pm$ 0,396	11,12 $\pm$ 1,926	0
<b>T1SEM</b>	18,16 $\pm$ 0,092	27,04 $\pm$ 5,708	6,73 $\pm$ 1,023
<b>T2SEM</b>	24,26 $\pm$ 0,015 *	73,37 $\pm$ 9,873 * *	7,04 $\pm$ 0,427 *
<b>T4SEM</b>	64,90 $\pm$ 1,830 *	77,08 $\pm$ 4,977 *	21,23 $\pm$ 0,977 * *
<b>T8SEM</b>	92,58 $\pm$ 4,977	111,50 $\pm$ 0260 *	74,48 $\pm$ 1,813 *
<b>T12SEM</b>	112,00 $\pm$ 5,063 *	91,07 $\pm$ 0,035	77,65 $\pm$ 21,772 *
<b>T16SEM</b>	112,91 $\pm$ 3,630	124,47 $\pm$ 0,040 *	93,88 $\pm$ 0,514 *

Figura 5.: **Dosagem de Proteínas Totais.** Quantificação de proteínas totais, através do Método de Bradford, no sobrenadante das amostras descclularizadas que foram armazenadas por diferentes períodos de tempo em diferentes meios de preservação,. T0: tempo zero, T1H: 1 hora, T1SEM: 1 semana, T2SEM: 2 semanas, T4SEM: 4 semanas, T8SEM: 8 semanas, T12SEM: 12 semanas, T16SEM: 16 semanas. O asterisco representa a diferença estatística entre os mesmos períodos de tempo e nas diferentes condições de manutenção dos arcabouços. \* PBSA / PBSA-AA, \* PBSA / CRIO, \* PBSA-AA / CRIO. (Two-way ANOVA. \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ ) (n=03). Fonte: Mantovani, 2019, p.91.

## 4 I CONCLUSÃO

Concluiu-se que para a criação de um Banco de Matriz Pancreática Descelularizada, a melhor condição dentre aquelas estudadas, é a manutenção dos arcabouços pancreáticos em meio CRIO à  $-80^{\circ}\text{C}$  por um período de até quatro semanas. Observou-se, ainda, que os arcabouços pancreáticos descclularizados murinos podem ser estocados por um período de até uma semana, sem prejuízos, em qualquer uma das três condições avaliadas.

O presente trabalho incitou diversos questionamentos, que poderão motivar a realização de trabalhos futuros. Um estudo interessante seria avaliar outras formas de manutenção/armazenamento dos arcabouços gerados *in vitro*, visando à criação de um Banco de Matriz Pancreática Descclularizada, o qual poderá permitir estender, ainda mais, o período de preservação estrutural dos arcabouços pancreáticos. Este é um trabalho de suma importância, que, atualmente, vem sendo negligenciado na literatura científica.

Todos esses esforços visam um cenário translacional clínico futuro, no qual órgãos alogênicos, ou até mesmo xenogênicos (suíno por exemplo), poderiam ser utilizados para descclularização, seguido de recelularização com células do próprio paciente (IPSCs) isoladas, diferenciadas e expandidas, para popular órgãos específicos. Após a recelularização e maturação deste órgão bioartificial, o enxerto personalizado seria

implantado sem a necessidade de imunossupressão a longo prazo, atuando, diretamente, na problemática da escassez de órgãos e melhor manutenção dos tecidos após transplante.

## REFERÊNCIAS

BROWN, B.N., Barnes, C.A., Kasick, R.T., Michel, R., Gilbert, T.W., Beer-Stolz, D., *et al.* **Surface characterization of extracellular matrix scaffolds.** *Biomaterials.* 31(3):428-465; 2010.

DE CARLO, E., Baiguera, S., Conconi, M.T., Vigolo, S., Grandi, C., Lora, S., *et al.* **Pancreatic acellular matrix supports islet survival and function in a synthetic tubular device: in vitro and in vivo studies.** *Int J Mol Med.* 25(2): 195-202; 2010.

FISHER, M.B. e MAUCK, R.L. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Recent Innovations and the Transition to Translation.** *Tissue Eng Part B Rev.* 19(1):1-13; 2013.

GILBERT, T.W., SELLARO, T.L., BADYLAK, S.F. **Decellularization of tissues and organs.** *Biomaterials.* 27(19):3675-3686; 2006.

GOH, S. K., Bertera, S., Olsen, P., Candiello, J.E., Halfter, W., Uechi, G., *et al.* **Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering.** *Biomaterials.* 34(28): 6760-72; 2013.

GRIFFITH, L.G. e NAUGHTON, G. **Tissue engineering: current challenges and expanding opportunities.** *Science.* 295(5557): 1009-1023; 2002.

LANGER, R. e VACANTI, J.P. **Tissue engineering.** *Science.* 260(5110):920-926; 1993.

MANTOVANI, Marluce da Cunha. **Descelularização pancreática visando à recelularização como alternativa terapêutica para o Diabetes mellitus tipo I.** 2019. 182 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

MIRMALEK-SANI, S.H.; Orlando G., Orlando, G., McQuilling, J.P., Pareta, R., Mack, D.L., Salvatori, M., *et al.* **Porcine Pancreas Extracellular Matrix as a Platform for Endocrine Pâncreas Bioengineering.** *Biomaterials.* 34(22): 5488-95; 2013.

ORLANDO, G., Baptista, P., Birchall, M., De Coppi, P., Farney, A., Guimaraes-Souza, N.K., *et al.* **Regenerative medicine as applied to solid organ transplantation: current status and future challenges.** *Transpl Int.* 24(3):223-255; 2010.

PELOSO, A., Urbani, L., Cravedi, P., Katari, R., Maghsoudlou, P., Fallas, M.E., *et al.* **The Human Pancreas as a Source of Protolerogenic Extracellular Matrix Scaffold for a New-generation Bioartificial Endocrine Pancreas.** *Ann Surg.* 264(1):169-79; 2016.

RBT (Registro Brasileiro de Transplantes). Transplante CEd (2018) Veículo Oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. In. **Associação Brasileira de Transplante de Órgãos.** Ano XXIV n°4 – Janeiro/Dezembro 2018.

SCARRITT, M.E.; PASHOS, N.C.; BUNNELL, B.A. **A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs.** *Front Bioeng Biotechnol.* 3:43; 2015.

STOLTZ, J.F., Decot, V., Huselein, C., He, X., Zhang, L., Magdalou, J., *et al.* **Introduction to regenerative medicine and tissue engineering.** *Biomed Mater Eng.* 22(1-3):3-16; 2012.

TOTONELLI, G., Maghsoudlou, P., Garriboli, M., Riegler, J., Orlando, G., Burns, A.J., *et al.* **A rat decellularized small bowel scaffold that preserves villus-crypt architecture for intestinal regeneration.** *Biomaterials*; 33(12): 3401-10; 2006.



## NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS NADH-DIAFORASE POSITIVOS DO JEJUNO DE RATOS VELHOS SUPLEMENTADOS COM *AGARICUS BLAZEI* MURRILL

Data de aceite: 01/03/2021

Data de submissão: 08/12/2020

### Wesley Ladeira Caputo

Universidade Estadual do Norte do Paraná,  
Centro de Ciências Biológicas  
Bandeirantes – PR  
<http://lattes.cnpq.br/0236227008282198>

### Ana Paula de Santi Rampazzo

Universidade Estadual de Maringá,  
Departamento de Ciências Morfológicas  
Maringá – PR  
<http://lattes.cnpq.br/2588664379664491>

### Rosane Marina Peralta

Universidade Estadual de Maringá,  
Departamento de Bioquímica  
Maringá – PR  
<http://lattes.cnpq.br/7046351448775946>

### Adelar Bracht

Universidade Estadual de Maringá,  
Departamento de Bioquímica  
Maringá – PR  
<http://lattes.cnpq.br/7040007133045509>

### Maria Raquel Marçal Natali

Universidade Estadual de Maringá,  
Departamento de Ciências Morfológicas  
Maringá – PR  
<http://lattes.cnpq.br/5721178588513838>

### João Paulo Ferreira Schoffen

Universidade Estadual do Norte do Paraná,  
Centro de Ciências Biológicas  
Bandeirantes – PR  
<http://lattes.cnpq.br/0268722659406188>

**RESUMO:** O envelhecimento está relacionado ao estresse oxidativo, podendo causar alterações morfofisiológicas na inervação intrínseca intestinal. O *Agaricus blazei* Murril (ABM) pode neutralizar espécies reativas de oxigênio (ERO) e prevenir alterações decorrentes da idade. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do extrato aquoso de ABM sobre os neurônios NADH diaforase positivos do plexo mioentérico de ratos Wistar velhos. Após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal, ratos Wistar com 7 meses de idade foram distribuídos em grupos controles de 7 e 23 meses (C7 e C23) e grupo experimental de 23 meses (CA23). Os ratos do grupo CA23 foram suplementados via gavagem diariamente com extrato aquoso de ABM (26mg/animal) por 16 meses. Todos os animais foram alimentados *ad libitum* com ração padrão para roedores. Após eutanásia dos animais, amostras do jejuno foram destinadas à obtenção de preparados de membrana e coloração pelo método histoquímico NADH-diaforase, para estudo quantitativo e morfométrico neuronal. Foram contados os neurônios em 80 campos microscópicos aleatórios por animal e mensuradas a área dos corpos celulares, núcleos e citoplasma de 100 neurônios por animal. Os dados foram analisados por one-way ANOVA e Tukey, com significância de 5%. O envelhecimento causou prejuízo neuronal, registrado com aumento significativo na densidade de neurônios NADH-diaforase positivos, não havendo interferência do extrato de ABM. Nenhuma modificação na área do corpo celular, núcleo e citoplasma dos neurônios ocorreu com o envelhecimento e suplementação.

O extrato aquoso de ABM não protege os neurônios NADH-diaforase positivos do jejuno de ratos Wistar velhos contra o dano nervoso ocasionado pela disfunção e aumento de ERO.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cogumelo do sol, envelhecimento, plexo mioentérico.

## NADH-DIAPHORASE POSITIVE NEURONS OF THE JEJUNUM OF OLD RATS SUPPLEMENTED WITH *AGARICUS BLAZEI* MURRILL

**ABSTRACT:** Aging is related to oxidative stress and may cause morphophysiological changes in the intestinal intrinsic innervation. The *Agaricus blazei* Murril (ABM) can neutralize reactive oxygen species (ROS) and prevent alterations due to age. The objective of this work was to analyse the effects of the aqueous extract of ABM on the NADH-diaphorase positive myenteric neurons of old rats. After approval by Ethics Committee Animal Experimentation, 7-month-old Wistar rats were distributed into groups control groups of 7 and 23 months (C7 and C23) and experimental group of 23 months (CA23). The CA23 group rats were supplemented by gavage daily of aqueous extract of ABM (26mg/animal) for 16 months. All animals were fed *ad libitum* with standard rodent feed. After euthanasia, samples of jejunum were destined to the whole-mount preparations stained with NADH-diaphorase histochemical method for neuronal morphoquantitative study. For neuronal analysis, myenteric neurons present in 80 randomic microscopic fields per animal were counted and the cell body area, nucleus and cytoplasm of 100 neurons per animal were measured. The data were submitted to analysis of one-way ANOVA and Tukey tests with 5% significance. The aging caused neuronal damage, registering significant increase of NADH-diaphorase positive neurons density, with no interference from the ABM extract. No modification occurred in the cell body, nucleus and cytoplasm of neurons after aging and supplementation. The aqueous extract of ABM did not protect the NADH-diaphorase positive neurons of jejunum of old Wistar rats against nerve damage caused by dysfunction and increase of ROS.

**KEYWORDS:** Sun mushroom, aging, myenteric plexus.

## 1 | INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento promove alterações morfoquantitativas na população de neurônios entéricos, na expressão de neurotransmissores e organização dos plexos nervosos (PHILLIPS; POWLEY, 2001), podendo levar a sintomas como redução do tempo de esvaziamento gástrico e dos movimentos peristálticos (HALL, 2002; WADE, 2002), atividades estas moduladas pela inervação intrínseca do trato gastrointestinal. Estas alterações estão relacionadas principalmente à produção de radicais livres, pelo metabolismo energético mitocondrial, redução dos antioxidantes intracelulares e depleção de fatores neurotróficos, provocando danos neuronais cumulativos e irreversíveis causando a morte celular (THRASIVOULOU *et al.*, 2006; KORSACK *et al.*, 2012; SCHOFFEN *et al.*, 2014).

Existem inúmeras rotas que levam à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), mas o metabolismo energético mitocondrial é geralmente reconhecido como o mais

importante na maioria das células eucarióticas (CARVAJAL *et al.*, 2012). Por ser a fonte intracelular direta de ERO, as mitocôndrias também estão sujeitas ao ataque direto dessas moléculas (SOARES *et al.*, 2009). Já foi constatado que os danos induzidos por moléculas oxidantes, incluindo mutações no DNA mitocondrial, pode resultar em perda progressiva da capacidade celular de produzir ATP, degeneração e, eventualmente, morte da célula (FIRENZUOLI *et al.*, 2008).

Compostos com propriedades antioxidantes como o basidiomiceto *Agaricus blazei* Murril (ABM) tem sido amplamente estudado com objetivo de amenizar os efeitos do estresse oxidativo sobre as células. ABM, conhecido como cogumelo do sol, possui atividades preventivas popularmente conhecidas para doenças como diabetes, hiperlipidemia, arteriosclerose, hepatite e câncer (TAKAKU *et al.*, 2001; NASO, 2010), além de ações antimutagênicas, imunestimulatórias, neuroprotetora e antioxidantes comprovadas cientificamente (TAKAKU *et al.*, 2001; BARBISAN *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2007; SANTI-RAMPAZZO *et al.*, 2015), podendo contribuir significativamente para a melhoria dos sintomas gastrointestinais e a qualidade de vida de idosos.

Neste contexto, vários métodos são utilizados para estudo dos neurônios do sistema nervoso entérico em animais e humanos, todavia a técnica histoquímica para NADH-diaforase (NADH-d) permite comparar o grau de atividade metabólica dos neurônios entéricos em diferentes tratamentos experimentais (SOUSA; MIRANDA-NETO, 2009). A técnica baseia-se na formação de um precipitado de formazana que ocorre na medida em que o *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) é reduzido às custas da oxidação do NADH em uma reação catalisada pelo complexo I da cadeia transportadora de elétrons das mitocôndrias (BERRIDGE *et al.*, 2005). Investigações dos efeitos do ABM sobre a inervação intrínseca intestinal de ratos envelhecidos evidenciada por esta técnica não são encontradas na literatura.

Este trabalho teve por objetivo analisar os efeitos do extrato aquoso de ABM sobre os neurônios NADH-diaforase positivos do plexo mioentérico de ratos Wistar velhos.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção do extrato de *Agaricus blazei* Murril (ABM)

O presente estudo utilizou basidiomas desidratados de ABM produzidos em Ibema, PR, Brasil (25°6'50" sul, 53°0'53" oeste). Os basidiomas foram moídos para formar um pó fino e então submetido à extração aquosa, modificada da metodologia de Soares *et al.* (2009). Água destilada (100 mL) foi adicionada a cada 10 g de basidioma moído, que permaneceu sob agitação a 28° C por 3 horas. Os sólidos residuais foram removidos por filtração a vácuo usando papel de filtro Whatman tamanho 1 e novamente submetido à extração, que foi repetida três vezes. Os filtrados foram liofilizados e mantidos em freezer a -20° C.

## 2.2 Animais e tratamento

Foram utilizados 15 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com 7 meses, mantidos em caixas de polipropileno com iluminação de claro e escuro de 12 horas e temperatura de  $22 \pm 2$  °C, os quais foram distribuídos em grupos denominados controles de 7 meses (C7) e 23 meses (C23), e grupo experimental de 23 meses (CA23).

Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração padrão NUVILAB-NUVITAL® para roedores durante todo período experimental. A partir dos 7 meses, os ratos pertencentes ao grupo CA foram suplementados diariamente, via gavagem, com 1 ml de solução aquosa contendo 26 miligramas do liofilizado de ABM por 16 meses.

Aos 7 e 23 meses os animais foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental sódico (Thionembutal®) na concentração de 40 mg/kg do peso corporal. Após laparotomia, amostras do jejuno foram retiradas e destinadas ao método histoquímico da NADH-d (GABELLA, 1969) para estudo morfoquantitativo dos neurônios mioentéricos.

Os procedimentos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (Protocolo N° 033/2010).

## 2.3 Técnica histoquímica para NADH-diaforase neuronal

As amostras coletadas foram lavadas e preenchidas com solução de Krebs, permanecendo 20 minutos imersas nesta mesma solução; seguido por permeabilização em Triton X-100 a 0,3% de Krebs por 5 minutos. Em seguida, realizaram-se 4 imersões em solução de Krebs (10 minutos cada) e, por último, as amostras ficaram por 45 minutos em meio de incubação contendo 50 ml de solução estoque de NBT, 50ml de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,3, 100ml de água destilada e 0,1g de  $\beta$ -NADH. A reação foi interrompida através da imersão dos segmentos em formol a 10% tamponado.

Após fixação, preparados totais da túnica muscular foram obtidos através da remoção das túnicas mucosa, submucosa e túnica muscular circular do jejuno, por meio de dissecação sob estereomicroscópio. Posteriormente, estes foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética Permout®.

## 2.4 Análise morfoquantitativa neuronal

Através de imagens microscópicas capturadas em objetiva de 40X, nas regiões intermediária e antimesentérica da circunferência intestinal, foram realizadas contagens das células nervosas em 80 campos microscópicos aleatórios por animal (40 campos/região) e mensuração da área ( $\mu\text{m}^2$ ) dos corpos celulares e núcleos de 100 neurônios/animal (50 neurônios/região). A área do citoplasma neuronal foi estimada pela subtração da área do núcleo da área do perfil do corpo celular.

A captura de imagens dos neurônios mioentéricos foi efetuada em microscópio de luz Motic BA410® e a análise morfoquantitativa foi realizada com auxílio do software Image-Pro Plus® 4.5.

## 2.5 Análise estatística

O software GraphPad Prism® 5.0 foi utilizado para análise estatística de todos os dados obtidos, aplicando-se o teste Kolmogorov-Smirnov (para verificar a normalidade) e Análise de Variância (one-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%, sendo os resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O envelhecimento causou aumento significativo (35,29%) na densidade de neurônios mioentéricos NADH-d positivos do jejuno no grupo C23 em relação ao grupo C7 (Fig. 1 e Fig. 2). Este resultado diverge da literatura para o intestino delgado e grosso de ratos, uma vez que registra-se redução quantitativa desta população neuronal aos 24 meses (SANTER; BAKER, 1988; JOHNSON *et al.*, 1998; COWEN *et al.*, 2000).

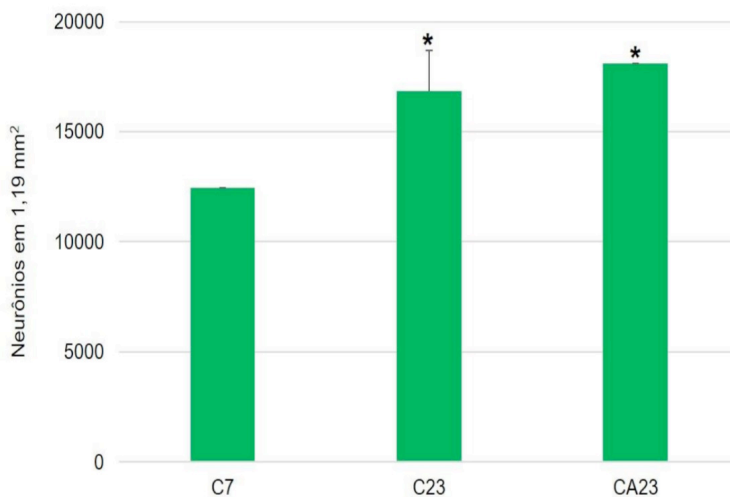


Figura 1 – Densidade de neurônios mioentéricos NADH-d positivos do jejuno de ratos controles de 7 e 23 meses (C7 e C23) e suplementados com extrato aquoso de ABM dos 7 aos 23 meses (CA23). Média  $\pm$  erro padrão (n=5). (\*)  $p < 0,05$  comparado com C7.

A maior quantidade de células nervosas NADH-d evidenciadas aos 23 meses neste estudo está relacionada ao intenso metabolismo mitocondrial, o qual aumentaria a quantidade de agentes oxidantes e a probabilidade de disfunção desta organela, conduzindo os neurônios à morte com o passar do tempo. Disfunção mitocondrial e aumento do estresse oxidativo é um fenômeno encontrado no cérebro de ratos velhos (SA-NAKAMISHI *et al.*, 2014b), podendo resultar em perda progressiva na capacidade celular de produzir ATP, degeneração celular e, eventualmente, morte (FIRENZUOLI *et al.*, 2008).

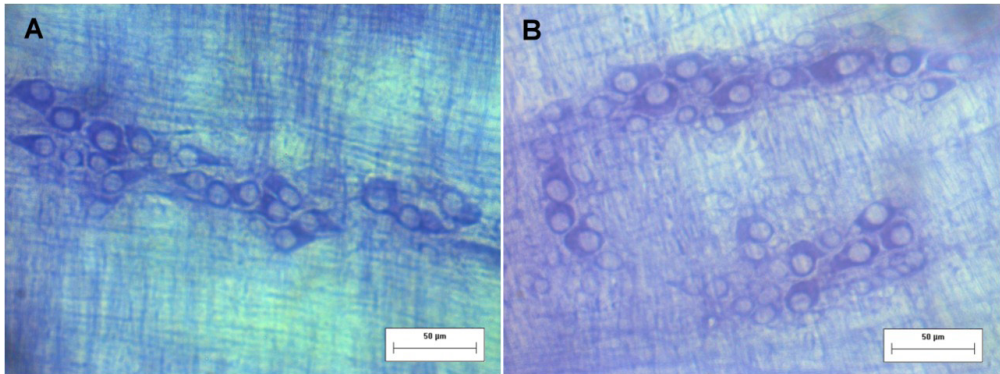


Figura 2 - Fotomicrografias de neurônios do plexo mioentérico evidenciados pelo método histoquímico NADH-d no jejuno de ratos controles com grupo controle de 7 (A) e 23 (B) meses (C7 e C23).

O aumento na densidade de neurônios entéricos no jejuno dos animais dessa pesquisa indica, portanto, dano no sistema nervoso entérico (SOARES *et al.*, 2015; STENKAMP-STRAHM *et al.*, 2015) ocasionado pela elevação de espécies reativas de oxigênio (ERO) mitocondrial (SA-NAKAMISHI *et al.*, 2014b), que resultará em apoptose neuronal a partir dos 24 meses (THARASIVOULOU *et al.*, 2006). Cabe destacar que manutenção na quantidade destes neurônios dos 6 aos 12 meses é verificada no duodeno e colo de ratos Wistar (GAGLIARDO *et al.*, 2008; MARI *et al.*, 2008), todavia, estudo dessa população neuronal entre 12 e 24 meses não são encontrados atualmente. A investigação neste intervalo etário possibilitaria maior entendimento sobre o comportamento e a capacidade plástica dos neurônios mioentéricos NADH-d com o avançar da idade.

Nos animais tratados com ABM (grupo CA23) também se registrou aumento (45,36%) na evidência dos neurônios NADH-d em relação a C7, todavia sem diferir de C23 (Fig. 1). Este resultado demonstra que a suplementação com ABM por 16 meses não foi capaz de alterar os efeitos do envelhecimento sobre o metabolismo neuronal (com intensa atividade mitocondrial), assim aumentando o estresse oxidativo e a possibilidade de morte celular. O extrato aquoso de ABM não se mostrou efetivo na diminuição de ERO e nem capaz de melhorar a capacidade antioxidante total no cérebro de ratos com 23 meses (SA-NAKAMISHI *et al.*, 2014a). Também não elevou a capacidade antioxidante plasmática (SANTI-RAMPAZZO *et al.*, 2015), tampouco diminuiu os níveis de ERO mitocondrial (SA-NAKAMISHI *et al.*, 2014b) e hepática em ratos velhos (SA-NAKAMISHI *et al.*, 2014a). De acordo com Sa-Nakamishi *et al.* (2014a), o longo e constante tratamento com ABM (200 mg/kg/dia) apresenta a tendência de se tornar menos efetivo acima dos 12 meses.

Com relação a análise morfométrica, nenhuma modificação significativa na área do corpo celular, núcleo e citoplasma dos neurônios ocorreu com o envelhecimento e a suplementação com ABM (Fig. 3). Comparando animais com 6 e 24 meses de idade, Santer

e Baker (1988) não encontraram diferença na área média dos neurônios NADH-d positivos do jejuno de ratos Wistar. Manutenção na morfologia neuronal também foi observada no colo de animais entre 6 e 12 meses (GAGLIARDO *et al.*, 2008). De acordo com Romano *et al.* (2010), a partir dos 3 meses, a tendência é de que o tamanho dos neurônios NADH-d no jejuno permaneça constante até o fim da vida do animal. Assim, nossos resultados morfométricos no envelhecimento estão de acordo com a literatura, não havendo efeito do ABM sobre os parâmetros analisados.

Vale ainda destacar que análises quantitativas de populações neuronais realizadas por amostragem da área intestinal (como executada nesta pesquisa), se faz necessário que o tamanho do órgão inervado por estas células seja considerado para correções, já que alterações no comprimento e/ou largura podem ocorrer. Frequentemente no processo de envelhecimento registra-se aumento no tamanho intestinal (JOHNSON *et al.*, 1998; COWEN *et al.*, 2000), o que pode levar a uma falsa redução no número de neurônios mioentéricos por área, já que estas células estariam mais dispersas no tecido (PECK *et al.*, 2009; GAMAGE *et al.*, 2013),

Ressalta-se que neste estudo verificou-se aumento estatisticamente significativo na área do intestino delgado dos grupos C23 e CA23 (66,67% e 48,24%) quando comparados ao grupo C7, com maior densidade de neurônios NADH-d ativos no jejuno de ratos velhos suplementados ou não com ABM (Fig. 4). Este dado corrobora com a hipótese de aumento na atividade metabólica mitocondrial na idade de 23 meses, antecedendo a apoptose neuronal.

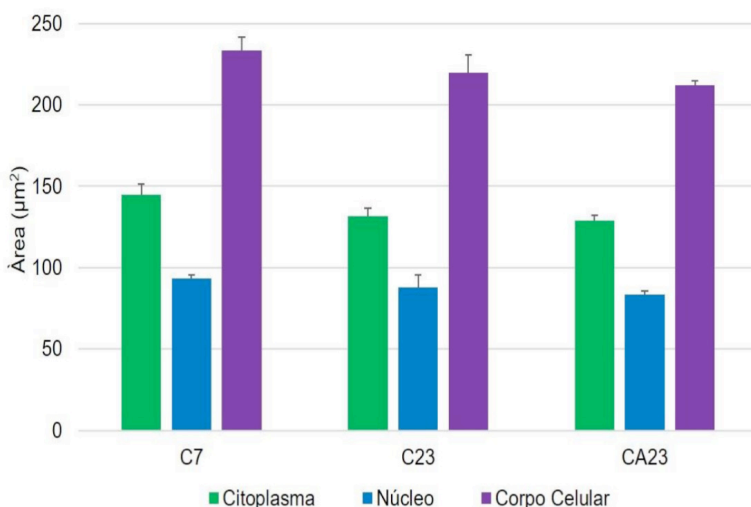


Figura 3 – Área média do corpo celular, núcleo e citoplasma dos neurônios mioentéricos NADH-d positivos do jejuno de ratos controles de 7 e 23 meses (C7 e C23) e suplementados com extrato aquoso de ABM dos 7 aos 23 meses (CA23). Média  $\pm$  erro padrão (n=5). Diferença não significativa ( $p > 0,05$ )

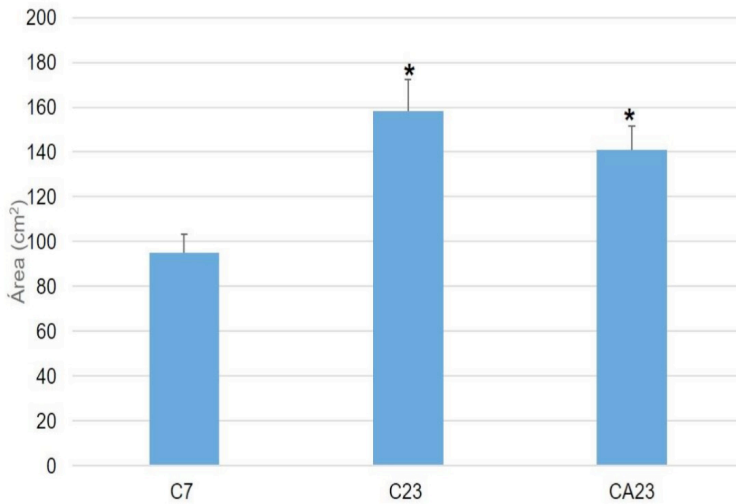


Figura 4 – Área intestinal do jejuno de ratos controles de 7 e 23 meses (C7 e C23) e suplementados com extrato aquoso de ABM dos 7 aos 23 meses (CA23). Média  $\pm$  erro padrão (n=5). (\*)  $p < 0,05$  comparado com C7.

## 4 | CONCLUSÕES

O extrato aquoso de *Agaricus blazei* Murril não protege os neurônios NADH-diaforase positivos do jejuno de ratos Wistar velhos contra o dano nervoso ocasionado pela disfunção e aumento de espécies reativas de oxigênio mitocondrial.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a UEM, a UENP e aos colaboradores do Laboratório de Morfologia Animal e Microscopia da UENP.

## AUXÍLIO FINANCEIRO

Esta pesquisa não recebeu nenhuma bolsa específica de agências de fomento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesses.



## REFERÊNCIAS

- BARBISAN, L.F. *et al.* **Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine.** J. Ethnopharmacol., v. 83, p. 25-32, 2002.
- BERRIDGE, M.V. *et al.* **Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction.** Biotechnol. Annu. Rev., v. 11, p. 127-152, 2005.
- CARVAJAL, A.E.S.S. *et al.* **Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (A. blazei) and their antioxidant properties.** J. Food Sci. Technol., v. 4, p. 493-499, 2012.
- COWEN, T. *et al.* **Restricted diet rescues rat enteric motor neurons from age related cell death.** Gut, v. 47, p. 653-660, 2000.
- FIRENZUOLI, F. *et al.* **The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems.** Evid. Based Complement. Alternat. Med., v. 5, n. 1, p. 3-15, 2008.
- GABELLA, G. **Detection of nerve cells by histochemical technique.** Experientia, v. 25, p. 218-219, 1969.
- GAGLIARDO, C.M. *et al.* **Exercise reduces inhibitory neuroactivity and protects myenteric neurons from age-related neurodegeneration.** Auton. Neurosci., v. 18, n. 1-2, p. 31-37, 2008.
- GAMAGE, P.P.K.M. *et al.* **Myenteric neuron numbers are maintained in aging mouse distal colon.** Neurogastroenterol. Motil., v. 25, n. 7, p. 495-505, 2013.
- HALL, K. E. **Ageing and neural control of the GI tract II. Neural control of the aging gut: can an old dog learn new tricks?** Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., v. 283, p. 827-832, 2002.
- JOHNSON R.J.R. *et al.* **The effects of age on the overall population and on sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine.** J. Anat., v. 283, n. 4, p. 479-488, 1998.
- KORSAK, K. *et al.* **Ageing of enteric neurons: oxidative stress, neurotrophic factors and antioxidant enzymes.** Chem. Cent. J., v. 6, n. 80, p. 1-7, 2012.
- MARI R.B. *et al.* **Effects of exercise on the morphology of the myenteric neurons of the duodenum of Wistar rats during the ageing process.** Anat. Histol. Embryol., v.37, n. 4, p.289-295, 2008.
- NASO, F.C. *et al.* **Effect of *Agaricus blazei* Murill on the pulmonary tissue of animals with streptozotocin-induced diabetes.** Exp. Diabetes. Res., v. 2010, p. 1-8, 2010.
- OLIVEIRA, O.M.M.F. *et al.* **Antioxidant activity of *Agaricus blazei*.** Fitoterapia, v. 78, p. 263-264, 2007.
- PECK, C.J. *et al.* **Fall in density, but not number of myenteric neurons and circular muscle nerve fibres in guinea-pig colon with ageing.** Neurogastroenterol. Motil., v. 21 n. 10, p. 1075-1090, 2009.

- PHILLIPS, R.J., POWLEY, T.L. **As the gut ages: timetables of aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat.** J. Comp. Neurol., v. 434, p. 358-377, 2001.
- ROMANO, E.B. *et al.* **Análise morfológica dos neurônios NADH-diaforase positivos do jejuno de ratos Wistar em diferentes idades.** Rev. Saúde e Pesq., v. 3, n. 1, p. 65-70, 2010.
- SA-NAKAMISHI, A.B. *et al.* **Effects of the continuous administration of an *Agaricus blazei* extract to rats on oxidative parameters of the brain and liver during aging.** Molecules, v. 19, n. 11, p. 18590-18603, 2014a.
- SA-NAKAMISHI, A.B. *et al.* **Effects of treating old rats with an aqueous *Agaricus blazei* extract on oxidative and functional parameters of the brain tissue and brain mitochondria.** Oxid. Med. Cell. Longev., v. 19, p. 1-13, 2014b.
- SANTER R.M, BAKER D.M. **Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats.** J. Auton. Nerv. Syst., v. 25, p. 59-67, 1988.
- SANTI-RAMPAZZO, A.P. *et al.* **Aqueous extract of *Agaricus blazei* Murrill prevents age-related changes in the myenteric plexus of the jejunum in rats.** Evid. Based. Complement. Alternat. Med., v. 2015, p. 1-13, 2015.
- SCHOFFEN, J.P.F. *et al.* **Food restriction enhances oxidative status in aging rats with neuroprotective effects on myenteric neuron populations in the proximal colon.** Exp. Gerontol., v. 51, p. 54-64, 2014.
- SOARES, A. *et al.* **Intestinal and neuronal myenteric adaptations in the small intestine induced by a high-fat diet in mice.** BMC Gastroenterol., v. 22, n. 3, p. 1-9, 2015.
- SOARES, A.A. *et al.* **Antioxidante activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity.** Food. Chem., v. 112, p. 775-781, 2009.
- STENKAMP-STRAHM, C.M. *et al.* **Prolonged high fat diet ingestion, obesity, and type 2 diabetes symptoms correlate with phenotypic plasticity in myenteric neurons and nerve damage in the mouse duodenum.** Cell Tissue Res., v. 361, n. 2, p. 411-426, 2015.
- TAKAKU T. *et al.* **Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murrill and its mechanism of action.** J. Nutr., v. 131, p. 1409-1413, 2001.
- THRASIVOULOU, C. *et al.* **Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons.** Aging Cell, v.5, p. 247-257, 2006.
- WADE, P.R. **Aging and neural control of the GI tract. Age-related changes in the enteric nervous system.** Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., v. 283, p. 489-495, 2002.

## INFLUENCE OF PEQUI OIL IN REORGANIZATION OF GERBIL PROSTATIC COMPARTMENTS AFTER SURGICAL CASTRATION

Data de aceite: 01/03/2021

Submission date: 18/12/2020

### Sergio Marcelino de Oliveira

Institute of Biological and Health Sciences,  
Federal University of Mato Grosso  
Pontal do Araguaia, Mato Grosso  
<https://orcid.org/0000-0002-6314-0882>

### Thayna Alves Tabori

Institute of Biological and Health Sciences,  
Federal University of Mato Grosso  
Pontal do Araguaia, Mato Grosso  
<http://lattes.cnpq.br/7548729817032441>

**ABSTRACT:** Prostate gland can be target of various proliferative lesions that compromise the quality and/or life span of patients. Pequi (*Caryocar brasiliense*) has been reported as a fruit with antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties, and presents a preventive potential against several types of cancer. In order to analyze the influence of pequi oil on normal prostate tissue behavior and under surgical castration, 15 male gerbils, 90 days old, divided into 3 groups (5 animals each) were used: Ca, submitted to bilateral orchiectomy, and sacrificed after 120 days; CaP, bilateral orchiectomysed, and received daily doses of pequi oil (1mL / kg) per gavage for 120 days, when were sacrificed; Co, formed by intact animals. The prostate were collected and processed for morphological, morphometric analyzes and mast cells counting. The data obtained from the stereological analysis

showed a significant decrease in the volume of all prostatic compartments in groups Ca and CaP, when compared to group Co. The administration of pequi oil seems to have attenuated the regression of epithelium and muscle stroma, when compared to the Ca group. Qualitative analysis of stromal collagen fibers revealed a higher amount and density of these fibers in the Ca group when compared to the Co group. In the CaP group there were no visible changes in fiber density and quantity when compared to the Ca group. compared to the Co. group Quantification of intact and degranulated mast cells revealed an increase in the amount of these cells in the prostatic stroma in both the Ca group and the CaP group compared to the Co. group. These results demonstrate that pequi oil appears to promote a modulation of gerbil prostate epithelium-stromal interaction by modifying the components stromal lesions besides regulating the amount of mast cells in the prostate tissue.

**KEYWORDS:** Prostate, anti-inflammatory, anti-proliferative, tissue remodeling.

### INFLUÊNCIA DO ÓLEO DE PEQUI NA REORGANIZAÇÃO DOS COMPARTIMENTOS PROSTÁTICOS DO GERBILO APÓS CASTRAÇÃO CIRÚRGICA

**RESUMO:** A próstata costuma ser alvo de diversas lesões proliferativas que comprometerem a qualidade e/ou a extensão de vida dos seus portadores. O pequi (*Caryocar brasiliense*) tem sido apresentado como um fruto com propriedades antioxidantes e antiproliferativas, e apresenta um potencial

preventivo contra diversos tipos de câncer. Com o objetivo de analisar a influência do óleo de pequi no comportamento tecidual da próstata normal e sob ação da castração cirúrgica foram utilizados 15 gerbilos: Ca, submetidos a orquiectomia e sacrificados após 120 dias; CaP, submetidos a orquiectomia e a doses diárias de óleo de pequi (1mL/kg) via gavagem por 120 dias; Co, animais intactos. A próstata foi coletada para processamento histológico para análises morfológicas, morfométricas e quantificação de mastócitos. Os dados obtidos a partir da análise estereológica evidenciaram uma significativa diminuição no volume de todos os compartimentos prostáticos nos grupos Ca e CaP, quando comparados com o grupo Co. A administração de óleo de pequi parece ter atenuado a regressão do epitélio e do estroma muscular, quando comparado com o grupo Ca. A análise qualitativa das fibras de colágeno do estroma revelou uma maior quantidade e densidade destas fibras no grupo Ca, quando comparado com o grupo Co. Já no grupo CaP não houve modificações visíveis na densidade e quantidade de fibras quando comparadas com o grupo Co. A quantificação de mastócitos intactos e desgranulados revelou um aumento na quantidade destas células no estroma prostático tanto no grupo Ca, quanto no grupo CaP em comparação com o grupo Co. Estes resultados demonstram que o óleo de pequi parece promover uma modulação da interação epitélio-estroma da próstata do gerbilo através da modificação dos componentes estromais além de regular a quantidade de mastócitos no tecido prostático.

**PALAVRAS-CHAVE:** Próstata, anti-inflamatório, anti-proliferativo, remodelação tecidual.

## 1 | INTRODUCTION

Growth and maturation of the prostate is highly dependent on the testosterone produced by the testicles (MARKER et al., 2003; BENTVELSEN et al., 1995; RUSSELL e WILSON, 1994).

The development and maintenance of this gland can be controlled by suppressing these androgens, using bilateral orchietomy, which consists of surgical removal of the testicles, promoting an immediate decrease in the absolute volume of the prostatic compartments, and loss of epithelial cell secretory activities (CAMPOS, et al., 2011; GÓES et al., 2007; OLIVEIRA, 2007; VILAMAIOR, et al., 2005; FOCHI 2013).

Castration causes intense surgical trauma, which activates the inflammatory response, being a complex biological process, promoting the interaction between numerous inflammatory, hormonal, metabolic and immunological mediators, which aims to minimize tissue damage, assist in the healing process and in homeostasis (BUSK et al., 2010; FILIPPO et al., 2016; GIANNOUDIS, 2003; MEDZHITOV, 2008;).

In this context, the mast cell is an immune system cell, which releases its cytoplasmic granules containing important chemical mediators for the defense of the organism such as the growth factor, cytokines, histamines, participating in the process of tumor angiogenesis, tissue repair and remodeling (KRYSTEL-WHITTEMORE, et al., 2016; MOON et al., 2010; PASTWIŃSKA et al., 2017; SILVA et al., 2014). However, any interruption or imbalance in the inflammation process may result in its prolongation, leading to drastic damage to the

organ (AYDIN et al., 2002; MEINEKE et al., 2000; YAMANAKA et al., 2000). These cells are distributed in various mammalian tissues, close to blood vessels, nerves, smooth muscle epithelium, connective tissue, respiratory and gastrointestinal tracts. In the prostate, mast cells are found in the stroma/connective tissue, acting on blood vessels dilation, activation of fibroblast to produce collagen and inducing the proliferation of epithelial cells and smooth muscle cells (DAMAZO et al., 2004; METCALFE e BOYCE, 2006; NOVIANA et al., 2004; YAMANAKA et al., 2000).

Intake of antioxidant fruits has been pointed out, in epidemiological studies, with the lowest risk of developing chronic diseases such as cancer (Diplock, 1994; Yang & Xiau, 2013; Sun *et al.*, 2013; Silberstein *et al.*, 2013; Fragoso *et al.*, 2012). In this way, the antioxidant properties of the fruits of the Caryocaraceae family have been the subject of important studies (Ribeiro, 2000). Pequi oil (*Caryocar brasiliense*) is very promising as a herbal medicine due to its anti-proliferative and anti-inflammatory actions, but it is necessary to investigate the action of its components, both in the normal prostate tissue and during the tissue remodeling process. The evaluation of the influence of the pequi oil ingestion on the drastic changes in prostatic histoarchitecture after surgical castration can bring important information for the understanding of its action in the maintenance and recovery of tissue homeostasis. Thus, the aim of this project was to analyze the behavior of prostatic compartments due tissue regression promoted by surgical castration, with or without oral intake of pequi oil.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Experimental animals

Adults male Gerbils (*Meriones unguiculatus*) were housed in the experimental animal maintenance room of the UFMT Araguaia Campus, under standard conventional conditions (25°C, 40% – 70% relative humidity, 12 hr light/12 hr dark) and allowed access to chow and water *ad libitum*.

### 2.2 Pequi oil

The pequi was obtained from local producers in Barra do Garças / MT (Brazil). The internal mesocarp was cut to obtain the pulp, which was packaged and frozen. The oil from the pequi pulp was extracted in a soxlet using exane as solvent. The extract was subjected to evaporation under vacuum pressure to complete removal of the solvent, being subsequently aliquoted and frozen (adapted from Miranda-Vilela *et al.*, 2009 and Miranda-Vilela *et al.*, 2008).

## 2.3 Experimental design

Adults male Gerbil were divided in following groups (n=03): Ca, surgically castrated; CaP, surgically castrated and received pequi oil (1 mL/Kg) by gavage for 4 months (adapted by Miranda-Vilela et al., 2009 e Miranda-Vilela et al., 2008); Co, intact animals. After euthanasia prostate gland were processed for histological analysis. Sections (5  $\mu$ m) were stained with Haematoxylin & Eosin, for morphometrical and stereological analysis, and with toluidine blue, for MCs quantification.

Animals received intramuscular administration of ketamine hydrochloride (Dopalen – 90 mg/kg) and Xylazine hydrochloride (Rompun – 10 mg/kg), for blood collection (5 mL). Then the euthanasia was made by overdose of same anesthetic described. After necropsy, the prostates were fragmented and immersed in fixative for 24 hours. Animal handling and experiments were done according to the ethical guidelines of Federal University of Mato Grosso, following the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Protocol 23108.209569/2017-92-CEUA-UFMT).

## 2.4 Statistical

The ANOVA and Tukey HSDs test were employed to compare differences in prostatic complex absolute weight, morfometrical-stereological and in quantification data. Than  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3 | RESULTS AND DISCUSSION

After 120 days there was an intense reduction in prostatic weight in the Ca and CaP groups (0.03g and 0.03g, respectively), when compared to the Co group (0.17g). The decrease in circulating T, caused by orchietomy, promoted a morphological regression in the prostatic compartments, with a thin epithelium in the prostatic acini (Fig. 1).

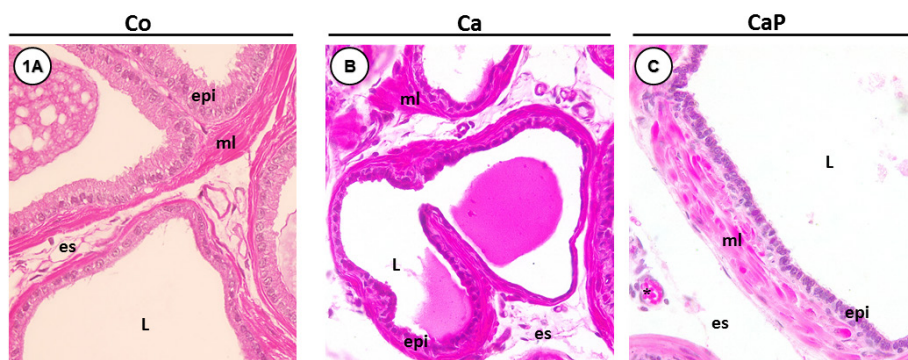


Figure 1: Photomicrographs of the prostatic compartments of animals from Co [A], Ca [B] and CaP [C] groups. L: lumen; epi: epithelium; es: stroma; \* blood vessel; ml: smooth muscle. Staining: Hematoxylin-Eosin. Magnification 400X.

In addition, the morphometric analysis (Fig. 2) showed a significant decrease in the epithelial height in the prostate of animals in the Ca and CaP group, when compared to the Co group, being more intense in the CaP group, because the experimental depletion of androgens (by orchiectomy ) caused an atrophy of the prostate, due to the decrease in prostatic blood flow, stopped in the synthesis and release of luminal secretion, consequently causing a decrease in the height and number of epithelial cells by apoptosis processes, resulting in reduced acini with low epithelial cells (BRANDES, 1966). Justulin et al. (2006) reported that all these changes are reversed by the administration of T, thus proving their role in the prostate tissue.

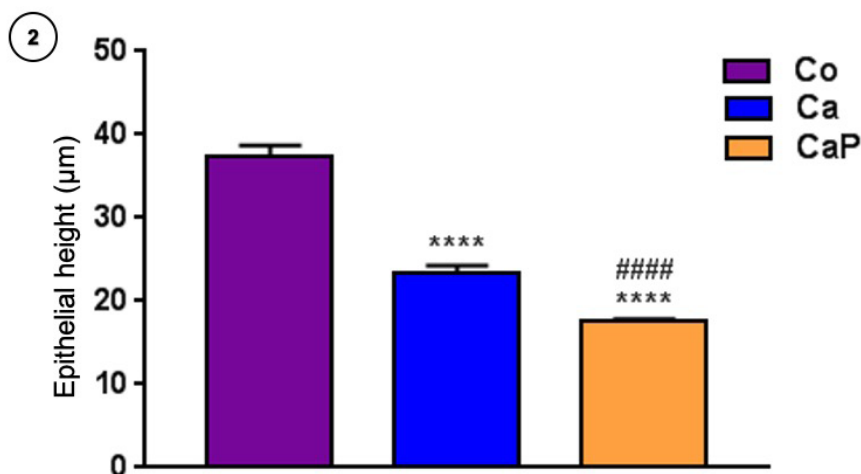


Figure 2: Morphometric analysis of the prostatic epithelium of the Co, Ca and CaP groups. Results showed as average  $\pm$  S.E.M. of 5 animals/ group. \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$  versus Co, ####  $p \leq 0.0001$  versus Ca.

The stereological analysis (Fig. 3) showed a lower volume of the epithelium, the muscular and non-muscular stroma, and the lumen of the Ca and CaP groups compared to the Co. group. Pequi oil administration, after castration, seems to have intensified the decrease in the volume of non-muscular stroma and epithelium. But in contrast, there was less regression of the muscular stroma and the lumen in the groups treated with pequi oil, when compared with the Ca.

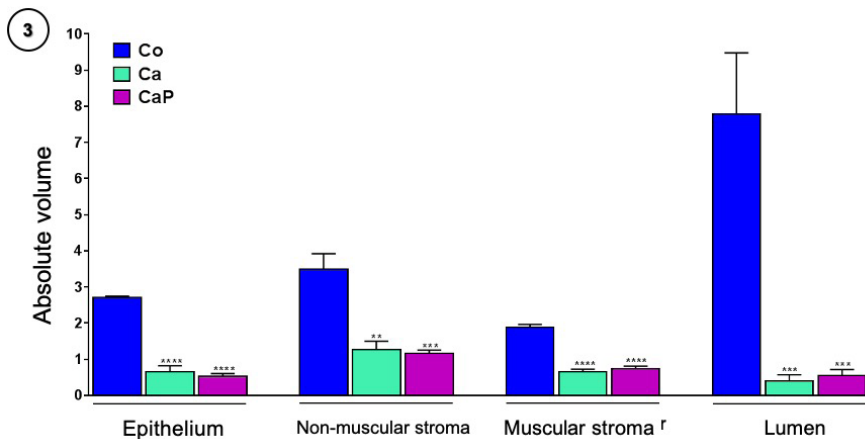


Figure 3: Stereological analysis of the prostatic compartments of the Co, Ca and CaP groups. Results shown as average  $\pm$  S.E.M. de 5 animals/group. \*\*  $p \leq 0.01$  versus Co; \*\*\*  $p \leq 0.001$  versus Co; \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$  versus Co.

Quantification of mast cells (Fig. 4 and 5) revealed a significant increase in the number of these cells in the prostatic stroma both in the Ca group (Fig. 4B) and in the CaP group (Fig. 4C) compared to the Co (Fig. 4A), due to the activation of the inflammatory process in response to extremely aggressive tissue modulation caused in the prostate gland as a result of surgical castration.

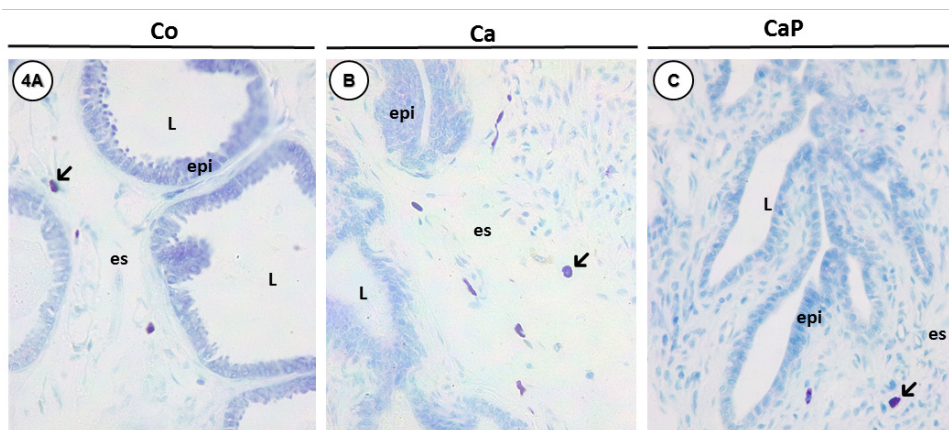


Figure 4: Photomicrographs of prostatic compartments from animals of Co (A), Ca (B) and CaP (C) groups. L: lumen; epi: epithelium; es: stroma; arrow: mast cell. Staining: Toluidine Blue. Magnification 400X.



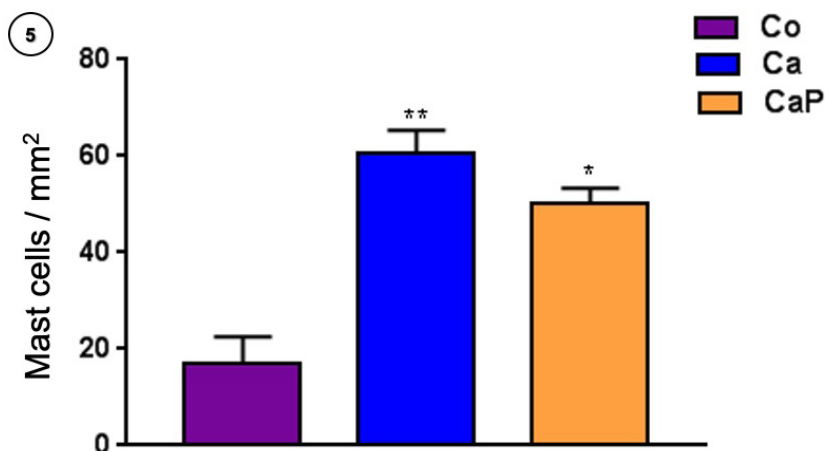


Figure 5: Quantification of mast cells in the prostatic stroma of the Co, Ca and CaP groups. Results shown as mean  $\pm$  S.E.M. of 5 animals/group. \*  $p \leq 0.05$  versus Co ; \*\*  $p \leq 0.01$  versus Co.

Administration of pequi oil after castration seems to promote a regulation of the amount of mast cells in the prostate tissue, which was significantly lower in the CaP group when compared to the Ca group, corroborating the study by Diniz (2015), that showed the anti-inflammatory effect of this fruit. Tissue repair after castration involves a series of biochemical, cellular and pathophysiological processes, which may have been accelerated by the bioactive substances present in the pequi (de LIMA, et al., 2007; de OLIVEIRA & NUNES-PINHEIRO, 2013).

All these results demonstrate that pequi oil is able to change the behavior of the epithelium during the tissue reorganization process triggered by surgical castration, promoting a modulation of the epithelium-stroma interaction, in addition to acting as a regulator of the inflammatory process by reducing the amount of mast cells in the prostate after castration, indicating the therapeutic potential of this promising herbal medicine native to the Brazilian Cerrado.

## REFERENCES

Aydin O, et al., 2002. **Immunohistological analysis of mast cells numbers in the intratumoral and peritumoral regions of prostate carcinoma compared to benign prostatic hyperplasia.** *Pathol Res Pract.* 198, (4) 267-271.

Behmer OA, Tolosa EMC & Neto AGF. 1976. **Manual de práticas para histologia normal e patológica.** EDART-EDUSP, SP.329p.

Bentvelsen FM, et al., 1995. **Developmental pattern and regulation by androgens of androgen receptor expression in the urogenital tract of the rat.** *Mol Cell Endocrinol.* 113, (2) 245-253.

- Busk P, Jacobsen S, Martinussen T, 2010. **Administration of perioperative penicillin reduces postoperative serum amyloid A response in horses being castrated standing.** *Veterinary Surgery*. 39, (5), 638-643.
- Brandes, D, 1966. **The Fine Structure and Histochemistry of Prostatic Glands in Relation to Sex Hormones.** *International Review of Cytology*. 20 (C): 207–276.
- Campos SGP, et al., 2011. **Prostatic stromal cells of old gerbils respond to steroidal blockades creating a microenvironment similar to reactive stroma.** *Cell Biology International*. 1 (2) 97-106.
- Corradi LS, Goes RM, Carvalho HF, Taboga SR, 2004. **Inhibition of 5-alpha reductase activity induces stromal remodeling and smooth muscle dedifferentiation in adult gerbil ventral prostate.** *Differentiation*. 72: 198-208.
- Cunha GR, et al., 1987. **The endocrinology and developmental biology of the prostate.** *Endocr.* 8,(3) 338-362.
- Damazo AS, et al, 2004. **Analysis of the annexin 1 expression in rat trachea.** *Annexins*. 1 (1)1–7.
- De Lima, A. et al., 2007. **Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.).** *Revista Brasileira de Fruticultura*. 29 (3) 695–698.
- De Oliveira MLM, Nunes-Pinheiro DCS, 2013. **Cellular and molecular biomarkers involved in immune-inflammatory response modulated by unsaturated fatty acids.** *Acta Veterinaria Brasilica*. 7 (2) 113–124.
- Diniz DM. **Atividade anti-inflamatória de microemulsão contendo óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* W.).** 2015. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, 2015.
- Diplock AT, 1994. **Antioxidants and disease prevention.** *Mol Aspects Med* 15: 293-376, doi: 10.1016/0098-2997 (94)90005-1.
- Filippo PD, et al., 2016. **Efeitos da castração sobre características físico-químicas e celulares do líquido peritoneal de equinos.** *Vet. Not.* 22 (2) 24-32.
- Fonchi RA, 2013. **Progesterone influence on gergil prostate (*meriones unguiculatus*): interactions with estrogen and testosterone.** 165f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - universidade estadual de campinas instituto de biologia, Campinas, São Paulo. 2013.
- Fragoso MF, Prado MG, Barbosa L, Rocha NS, Barbisan LF, 2012. **Inhibition of mouse urinary bladder carcinogenesis by acai fruit (*Euterpe oleraceae* Martius) intake.** *Plant Foods Hum Nutr*; 67: 235-241, doi: 10.1007/s11130-012-0308.
- Giannoudis PV, 2003. **Current concepts of the inflammatory response after major trauma.** *Injury Journal*. 34, (6) 397-404.
- Góes RM, et al., 2007. **Surgical and chemical castration induce differential histological response in prostate lobes of Mongolian gerbil.** *Elsevier*. São Paulo. 38, (3) 231-236.

Justulin LA, et al., 2006. **Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement.** Cell Biology International. 30 (4), 354–364.

Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG, 2016. **Mast cell: a multi-functional master cell.** Front Immunol. 6, ( 620), 1-12.

Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR, 2003. **Hormonal, cellular, and molecular control prostatic development.** Dev Biol 253:165-174.

Medzhitov R, 2008. **Origin and physiological roles of inflammation.** Nature. 454, (428), 428-435.

Meineke V, et al., 2000. **Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testis of infertile men.** Fertil Steril. 74, (2) 239-244.

Metcalfe DD, Boyce JA, 2006. **Mast cell biology in evolution.** J. Allergy Clin. Immunol. 117 (6) 1227-1229.

Miranda-Vilela AL, Resck IS & Grisolia CK, 2008. **Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense Camb.*) pulp.** Genetics and Molecular Biology, 31, 4, 956-963.

Miranda-Vilela AL, Akimoto AK, Alves PCZ, Pereira LCS, Gonçalves CA, Klautau-Guimarães MN & Grisolia CK, 2009. **Dietary carotenoid-rich pequi oil reduces plasma lipid peroxidation and DNA damage in runners and evidence for an association with MnSOD genetic variant -Val9Ala.** Genetics and Molecular Research 8 (4): 1481-1495.

Moon TC, et al., 2010. **Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function.** Mucosal Immunol. 3 (2)111-128.

Noviana D, et al., 2004. **Distribution, histochemical, and enzyme histochemical characterization of mast cell in dogs.** J Mol Histol. 35, (2) 123-132.

Pastwińska J, Agier J, Dastyh J, Brzezińska-Błaszczuk E, 2017. Mast cells as the strength of the inflammatory process. Pol J Pathol. 68, (3) 187-196.

Ribeiro RF, 2000. **Pequi: o rei do cerrado.** Belo Horizonte: Rede Cerrado; 62p.

Russell DW, Wilson JD, 1994. **Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes.** Annu Rev Biochem. 63, 25-61.

Silberstein T, Silberstein E, Saphier O, 2013. **Lycopene and tomatoes – their effect on prevention of prostatic cancer.** Harefuah; 152: 461-463, 499.

Silva EZ, Jamur MC, Oliver C, 2014. **Mast cell function: a new vision of an old cell.** J Histochem Cytochem. 62, (10) 698-738.

Sun C, Huang H, Xu C, Li X, Chen K, 2013. **Biological activities of extracts from Chinese bayberry (*Myrica rubra Sieb. et Zucc.*): a review.** Plant Foods Hum Nutr; 68: 97- 106, doi: 10.1007/s11130-013-0349.

Vilamaior PSL, Taboga SR, Carvalho HF, 2005. **Modulation of smooth muscle cell function: Morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration.** Cell Biology International. 29, (9) 809-816.

Yang J, Xiao YY, 2013. **Grape phytochemicals and associated health benefits.** Crit Rev Food Sci Nutr; 53: 1202-1225.

Yamanaka K, et al., 2000. **Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility.** Hum Reprod. 15, (7) 1543-1547.

# CAPÍTULO 7

## MONITORIA: ESTRATÉGIA PARA SUPERAR DESAFIOS DA DISCIPLINA DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA EM UMA UNIVERSIDADE INTERNACIONAL

Data de aceite: 01/03/2021

Data de submissão: 28/12/2020

**Juliana Jales de Hollanda Celestino**

Universidade da Integração Internacional da  
Lusofonia Afro-Brasileira

Redenção – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/1526422544963342>

**Letícia Pereira Felipe**

Universidade da Integração Internacional da  
Lusofonia Afro-Brasileira

Redenção – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/8295158569704531>

**Davide Carlos Joaquim**

Universidade Federal do Ceará

Fortaleza – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/9966732655461768>

**Nicásio Urinque Mendes**

Universidade da Integração Internacional da  
Lusofonia Afro-Brasileira

Redenção – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/0389042458734544>

**Virgínia Cláudia Carneiro Girão-Carmona**

Universidade Federal do Ceará

Fortaleza – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/5491102217675347>

**Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha**

Universidade da Integração Internacional da  
Lusofonia Afro-Brasileira

Redenção – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/4060982214181976>

**Ana Caroline Rocha de Melo Leite**

Universidade da Integração Internacional da  
Lusofonia Afro-Brasileira

Redenção – Ceará

<http://lattes.cnpq.br/1433681003429411>

**RESUMO:** Como estratégia pedagógica no ensino superior, a monitoria acadêmica constitui instrumento importante de interação e compartilhamento de experiências entre discentes, por meio do ensino dinâmico e interativo. No contexto da Histologia, componente curricular relevante entre os cursos de graduação da área da saúde, a monitoria colabora significativamente com o ensino dessa disciplina, como uma estratégia metodológica alternativa capaz de promover o interesse dos discentes e facilitar a aprendizagem. O trabalho objetivou relatar a experiência da monitora do Programa de Monitoria Acadêmica de uma universidade brasileira federal de cunho internacional sobre as dificuldades vivenciadas por discentes que cursam a disciplina de Histologia e Embriologia Humana e a contribuição da monitoria para a sua superação e desenvolvimento do acadêmico-monitor. Trata-se de relato de experiência conduzido pela monitora da disciplina de Histologia e Embriologia Humana com estudantes brasileiros e estrangeiros do Curso de Enfermagem da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, no período de julho de 2018 a abril de 2019. Para as atividades de monitoria, foram utilizados recursos metodológicos, como *google forms*, *google docs*, roteiros de aula prática,

lâminas histológicas e modelos embriológicos. Foi perceptível a consolidação do apoio pedagógico proporcionado pela monitoria, particularmente pelas atitudes positivas, retorno favorável e relatos dos discentes. Quanto aos estudantes estrangeiros, esses buscaram a monitoria com maior frequência, a qual foi significativamente marcada pelo esclarecimento de dúvidas. As atividades de monitoria tornaram o estudante mais confiante em falar e manifestar suas perspectivas, bem como fortaleceram o conhecimento obtido em sala de aula e proporcionaram a busca da monitora quanto a assuntos paralelos à disciplina, incluindo interesse em atividades de pesquisa. Para essa última, a monitoria permitiu o aprofundamento do estudo teórico e prático, o exercício da responsabilidade e liderança e uma formação pessoal, ética e moral mais consciente.

**PALAVRAS-CHAVE:** Histologia, Universidade, Ensino, Aprendizagem, Educação em Enfermagem.

## MONITORING: STRATEGY TO OVERCOME CHALLENGES IN THE HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY DISCIPLINE IN AN INTERNATIONAL UNIVERSITY

**ABSTRACT:** As a pedagogical strategy in higher education, academic monitoring is an essential instrument for interaction and sharing experiences among students through dynamic and interactive teaching. In the context of Histology, a relevant curricular component among undergraduate courses in the health area, monitoring significantly collaborates with the teaching of this discipline as an alternative methodological strategy capable of promoting students' interest and facilitating learning. The work aimed to report the experience of the monitor of the Academic Monitoring Program of a Brazilian federal university of an international nature about the difficulties experienced by students who study the discipline of Human Histology and Embryology and the contribution of monitoring to their overcoming and academic development- monitor. This is an experience report conducted by the monitor of Human Histology and Embryology with Brazilian and international students of the Nursing Course at the University of International Integration of Afro-Brazilian Lusophony, from July 2018 to April 2019. For the monitoring activities, methodological resources were used, such as Google forms, google docs, practical class scripts, histological slides, and embryological models. The consolidation of the monitoring's pedagogical support was noticeable, mainly due to the positive attitudes, favorable feedback, and reports from the students. As for international students, they sought monitoring more frequently, which was significantly marked by the clarification of doubts. The monitoring activities made the student more confident in speaking and expressing his / her perspectives, strengthening the knowledge obtained in the classroom, and providing the monitor's search for subjects parallel to the discipline, including interest in research activities. For the latter, the monitoring allowed the deepening of the theoretical and practical study, the exercise of responsibility and leadership, and a more conscious personal, ethical, and moral training.

**KEYWORDS:** Histology, University, Teaching, Learning, Nursing Education.

## 1 | INTRODUÇÃO

No âmbito do ensino superior no Brasil, a Lei nº 5.540, de 28 de novembro de 1968, estabeleceu normas de organização e funcionamento do ensino superior e sua articulação

com a escola média. Nesse contexto, reconheceu-se a potencialidade pedagógica da monitoria acadêmica, por meio do incentivo ao aperfeiçoamento didático, nas instituições de ensino superior (BRASIL, 1968).

Nessa perspectiva, a monitoria acadêmica, tida como uma proposta criativa de apoio pedagógico (GURGEL et al, 2017), surge como um importante instrumento na formação e construção de uma educação mais dinâmica e justa perante os anseios e possibilidades de ensino (MAGALHÃES et al, 2013). Quanto a sua base, ela está fundamentada na interação e compartilhamento de experiências entre os discentes. Para esses, o monitor representa aquele indivíduo em que se tem a liberdade de esclarecer as dúvidas e apoio emocional diante dos desafios vivenciados nas disciplinas (SANTOS et al, 2020).

De acordo com a Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional nº 9.394, de 20 de dezembro de 1996, entre outras atribuições, o monitor deve estar nas aulas ministradas pelo docente orientador, ajudá-lo nas atividades programadas para a disciplina, planejar, organizar e implementar grupos de estudos e aprofundar o conhecimento por meio de leituras e pesquisas complementares (BRASIL, 1996). Dessa forma, o papel do monitor não se restringe ao esclarecimento de dúvidas, devendo elaborar e implementar métodos eficientes e eficazes que auxiliem o processo de metacognição do monitorado (FERNANDES et al, 2015).

A monitoria estimula o estabelecimento de práticas inovadoras e vivências pedagógicas que visam a consolidação da teoria e prática. Para além disto, a monitoria oferece a possibilidade do estudante de se envolver na pesquisa e extensão (SILVA et al, 2020), importantes pilares da Universidade, bem como propiciar um auxílio mútuo entre estudante e professor. Particularmente, para Silva et al. (2020) e Ferreira et al. (2020), ela objetiva estimular a prática docente e experienciar situações-problemas que o monitor se deparará no mercado de trabalho.

No contexto da Histologia, um componente curricular relevante entre os cursos de graduação da área da saúde, a monitoria tem colaborado significativamente com o ensino dessa disciplina, como uma metodologia alternativa capaz de promover o interesse dos discentes e facilitar a aprendizagem (SANTOS et al, 2020).

Pelo elevado volume de conteúdo e nível de dificuldade, a monitoria em Histologia é um importante instrumento de apoio ao professor e fortalecimento da aprendizagem do estudante, com relação aos conteúdos ministrados em sala de aula, especialmente para aqueles que apresentam deficiência de compreensão do assunto durante a aula ministrada pelo docente (SANTOS et al, 2020).

Esse trabalho teve como objetivo relatar a experiência da monitora do Programa de Monitoria Acadêmica de uma universidade brasileira federal de cunho internacional sobre as dificuldades vivenciadas por discentes que cursam a disciplina de Histologia e Embriologia Humana e a contribuição da monitoria para a sua superação e desenvolvimento do acadêmico-monitor.

## **2 | MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Tipo de Estudo**

Este estudo é um relato de experiência, de natureza descritiva, que visa registrar as observações e impressões de uma estudante bolsista de monitoria de uma disciplina básica do Curso de Enfermagem.

### **2.2 Local do Estudo**

A experiência teve como cenário o Programa de Monitoria Acadêmica (PMA) da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), uma universidade federal brasileira de cunho internacional localizada nos estados do Ceará (municípios de Redenção e Acarape) e Bahia (município de São Francisco do Conde). A monitoria foi conduzida no Campus das Auroras, situado em Redenção, com discentes da disciplina de Histologia e Embriologia Humana do Curso de Enfermagem, uma disciplina básica dos cursos da área da saúde.

Na instituição supracitada, a disciplina é ofertada no segundo semestre do curso de bacharelado em Enfermagem, na modalidade presencial, com a carga horária de 120 horas, sendo distribuídas em aulas teóricas (80 horas) e práticas (40 horas). Aborda a caracterização, aprofundamento e identificação microscópica dos tecidos epitelial, conjuntivo, muscular e nervoso, órgãos e sistemas do corpo humano. A disciplina contempla ainda o desenvolvimento embrionário até a 8ª semana e anexos embrionários.

### **2.3 Período de Realização da Experiência**

A monitoria em Histologia e Embriologia Humana do Curso de Enfermagem da UNILAB foi realizada no período de julho de 2018 a abril de 2019.

### **2.4 Sujeitos Envolvidos na Experiência**

Os sujeitos envolvidos na experiência foram os 75 discentes do segundo semestre do curso de graduação em Enfermagem da UNILAB, matriculados na disciplina de Histologia e Embriologia Humana, no período de julho de 2018 a abril de 2019. Participaram ainda a estudante monitora e o corpo docente da disciplina, constituído por duas professoras. Para esse estudo, não foram aplicados critérios de exclusão.

### **2.5 Descrição da Experiência**

As atividades de monitoria foram elaboradas e desenvolvidas em conjunto com o corpo docente e colaboração dos discentes brasileiros e estrangeiros matriculados na disciplina. O planejamento das ações foi contínuo e flexível, tendo em vista a necessidade de apoio pedagógico pelo aumento de demanda da disciplina e grau de complexidade dos conteúdos abordados a cada semana.

Os recursos utilizados no desenvolvimento das atividades de monitoria foram distintos, considerando o caráter teórico-prático da disciplina. A abordagem da teoria foi



realizada por meio de métodos audiovisuais, representados pelo projetor multimídia e lousa branca. Os encontros referentes aos conteúdos teóricos foram realizados em sala de aula, semanalmente, no horário livre da monitora e discentes matriculados na disciplina.

Para a abordagem teórica, foram utilizados recursos autorregulatórios, constituídos por aplicativos de administração de pesquisa, como o *google forms*, e conteúdo, como o *google docs*. Foram empregados ainda materiais elaborados previamente pela monitora e corpo docente, como roteiros de aula, glossários e simulados de questões referentes aos assuntos abordados na disciplina.

Em relação à abordagem do conteúdo prático, ela ocorreu no laboratório de microscopia da UNILAB, semanalmente, na presença da monitora e discentes, em horários previamente definidos. Nesses encontros, a monitora revisava o assunto já abordado na aula prática e esclarecia as dúvidas dos discentes. Roteiros de aula prática, contendo a descrição de estruturas histológicas a serem observadas em cada lâmina, constituíram uma estratégia de ensino no aspecto prático da disciplina.

Em relação ao estudo de Embriologia, modelos embriológicos adquiridos e disponibilizados pela UNILAB, que retratavam a progressão do desenvolvimento embrionário, desde a fecundação até a 8ª semana, foram utilizados como recurso didático. Os modelos de anexos embrionários, também disponibilizados pela instituição de ensino, foram usados para auxílio da teoria, para, como recurso visual e tátil, facilitar a aproximação do discente ao conteúdo.

Cabe salientar que as atividades de monitoria foram fortemente embasadas nas necessidades e limitações dos discentes e observação de suas potencialidades, a fim de garantir o melhor rendimento e aproveitamento acadêmico quanto à disciplina.

## 2.6 Aspectos Éticos

Por se tratar de um relato de experiência, não houve a necessidade de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Entretanto, foi garantida a confidencialidade das conversas particulares dos discentes com a monitora, assim como foram asseguradas a privacidade e proteção da imagem dos estudantes e corpo docente.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo do desenvolvimento da atividade de monitoria acadêmica, foi implementado o apoio pedagógico aos discentes com relação ao conteúdo programático da disciplina, tanto no âmbito da teoria quanto da prática. Nesse contexto, foi perceptível a consolidação desse suporte, particularmente pelas atitudes positivas, retorno favorável e relatos dos discentes sobre o impacto significativo do PMA no processo de ensino-aprendizagem.

Sabe-se que existem muitos obstáculos que podem influenciar negativamente o processo de ensino-aprendizagem. Dentre eles, podem-se citar as discrepâncias metodológicas que, aliadas a um planejamento baseado na heterogeneidade do público-alvo,

podem desencadear aversões importantes entre os estudantes. Consequentemente, esses podem apresentar um bloqueio da aprendizagem, impactando gradual e negativamente na sua formação acadêmica e profissional (DONILDA; SANTANA, 2019).

Associado a esse fato, muitas vezes, o modelo educativo vigente, caracterizado pela exclusão e sobreposição de elementos, desvaloriza a capacidade de aprendizagem do discente, trazendo à tona relações hierárquicas e se contrapondo a princípios básicos da pedagogia (DONILDA; SANTANA, 2019).

Nessa perspectiva, Freire (1987) salienta que a relação entre educador e educando deve ser entendida em um contexto dinâmico, no qual a educação não deve ser forjada para o educando, mas construída por ele. Esse processo de construção deve se basear em estratégias que garantam a formação da identidade do estudante no ambiente de aprendizagem. Assim, será possível a transformação educacional, bem como a garantia da consolidação de meios de aprendizagem individuais e subjetivos.

Considerando que a universidade em questão se trata de uma instituição de cunho internacional, as dificuldades apresentadas pelos discentes estrangeiros que cursavam a disciplina se tornaram mais aparentes com o avanço do semestre. Especificamente, a incompreensão por parte desses estudantes de terminologias mencionadas durante as aulas, em decorrência da adaptação linguística, progrediu como um obstáculo real no processo de aprendizagem. Como consequência, os discentes estrangeiros buscaram a monitoria com maior frequência, a qual foi significativamente marcada pelo esclarecimento de dúvidas.

Somado a essa realidade, a disciplina, por envolver estruturas não visíveis a olho nu e, portanto, necessitando do uso de microscópio nas aulas práticas, pode induzir à saturação da visão, constituindo mais um obstáculo à aprendizagem.

Particularmente, nesse sentido, foi evidente a dificuldade de aprendizagem apresentada pelos discentes em relação à visualização e interpretação de lâminas, contendo cortes histológicos, durante as aulas práticas. Contudo, o emprego dessas técnicas nesse tipo de aula faz-se necessário para a consolidação do conteúdo teórico, além de tornar o ensino e aprendizagem sistemas mais dinâmicos, atrativos e eficientes (SANTOS, 2019).

É possível que a dificuldade acima referida tenha colaborado com a insegurança observada entre os discentes, especialmente no período que antecedia as provas práticas da disciplina. Algumas dessas foram marcadas pelo reduzido rendimento acadêmico, o que pode ter decorrido, não apenas da dificuldade de aprendizagem e insegurança em relação ao conteúdo, mas do considerável nível de estresse dos estudantes.

Entretanto, deve-se deixar claro que, além dos fatores acima mencionados, outros elementos podem ter contribuído para o resultado inadequado dos discentes nas provas práticas. Dentre eles, deve-se citar a possibilidade de alguns estudantes negligenciarem o apoio oferecido pelo monitor, por diferentes motivos (MESQUITA et al., 2019), comprometendo o seu rendimento na disciplina.

Diante dessa realidade, a monitoria acadêmica surge como uma estratégia que, dentre outras atribuições, propicia a socialização por meio da criação de ambientes de ensino simplificados. Associado a essa competência, a monitoria pode colaborar com o enfrentamento dos desafios do estudante diante da aprendizagem por esse considerar a didática do monitor relevante na aquisição do conhecimento e por ser o monitor um discente como ele (SALES; OLIVEIRA, 2018).

No decorrer do PMA, métodos foram adotados para um ambiente de aprendizado significativo, que propiciasse maior autonomia e interação entre os discentes. Dentre esses recursos, as gincanas em sala de aula se destacaram pela participação dos discentes ao proporem respostas diante do grupo às questões referentes ao conteúdo abordado na disciplina. Essa atividade tornou o estudante mais confiante em falar e manifestar suas perspectivas, além de ser ocasionalmente mencionada como uma experiência positiva para o fortalecimento do conhecimento obtido em sala de aula. Assim, considera-se que, momentos como esse, trouxeram mais solidez à ideia de empoderamento prevista pelo PMA.

Além das gincanas, sobressaíram-se os plantões de retirada de dúvidas. Esses eram realizados principalmente no período de provas, momento em que os questionamentos aumentavam significativamente. A atitude adotada pela monitora ressalta o fato de que o trabalho em grupo pode, além de despertar a curiosidade e entusiasmo, permitir o compartilhamento de saberes entre os estudantes. Conforme revisão integrativa de Botelho et al. (2019), esse compartilhamento pode ser uma estratégia importante na superação de fragmentos no ensino universitário, por meio da autorregulação da aprendizagem. Consequentemente, tem-se uma formação mais autônoma e diferenciada perante o ensino tradicional.

A atividade de monitoria foi marcada também pela busca por parte dos discentes do aconselhamento pela monitora com relação a assuntos paralelos à disciplina, como, por exemplo, horários propícios para o estudo nos laboratórios de microscopia e interesses em atividades de pesquisa. Assim, considera-se que essas atitudes favoreceram o processo de aprendizagem, uma vez que vínculos foram criados, permitindo uma melhor comunicação entre as partes, aspecto essencial para a otimização do ensino.

Em relação à contribuição do PMA na formação da monitora, esse permitiu o aprofundamento do estudo teórico e prático no que se refere à disciplina de Histologia e Embriologia Humana, bem como o incentivo à formação pessoal por despertar sentimentos e situações voltados ao exercício da responsabilidade, altruísmo e liderança.

No contexto do ensino de Enfermagem, a disciplina permitiu à monitora a visualização mais acurada do ser humano no que se refere aos seus tecidos e órgãos. Nessa perspectiva, vale ressaltar que a visualização do ser no aspecto biológico propicia um conceito mais amplo de saúde, o que por sua vez possibilita um maior embasamento no cuidado, pautado em aspectos técnicos de possíveis acometimentos.

No que concerne à aproximação da docência, pode-se relatar que o PMA estimulou o estabelecimento dessa ligação (VENTURA; SILVA; GALVÃO, 2015) ao requerer do monitor a participação contínua em demandas pedagógicas, tornando-o um símbolo da disciplina e um estudante verdadeiramente comprometido e preparado para o desempenho satisfatório de sua atividade.

Quanto ao engajamento com a ciência, a monitoria oportunizou a participação em grupos de pesquisa e apresentação de trabalhos referentes ao PMA em eventos científicos, fatos que, indiscutivelmente, tornaram essa experiência mais enriquecedora no contexto profissional, pessoal e social.

Por se tratar de um relato de experiência, poucas são as limitações relacionadas ao estudo. Contudo, pode-se mencionar o fato da experiência relatada ser um fenômeno unilateral, no qual as impressões ou observações são unicamente da monitória e corpo docente da disciplina, sem a representação das observações dos discentes beneficiados com as atividades da monitoria.

Vale destacar também a limitação da literatura quanto às abordagens relacionadas às práticas de ensino voltadas a estudantes de diferentes nacionalidades no ensino superior. Questões, como abordagens de ensino preferíveis pelos estudantes estrangeiros para otimização do seu aprendizado, não foram elucidadas no estudo.

#### **4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A partir dos resultados obtidos, pode-se considerar que, apesar do temor, desafios e adversidades vivenciados pelos discentes, especialmente os estrangeiros, a monitoria proporcionou a eles confiança e consolidação do conhecimento. Ela promoveu ainda um diálogo entre os discentes e monitória para além do conteúdo abordado na disciplina.

Para a monitória, o desenvolvimento das atividades possibilitou o aprofundamento dos assuntos retratados na disciplina, uma formação pessoal, ética e moral mais consciente, uma afinidade com a docência e um comprometimento com a ciência.

A elaboração e subsequente publicação do presente estudo podem contribuir para o compartilhamento de saberes com a comunidade científica, em especial para os futuros monitores, a respeito de métodos utilizados para aprendizagem de Histologia e Embriologia Humana com estudantes brasileiros e outras nacionalidades.

O presente relato trouxe uma ideia ampliada do Programa de Monitoria Acadêmica, ao despertar, nos estudantes, o interesse por assuntos da competência de outros setores da Universidade, além do estabelecimento de vínculo e confiabilidade.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Lei nº 9394 de 20 de dezembro de 1996. Estabelece as diretrizes e bases da educação nacional. Brasília (DF): **Gráfica do Senado**; 1996;

BRASIL. Lei nº 5540 de 28 de novembro de 1968. Fixa normas de organização e funcionamento do ensino superior e sua articulação com a escola média e dá outras providências. Brasília (DF): **Conselho Federal de Educação**; 1968;

BOTELHO, L. V. et al. Monitoria acadêmica e formação profissional em saúde: uma revisão integrativa. **ABCS Health Sci.**, v. 44, n. 1, p. 67-74, 2019;

DONILDA, L. O.; SANTANA, P. A. Apoio pedagógico como proposta de educação para todos. **Educ. Pesqui.**, São Paulo, v. 45, p. 1-19, 2019;

FERNANDES, J. et al. Influência da monitoria acadêmica no processo de ensino e aprendizagem da psicologia. **Clínica & Cultura**, v. 2, n. 1, p. 36-43, 2015;

FREIRE, P. **Pedagogia do Oprimido**. ed. 17, Rio de Janeiro. Paz e Terra, 1987;

GURGEL, S. S. et al. Jogos Educativos: Recursos Didáticos Utilizados na Monitoria de Educação em Saúde. **Rev Min Enferm.** v. 21, 2017;

MAGALHÃES, S.S. et al. Expansão do ensino de enfermagem no Brasil: evidências históricas e perspectivas da prática. **Enferm. Foco.**, v. 4, n. 4, 2013;

MESQUITA, G. N. et al. Métodos de ensino integrados em monitoria de anatomia e Histologia: um relato de experiência. **REAS/EJCH**, v. 30, p. 1-5, 2019;

SALES, F. P. O. A.; OLIVEIRA, M, A. S. A importância das provas simuladas e da monitoria no laboratório de Histologia. **Revista Brasileira de Ensino Superior**, Passo Fundo, v. 4, n. 3, p. 24-33, 2018;

SANTOS, C. L. OLIVEIRA, C. L. C. O jogo digital Quiz dos tecidos, as contribuições da monitoria para o ensino de Histologia e para a formação acadêmica do monitor. **Horizontes**. v. 38, n. 1, 2020;

SILVA, T. R. et al. Os impactos da monitoria na carreira profissional dos monitores egressos do curso de ciências contábeis da faculdade Vale do Salgado. **Revista Livre de Sustentabilidade e Empreendedorismo**, v. 5, n. 2. 2020;

VENTURA, A. F.; SILVA, C. J. A.; GALVÃO, B. H. A. Monitoria acadêmica x docência no ensino superior. **Cadernos de Graduação**, Recife, v. 2, n. 3, p. 35-44, 2015;

## **SOBRE O ORGANIZADOR**

**RENAN MONTEIRO DO NASCIMENTO** - Possui Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado da Bahia - UNEB (2013). É Especialista em Gestão do Trabalho Pedagógico pela Faculdade Vale do Cricaré - FVC (2013); Especialista em Meio Ambiente e Sustentabilidade pela Faculdade Vale do Cricaré - FVC (2014); Possui Especialização em Análises Clínicas e Microbiologia pela Universidade Candido Mendes - UCAM (2016); Obteve seu Mestrado em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC (2016). Em 2012 foi Pesquisador do Laboratório de Biologia da UNEB; De 2014 a 2016 atuou como Pesquisador no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do Centro de Biotecnologia e Genética (CBG) da UESC. Desenvolveu pesquisas na área de Microbiologia, Genética Molecular e Biologia Evolutiva, atuando principalmente nas seguintes linhas: microrganismos patogênicos presentes na água; citogenética animal de himenópteros; filogenia e evolução molecular de meliponíneos. Foi Docente no Ensino Fundamental no Colégio Alfa da Rede Pitágoras lecionando a disciplina de Ciências (2013-2014). Possui experiência no Ensino Médio ministrando a disciplina de Biologia no Colégio Polivalente de Caravelas (2017). De 2017 a 2020 foi professor no Centro Territorial de Educação Profissional do Extremo Sul (CETEPES) nas seguintes disciplinas: Biologia; Química; Anatomia e Fisiologia Humana; Bioquímica Básica; Imunologia Básica; Histologia; Hematologia; Bacteriologia; Microbiologia; Parasitologia; Biossegurança; Políticas Públicas em Saúde; Físico-Química; Metodologia do Trabalho Científico; Gestão de Qualidade, Saúde e Meio Ambiente; Monitoramento, Controle e Manutenção Ambiental; Aspectos e Impactos Ambientais. Foi Professor Substituto na Universidade Federal do Sul da Bahia - UFSB (2018-2020) atuando como Professor Tutor no Colegiado de Medicina da UFSB e lecionando as seguintes disciplinas: Biologia Celular; Genética Básica; Histologia e Embriologia; Concepção e Formação Humana; Sistemas de Controle Homeostáticos e Alostáticos; Bases Morfofuncionais Humanas. Atualmente cursa o Doutorado em Patologia Molecular na Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e é Pesquisador no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas do Departamento de Biologia Celular e no Laboratório de Biologia e Conservação de Morcegos do Departamento de Zoologia no Instituto de Ciências Biológicas (IB) da UnB. O autor tem se dedicado a desenvolver estudos na linha de pesquisa “Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos” realizando um mapeamento metagenômico e proteômico dos vírus de morcegos para futuras publicações em periódicos nacionais e internacionais.

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Agaricus Blazei Murrill 44, 45  
Anatomia 9, 72, 73  
Anti-Inflamatório 55  
Anti-Proliferativo 55  
Aprendizagem 11, 21, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 72  
Arcabouço Pancreático 31

### B

Banco de Matriz Pancreática Descelularizada 31, 40, 41

### C

Castração Cirúrgica 54, 55  
Células 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 20, 22, 24, 25, 26, 30, 31, 32, 34, 35, 37, 41, 46, 47, 48, 50, 55  
Ciências Morfofuncionais 2  
Cogumelo do Sol 45, 46  
Compartimentos Prostáticos 54, 55  
Corpo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 21, 44, 47, 49, 50, 67, 68, 71

### D

Descelularização Pancreática 31, 32, 42  
Diabetes mellitus 20, 21, 23, 26, 27, 32, 42  
Diabéticos 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26  
Disciplina 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 73

### E

Educação em Enfermagem 65  
Embriologia 64, 66, 67, 68, 70, 71, 73  
Engenharia Tecidual 30, 31, 32, 34  
Ensino 9, 27, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 72, 73  
Envelhecimento 44, 45, 48, 49, 50  
Estratégia 64, 68, 70

### F

Fisiologia 1, 7, 9, 73

Fitoterapia 20, 52

## **G**

Gerbilo 54, 55

## **H**

Hipocampo 20, 22, 24, 25, 26, 27

Histologia 18, 36, 37, 38, 60, 64, 65, 66, 67, 70, 71, 72, 73

## **J**

Jejuno 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 53

Junções Neuromusculares 10, 11, 13, 16, 17, 19

## **L**

Lipopolissacarídeo 10, 11

## **M**

Matriz Extracelular 3, 15, 29, 30, 31, 32, 34, 35

Morfologia 1, 10, 11, 13, 16, 24, 50, 51

Morfológica 10, 24

Morfometria 10, 11, 13, 17, 20, 22, 24, 25

Morfométrica 10, 20, 25, 49, 53

## **N**

Neurônios 4, 5, 13, 16, 20, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 53

Neuroproteção 20

## **O**

Óleo de Pequi 54, 55, 61

Órgãos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 21, 32, 33, 34, 41, 42, 67, 70

## **P**

Pâncreas Bioartificial 30, 31, 32, 34

Paralisia Cerebral 10, 11, 12, 17, 18, 19

Plexo Mioentérico 44, 45, 46, 49

Pouteria ramiflora 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28

Próstata 54, 55

## **R**

Ratos 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 29, 32, 33, 44, 45, 46, 47, 48, 49,



50, 51, 53

Remodelação Tecidual 55

Restrição Sensório-Motora 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17

## **S**

Sistemas 1, 4, 67, 69, 73

Sistemas Corporais 1

## **T**

Tecidos 1, 4, 6, 7, 24, 30, 32, 34, 35, 42, 67, 70, 72

Tratamento 6, 8, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 32, 34, 47, 49

# CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br) 

[contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br) 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

[www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br) 

# CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br) 

[contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br) 

[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora) 

[www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br) 