MARIÁ MUNHOZ EVANGELINELLIS

**ESTUDO DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR P2X7, *BRILLIANT BLUE G*, SOBRE
OS NEURÔNIOS ENTÉRICOS DO COLO DISTAL DE RATOS SUBMETIDOS À
COLITE ULCERATIVA EXPERIMENTAL.**

São Paulo

2019

MARIÁ MUNHOZ EVANGELINELLIS

**ESTUDO DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR P2X7, *BRILLIANT BLUE G*, SOBRE
OS NEURÔNIOS ENTÉRICOS DO COLO DISTAL DE RATOS SUBMETIDOS À
COLITE ULCERATIVA EXPERIMENTAL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dra. Patricia Castelucci

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3634
FMVZ

Evangelinellis, Mariá Munhoz

Estudo do antagonista do receptor P2X7, *Brilliant Blue G*, sobre os neurônios entéricos do colo distal de ratos submetidos à colite ulcerativa experimental / Mariá Munhoz Evangelinellis. – 2019.

77 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Castelucci.

1. Plexo mioentérico. 2. Receptor P2X7. 3. Antagonista *Brilliant Blue G*. 4. Colite ulcerativa experimental. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "ESTUDO DO ANTAGONISTA BRILLIANT BLUE G SOBRE O RECEPTOR P2X7 NOS NEURÔNIOS ENTÉRICOS E CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS DO COLO DISTAL DE RATOS SUBMETIDOS À COLITE ULCERATIVA EXPERIMENTAL", protocolado sob o CEUA nº 1793240815, sob a responsabilidade de **Patrícia Castelucci e equipe; Mariá Munhoz Evangelinellis** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 01/02/2016.

We certify that the proposal "Study of the Brilliant Blue G antagonist of the P2X7 receptor in the enteric neurons and enteric glial cells of the rat distal colon submitted to ulcerative colitis", utilizing 200 Isogenic rats (200 males), protocol number CEUA 1793240815, under the responsibility of **Patrícia Castelucci and team; Mariá Munhoz Evangelinellis** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 02/01/2016.

Vigência da Proposta: de 09/2015 a 02/2018

Área: Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres

Procedência: Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP

Espécie: Ratos isogênicos

sexo: Machos

idade: 2 meses

N: 200

Linhagem: Wistar

Peso: 250

Resumo: As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas do trato gastrointestinal e incluem a colite ulcerativa e a Doença de Crohn. A colite ulcerativa caracteriza-se como uma inflamação limitada ao colo, normalmente iniciando no reto e espalhando de maneira contínua. A frequência da colite ulcerativa é maior nos países desenvolvidos e áreas urbanas e infecções gastrointestinais prévias podem dobrar o risco de desenvolvimento da doença. A inflamação intestinal, seja ela causada por infecções ou por resposta imune anormal podem levar a alterações que resultam em mudanças estruturais, intrínsecas e sinápticas que alteram a função neuronal. Estudos em modelos animais têm demonstrado o efeito da inflamação intestinal sobre o sistema nervoso entérico, após a indução de colite com substâncias ácidas, como o 2,4,6 Trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Tem sido descrito a presença de receptores purinérgicos P2X1-P1X7 no sistema nervoso entérico. O receptor P2X7 é o maior entre os membros da família P2X e participa na regulação de diversos processos, como a permeabilidade células, apoptose e liberação de citocinas. Um estudo recente demonstrou que a colite ulcerativa reduz o número de neurônios imunorreativos a P2X7 no plexo mioentérico. A redução na densidade neuronal também resultou em perda de motilidade intestinal. Este projeto visa avaliar o efeito do Brilliant Blue G, antagonista do receptor P2X7, no sistema nervoso entérico do intestino grosso de animais submetidos à colite ulcerativa. Serão analisados o colo distal de ratos Wistar submetidos a indução da colite ulcerativa pela administração TNBS no intestino grosso. O tratamento com BBG será feito 1 hora após a indução da colite e por 5 dias consecutivos, os colos distais serão coletados 24 horas e 7 dias após a indução da colite. Os grupos estudados serão grupo controle (CT, não manipulado), grupo SHAM, (indução será feita com salina), grupos COL 24h, BBG 24h, COL 7 dias e BBG 7 dias. Será avaliado o código químico, a densidade neuronal e área dos neurônios entéricos imunorreativos a óxido nítrico sintase neuronal (NOSn), colina acetil Transferase (ChAT), Calbindina e Calretinina, juntamente com o receptor P2X7, assim como nas células gliais entéricas, reativas ao S100 β e ao GFAP (proteína fibrilar ácida). O material será analisado através das técnicas de imunohistoquímica por dupla marcação quanto a imunoreatividade à P2X7, ChAT, NOS, Calb, Carl, S100 β e ao GFAP e anti HuC/D; análise histológica, utilizando as técnicas de Hematoxilina-Eosina, Tricrômio de Masson e Pricrosirius para avaliar a integridade da parede intestinal; classificação da colite; western blot e PCR em tempo real para avaliação da expressão de P2X7; microscopia eletrônica de transmissão; histoquímica da Mieloperoxidase (MPO) para quantificação de neutrófilos e motilidade intestinal.

São Paulo, 01 de fevereiro de 2016

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Estudo do receptor P2X7 e do sistema nervoso entérico do intestino grosso de ratos submetidos a colite ulcerativa experimental*", registrado sob o protocolo nº **68/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **11/10/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Patrícia Castelucci**

- Departamento: *Anatomia*

- Membros da Equipe: *Mariah Munhoz Evangelinellis (Pós-graduando), Cristina Eusebio Mendes (Pós-graduando), Roberto Figueiroa de Souza (Iniciação científica)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Study of the P2X7 receptors and enteric nervous system of the rats distal colon after ulcerative colitis*", protocol nº **68/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **10/11/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Patrícia Castelucci**

- Team members: *Mariah Munhoz Evangelinellis (Graduate Student), Cristina Eusebio Mendes (Graduate Student), Roberto Figueiroa de Souza (Undergraduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Rattus norvegicus</i>	Wistar	Macho/Male	200 g	308

São Paulo, 14 de outubro de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: EVANGELINELLIS, Mariá Munhoz.

Título: Estudo do antagonista do receptor P2X7, *Brilliant Blue G*, sobre os neurônios entéricos do colo distal de ratos submetidos à colite ulcerativa experimental.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Patrícia Castelucci

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento:_____

Prof. Dr. José Roberto Kfoury

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento:_____

Profa Dra. Cristina Eusébio Mendes

Instituição: Universidade Ibirapuera

Julgamento:_____

Prof. Dr. Paulo Correia de Sá

Instituição: Universidade do Porto

Julgamento:_____

Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva

Instituição: Universidade Federal de Sergipe

Julgamento:_____

“Nada em mim foi covarde, nem mesmo as desistências.
Desistir, ainda que não pareça,
foi meu grande ato de coragem.”
- Caio Fernando Abreu

À minha mãe, Maria Ivete Munhoz.

Por sempre o melhor exemplo de ser humano que eu poderia ter. Obrigada por me guiar, me acolher e sempre estar lá.

AGRADECIMENTOS

Seria impossível listar todas as pessoas que fizeram parte dessa jornada e que direta ou indiretamente contribuíram para esta tese.

À Universidade de São Paulo, por possibilitar a realização deste trabalho.

Ao CNPq, Capes e FAPESP pelo apoio financeiro.

À minha mãe, Maria Ivete Munhoz, mãe, melhor amiga, terapeuta, incentivadora, patrocinadora oficial do evento. Obrigada por acreditar em mim. Por mais uma vez fazer do meu sonho o seu sonho. A minha luta, a sua luta. Por enxugar minhas lágrimas, me reerguer e me ensinar todos os dias como ser um ser humano melhor. Nós conseguimos!

Ao meu pai, Joannis Evangelos Evangelinellis (*in memoriam*), que mesmo na ausência física sempre esteve presente na minha vida. Que vibrou com a primeira palavra lida. De quem eu herdei a curiosidade e o desejo de aprender sempre. Que de onde estiver, me guia, me protege, me orienta.

Aos membros da banca, por aceitarem avaliar esta tese e compartilharem seus conhecimentos.

À minha orientadora, Patrícia Castelucci, por abrir as portas do Laboratório de Neurogastroenterologia e aceitar me orientar. Obrigada pelo apoio e conhecimentos compartilhados.

À minha vó, Josefa Pelayo Munhoz (*in memoriam*). Eterna luz da minha vida, exemplo de vida, amor eterno. Quem dera Deus cometesse um descuido e te devolvesse pra nós.

À minha vó de coração, Maria Geralda Pereira, minha calanga amada, pela paciência, amor, carinho. Que acompanha minha vida acadêmica desde os tempos de aulas de jazz e piano.

Aos meus irmãos Vinsent Munhoz Evangelinellis, Joannis Evangelos Soares Evangelinellis, Ricardo Kutney Evangelinellis e Pedro Kutney Evangelinellis pelo carinho, amor e palavras de incentivo.

À amiga e mentora Beatriz Freitas, pelo apoio, confiança, carinho. Sem você esse doutorado jamais teria existido!

À Prof. Dra. Patrícia Baleeiro Beltrão Braga, por abrir as portas da Universidade de São Paulo e me receber em seu laboratório.

Aos pais e pacientes do Projeto A Fada do Dente. Obrigada por me permitirem fazer parte desse mundo azul, por me receberem em suas casas, acreditarem no meu trabalho e tantos aprendizados.

Ao Prof. Dr. José Roberto Kfoury, que cedeu os equipamentos de seu laboratório na primeira etapa deste doutorado. Obrigada pela confiança e suporte na transição de projetos.

Aos professores do Departamento de Anatomia Veterinária dos Animais Domésticos e Silvestres, pelos ensinamentos e conhecimento compartilhado. Obrigada pela confiança ao cederem seus equipamentos e espaços. Aos amigos e funcionários do departamento, pelo apoio e suporte durante meu doutorado.

Aos amigos queridos da Universidade Federal de São Paulo, que também tiveram participação na primeira etapa deste doutorado. Em especial à Prof. Dra. Janete Cerutti e ao Prof. Dr. Rui Monteiro Maciel por autorizarem o uso de equipamentos e me receberem em seus laboratórios.

To the great guys from University Global Partnership Network (UGPN) 2015: Emma Hawkins, Glenn Sidle, Ravi Mathur, Phuong Hoang, Amy Barber and all the fantastic professors from University of Surrey. Thanks for the amazing days, experiences and knowledge. And for the beers, of course! Aos queridos Pâmela Alexandre, Rodrigo Marques da Silva, Diego Ângelo Duarte, Pedro Russo e Helder Nakaya, may The Cloud be ever with you!

Às minhas colegas de laboratório Cristina Eusébio Mendes, pela recepção e apoio no momento de necessidade; Thaíra Pereira, Andressa Lima, Roberta Figueiredo, Isabel da Silva e Dailiany Orechio pela amizade, apoio, incentivo, risadas. Vocês tornaram os dias mais leves.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas III. Aos técnicos do biotério, pelo cuidado e auxílio com os animais utilizados nesse projeto. Ao laboratório de Histologia, em especial a querida Marta Maria da Silva Righetti, pela paciência, carinho e apoio mesmo perante os prazos curtos e apertados.

À minha tia Marilene Munhoz, que sempre apoiou meus avanços acadêmicos, celebrou minhas conquistas e incentivou minha carreira. Os finais de semana no Hostel da Marilene foram essenciais! À minha tia Roseli Munhoz, pelas conversas, desabafos, apoio e carinho. Aos meus tios José Carlos, Antônio, Valquíria, Maria Tereza e Izilda pela presença e carinho.

Aos meus primos amados: Thaís Munhoz, companheira de ballet, de risadas, choros, desabafos, cantorias e loucuras. Mariel Munhoz, pela infalível presença, companheirismo e ouvidos sempre atentos. Renan Munhoz Nagao, meu corazón e melhor abraço (e melhor Bananooff!). Marcel Munhoz, primo, amigo e parceiro, pela sua moto salvadora, bate papos e risadas. Aos queridos Glauco Garcia, Eduardo Munhoz Nagao, Mariana Munhoz Costa, Fernando Garcia, Paulo Gracindo Junior e Diego Munhoz. Obrigada por tornarem a vida mais leve. I'll be there for you, cause you there for me too.

Aos amigos: Fábio Augusto Costa Abrahão, pela presença nos últimos 27 anos, risadas, conselhos, confissões e parceria. Maurício Provasi, meu Dani Sam, amigo e irmão, pelas noites de strogonoff no chão da sala e amizade incondicional. Thiago Patente e Tamires Souza, pelas infinitas discussões científicas em mesa de bar, risadas e trocas de experiência. Felipe Scassi Salvador, meu cromossomo extra e amigo, pelo ombro amigo sempre disponível. Paloma Besson, pela amizade e parceria, noites de sofrência e pizza, obrigada pela paciência! Izabella Oliveira, amiga e companheira dos momentos mais tensos. Obrigada por estar presente no dia mais estranho dos últimos 5 anos! Roberta Nascimento, minha maninha, pela troca eterna de audiobooks, pela presença sempre constante ainda que a distância física insista em nos atrapalhar. Pedro Gryschek, minha herança maldita e grande amigo. Pela amizade, paciência e palavras de apoio. Iasmim Polido, amiga e conselheira, pelas discussões científicas (ou não tão

científicas assim!), apoio, carinho e amizade. Beatriz Moraes, que há muito deixou de ser cliente e se tornou amiga, pela confiança, apoio e carinho. Talita Barone, eterna caloura, quem diria que uma calça faria esse estrago todo! Pelos “berros”, “mortes”, corridas de cavalo, podcasts, presença, conselhos infalíveis e paciência. Se orienta! Carolina Cardoso, irmã que a biologia não me deu, obrigada por 27 anos de presença, amor, irmandade e apoio. Mariana Tavares, outro presente do ateliê, amiga e quase terapeuta, pela presença, paciência e apoio. Jacqueline de Siqueira, pela amizade e risadas, tubos de primer vazios, histórias bizarras, talkshows e apoio. Eduardo Malavasi Bruno, pelos cafés e cervejas, simpósios, risadas e informações úteis sobre tubarões. Sigo esperando encontrar um no aquário! Aos queridos Gustavo Barbosa, Caroline Stocco, Carina Borba, Izabel Borba, Margaret Arakaki, Marcella Ferreira, Marina Lopes, Natasha Kutney Evangelinellis, Amauri Marfim Pedrini, Ivete Pedrini, Emile Casasco, Aline Campos. Cada um de vocês teve papel essencial nos últimos 5 anos. Obrigada pela amizade, carinho, paciência, apoio, incentivo, broncas, puxões de orelha, elogios, passeios, risadas, piadas. Cada um de vocês tornaram os tombos mais leves, as dores mais suaves, as tempestades menores. Eu poderia escrever uma tese agradecendo cada um de vocês. Sem vocês eu não estaria aqui.

À Bruno Berretini Camponês do Brasil. Obrigada pela parceria, amizade, incentivo incondicional, carinho, paciência, dedicação e confiança. Aos queridos Dr. Osiris de Oliveira Camponês do Brasil e Lia Mariza Berretini Camponês do Brasil, pelo carinho, palavras de incentivo e apoio. Obrigada por terem feito parte da minha jornada.

Aos amigos queridos Daniela Pinto e Douglas Pinto. Pela amizade, apoio, força, vinhos, jantares e apoio espiritual. Aos meus amores Gian e Pietra pelo amor, noites de Banco Imobiliário, penteados, brigadeiros e sorvetinhos.

Aos queridos Norberto Polido (*in memoriam*) e Marina Polido, pela presença e palavras sempre inspiradoras.

Aos amigos Suzana Ramos de Almeida Costa e Marco Antonio Costa, pela amizade e carinho. Pelas tardes de conversa e bolo de banana.

Aos queridos mestres do Colégio Passionista Santa Maria, responsáveis pela minha formação não só nos estudos, mas também como ser humano.

Aos professores da Fundação Lusíada, Faculdades Metropolitanas Unidas, Universidade Federal de São Paulo e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo que fizeram parte da minha formação e carreira acadêmica.

Às minhas pequenas Mahalla (*in memoriam*), que em muitos momentos deixou de receber a atenção merecida e nunca deixou de receber com abanos de rabo e lambidas amorosas; e Lola Maria Panqueca, minha fiel companheira. Obrigada por me lembrarem diariamente que sou cercada de amor incondicional.

À todas as clientes do Ateliê Foi a Mah que fez. Vocês tornaram o recomeço possível. Obrigada por confiarem no meu talento e me permitir fazer parte dos sonhos de vocês. Por cada “Tia Maaaaah”, por cada vestido, cada roupa, cada festa, cada sonho. Obrigada por fazerem parte da mudança que me devolveu a paz e os sorrisos. Aos meus pequenos e pequenas que enchem minha vida de cor e luz! À todas as alunas da “Mah Munhoz”. Vocês foram essenciais nessa trajetória. Obrigada por me permitirem dividir meu conhecimento e acima de tudo, aprender todos os dias.

À minha estrelinha, por me escolher. Obrigada por me ensinar sobre amor incondicional, empatia, compaixão, superação, força, resiliência e recomeços. Você me incentiva todos os dias a ser melhor. Mas só enquanto eu respirar, vou me lembrar de você.

Por fim, agradeço à Deus, à Nossa Senhora da Guia e aos meus guias espirituais por me ampararem e me darem forças perante as dificuldades. Ainda que o caminho tenha sido longo, onde muitas vezes fraquejei e as incertezas me dominaram, minhas necessidades foram supridas e minha luta recompensada.

À cada um que segurou minha mão, me apoiou, enxugou uma lágrima, ofereceu um abraço, um sorriso ou uma palavra amiga. O meu mais verdadeiro MUITO OBRIGADA! Encerro essa etapa com um sorriso no rosto, alma leve e paz no coração. Foram anos de luta e superação, de cair e levantar, de calmaria e tempestade. Mas nada que é fácil vale a pena, lembre-se disso!

RESUMO

EVANGELINELLIS, M.M. Estudo do antagonista do receptor P2X7, *Brilliant Blue G*, sobre os neurônios entéricos do colo distal de ratos submetidos à colite ulcerativa experimental. 2019. 77f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas do trato gastrointestinal e incluem a colite ulcerativa e a Doença de Crohn. A colite ulcerativa caracteriza-se como uma inflamação limitada ao colo, normalmente iniciando no reto e espalhando de maneira contínua. A inflamação intestinal pode levar a alterações nos neurônios entéricos. Estudos em modelos animais têm demonstrado o efeito da inflamação intestinal sobre o sistema nervoso entérico, após a indução de colite com substâncias ácidas, como o 2,4,6 Trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Tem sido descrito a presença de receptores purinérgicos P2X1-P2X7 no sistema nervoso entérico. O receptor P2X7 participa na regulação de diversos processos, como a permeabilidade células, apoptose e liberação de citocinas. Este projeto visa avaliar o efeito do *Brilliant Blue G* (BBG), antagonista do receptor P2X7, no sistema nervoso entérico do colo distal de animais submetidos à colite ulcerativa. Foram analisados o colo distal de ratos Wistar submetidos a indução da colite ulcerativa pela administração TNBS no intestino grosso. O tratamento com BBG foi feito 1 hora após a indução da colite e por 5 dias consecutivos, os colos distais foram coletados 24 horas e 7 dias após a indução da colite. Os grupos estudados são grupo controle (não manipulado), grupo Sham (indução feita com veículo), grupos Colite 24h e 7 dias, e grupos BBG 24h e BBG 7 dias. Foi avaliado o código químico, a densidade neuronal e área dos neurônios entéricos imunorreativos a óxido nítrico sintase neuronal (NOS), colina acetil Transferase (ChAT) e o receptor P2X7. O material foi analisado através das técnicas de imunohistoquímica por dupla marcação quanto a imunoreatividade à P2X7 com a ChAT e a NOS. Foi feita análise histológica, utilizando a coloração de Hematoxilina-Eosina para avaliar a integridade da parede intestinal e a classificação da colite. Os resultados demonstraram diminuição dos neurônios positivos ao NOS, ao ChAT e ao receptor P2X7 na colite e recuperação na densidade neuronal nos grupos tratados com o BBG. A área neuronal demonstrou aumento da área do perfil nos grupos colites e recuperação nos grupos tratados com o BBG. Conclui-se que o BBG foi efetivo na colite ulcerativa experimental podendo ser o receptor P2X7 um alvo terapêutico.

Palavras Chaves: Plexo mioentérico. Receptor P2X7. Antagonista Brilliant Blue G. Colite ulcerativa.

ABSTRACT

Evangelinellis, MM. Study of the P2X7 receptor antagonist, Brilliant Blue G, on enteric neurons of the rats distal colon submitted to experimental ulcerative colitis. 2019. 77p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic diseases of the gastrointestinal tract that include ulcerative colitis and Crohn's disease. Ulcerative colitis is characterized as a limited inflammation of the colon, usually beginning in the rectum, spreading continuously. The intestinal inflammation, whether caused by infection or abnormal immune response may lead to structural changes in enteric neurons. Studies in animal models have demonstrated the effect of intestinal inflammation on enteric nervous system, following colitis induction with acidic substances such as 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic (TNBS). It has been reported the presence of P2X1-P2X7 purinergic receptors in the enteric nervous system. The P2X7 receptor participates in the regulation of several processes such as cell permeability, apoptosis and cytokine release. A recent study has shown that ulcerative colitis reduces the number of P2X7 immunoreactive neurons in myenteric plexus. This project aims to evaluate the effect of *Brilliant Blue G* (BBG), a P2X7 receptor antagonist, in the enteric nervous system of the large intestine in animals with ulcerative colitis. The distal colon of Wistar rats was submitted to induction of ulcerative colitis by TNBS administration in the large intestine. Treatment with BBG was given 1 hour after induction of colitis and for 5 consecutive days, distal colons are collected 24 hours and 7 days after colitis induction. The animals was divided in control group (not manipulated), Sham 24 h and 7 days (induction was done with vehicle), Colitis 24h, BBG 24h, Colitis 7 days and BBG 7 days. The chemical code, neuronal density and area of enteric neurons reactive to neuronal nitric oxide synthase (NOS, choline acetyl transferase (ChAT) and the P2X7 receptor. The distal colon was analyzed through immunohistochemical techniques for double labelling as the immunoreactivity to P2X7, ChAT and NOS. Histological analysis using staining for Hematoxylin and Eosin was done to evaluate the integrity of the intestinal wall. The results showed a decrease in neurons positive to NOS, ChAT and P2X7 receptor in colitis groups and recovery in neuronal density in the groups treated with BBG. The neural profile area showed an increase in the profile area in the colitis groups and recovery in the groups treated with BBG. In conclusion, BBG was effective in experimental ulcerative colitis and the P2X7 receptor may be a therapeutic target.

Keywords: myenteric plexus, P2X7 receptor, antagonist Blue Brilliant G, ulcerative colitis.

LISTA DE ABREVIATURAS

μg – Micrograma
 μM - Micromolar
5-HT – 5-hidroxitriptamina
ACh- Acetilcolina
ADP – Adenosina difosfato
ATP – Adenosina Trifosfato
BBG – Brilliant Blue Green
 Ca^{2+} - Cálcio
 CaCl_2 – Cloreto de Cálcio
Calb – Calbindina
Carl – Calretinina
cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar
ChAT – Acetilcolina Transferase
 CO_2 – Dióxido de Carbono
CT – Controle
DII – Doença intestinal inflamatória
DMax – Diâmetro máximo
DMim – Diâmetro mínimo
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNBS - Dinitrobenzeno sulfônico
EDTA – Etileno Diamino Tetracético
GFAP – Proteína fibrilar glial ácida
h – hora
 H_2O – estrutura molecular da água
 H_2O_2 – peróxido de hidrogênio
HE – Hematoxilina-Eosina
IPANs - neurônios aferentes intrínsecos primários.
 K^+ - Potássio
KCl – Cloreto de Potássio
Kg – Quilograma
M – Molar
 MgCl_2 - Cloreto de magnésio

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

ml – Mililitro

mM – Milimolar

MPO – Mieloperoxidase

Na⁺ - Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaH₂PO₄ – Fosfato de sódio monobásico

NOS – Óxido nítrico sintase

nM – Nanomolar

PBS – Tampão Fosfato Salina

PCR – Reação de Polimerização em Cadeia

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNE – Sistema Nervoso Entérico

SOM – Somatostatina

RNA – ácido ribonucleíco

TBST – Tampão salina tris

TNBS - 2,4,6 Trinitrobenzeno sulfônico

UDP – Uridina difosfato

UTP – Uridina trifosfato

VIP – Peptídeo Intestinal Vasoativo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grau de lesão no colo distal da colite ulcerativa.....	35
Tabela 2: Característica dos anticorpos primários.....	36
Tabela 3: Anticorpos secundários usados.....	36
Tabela 4: Peso dos animais Sham, Colite e BBG 24 horas.....	39
Tabela 5: Peso dos animais Sham, Colite e BBG 7 dias.....	40
Tabela 6: Co-localização dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7 e a NOS.....	48
Tabela 7: Co-localização dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7 e a ChAT.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do SNE do intestino.....	26
Figura 2: Representação esquemática dos tipos de neurônio do SNE.....	27
Figura 3: Neurônios imunorreativos à NOS e ao receptor P2X7 no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Sham, Colite e BBG 24 horas.....	41
Figura 4: Neurônios imunorreativos à NOS e ao receptor P2X7 no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Sham, Colite e BBG 7 dias.....	42
Figura 5: Neurônios imunorreativos à ChAT e ao receptor P2X7 no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Sham, Colite e BBG 24 horas.....	43
Figura 6: Neurônios imunorreativos à NOS e ao receptor P2X7 no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Sham, Colite e BBG 7 dias.....	44
Figura 7: Fotomicrografia de secções coradas com hematoxilina eosina no colo distal dos grupos Sham, Colite e BBG 24 horas.....	46
Figura 8: Fotomicrografia de secções coradas com hematoxilina eosina no colo distal dos grupos Sham, Colite e BBG 7 dias.....	47
Figura 9: Histograma da densidade de neurônios imunorreativos ao P2X7 nos grupos Controle; Sham, Colite e BBG 24 horas e Sham, Colite e BBG 7 dias.....	49
Figura 10: Histograma da densidade de neurônios imunorreativos ao NOS nos grupos Controle; Sham, Colite e BBG 24 horas e Sham, Colite e BBG 7 dias.....	51
Figura 11: Histograma da densidade de neurônios imunorreativos ao ChAT nos grupos Controle; Sham, Colite e BBG 24 horas e Sham, Colite e BBG 7 dias.....	52
Figura 12: Histograma do perfil neuronal e dos diâmetros máximo (DMAX) e mínimo (DMIN) dos neurônios imunorreativos ao NOS nos grupos Controle; Sham, Colite e BBG 24 horas e Sham, Colite e BBG 7 dias.....	54

Figura 13: Histograma do perfil neuronal e dos diâmetros máximo (DMAX) e mínimo (DMIN) dos neurônios imunorreativos ao ChAT nos grupos Controle; Sham, Colite e BBG 24 horas e Sham, Colite e BBG 7 dias.....56

SUMÁRIO

Resumo.....	14
Abstract.....	15
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Doença Inflamatória Intestinal.....	23
1.2 Sistema Nervoso Entérico.....	25
1.3 Receptores Purinérgicos.....	29
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivos Gerais.....	33
2.2 Objetivos Específicos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Animais.....	34
3.2 Indução da Colite Ulcerativa.....	34
3.3 Avaliação da Colite.....	35
3.4 Preparação do Material para Imunohistoquímica.....	35
3.5 Método da Dupla Marcação com Imunofluorescência.....	35
3.6 Análises Qualitativas.....	36
3.7 Análises Quantitativas.....	37
3.7.1 Análise do Código Químico.....	37
3.7.2 Análise da Densidade Neuronal.....	37
3.7.3 Análise morfométrica.....	37
3.7 Análise Histológica.....	38
3.8 Análise Estatística.....	38
4 RESULTADOS	
4.7 Análise do Peso dos Animais.....	39
4.8 Análise Qualitativa.....	40
4.8.3 Análise das imunorreatividades do receptor P2X7, da NOS e da ChAT.....	40
4.8.4 Análise da histologia.....	45
4.9 Análises Quantitativas.....	48
4.9.3 Colocalização.....	48
4.9.4 Densidade Neuronal.....	49
4.9.5 Morfometria.....	53
5 DISCUSSÃO	

5.7	Considerações gerais da colite no colo distal.....	57
5.8	Considerações sobre o código químico e a expressão do receptor P2X7.....	58
5.9	Considerações sobre a densidade neuronal.....	60
5.10	Considerações sobre o perfil neuronal.....	61
6	CONCLUSÕES	63
7	REFERÊNCIAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Inflamatória Intestinal

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas do trato gastrointestinal e incluem a colite ulcerativa e a Doença de Crohn. Essas doenças apresentam maior incidência na América do Norte e na Europa, afetando cerca de 1 a cada 500 pessoas. Nos Estados Unidos, aproximadamente 1.6 milhões de habitantes são afetados pela Doença de Crohn e 910 mil são afetados pela colite ulcerativa (ANIWAN, S ET AL, 2017).

Sua etiologia ainda é desconhecida e estudos demonstram que seriam o resultado de uma desregulação entre o sistema imune e a microbiota do intestino, associado a fatores genéticos (SARTOR 2003, AHMAD ET AL., 2004, LOFTUS 2004, SARTOR 2006, SHIH, TARGAN ET AL, 2008, KHOR, GARDET ET AL, 2011, VAN LIMBERGEN ET AL, 2014). O histórico familiar representa um fator de risco para o desenvolvimento da doença, que pode aparecer em qualquer idade, não sendo observada diferença entre o sexo, mas apresenta pico de incidência no início da vida adulta e um segundo pico de incidências nos idosos (ZEMPLJIC ET AL., 2014).

Estudos recentes demonstraram que o fenótipo da doença nos jovens, difere do padrão observado nos idosos, no entanto, ainda não sabe se sabe se essas diferenças refletem variações na resposta do sistema imune, na composição da microbiota intestinal ou influência de fatores ambientais (CUMMINGS; OVERDUIN 2007, KELSEN; BALDASSANO 2008, OHMAN; SIMREN 2010, KHOR ET AL., 2011, COLLINS ET AL., 2012; NG, S.C. ET AL, 2018; RAMOS, P.G E PAPADAKIS, A.K., 2019). O desenvolvimento de câncer colorretal apresenta-se como uma complicação grave da DII e ocorre em 3,7% dos pacientes. O risco de desenvolvimento de câncer aumenta de acordo com a duração da doença, sendo de 2% em 10 anos, 8% em 20 anos e 18% em 30 anos. O risco de aparecimento esporádico na população dos Estados Unidos é de 5% (EADEN ET AL., 2001, THORSTEINSDOTTIR ET AL., 2011).

A colite ulcerativa caracteriza-se como uma inflamação limitada ao colón, normalmente iniciando no reto e espalhando de maneira contínua, frequentemente envolvendo a região periapendicular. Histologicamente, a colite ulcerativa apresenta inflamação superficial, limitada as regiões da mucosa e submucosa, associada a criptite e abscessos crípticos (HANAUER 2004, SARTOR 2006, KHOR; GARDET ET AL., 2011).

A frequência da colite ulcerativa é maior nos países desenvolvidos e áreas urbanas, quando comparado a áreas rurais. Infecções gastrointestinais prévias podem dobrar o risco de

desenvolvimento de colite ulcerativa (PORTER ET AL., 2008), o que sugere que mudanças na flora intestinal podem agir como gatilho para o processo de inflamação crônica em pacientes geneticamente predispostos a doença (NISHIDA, A ET AL, 2018).

Diversos estudos demonstraram que fatores ambientais podem atuar como fatores de predisposição ou de proteção no desenvolvimento da colite ulcerativa. O tabagismo é descrito como um fator protetor (MAHID ET AL., 2006), no entanto, indivíduos que pararam de fumar tem atividade aumentada da doença (BEAUGERIE ET AL., 2001).

A apendicectomia também é descrita como um fator protetor, reduzindo em 69% o risco de desenvolvimento da colite ulcerativa (ANDERSSON ET AL., 2001). Não há dados que comprovem a influência do estresse psicológico no aparecimento da doença (KIANK ET AL., 2010).

O diagnóstico da colite ulcerativa é baseado nos sintomas clínicos associado com investigação radiológica, e exames de endoscopia e análise da histologia. Ainda não foram descritos marcadores biológicos específicos, capazes de distinguir a colite ulcerativa de outras formas de colite (CIOFFI ET AL., 2015).

Na doença inflamatória intestinal, os neurônios e terminações nervosas do sistema nervoso entérico (SNE) se encontram em um complexo ambiente de sinalização, no qual estão sujeitos a distorção mecânica, durante o processo de distensão de contração do intestino e diversas moléculas neuroativas (FURNESS 2012). O ambiente intestinal, bem como a atividade neuronal pode ser modulados por diversos fatores como stress, o sistema imune, a microbiota, a glia entérica, bem como nutrientes e tipo de alimentação ingerida (CUMMINGS; OVERDUIN 2007, PORTER ET AL., 2008, BRIERLEY E LINDEN 2014).

A inflamação intestinal, seja ela causada por infecções ou por resposta imune anormal podem levar ao processo de neuroplasticidade, ou seja, alterações que resultam em mudanças estruturais, intrínsecas e sinápticas que alteram a função neuronal. Como resultado, a neuroplasticidade pode contribuir para secreção e motilidade anormais, resultando em desconforto, dor, constipação e diarreia. Estudos demonstram que ocorrem alterações morfológicas, que incluem alterações degenerativas, degeneração axonal, necrose com hipertrofia de plexos nervosos e hiperplasia de células ganglionares, além de mudanças na quantidade e proporção de neurotransmissores (VILLANACCII ET AL., 2008, BRIERLEY;LINDEN 2014).

Estudos em modelos animais têm demonstrado o efeito da inflamação intestinal sobre o plexo mioentérico, após a indução de colite com substâncias ácidas, como o Dinitrobenzeno sulfônico (DNBS) e o 2,4,6 Trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). O modelo de indução da colite

através da injeção de TNBS em solução de etanol é considerado eficiente e amplamente utilizado na literatura (JACOBSON ET AL., 1997, SANOVIC ET AL., 1999, POLI ET AL., 2001, BOYER ET AL., 2005, GULBRANSEN ET AL., 2012, WINSTON ET AL., 2013).

1.2 Sistema Nervoso Entérico

O trato gastrointestinal difere de outros órgãos periféricos, pois apresenta uma extensa rede intrínseca de neurônios, denominado Sistema Nervoso Entérico (SNE). Ainda que durante muitos anos o SNE foi definido como a porção pós-ganglionar da divisão parassimpática do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), atualmente, é reconhecido como um componente do SNA com função independente do Sistema Nervoso Central (SNC) (FURNESS, 2006). O controle da função gastrointestinal ocorre por meio de um sistema integrado, que envolve reflexos entéricos locais, reflexos que passam pelos gânglios simpáticos e reflexos que passam do intestino e voltam para o SNC (FURNESS ET AL., 2003, FURNESS 2012).

O SNE do trato gastrointestinal é formado por redes interconectadas ou plexos de neurônios, seus axônios e células gliais entéricas. Estima-se que o SNE em humanos seja formado por cerca de 400-600 milhões de neurônios, o que é superior ao aos gânglios simpáticos e parassimpáticos combinados e aproximadamente o mesmo número de neurônios presentes na medula espinhal. O SNE é responsável por diversas funções, como a motilidade intestinal, controle da secreção ácido gástrico, regulação de fluido através do epitélio, mudanças no fluxo sanguíneo local e interação com os sistemas endócrino e imune do intestino. As células gliais entéricas contribuem para a manutenção da integridade da barreira epitelial presente entre o lúmen do intestino e as células da parede intestinal (TOUMI ET AL., 2003, SAVIDGE ET AL., 2007, FURNESS 2012).

O SNE apresenta dois plexos ganglionares, o plexo mioentérico e o plexo submucoso (Figura 1).

Figura 1: Representação esquemática do SNE do intestino. Adaptado de FURNESS, 2012.

O plexo mioentérico (plexo de Auerbach) é encontrado entre a camada muscular longitudinal externa e a camada do músculo circular, estando presente em todo o trajeto do trato gastrointestinal, do esôfago ao reto. É formado por 3 componentes: o plexo primário, o secundário e o terciário (AUERBACH, 1864; LI, 1940; SCHABADASCH, 130A,B; STÖHR, 1930).

Diferente do plexo mioentérico, o plexo submucoso está presente somente nos intestinos delgado e grosso e é composto pelo plexo submucoso interno (plexo de Meissner), logo abaixo da mucosa; pelo plexo submucoso externo (plexo de Schabadasch ou de Henle), que fica junto a camada circular do músculo e o plexo intermediário, localizado entre os plexos submucosos interno e externo. O plexo submucoso difere do mioentérico também pelo tamanho da malha, gânglios menores e fibras interconectadas mais finas (GONIAEW, 1875; HENLE, 1871).

De modo geral, os plexos entéricos seguem um padrão ao longo do trato gastrointestinal, no entanto, podem ser observadas diferenças quanto a densidade e tamanho dos neurônios e forma dos gânglios em animais da mesma espécie e idades diferentes (MATINI ET AL., 1997, MCKEOWN ET AL., 2001, QU, THACKER ET AL., 2008), ou submetidos a condições experimentais como a inflamação (DE GIORGIO, GUERRINI ET AL., 2004, BOYER ET AL., 2005), desnutrição (CASTELUCCI ET AL., 2002, GOMES ET AL., 2006, GREGGIO ET AL., 2010, MISAWA ET AL., 2010, GIROTTI ET AL., 2013), isquemia (PAULINO ET AL., 2011, PALOMBIT ET AL., 2013) e obesidade (MIZUNO ET AL., 2012).

Os neurônios entéricos são classificados de acordo com sua morfologia, propriedades fisiológicas, marcações imunohistoquímica, estruturas que inervam, transmissores que utilizam

e conexões que recebem. Os neurônios entéricos podem ser divididos em neurônios motores, interneurônios e intrínsecos aferentes primários (IPANs), também denominados neurônios sensoriais intrínsecos (Figura 2) (FURNESS, 2006).

Figura 2: Representação esquemática dos tipos de neurônio do SNE. Adaptado de FURNESS, 2012.

Os neurônios motores podem ser classificados em neurônios excitatórios e inibitórios da musculatura lisa do intestino e neurônios secretomotores/vasodilatadores. Os neurônios excitatórios e inibitórios são encontrados no plexo mioentérico e estão relacionados com o controle da motilidade intestinal. Os neurônios secretomotores/vasodilatadores estão localizados no plexo submucoso e atuam na inervação da mucosa e regulam a secreção, absorção e fluxo sanguíneo (FURNESS 2000).

Os neurônios excitatórios estão presentes ao longo de todas as regiões do intestino, são predominantemente muscarínicos e reativos a Acetilcolina Transferase ChAT (LIPPI, ET AL., 1998). Os neurônios inibitórios são imunorreativos a enzima óxido nítrico sintase (NOS) e liberam NO com efeito relaxante. Embora evidências comprovem que o NO seja o neurotransmissor desses neurônios, sabe-se que não é único transmissor que age nesses neurônios (SANDERS ET AL., 1992, STARK; SZURSZEWSKI 1992).

Os neurônios secretomotores e vasomotores do plexo submucoso são responsáveis pela regulação do circuito reflexo local. Os neurônios secretomotores intestinais são classificados como colinérgicos, utilizando a ChAT como neurotransmissor primário, e não colinérgicos, que utilizam VIP (peptídeo intestinal vasoativo) ou um peptídeo relacionado (FURNESS 2000).

Os interneurônios são divididos em ascendentes (com direção oral) e descendentes (com direção anal). Os interneurônios ascendentes são colinérgicos, formam uma rede ao longo do

intestino e estão envolvidos nos reflexos propulsivos. Os interneurônios descendentes são classificados em 3 tipos, de acordo com seu código químico: ChAT, VIP e NOS, relacionados na motilidade reflexa local; ChAT e Somatostatina (SOM), envolvidos na condução dos complexos mioelétricos no intestino delgado; e ChAT e 5-Hidroxitriptamina (5-HT), relacionado a reflexos secretomotores e motilidade reflexa de maneira indireta (POMPOLO; FURNESS 1998, FURNESS 2000).

Os IPANs são neurônios sensoriais, encontrados nos plexos submucoso e mioentérico e que apresentam morfologia de neurônio Dogiel Tipo II. Distingue-se dos interneurônios e neurônios motores através de propriedades fisiológicas. É imunorreativo ao ChAT e a Calbindina (Calb) (KIRCHGESSNER ET AL., 1992, KUNZE ET AL., 1995, BERTRAND ET AL., 1997, KUNZE ET AL., 1998, KUNZE ET AL., 1999).

Aleksander Stanislavovic Dogiel (A. S. Dogiel) foi o primeiro a desenvolver uma classificação morfológica dos neurônios entéricos. Os critérios utilizados por Dogiel foram os comprimentos e formatos dos dendritos. Além disso, ele também utilizou o tamanho dos corpos celulares, a posição do núcleo e a localização dentro do núcleo (DOGIEL, 1899).

Os neurônios Dogiel Tipo 1, quando observados em preparados de membrana, são classificados como células achatadas, geralmente alongadas, semelhantes a uma estrela, apresentando de 4 a 20 dendritos e um axônio. Apresentam como característica marcante dendritos lamelares, que são achatados e se estendem a uma distância curta do corpo celular (DOGIEL, 1899; LAWRENTJE, 1929). Os interneurônios ascendentes e descendentes, e os neurônios motores inibitórios e excitatórios são classificados com morfologia Dogiel Tipo 1. Os neurônios com morfologia Dogiel Tipo II apresentam corpos celulares grandes e ovóides, com superfície lisa e núcleo excêntrico. Sua principal característica é a presença de diversos processos celulares longos, decorrentes diretamente do corpo celular nervoso ou de um único processo. Esses neurônios dão origem a extensas ramificações dentro do gânglio mioentérico e seus axônios sempre se projetam em direção a mucosa (BROOKES; COSTA 1990, BORNSTEIN, ET AL., 1991, BROOKES ET AL., 1991, BROOKES ET AL., 1992, COSTA ET AL., 1992, WATTCHOW ET AL., 1995, YOUNG; FURNESS 1995, YOUNG ET AL., 1995, PORTBURY ET AL., 1996, BROOKES ET AL., 1997, CLERC ET AL., 1998)

As células gliais entéricas estão presentes nos gânglios nervosos do trato gastrointestinal. As células gliais são conectadas por junções “gap”, dando a impressão de um entrelaçamento íntimo e complexo de neurônios e células gliais (GABELLA 1971). Devido a sua proximidade com os neurônios entéricos, essas células tem como função dar suporte aos neurônios. Estudos recentes demonstram que essas células também tem papel importante na homeostase neuronal,

na função imune, na neurotransmissão, na motilidade e nos processos inflamatórios. Além disso, as células gliais entéricas se distribuem nos gânglios entéricos de maneira que um déficit na sua função poderia afetar todo o desenvolvimento da arquitetura neuronal, bem como a coordenação da função (RUHL 2005, BASSOTTI ET AL., 2007, BASSOTTI ET AL., 2007).

Lesões no sistema nervoso resultam em ativação das células gliais (ENG ET AL., 1992, O'CALLAGHAN 1993). Essa ativação é sugerida como um mecanismo de sinalização, resultando em morte neuronal subsequente (GIULIA ET AL., 1994). Estudos demonstram que as células gliais entéricas tem papel em processos inflamatórios, como na doença de Crohn, devido a sua interação com linfócitos (HIRATA ET AL., 1986, KORETZ ET AL., 1987, GEBOES; COLLINS 1998, RUHL ET AL., 2001) e podem alterar o seu formato e número por área na inflamação (DA SILVA ET AL., 2015) e na isquemia e reperfusão intestinal et al (MAROSTI ET AL., 2015; MENDES ET AL., 2015). Acredita-se também, que assim como os astrócitos do SNC, as células da glia entérica participam ativamente na fisiologia sináptica, pois expressam receptores para neurotransmissores, enzimas, transportadores de receptação e degradação de enzimas e liberação de neurotransmissores (JESSEN; MIRSKY 1983, KIMBALL; MULHOLLAND 1996, ZHANG ET AL., 2003, RUHL 2005, AGULHON ET AL., 2008).

As células gliais podem ser identificadas por métodos imunohistoquímicos e são reativas a vimentina e proteína fibrilar glial ácida (GFAP) (JESSEN; MIRSKY 1983). O marcador S100 β , que é encontrado exclusivamente nesse tipo de células, também vem sendo utilizado (KRAMMER ET AL., 1994, HEIZMANN 2002).

1.3 Receptores Purinérgicos

Estima-se que o ATP participe de mais reações químicas que qualquer outra molécula, além da água. As primeiras descrições das ações fisiológicas do ATP foram feitas em 1929 por Drury e Szent-Györgyi. Eles demonstraram as potentes ações do ATP e da adenosina no coração e em vasos sanguíneos coronários. Desde então, diversos estudos demonstraram como o ATP afeta os mecanismos nervosos centrais e periféricos. Em 1963, Burnstock et al (BURNSTOCK, CAMPBELL ET AL., 1963) propuseram a existência de nervos autônomos que não eram adrenérgicos nem colinérgicos e que supriam o trato gastrointestinal. No entanto, ainda que o importante papel do ATP nos processos bioquímicos fosse reconhecido pelo meio científico, a ideia que um simples composto pudesse agir como mensageiro extracelular era considerada improvável (BURNSTOCK 2007).

As purinas (adenosina, adenosina difosfato-ADP e ATP) e as pirimidinas (uridina Difosfato – UDP e uridina trifosfato – UTP) extracelulares são moléculas sinalizadoras de grande importância e medeiam diversos efeitos biológicos (RALEVIC; BURNSTOCK 1998). Os compostos purinérgicos são liberados em grande quantidade por células danificadas ou em degeneração, particularmente sob condições traumáticas ou isquêmicas (FRANKE ET AL., 2006). Também podem ser liberados em vesículas, geralmente com outros neurotransmissores (BOARDER; HOURANI 1998). Os compostos purinérgicos têm efeito na função cardíaca, agregação plaquetária, tônus vascular (HUTTEMANN ET AL., 1984), atuam como fatores tróficos e reguladores da diferenciação celular, na fertilização e na embriogênese.

Estudos farmacológicos definiram uma primeira divisão dos receptores purinérgico em P1 (ativados pela adenosina) e P2 (ativados pelo ATP) (BURNSTOCK 1978). Estudos de estrutura molecular e mecanismos de transdução dividiram os receptores purinérgico do tipo P2 em duas grandes famílias: receptores P2X, ligados a canais iônicos e receptores P2Y, acoplados a proteína G (BURNSTOCK; KENNEDY 1985). Atualmente, essa nomenclatura é amplamente utilizada e sete tipos de receptores P2X (P2X1-7) são reconhecidos, assim como oito tipos de receptores P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14) (ABBRACCHIO; BURNSTOCK 1998, BURNSTOCK 2007).

Os receptores P2X caracterizam-se por duas regiões transmembrana, com os terminais N- e C- localizados na porção intracelular. A porção extracelular representa a maior porção da proteína e contém o sítio de ligação ao ATP e os sítios para antagonistas. Esses receptores têm de 359 a 595 aminoácidos, sendo o P2X7 o maior deles. Os receptores P2X estão acoplados a canais iônicos, que medeiam de maneira rápida e seletiva a entrada de cátions como sódio, potássio e cálcio. Esses receptores são encontrados em células musculares lisas, neurônios, células gliais e apresentam papel de mediador na neurotransmissão excitatória rápida no SNC e no Sistema Nervoso Periférico (RALEVIC; BURNSTOCK 1998, VOLONTE ET AL., 2012). Em relação ao SNE, os receptores purinérgicos estão amplamente distribuídos no trato gastrointestinal e mediam a sinalização nos neurônios entéricos e nas junções neuromusculares (BURNSTOCK 2014; BURNSTOCK, 2016; OCHOA-CORTES ET AL.; 2016; GRUBISIC E GULBRANSEN, 2017; CHAUDHURY ET AL., 2016).

CASTELUCCI et al (2002) demonstrou pela primeira vez a presença do receptor P2X2 em neurônios entéricos imunorreativos à NOS e a Calb. Conclui-se que o receptor P2X2 está presente em alguns tipos de neurônios entéricos, como os neurônios motores inibitórios, neurônios secretomotores não colinérgicos, IPANs e terminações aferentes vagais (CASTELUCCI et al., 2002). POOLE et al (2002), observou a presença do receptor purinérgico

P2X3 em neurônios motores inibitórios e nos neurônios secretomotores não colinérgicos (POOLE ET AL., 2002).

Mudanças nos padrões de expressão dos receptores P2X são frequentemente observadas em diferentes tecidos e tipos celulares, não somente como uma consequência de maturação e diferenciação, mas também de condições patológicas, como isquemia, hipóxia, inflamação e injúrias agudas no SNC. Acredita-se que os mecanismos purinérgicos podem estar envolvidos na etiologia de muitas doenças neurodegenerativas, por causa da grande liberação de ATP, adenosina e outros neurotransmissores. A relação entre as mudanças na expressão dos receptores P2 e a resposta específica dos diferentes tipos celulares envolvidos em processos de injúria é extremamente complexa e pode ter efeitos nocivos e/ou benéficos (POOLE ET AL., 2002, FRANKE ET AL., 2006, BURNSTOCK ET AL., 2011).

O receptor P2X7 é o maior entre os membros da família P2X e participa na regulação de diversos processos, como a permeabilidade células, apoptose e liberação de citocinas. Apresenta estrutura similar a outros receptores P2X, exceto pelo fato de ter a cadeia C-terminal intracelular mais longa do que os demais receptores (VOLONTE ET AL., 2012) (SURPRENANT ET AL., 1996, DI VIRGILIO ET AL., 1998). Este receptor é expresso em células hematopoiéticas, monócitos, macrófagos, micróglia, fibroblastos humanos (SOLINI ET AL., 1999, SOLINI ET AL., 2000), epitélio e bexiga humano (O'REILLY, 2001), uretra de humanos e ratos (SLATER ET AL., 2000, TASSELL ET AL., 2000), órgãos genitais masculinos de humanos e ratos (LEE ET AL., 2000), células do ducto e acinares da glândula parótida (LI ET AL., 2003).

Estudos imunohistoquímicos demonstram a expressão dos receptores P2X no sistema nervoso entérico de diversas espécies (VULCHANOVA ET AL., 1996, CASTELUCCI ET AL., 2002, GIARONI ET AL., 2002, POOLE ET AL., 2002, VAN NASSAUW ET AL., 2002, XIANG; BURNSTOCK 2004, XIANG; BURNSTOCK 2005, YU ET AL., 2010). YIANGOU et al (2001) observou o aumento da expressão do receptor P2X3 na Doença de Crohn (YIANGOU ET AL., 2001). A expressão de P2X7 foi estudada em neurônios entéricos de ratos submetidos a má nutrição e renutrição (MISAWA ET AL., 2010, GIROTTI ET AL., 2013) e isquemia (PALOMBIT ET AL., 2013). Além disso, também foi demonstrado a presença de P2X7 em células gliais entéricas de ratos. Em estudo recente, DA SILVA et al., (2015) demonstrou que a colite ulcerativa reduz a expressão de P2X7 nos neurônios do plexo mioentérico e a redução na densidade neuronal. Um estudo recente demonstrou que a inativação genética (animal nocaute) e química, com o uso de antagonistas resultam em redução

da inflamação em modelo animal de colite, no entanto aumentam a susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer (HOFMAN et al., 2015).

O *Brilliant Blue G* (BBG) se apresenta como o antagonista mais seletivo e potente para o receptor P2X7 (JIANG ET AL, 2000). A baixa toxicidade e a alta seletividade fazem desse composto um candidato ideal para bloquear os efeitos adversos da ativação do receptor P2X7 (JIANG ET AL., 2000, REMY ET AL., 2008). O BBG é reconhecido como um potente agente farmacológico, em especial no tratamento de patologias que envolvam morte neuronal. Estudos demonstram que a administração *in vivo* de BBG protege contra a morte neuronal em modelo de Doença de Alzheimer (RYU; MCLARNON 2008) e reduz a apoptose neuronal e déficit motor em modelo de Doença de Huntington (DIAZ-HERNANDEZ et al., 2009). Outro estudo ainda demonstrou que o BBG melhora a recuperação de lesões da medula espinhal e reduz a resposta inflamatória (PENG et al., 2009).

Este trabalho visa avaliar o efeito do BBG sobre as diferentes classes neuronais do plexo mioentérico após indução de colite ulcerativa e o efeito sobre o receptor P2X7 em diferentes classes neuronais e células gliais entéricas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho visa analisar os efeitos colite ulcerativa nos neurônios do plexo mioentérico do colo distal de ratos Wistar com o uso do antagonista do receptor P2X7, o *Brilliant Blue G*.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar a distribuição e expressão do receptor purinérgico P2X7;
- b) Verificar a dupla marcação dos neurônios imunorreativos ao receptor purinérgico P2X7 com a NOS e ChAT;
- c) Analisar a densidade dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7, à NOS, e a ChAT
- d) Analisar as áreas dos perfis, diâmetro máximo e mínimo dos neurônios imunorreativos à NOS e ChAT;
- f) Verificar a morfologia do colo distal.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados um total de 35 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com idade de 2 meses e peso entre 210 e 300g, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram alojados no Biotério do Departamento de Anatomia do ICB-USP e mantidos em condições de temperatura e umidade controladas e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à comida e água. Os animais foram divididos em 7 grupos experimentais: Controle, onde os animais não foram submetidos a nenhuma intervenção; Sham, onde os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos dos animais que desenvolvem colite, mas sem indução da doença; os grupos Colite, onde foi realizado o procedimento para indução da colite ulcerativa; e os grupos BBG (*Blue Brilliant Green*), onde foi realizado o procedimento para indução da colite ulcerativa seguido de tratamento com BBG.

3.2 Indução da Colite Ulcerativa

Os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de xilazina (10mg/kg), cetamina (50mg/kg) e acepromazina (2mg/kg) via subcutânea. A inflamação no intestino grosso foi induzida por meio da administração de ácido 2,4,6 Trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), 30mg em etanol 30%, no lúmen do colo distal, através de cânula de polipropileno. Nos animais Sham 24h e 7 dias, foi administrado veículo, seguindo o mesmo procedimento utilizado para indução da colite. Nos grupos Colite 24h foi injetada salina (0,9% de NaCl) por injeção subcutânea ou BBG (50mg/kg), 1 hora após a indução da colite. Nos grupos Colite 7 dias, foi injetada salina por injeção subcutânea (0,9% de NaCl) ou BBG (50mg/kg), 1 hora após a indução e nos 5 dias subsequentes. Os animais foram sacrificados 24h e 7 dias após a indução, em câmara de CO₂ (PENG et al., 2009; PALOMBIT et al. 2018). Os animais foram acompanhados diariamente no Biotério após os experimentos. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) (CEUA n° 1793240815).

3.3 Avaliação da Colite

Após o tecido ter sido coletado, foi feita análise macroscópica da lesão. A classificação da lesão foi feita segundo a classificação de Bell *et al* (1995), que desenvolveu uma escala para definir o grau da lesão (TABELA 1) (Bell et al., 1995).

Tabela 1: Grau de lesão no colo distal da colite ulcerativa.

Ausência de lesão	Sem pontos
Hiperemia, sem úlceras	1 ponto
Úlcera linear, sem inflamação significativa	2 pontos
Úlcera linear com inflamação em um local	3 pontos
Dois ou mais locais de ulceração/inflamação	4 pontos
Dois ou mais locais de ulceração e inflamação ou um local de ulceração/inflamação com extensão superior a 1cm do comprimento do colo	5 pontos
Se o dano abranger 2cm ao longo do comprimento do colo distal, a pontuação é aumentada em 1 ponto por centímetro adicional da lesão.	6-10 pontos

3.4 Preparação do material para imunohistoquímica

Os colos foram obtidos dos animais submetidos aos procedimentos descritos no item 3.2. Os segmentos do intestino grosso foram colocados em PBS 0,01M. Os segmentos foram limpos de seus conteúdos, abertos ao longo da borda mesentérica e colocados em balsas de madeiras com a mucosa voltada para baixo, e esticados por meio e alfinetes. A fixação foi realizada em solução 4% de paraformaldeído em 0,1M de tampão o fosfato de sódio, pH7,0, a 4°C, por uma noite. A seguir, os tecidos foram clareados através de 3 lavagens de 10 minutos cada, em dimetilsufóxido, seguido de 3 lavagens de 10 minutos cada em PBS. Os tecidos foram armazenados em PBS contendo sódio-ázida (0,1%) e mantidos a 4°C.

3.5 Método de Dupla Marcação com Imunofluorescência

Após a fixação e clareamento dos tecidos, o material foi seccionado em fragmentos de cerca de 1cm² com auxílio da lâmina de bisturi. Para o procedimento de dissecação, foi utilizado microscópio estereoscópico ZM800 Nikon, placa de petri para apoiar o tecido, duas pinças de ponta fina e bisturi. Para obtenção dos preparados de membrana, os tecidos foram dissecados em camadas, removendo as camadas mucosa, submucosa e a camada muscular, mantendo somente a camada muscular longitudinal com o plexo mioentérico.

O preparado de membrana foi cortado ao meio, resultando em 2 preparados por animal, de 0,5cm² cada. Foram utilizados 4 animais para cada um dos grupos: Controle, Sham 24, Colite 24 h, BBG 24h, Sham 7 dias, Colite 7 dias e BBG 7 dias, para cada imunoreatividade.

Os preparados de membrana foram imersos em solução de soro normal de cavalo 10% contendo 1,5% de Triton-X (Sigma), diluído em PBS, por 45 minutos, em temperatura ambiente. Na sequência, foram incubados em anticorpo primário (Tabela 2) por 24 horas, as 4°C. Após a incubação, os preparados de membrana foram lavados 3 vezes em PBS, por 10 minutos.

As duplas marcações foram obtidas usando as combinações de anticorpos primários do receptor purinérgico P2X7 com a NOS (marcador de neurônios inibitórios do plexo mioentérico) e ChAT (marcador de neurônios excitatórios do plexo mioentérico).

Tabela 2: Característica dos anticorpos primários

Antígeno	Hospedeiro	Diluição	Referência
Receptor P2X7	Coelho	1:200	Chemicon
NOS	Carneiro	1:1000	Chemicon
ChAT	Cabra	1:50	Chemicon

Após a incubação do anticorpo primário e lavagens em PBS, os tecidos foram incubados em anticorpos secundários (Tabela 3), por um hora, a temperatura ambiente e posteriormente lavados 3 vezes em PBS, por 10 minutos. A seguir, os tecidos foram incubados com DAPI, por 3 minutos em câmara escura, seguida de 3 lavagens em PBS, por 5 minutos. Os tecidos foram montados em lâmina com glicerol tamponado com tampão carbonato de cálcio 0,5M, pH 8,6 e mantidas protegidas da luz, a 4°C.

Tabela 3: Anticorpos secundários usados.

Anticorpo	Diluição	Referência
Burro anti-coelho IgG Alexa 488	1:500	Molecular Probes
Burro anti-carneiro IgG Alexa 594	1:100	Molecular Probes

3.6 Análises Qualitativas

Na análise qualitativa da imunoreatividade dos marcadores P2X7, NOS e ChAT no plexo mioentérico foi utilizado microscópio de fluorescência Nikon 80i, equipado com filtros para discriminar entre as fluorescência 488 (verde) e 594 (vermelho). Este microscópio de fluorescência utiliza o filtro 10 para 488 (450-490nm de filtro de excitação e 515-565nm para

emissão) e filtro 00 para 594 (530-585nm de filtro de excitação e 615nm de filtro para emissão). As imagens foram capturadas e analisadas pelo programa NIS Elements (Nikon, versão 5).

As preparações foram analisadas pelo microscópio Confocal de à Laser do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres/FMVZ, o LSM510 da Zeiss, equipado com três laser: Argônio 458, 488 e 514nm, Hélio/Neônio 543nm e Hélio/Neônio 633nm. As imagens estão em 512x512 pixels, em uma espessura de secção ótica de 0,5mm e foram processadas usando os programas de software LSM 5.0 (Zeiss) Corel Photo Paint e Corel.

3.7 Análises Quantitativas

3.7.1 Análise do Código Químico

Foram realizadas análises quantitativas do código químico dos neurônios imunorreativos ao receptor purinérgico P2X7 duplamente marcados com a NOS e ChAT. As análises também foram feitas através da dupla marcação dos preparados de membrana no microscópio de fluorescência Nikon 80i. Primeiro, os neurônios foram localizados pela presença do fluoróforo que marca um antígeno e então o filtro foi mudado para determinar se o neurônio era marcado ou não por um segundo antígeno, localizado por um segundo fluoróforo de cor diferente. Foram analisados 50 neurônios para cada marcador em um animal de cada grupo.

3.7.2 Análise da Densidade Neuronal

A obtenção da densidade dos neurônios (neurônios/cm²) imunorreativos ao receptor P2X7, NOS e ChAT no plexo mioentérico foi feita em aumento de 100x no microscópio de fluorescência Nikon 80i (área do campo microscópico 0,000379cm²) acoplado com filtros para discriminar as fluorescências 488 e 594. Foram feitas contagens do número de neurônios em 50 campos, em dois preparados de membrana de cada um dos 4 animais, dos grupos Controle, Sham 24 h, Colite 24 h, Sham 7 dias, Colite 7 dias, BBG 24h e BBG 7 dias.

3.7.3 Análise Morfométrica

Para obtenção da área do perfil do corpo celular, diâmetro máximo (DMáx) e diâmetro mínimo (DMín), foram fotografados 100 neurônios imunorreativos à NOS e ChAT de todos os grupos. As imagens foram obtidas pelo programa NIS Elements (Nikon) e a análise morfométrica foi no programa Image-Pro Plus 4.1.0.0.

3.8 Análise Histológica

Foram coletados segmentos do colo distal dos animais (n=4/grupo) dos grupos Controle, Sham 24 h e 7 dias, Colite 24 h, Colite 7 dias, BBG 24h e BBG 7 dias para análise histológica. Os tecidos foram lavados em PBS, abertos pela borda mesentérica, colocados em balsas de madeira com a mucosa virada para cima e fixados em paraformaldeído a 4%, por 24 horas. Os tecidos foram passados por uma série de concentrações crescentes de álcoois: 3 vezes em etanol absoluto, por 30 minutos cada, 1 vez em etanol 90% por 30 minutos, 1 vez em etanol 80% por 30 minutos e 1 vez em etanol 70% por 30 minutos; diafanizados em 3 séries de xilol, por 20 minutos cada e incluídos em parafina, 3 banhos de 30 minutos cada e inclusão no bloco. Em seguida, os tecidos foram cortados transversalmente em micrótomo, com uma espessura de 5µm e corados pelos métodos de Hematoxilina-Eosina (HE).

Foram realizadas análises qualitativas da camada longitudinal, plexo mioentérico, camada circular, plexo submucoso, lâmina própria e vilosidades na coloração de HE.

Os fragmentos dos colos distais dos animais utilizados para a análise histológica foram provenientes de colos distais de animais utilizados na imunohistoquímica.

3.9 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada comparando os grupos Controle, Sham, Colite 24 h, Colite 7 dias, BBG 24h e BBG 7 dias, verificando as variáveis da densidade neuronal (neurônios/cm²) e perfil neuronal (µm²).

Os dados foram comparados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Foi considerado o nível de significância $p < 0,05$.

4. Resultados

Os resultados apresentados são dos grupos Controle, Sham 24 h, Colite 24 h, BBG 24h, Sham 7 dias, Colite 7 dias e BBG 7 dias. As análises qualitativas e macroscópica do colo distal permitiram observar que os tecidos dos animais dos grupos Controle, Sham 24 horas e Sham 7 dias não apresentaram lesões, hiperemias e formação de úlceras (Segundo a Tabela do grau de lesão, Sem pontos). Os tecidos dos grupos Colite 24 horas apresentaram lesões, hiperemia, inflamação e presença de úlceras com extensão da lesão de 2 a 4 cm (Segundo a Tabela de lesão = 5 pontos). Os tecidos dos grupos BBG 24 apresentaram lesões, hiperemia, inflamação e presença de úlceras, porém em menor número e grau quando comparado ao grupo Colite (Segundo a Tabela de lesão = 3 pontos). Os animais do grupo Colite 7 dias apresentaram poucas lesões, leve hiperemia, sem sinal de inflamação ou úlceras (Segundo a Tabela de lesão = 2 pontos). Os tecidos do grupo BBG 7 dias não apresentaram alterações macroscópicas (Segundo a Tabela do grau de lesão, Sem pontos).

4.1 Análises dos Pesos dos Animais

Os ratos submetidos à colite não demonstraram diferenças de peso corporal antes e após a indução, e após os períodos de tratamento, quando comparado ao grupo Sham (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 – Peso dos animais em gramas (antes da indução e após a indução da colite) – Grupo 24 horas.

Grupos	Controle	Antes da Indução	Depois da Indução
Controle	275,0	-	-
Sham	-	267,5 ± 28,72	262,0 ± 6,27
Colite	-	267,5 ± 27,23	252,0 ± 18,77
BBG	-	271,0 ± 26,62	274,7 ± 34,78

Dados expressos em Média ± desvio padrão.

Tabela 5: Peso dos animais em gramas (antes da indução e após a indução) – Grupo 7 dias.

Grupos	Controle	Sham	TNBS	BBG
Controle	275,0	-	-	-
0h	-	280,0±24,8	293,7±31,9	266,2±17,9
24h	-	277,5±26,6	282,2±32,7	260,0±21,6
2 dias	-	276,2±21,3	277,5±35,7	253,7±11,0
3 dias	-	276,2±21,3	280,5±41,2	249,2±11,0
4 dias	-	278,7±19,3	277,5±34,4	256,7±4,7
5 dias	-	278,7±22,5	280,0±41,8	253,7±12,2
6 dias	-	288,7±26,5	301,5±37,5	257,5±12,5
7 dias	-	285,0±26,4	298,7±35,2	257,5±5,0

Dados expressos em Média ± desvio padrão.

4.2 Análise Qualitativa

4.2.1 Análise das imunorreatividades do receptor P2X7, da NOS e da ChAT

A expressão do receptor P2X7 foi analisada nos neurônios do plexo mioentérico, e observou-se que o receptor estava presente no citoplasma e na membrana celular em todos os grupos analisados (Fig. 3 e 4).

Os neurônios imunorreativos a NOS apresentaram a morfologia Dogiel Tipo I nos grupos Controle, Sham 24h, Colite 24h, BBG 24h, Sham 7 dias, Sham 7 dias, Colite 7 dias e BBG 7 dias. Não foi verificada alteração da imunorreatividade do NOS nos grupos estudados. Foi observado aumento na área dos neurônios com núcleos excêntricos nos grupos Colite 24 h e Colite 7 dias. No grupo BBG 24 h pareceu haver melhora da morfologia dos neurônios, similar ao grupo Sham (Fig. 3 e 4).

Os neurônios imunorreativos a ChAT apresentaram classificação morfológica Dogiel Tipo I nos grupos Controle, Sham 24h, Colite 24h, BBG 24h, Sham 7 dias, Colite 7 dias e BBG 7 dias. Não foi verificada alteração da imunorreatividade da ChAT nos grupos estudados. Foi observado aumento no tamanho dos neurônios com núcleos excêntricos no grupo Colite 24 h e Colite 7 dias. No grupo BBG 24 h e BBG 7 os neurônios pareceram com morfologias normais similares ao grupo Sham (Fig. 5 e 6).

Figura 3: Demonstra o plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Sham 24 horas (A, A', A''), Colite 24 horas (B, B', B'') e BBG 24 horas (C, C', C''). Neurônios imunorreativos a NOS (A, B, C), ao receptor P2X7 (A', B', C') e a tripla marcação dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7, a NOS e ao marcador nuclear DAPI. As setas indicam colocalização de neurônios ao NOS e ao receptor P2X7. Barra 50μm.

Figura 4: Demonstra o plexo do colo distal de ratos dos grupos Sham 7 dias (A, A', A''), Colite 7 dias (B, B', B'') e BBG 7 dias (C, C', C''). Neurônios imunorreativos a NOS (A, B, C), ao receptor P2X7 (A', B', C') e a tripla marcação dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7, a NOS e ao marcador nuclear DAPI. As setas indicam colocalização de neurônios ao NOS e ao receptor P2X7. Barra 50µm.

Figura 5: Demonstra o plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Sham 24 horas (A, A', A''), Colite 24 horas (B, B', B'') e BBG 24 horas (C, C', C''). Neurônios imunorreativos a ChAT (A, B, C), ao receptor P2X7 (A', B', C') e a tripla marcação dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7, a ChAT e ao marcador nuclear DAPI. As setas indicam colocalização de neurônios a ChAT e ao receptor P2X7. Barra 50µm.

Figura 6: Demonstra o plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Sham 7 dias (A, A', A''), Colite 7 dias (B, B', B'') e BBG 7 dias (C, C', C''). Neurônios imunorreativos a ChAT (A, B, C), ao receptor P2X7 (A', B', C') e a tripla marcação dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7, a ChAT e ao marcador nuclear DAPI. As setas indicam colocalização de neurônios a ChAT e ao receptor P2X7. Barra 50µm.

4.2.2 Análise da Histologia

A morfologia da parede intestinal foi analisada pelo método de HE. Os animais dos grupos Sham 24 h e Sham 7 dias não apresentaram alterações morfológicas aparentes. A parede intestinal apresentou-se com a mucosa revestida por epitélio com a presença de vilosidades e com as células caliciformes. As criptas intestinais mantiveram suas características em todos os grupos analisados. No grupo Colite 24 h, o topo das vilosidades estava danificado, e aparenta desorganização, como consequência da colite ulcerativa. A musculatura circular pareceu estar mais espessa (Fig. 7 e 8).

No grupo BBG 24h, a mucosa aparentaram estar mais conservadas e a mucosa apresentou aspecto mais organizado quando comparado ao grupo Colite 24h. Em comparação ao grupo Colite 24h, o grupo Colite 7 dias apresentou redução no dano as vilosidades, no entanto, as células da mucosa também apresentam-se de maneira desorganizada quando comparada ao grupo Sham 7 dias. A camada muscular também aparentou estar mais espessa. No grupo BBG 7 dias foi possível visualizar uma melhora na organização da camada da mucosa quando comparado ao grupo Colite 7 dias. Foi possível a visualização de gânglios mioentéricos em todos os grupos avaliados (Fig. 7 e 8).

Figura 7: Fotomicrografia demonstra secções coradas com hematoxilina e eosina, do colo distal de ratos nos grupos Sham 24h (A, A' e A''), Colite 24h (B, B', B'') e BBG 24h (C, C', C''). CM – camada muscular, LP – lâmina própria, GM – glândula da mucosa, PM – plexo mioentérico. Barras (A-C) 100µm, (A'-C') 50µm e (A''-C'') 10µm.

Figura 8: Fotomicrografia demonstra secções coradas com hematoxilina e eosina, do colo distal de ratos nos grupos Sham 7 dias (A, A' e A''), Colite 7 dias (B, B', B'') e BBG 7 dias (C, C', C''). CM – camada muscular, LP – lâmina própria, GM – glândula da mucosa, PM – plexo mioentérico. Barras (A-C) 100µm, (A'-C') 50µm e (A''-C'') 10µm.

4.3 Análises Quantitativas

4.3.1 Colocalização

Foi realizado o estudo de dupla marcação dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7 com a NOS e ChAT no colo distal de animais dos grupos Controle, Sham 24h, Colite 24h, BBG 24h, Sham 7 dias, Colite 7 dias e BBG 7 dias. Os resultados estão demonstrados nas Tabelas 6 e 7.

Os neurônios imunorreativos NOS colocalizaram 100% com neurônios imunorreativos para o receptor P2X7 em todos os grupos estudados. Por outro lado, o receptor P2X7 colocalizou 20% no grupo controle, 14% no Sham 24 h, 8% no Colite 24 h, 18% no BBG 24 h, 20% no Sham 7 dias, 10% no Colite 7 dias e 14% no BBG 7 dias (Tabela 6).

Tabela 6: Dupla marcação dos neurônios imunorreativos a NOS e ao receptor P2X7 nos grupos Controle, Sham 24h, Colite 24h, BBG 24h, Sham 7 dias, Colite 7 dias e BBG 7 dias.

<i>Grupos</i>	<i>NOS/P2X7</i>	<i>NOS/-</i>	<i>P2X7/NOS</i>	<i>P2X7/-</i>
Controle	100%	0%	20%	80%
Sham 24h	100%	0%	14%	86%
Colite 24h	100%	0%	8%	92%
BBG 24h	100%	0%	18%	82%
Sham 7 dias	100%	0%	20%	80%
Colite 7 dias	100%	0%	10%	90%
BBG 7 dias	100%	0%	14%	86%

Os neurônios imunorreativos ChAT colocalizaram 100% com neurônios imunorreativos para o receptor P2X7 em todos os grupos estudados. Por outro lado, os neurônios P2X7 colocalizaram 38% no grupo controle, 34% no Sham 24 h, 30% no Colite 24 h, 34% no BBG 24 h, 26% no Sham 7 dias, 14% no Colite 7 dias e 30% no BBG 7 dias (Tabela 7).

Tabela 7: Dupla marcação dos neurônios imunorreativos a ChAT e ao receptor P2X7 nos grupos Controle, Sham 24h, Colite 24h, BBG 24h, Sham 7 dias, Colite 7 dias e BBG 7 dias.

<i>Grupos</i>	<i>ChAT/P2X7</i>	<i>ChAT/-</i>	<i>P2X7/ChATir</i>	<i>P2X7/-</i>
Controle	100%	0%	38%	62%
Sham 24h	100%	0%	34%	66%
Colite 24h	100%	0%	30%	70%
BBG 24h	100%	0%	34%	66%
Sham 7 dias	100%	0%	26%	74%
Colite 7 dias	100%	0%	14%	86%
BBG 7 dias	100%	0%	30%	70%

4.3.2 Densidade Neuronal

Ao analisar a densidade neuronal, foi observada nos neurônios receptor P2X7-ir uma diminuição significativa de 37% e 24 % no grupo Colite 24h quando comparado aos grupos Controle e Sham 24h, respectivamente ($p < 0,05$). Houve um aumento significativo de 18% dos neurônios receptor P2X7-ir no grupo BBG 24 h quando comparado ao grupo Colite 24 h ($p < 0,05$). No grupo de 7 dias, houve uma diminuição significativa de 31% e 13% no grupo Colite 7 dias quando comparado aos grupos controle e Sham 7 dias, respectivamente ($p < 0,05$). Foi observado um aumento significativo de 8% no grupo BBG 7 dias quando comparado ao grupo Colite 7 dias ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos Sham 24 h, BBG 24h, Sham 7 dias e o grupo BBG 7 dias ($p > 0,05$) (Fig. 9).

Figura 9. Histograma da densidade de neurônios imunorreativos ao receptor P2X7 nos grupos Controle, Sham 24 h, Colite 24 h, BBG 24 h, Sham 7 dias, Colite 7 dias e BBG 7 dias. Os dados são média $\pm$ erro padrão. (* comparado aos grupos Controle e Sham 24 h, ** comparado ao grupo Colite 24 h; α comparado ao grupo Sham 7 dias, # comparado ao grupo Colite 7 dias (*, **, α , # $p < 0,05$).

Ao analisar a densidade neuronal dos neurônios NOS-ir, foi observada uma diminuição significativa de 25 % e 12% no grupo Colite 24h quando comparado aos grupos Controle e Sham, respectivamente ($p < 0,05$). Houve um aumento significativo de 28% de neurônios NOS-ir no grupo BBG 24 h quando comparado ao grupo Colite 24 h ($p < 0,05$). No grupo de 7 dias, houve aumento significativo de 16% no grupo Colite 7 dias quando comparado ao grupo Colite 24 h e uma diminuição de 13% no grupo BBG 7 dias quando comparado ao grupo BBG 24 h. Não houve diferença significativa entre os grupos Controle, Sham 24 h e Sham 7 dias ($p > 0,05$) (Fig. 10).

Figura 10. Histograma da densidade de neurônios imunorreativos ao NOS nos grupos Controle, Sham 24 h, Colite 24 h, BBG 24 h, Sham 7 dias, Colite 7 dias e BBG 7 dias. Os dados são média $\pm$ erro padrão. (* comparado ao grupo Controle e Sham 24 h; ** comparado ao grupo Colite 24 h; α comparado ao grupo Sham 7 dias; # comparado ao grupo Colite 7 dias; *, **, α, # $p < 0,05$).

Ao analisar a densidade neuronal, foi observada nos neurônios ChAT-ir uma diminuição significativa de 43% e 21 % no grupo Colite 24h quando comparado aos grupos Controle e Sham 24h, respectivamente ($p<0,05$). Houve um aumento significativo de 25% dos neurônios ChAT-ir no grupo BBG 24 h quando comparado ao grupo Colite 24 h ($p<0,05$). No grupo de 7 dias, houve uma diminuição significativa de 44% no grupo Colite 7 dias quando comparado ao grupo Sham 7 dias, um aumento significativo de 38% no grupo BBG 7dias quando comparado ao grupo Colite 7 dias ($p<0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos Sham 24 h e BBG 24h, e entre os grupos Sham 7 dias e o grupo BBG 7 dias ($p>0,05$) (Figura 11).

Figura 11. Histograma da densidade de neurônios imunorreativos ao ChAT nos grupos Controle, Sham 24 h, Colite 24 h, BBG 24 h, Sham 7 dias, Colite 7 dias e BBG 7 dias. Os dados são média $\pm$ erro padrão. (* comparado ao grupo Controle e Sham 24 h; ** comparado ao grupo Colite 24 h; α comparado ao grupo Sham 7 dias; # comparado ao grupo Colite 7 dias; *, **, α, # $p<0,05$).

4.3.3 Morfometria

A análise do perfil, diâmetro máximo e mínimo dos neurônios NOS e ChAT foi realizada para determinar alterações nas áreas dos perfis nessas classes neuronais.

A análise das áreas dos neurônios NOS-ir no grupo controle apresentou uma média de 404,20 μm^2 no grupo Controle, uma média de 422,39 μm^2 no grupo Sham 24h, uma média de 410,98 μm^2 no grupo Colite 24h, uma média de 430,64 μm^2 no grupo BBG 24h. No grupo Sham 7 dias a média foi de 458,13 μm^2 , no grupo Colite 7 dias a média foi de 571,50 μm^2 e no grupo BBG 7 dias foi de 455,54 μm^2 (Fig. 12A).

Quando analisados do diâmetro máximo (DMax) e mínimo (DMin) foi encontrado um valor de 34,94 e 14,92 μm , respectivamente, no grupo Controle, de 34,90 e 15,34 μm no grupo Sham 24h, 33,67 e 15,67 μm no grupo Colite 24h e 35,11 e 15,74 μm no grupo BBG 24h. No grupo Sham 7 dias foi encontrado o valor de 35,54 e 16,38 μm , no grupo Colite 7 dias 41,18 e 18,26 μm e no grupo BBG 7 dias foi de 35,42 e 15,59 μm (Fig. 12 B, C).

Com relação a área do perfil neuronal dos neurônios NOS-ir houve diferença significativa com um aumento de 21% no grupo colite de 7 dias quando comparado ao grupo Sham 7 dias e uma diminuição de 17% do perfil neuronal do grupo BBG 7 dias quando comparado ao grupo Colite 7 dias ($p<0,05$) (Fig. 12A).

Com relação ao DMax e DMin dos neurônios NOS-ir houve diferença significativa com um aumento de 14% e 11%, respectivamente, no grupo colite 7 dias quando comparado ao grupo Sham 7 dias ($p<0,05$) (Fig. 12 B, C).

Figura 12. Histograma da área do perfil neuronal (A) e dos diâmetros máximo (DMAX) (B) e mínimo (DMIN) (C) dos neurônios imunorreativos ao NOS nos grupos Controle, Sham 24 h, Colite 24 h, BBG 24 h, Sham 7 dias, Colite 7 dias e BBG 7 dias. Os dados são média $\pm$ erro padrão. (* comparado ao grupo Sham e BBG de 7 dias; * $p < 0,05$).

A análise das áreas dos neurônios ChAT-ir no grupo controle apresentou uma média de $361,32 \mu\text{m}^2$ no grupo Controle, uma média de $413,36 \mu\text{m}^2$ no grupo Sham 24h, uma média de

377,26 μm^2 no grupo Colite 24h, uma média de 354,19 μm^2 no grupo BBG 24h. No grupo Sham 7 dias a média foi de 359,06 μm^2 , no grupo Colite 7 dias a média foi de 418,22 μm^2 e no grupo BBG 7 dias foi de 415,84 μm^2 (Fig. 13 A).

Quando analisados do diâmetro máximo (DMax) e mínimo (DMin) foi encontrado um valor de 26,12 e 19,27 μm , respectivamente, no grupo Controle, de 28,65 e 17,42 μm no grupo Sham 24h, de 27,20 e 16,89 μm no grupo Colite 24h 21,43 e 21,37 μm e no grupo BBG 24h. No grupo Sham 7 foi encontrado o valor de 26,12 e 19,27, no grupo Colite 7 dias 30,64 e 16,32 e no grupo BBG 7 dias foi de 26,12 e 19,27 (Fig. 13B, C).

Com relação a área do perfil neuronal dos neurônios ChAT-ir houve diferença significativa com uma diminuição de 8,7% no grupo Colite 24h quando comparado ao grupo Sham 24h. No grupo de 7 dias, houve diferença significativa com um aumento do perfil neuronal de 16% do grupo Colite quando comparado ao grupo Sham ($p < 0,05$) e diminuição de 6,4% no grupo BBG quando comparado ao grupo Colite ($p < 0,05$) (Fig. 13 A).

Figura 13. Histograma da área do perfil neuronal (A) e dos diâmetros máximo (DMAX) (B) e mínimo (DMIN) (C) dos neurônios imunorreativos a ChAT nos grupos Controle, Sham 24 h, Colite 24 h, BBG 24 h, Sham 7 dias, Colite 7 dias e BBG 7 dias. Os dados são média $\pm$ erro padrão. (* comparado ao grupo Sham 24 h; α comparado ao grupo Sham 7 dias e # comparado ao grupo colite de 7 dias; *, α , # $p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

5.1 Considerações Gerais da colite no colo distal

A colite ulcerativa caracteriza-se como uma inflamação limitada ao colo, normalmente iniciando no reto e espalhando de maneira contínua. Conforme descrito na literatura, a colite ulcerativa apresenta inflamação superficial, limitada as regiões da mucosa e submucosa, associada a criptite e abscessos crípticos (SARTOR, 2006; KHOR et al., 2011; DA SILVA et al., 2015, 2017). Em nosso estudo, os tecidos do grupo Colite 24 horas apresentaram lesões, hiperemia, inflamação e presença de úlceras com extensão da lesão de 2 a 4 cm. Os animais do grupo Colite 7 dias apresentaram poucas lesões, leve hiperemia, sem sinal de inflamação ou úlceras. Em comparação, os animais dos grupos Controle e Sham (24 horas e 7 dias) não apresentaram alterações macroscópicas. Os tecidos dos grupos BBG 24 apresentaram lesões, hiperemia, inflamação e presença de úlceras, porém em menor número e grau quando comparado ao grupo Colite. Os tecidos do grupo BBG 7 dias não apresentaram alterações macroscópicas. Foi observado resultados semelhantes em tecidos submetidos a colite (Da Silva et al., 2015).

A inflamação intestinal, seja ela causada por infecções ou por resposta imune anormal podem levar ao processo de neuroplasticidade, ou seja, alterações que resultam em mudanças estruturais, intrínsecas e sinápticas que alteram a função neuronal (VILLANACCI et al., 2008; BRIERLEY e LINDEN, 2014). Em relação ao peptídeo intestinal vasoativo, nenhuma tendência clara foi identificada (NEUNLIST et al., 2003).

Estudos em modelos animais têm demonstrado o efeito da inflamação intestinal sobre o plexo mioentérico, após a indução de colite com substâncias ácidas, como o Dinitrobenzeno sulfônico (DNBS) e o 2,4,6 Trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). O modelo de indução da colite através da injeção de TNBS em solução de etanol é considerado eficiente e amplamente utilizado na literatura (JACOBSON et al., 1997, SANOVIC et al., 1999, POLI et al., 2001, BOYER et al., 2005, GULBRANSEN et al., 2012, WINSTON et al., 2013). Um estudo em cobaias demonstrou que os danos no colo são maiores nas primeiras 12 horas após administração de TNBS, se mantendo significativamente durante seis dias (LINDEN et al., 2005). O protocolo utilizado no presente trabalho com o TNBS foi eficiente na produção da colite.

5.2 Considerações sobre o Código Químico e a Expressão do Receptor P2X7.

O código químico nos neurônios entéricos tem sido particularmente importante para o entendimento dos aspectos funcionais de cada neurônio entérico e do funcionamento do sistema gastrointestinal. Para a marcação de neurônios motores inibitórios no plexo mioentérico, utilizou-se a NOS e para neurônios motores excitatórios, utilizou-se a ChAT.

Os neurônios que contem a enzima NOS atuam diretamente na função motora inibitória do intestino porque o óxido nítrico representa o principal mediador do relaxamento do músculo liso presente na parede intestinal (NICHOLS et al., 1992; AIMI et al., 1993). Nos neurônios entéricos de ratos e humanos, a NOS é frequentemente localizada junto com outros dois neurotransmissores inibitórios, o VIP e o GABA (NICHOLS et al., 1992; AIMI et al., 1993). Raramente é observado a colocalização de NOS com ChAT no plexo mioentérico de ratos, camundongos ou cobaias, devido a existência de populações distintas de neurônios mioentéricos inibitórios e excitatórios (SCHEMANN e SCHAAF, 1995; MANN et al., 1999). Dados obtidos em cobaias demonstram que neurônios imunorreativos a NOS, que também são imunorreativos a ChAT representam os interneurônios (LI e FURNESS, 1998).

Diversos estudos demonstraram que os neurônios NOS-ir detectados no plexo mioentérico de ratos apresentam morfologia do tipo Dogiel I (NICHOLS et al., 1992; AIMI et al., 1993; EKBLAD et al., 1994; EKBLAD et al., 1994; JARVINEN et al., 1999). Em nosso estudo, observamos que os neurônios NOS-ir apresentam morfologia Dogiel Tipo I em todos os grupos analisados e não foi observada alteração da intensidade entre os grupos Controle, Sham, Colite e BBG, nos períodos 24 horas e 7 dias.

A acetilcolina é o principal neurotransmissor do trato gastrointestinal e está relacionado com a regulação neural da motilidade e secreção (FURNESS, 2006). Estudos demonstram que a proporção de neurônios ChAT-ir diminui cerca de 41% em áreas não-inflamadas e até 30% em áreas inflamadas quando comparadas com o tecido controle. Em nosso estudo, observamos marcação homogênea de ChAT no citoplasma dos neurônios, com intensidade variando de fraca a intensa, resultados semelhantes foram observados no SNE de cobaias (LI e FURNESS, 1998; CHIOCCHETTI et al., 2003) e equinos (FREYTAG et al., 2008).

Estudos imunohistoquímicos demonstram a expressão dos receptores P2X7 no sistema nervoso entérico de (HU et al., 2001). Yiangou e col. (2001) observaram o aumento da expressão do receptor P2X3 na Doença de Crohn. Em nosso estudo, observamos imunoreatividade do receptor P2X7 nas células do plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos analisados. No grupo Colite, a intensidade da expressão do receptor estava

diminuída quando comparada ao grupo Controle, Sham e BBG. Observamos também uma redução no número de células imunorreativas ao receptor P2X7 nos grupos Colite 24 horas e Colite 7 dias, quando comparado aos grupos Controle, Sham 24h e Sham 7 dias. Estes dados corroboram com Da Silva et al. (2015) que observaram na colite a diminuição de células positivas ao receptor P2X7.

O método de imunohistoquímica mostrou-se uma boa ferramenta para avaliar alterações no sistema nervoso entérico que ocorrem durante o processo da colite (BELAI e BURNSTOCK, 1999). Este método permite fazer a colocalização de diferentes neurotransmissores dentro de um único neurônio, sendo possível avaliar o código químico de uma população neuronal.

Nesse trabalho, avaliamos a dupla marcação dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7 com a NOS e ChAT no plexo mioentérico do colo distal. Os neurônios imunorreativos NOS e ChAT colocalizaram 100% para o receptor P2X7 em todos os grupos estudados. Por outro lado, observamos uma redução na colocalização de P2X7 no grupo Colite 24 horas e Colite 7 dias, quando comparado aos grupos Controle, Sham 24h e Sham 7 dias. Nos grupos tratados, BBG 24h e BBG 7 dias, foi observado aumento no número de células em relação ao grupo Colite. Este resultado está de acordo com os dados obtidos na contagem da densidade neuronal, apresentados adiante. Alterações em colocalizações do receptor P2X7 no plexo mioentérico foram observados em protocolos de colite e isquemia e reperfusão (PALOMBIT et al., 2013; DA SILVA et al., 2015)

A expressão de P2X7 foi estudada em neurônios entéricos de ratos submetidos a desnutrição e renutrição (MISAWA et al., 2010; GIROTTI et al., 2013) e isquemia (PALOMBIT et al., 2013; MAROSTI et al., 2015). Além disso, também foi demonstrada a presença de P2X7 em células gliais entéricas de ratos (MENDES et al., 2015). Da Silva et al. (2015) demonstraram que a colite ulcerativa reduz a expressão de P2X7 nos neurônios do plexo mioentérico e a redução na densidade neuronal. Um estudo demonstrou que a inativação genética (animal nocaute) e química, com o uso de antagonistas resultam em redução da inflamação em modelo animal de colite, no entanto aumentam a susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer (HOFMAN et al., 2015).

As mudanças na expressão dos receptores purinérgicos nos neurônios são frequentemente observadas não somente como uma consequência da maturação neuronal e diferenciação, mas também após diferentes injúrias agudas no SNC, como isquemia, hipóxia, estresse mecânico e inflamação. Os mecanismos purinérgicos podem estar envolvidos na etiologia de muitas condições neurodegenerativas, especialmente por causa da grande

liberação extracelular de ATP (FRANKE et al., 2006). Outros trabalhos avaliando o sistema entérico após evento de isquemia e reperfusão observaram resultados semelhantes na diminuição de neurônios P2X imunorreativos (PAULINO et al., 2011; PALOMBIT et al., 2013).

O BBG é um derivado do corante alimentar FD&C número 1, e não em toxicidade conhecida, exceto para a potenciação da acidose metabólica em paciente sépticos (PENG et al., 2009). Estudos do laboratório demonstraram que a injeção subcutânea do antagonista do receptor P2X7, o BBG, reduziu os efeitos da isquemia intestinal nos neurônios entéricos de ratos (PALOMBIT et al., 2013).

Nesse estudo, avaliamos o efeito do uso do BBG no tratamento da colite ulcerativa e observamos a recuperação dos neurônios entéricos.

5.3 Considerações sobre a Densidade Neuronal.

Diversos estudos têm demonstrado alterações na densidade neuronal, como os trabalhos de desnutrição/renutrição, obesidade e isquemia e reperfusão (MISAWA et al., 2010; PAULINO et al., 2011; MIZUNO et al., 2012, 2014; GIROTTI et al., 2013; PALOMBIT et al., 2013; MENDES et al., 2015). Em relação às doenças inflamatórias, a secreção e motilidade intestinal são dependentes da atividade dos neurônios entéricos e a redução no número desses neurônios pode resultar em disfunção intestinal (GUBRANSEN et al., 2012).

Quanto à densidade neuronal, foi observado nos neurônios NOS-ir uma diminuição no grupo Colite 24h e houve um aumento significativo de 28% de neurônios NOS-ir no grupo BBG 24 h. No grupo de 7 dias, houve aumento significativo de 8% no grupo Colite 7 dias quando comparado ao grupo Colite 24 h e uma diminuição significativa de 12% no grupo BBG 7 dias quando comparado ao grupo BBG 24 h. Resultados semelhantes foram observados em modelo de isquemia e reperfusão intestinal tratados com BBG (Palombit et al., 2018). No entanto, um estudo feito em cobaias, demonstrou aumento no número de neurônios NOS-ir após indução de colite, nos períodos de 24 horas e 72 horas, assim como em estudos experimentais de colite e estudos da Doença de Chron em humanos (GEOBEOS et al., 1998; GULBRANSEN et al., 2012).

Com relação a densidade neuronal, foi observada nos neurônios ChAT-ir uma diminuição significativa de 43% e 21 % no grupo Colite 24h quando comparado aos grupos Controle e Sham 24h, respectivamente. Houve um aumento significativo de 25% dos neurônios ChAT-ir no grupo BBG 24 h quando comparado ao grupo Colite 24 h. No grupo de 7 dias,

houve uma diminuição significativa de 80% no grupo Colite 7 dias quando comparado ao grupo Sham 7 dias, um aumento significativo de 38% no grupo BBG 7dias quando comparado ao grupo Colite 7 dias. Estudos anteriores do laboratório em colite apresentaram estudos semelhantes nos animais Colite 24h (DA SILVA et al., 2015). Além disso, estudo feito em cobaias também demonstrou redução no número de neurônios colinérgicos (BOYER et al., 2005; WINSTON et al., 2013; STAVELY et al., 2015).

Alterações no código químico dos neurônios entéricos estão associados com alterações na coordenação da contração muscular e perda de motilidade em modelos animais e humanos (WOOD, 2007; SUPPLY et al., 2012; WINSTON et al., 2013).

Um dos processos que podem ocasionar a perda de neurônios é a necrosa, no qual as células sofrem um dano que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade de membrana e ruptura celular. Durante esse processo, o conteúdo celular é liberado e causa danos às células vizinhas, o que acaba gerando uma reação inflamatória local. O processo de apoptose também poderia explicar a perda neuronal durante o processo da colite ulcerativa. Trata-se de um fenômeno rápido, onde ocorre retração da células, resultando em perda de aderência a matrix extracelular (ZIEGLER e GROSCURTH 2004).

Os mecanismos da perda neuronal durante o processo da colite ainda não foram completamente esclarecidos, mas estudos indicam que a infiltração de neutrófilos e eosinófilos possa estar envolvida (LINDEN et al., 2005).

5.4 Considerações sobre Perfil Neuronal

A avaliação de alterações morfométricas (medida da área do perfil celular) tem sido amplamente estudada em diversos protocolos experimentais. Estudos demonstraram que ratos submetidos à dieta autoclavada durante a gestação, lactação e pós-desmame não sofrem alteração no número de neurônios reativos a NADH-diaforase no jejuno, no entanto, a área do corpo do celular está reduzida quando comparada a animais submetidos a dieta não autoclavada, sugerindo que esses neurônios podem apresentar atividade metabólica inferior (GONCALEZ et al., 2011).

Outros estudos em desnutrição e renutrição demonstraram que neurônios mioentéricos do intestino grosso de ratos reativos a NADH-diaforase sofreram redução de 15% no tamanho da área (CASTELUCCI et al., 2002a). A diminuição na área do perfil de diferentes classes neuronais nos plexos mioentérico e submucosa também foi observada em protocolo de

desnutrição e isquemia e reperfusão (MISAWA et al., 2010; PAULINO et al., 2011; GIROTTI et al., 2013; PALOMBIT et al., 2013; MAROSTI et al., 2015). Por outro lado, experimentos em obesidade demonstraram aumento nos neurônios imunorreativos a ChAT e a Calr (MIZUNO et al., 2014, 2016).

No presente trabalho, a análise do perfil, diâmetro máximo e mínimo dos neurônios NOS e ChAT foi realizada para determinar alterações nas áreas dos perfis nessas classes neuronais. Em relação os neurônios nitrérgicos e colinérgicos, os animais do grupo Colite apresentaram um aumento, e recuperação nos tratados com BBG. O aumento da área do perfil neuronal poderia ser explicado como mecanismo compensatório devido a morte neuronal no grupo Colite. Os autores Da Silva et al. (2015) observaram alterações nos perfis neuronais de grupo submetido a colite com 24 horas do plexo mioentérico.

A importância deste trabalho está em demonstrar que a colite ulcerativa afeta de maneira diferenciada as diferentes classes neuronais, que expressam o receptor P2X7. Além disso, o tratamento com BBG demonstrou ser efetivo na recuperação dos neurônios mioentéricos, sendo assim, demonstra que o receptor P2X7 pode ser um possível alvo terapêutico no tratamento da colite ulcerativa.

6 CONCLUSÕES

- 1) A indução da colite ulcerativa no colo distal foi efetiva, apresentando hiperemia, aumento da lâmina própria e formação de úlceras. O uso do BBG foi efetivo na diminuição das alterações macroscópicas da colite ulcerativa.
- 2) O receptor P2X7 estava presente nas células entéricas do plexo mioentérico do colo distal em todos os grupos avaliados.
- 3) Nos grupos Colites houveram reduções nas densidades neuronais e nos grupos tratados com BBG houve recuperação da densidade neuronal.
- 4) Nos grupos Colites apresentaram redução na área do perfil neuronal de ChAT-ir e aumento na área do perfil neuronal de NOS-ir, respectivamente, e houve recuperação das áreas com o uso do BBG.
- 5) O uso do antagonista BBG foi efetivo na recuperação dos neurônios entéricos na colite ulcerativa experimental.

7. REFERÊNCIAS

- ABBACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signaling; pathophysiological roles. *Jpn. J. Pharmacol.*, v. 78, p. 113-145, 1998.
- AGULHON, C., J. PETRAVICZ, A. B. MCMULLEN, E. J. SWEGER, S. K. MINTON, S. R. TAVES, K. B. CASPER, T. A. FIACCO; K. D. MCCARTHY. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 59(6): 932-946, 2008
- AHMAD, T., C. P. TAMBOLI, D. JEWELL; J. F. COLOMBEL. Clinical relevance of advances in genetics; pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology* 126(6): 1533-1549, 2004.
- AIMI, Y.; KIMURA, H.; KINOSHITA, T.; MINAMI, Y.; FUJIMURA, M.; VINCENT, S. R. Histochemical localization of nitric oxide synthase in rat enteric nervous system. *Neuroscience*, v. 53, p. 553-560, 1993. [doi:10.1016/0306-4522\(93\)90220-A](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90220-A)
- AMBACHE, N. Unmasking, after cholinergic paralysis by botulinum toxin, of a reversed action of nicotine on the mammalian intestine, revealing the probable presence of local inhibitory ganglion cells in the enteric plexuses. *Br. J. Pharmacol.*, v. 6, p. 51-67, 1951.
- ANDERSSON, R. E., G. OLAISON, C. TYSK; A. Ekbom. Appendectomy; protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 344(11): 808-814, 2001
- ANIWAN S, PARK SH, LOFTUS EV JR. Epidemiology, natural history, and risk stratification of Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2017;46(3):463-480.
- AUERBACH, L. Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. *Arch Pathol Anat Physiol.*, v.30, p.457-460, 1864.
- BASSOTTI, G.; VILLANACCI, V.; ANTONELLI, E.; MORELLI, A.; SALERNI, B. Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? *Laboratory Investigation*, v. 87, p. 628-632, 2007b.
- BASSOTTI, G.; VILLANACCI, V.; FISOGNI, S.; ROSSI, E.; BARONIO, P.; CLERICI, C.; MAURER, C. A.; CATHOMAS, G.; ANTONELLI, E. Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: Introducing the neuro-gliopathies. *World J. Gastroenterol.*, v. 13, n. 30, p. 4035-4041, 2007.
- BASSOTTI, G.; VILLANACCI, V.; MAURER, C. A.; FISOGNI, S.; DI FABIO, F.; CADEI, M.; MORELLI, A.; PANAGIOTIS, T.; CATHOMAS, G.; SALERNI, B. The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation. *Gut*, v. 55, p. 41-46, 2008.
- BELAI, A.; BURNSTOCK, G. Distribution and colocalization of nitric oxide synthase and calretinin in myenteric neurons of developing, aging, and Crohn's disease human small intestine. *Dig. Dis. Sci.*, v. 44, p. 1579-1587, 1999. [doi:10.1023/A:1026658826010](https://doi.org/10.1023/A:1026658826010)
- BELL, C. J., GALL, D.G., WALLACE, J. L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* 1995; v. 268 p. G622-630.

BERTRAND, P. P.; KUNZE, W. A. A.; BORNSTEIN, J. C.; FURNESS, J. B.; SMITH, M. L. Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am. J. Physiol.*, v. 273, p. G422-G435, 1997.

BJORCK, S., E. JENNISCHE, A. DAHLSTROM; H. AHLMAN. Influence of topical rectal application of drugs on dextran sulfate-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 42(4): 824-832, 1997.

BOARDER, M. R.; HOURANI, S. M. O. The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 19, p. 99-107, 1999.

BORNSTEIN, J. C.; HENDRIKS, R.; FURNESS, J. B.; TRUSSELL, D. C. Ramifications of the axons of AH-neurons injected with the intracellular marker biocytin in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *J. Comp. Neurol.*, v. 314, p. 437-451, 1991.

BOYER, L.; GHOREISHI, M.; TEMPLEMAN, V.; VALLANCE B.,A., BUCHAN, A.,M., JEVON, G.; JACOBSON. K. Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. *Auton Neurosc.*, v. 117, p. 41-53, 2005.

BRIERLEY, S. M.; D. R. LINDEN (2014). Neuroplasticity; dysfunction after gastrointestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11(10): 611-627, 2014.

BROOKES, S. J.; COSTA, M. Identification of enteric motor neurones which innervate the circular muscle of the guinea pig small intestine. *Neurosci. Lett.*, v. 118, p. 227-230, 1990.

BROOKES, S. J.; MEEDENIYA, A. C.; JOBLING, P.; COSTA, M. Orally projecting interneurons in the guinea-pig small intestine. *J. Physiol.*, v. 505, p. 473-491, 1997.

BROOKES, S. J.; SONG, Z. M.; STEELE, P. A.; COSTA, M. Identification of motor neurons to the longitudinal muscle of the guinea pig ileum. *Gastroenterology*, v. 103, p. 961-973, 1992.

BROOKES, S. J.; STEELE, P. A.; COSTA, M. Calretinin immunoreactivity in cholinergic motor neurones, interneurons and vasomotor neurones in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.*, v. 263, p. 471-481, 1991. [doi:10.1007/BF00327280](https://doi.org/10.1007/BF00327280)

BURNSTOCK, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: STRAUB, R.W.; BOLIS, L.(Eds.). *Cell membrane receptors for drugs and hormones. a multidisciplinary approach*. New York., : Raven Press, 1978. p. 107-118.

BURNSTOCK, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: STRAUB, R. W.; BOLIS, L. (Ed.). *Cell membrane receptors for drugs and hormones. A Multidisciplinary Approach*. New York: Raven Press, 1978. p. 107-118.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev.* v. 87, p. 659-797, 2007.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine *Cell Mol. Life Sci.*, v. 64 n.12, p. 1471-1483, 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nature Rev. Drug Discov.*, v. 7, n. 7, p. 575-590, 2008.

BURNSTOCK, G., KENNEDY, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.*, v.16, p.433-440, 1985.

BURNSTOCK, G.; KRÜGEL, U.; ABBRACCHIO, M. P.; ILLES, P. Purinergic signalling: From normal behaviour to pathological brain function. *Progress in Neurobiology*, v. 95, p. 229-274, 2011.

BURNSTOCK, G. PURINERGIC SIGNALLING IN THE GUT. IN: BRIERLEY, S., COSTA, M., EDITORS. *The Enteric Nervous System 30 Years Later*. Springer; Heidelberg/Berlin: 2016. p. 91-112.

CASTELUCCI, P.; DE SOUZA, R. R.; DE ANGELIS, R. C.; FURNESS, J. B.; LIBERTI, E. A. Effects of pre-and postanal protein deprivation and postanal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. *Cell Tissue Res.*, v. 310, p. 1-7, 2002b.

CASTELUCCI, P.; ROBBINS, H. L.; POOLE, D. P.; FURNESS, J. B. The distribution of purine P2X2 receptors in the guinea pig enteric nervous system. *Histochem. Cell Biol.*, v. 117, p. 415-422, 2002a.

CHANDRASEKHARAN, B., V. BALA, V. L. KOLACHALA, M. VIJAY-KUMAR, D. JONES, A. T. GEWIRTZ, S. V. SITARAMAN;S. SRINIVASAN (2008). Targeted deletion of neuropeptide Y (NPY) modulates experimental colitis. *PLoS One* 3(10): e3304, 2008.

CHAUDHURY A, DENDI VS, MIRZA W. Colligative property of ATP: implications for enteric purinergic neuromuscular neurotransmission. *Front Physiol.* 2016; 7:500.

CHIOCCHETTI, R.; POOLE, D. P.; KIMURA, H.; AIMI, Y.; ROBBINS, H. L.; CASTELUCCI, P.; FURNESS, J. B. Evidence that two forms of choline acetyltransferase are differentially expressed in subclasses of enteric neurons. *Cell Tissue Res.*, v. 311, p. 11-22, 2003.

CIOFFI, M., A. D. ROSA, R. SERAO, I. PICONE;M. T. VIETRI. Laboratory markers in ulcerative colitis: Current insights;future advances. *World J Gastrointest Pathophysiol* 6(1): 13-22, 2015.

CLERC, N.; FURNESS, J. B.; BORNSTEIN, J. C.; KUNZE, W. A. A. Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of myenteric neurons of the duodenum in the guinea-pig. *Neuroscience*, v. 82, p. 899-914, 1998a.

COLLINS, S. M., M. SURETTE;P. BERCIK. The interplay between the intestinal microbiota;the brain. *Nat Rev Microbiol* 10(11): 735-742, 2012.

COSTA, M.; FURNESS, J. B.; POMPOLO, S.; BROOKES, S. J. H.; BORNSTEIN, J. C.; BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea-pig small intestine. *Neurosci. Lett.*, v. 148, p. 121-125, 1992.

CUMMINGS, D. E.;J. OVERDUIN. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 117(1): 13-23, 2007.

DA SILVA M.V.; MAROSTI, A. R.; MENDES, C. E.; PALOMBIT, K.; CASTELUCCI P. Differential effects of experimental ulcerative colitis on P2X7 receptor expression in enteric neurons. *Histochem. Cell. Biol.*, v. 143 (2), p. 171-184, 2015.

DA SILVA, M.V.; MAROSTI, A.R.; MENDES, C.E.; PALOMBIT, K.; CASTELUCCI, P. Submucosal neurons and enteric glial cells expressing the P2X7 receptor in rat experimental colitis. *Acta Histochem.* 119(5):481-494, 2017. doi: 10.1016/j.acthis.2017.05.001.

DE GIORGIO, R., GUERRINI, S.; BÁRBARA, G.; STANGHELLINI, V.; PONTI, F.; CORINALDESI, R.; MOSES, P.L.; Sharkey, K.A.; Mawe, G.M. Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system. *Gastroenterology* v. 126: p. 1872-1883, 2004.

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FALZONI, S.; FERRARI, D.; SANZ, J. M.; VENKETARAMAN, V.; BARICORDI, O. R. Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ.*, v. 5, n. 3, p. 191-9, 1998.

DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; DÍEZ-ZAERA, M.; SÁNCHEZ-NOGUEIRO, J.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; CANALS, J. M.; ALBERCH, J.; MIRAS-PORTUGAL, M. T.; LUCAS, J. J. Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J.*, v. 23, p. 1893-1906, 2009.

DOGIEL, A. S. Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. *Arch. Anat. Physiol. Leipzig Anat. Abt. Jg.*, v. 1899, p. 130-158, 1899.

EADEN, J. A., K. R. ABRAMS; J. F. MAYBERRY. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48(4): 526-535, 2001.

EKBLAD, E.; ALM, P.; SUNDLER, F. Distribution, origin and projections of nitric oxide synthase-containing neurons in gut and pancreas. *Neuroscience*, v. 63, p. 233-248, 1994a. doi:10.1016/0306-4522(94)90019-1.

EKBLAD, E.; MULDER, H.; UDDMAN, R.; SUNDLER, F. NOS-containing neurons in the rat gut and coeliac ganglia. *Neuropharmacology*, v. 33, p. 1323-1331, 1994b.

EL-SALHY, M.; T. HAUSKEN. The role of the neuropeptide Y (NPY) family in the pathophysiology of inflammatory bowel disease (IBD). *Neuropeptides*, 2015.

ENG, L. F., A. C. YU; Y. L. LEE. Astrocytic response to injury. *Prog Brain Res* 94: 353-365, 1992.

FRANKE, H.; ILLES, P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacol. Ther.*, v. 109, p. 297-324, 2006.

FRANKE, H.; ILLES, P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacology and Therapeutics* v. 109, p. 297-324, 2006. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.06.002

FRANKE, H.; ILLES, P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 109, n. 3, p. 297-324, 2006.

FRANKE, H.; KRÜGEL, U.; ILLES, P. P2 receptors and neuronal injury. *Euro. Jour. Physiol.*, v. 452, p. 622-644, 2006. doi:10.1007/s00424-006-0071-8

FREYTAG, C.; SEEGER, J., SIEGEMUND, T.; GROSCHE, J., GROSCHE, A.; FREEMAN, D.E.; SCHUSSER, G.F.; HÄRTIG, W. Immunohistochemical characterization and quantitative analysis of neurons in the myenteric plexus of the equine intestine. *Brain Res.* v.9 p.1244:1253-64, 2008.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 9, n. 5, p. 286-294, 2012.

FURNESS, J. B. The Enteric Nervous System. Austrália: Blackwell Publishing. USA, 2006.

FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.*, v. 81, p. 87-96, 2000.

FURNESS, J. B.; CLERC, N.; LOMAX, A. E. G.; BORNSTEIN, J. C.; KUNZE, W. A. A. Shapes and projections of tertiary plexus neurons of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.*, v. 300, p. 383-387, 2000.
G195, 1995.

GABELLA, G. Neuron size and number in the myenteric plexus of newborn and adult rat. *J. Anat.*, v. 109, p. 81-95, 1971. PMID: 5556678

GEBOES, K., COLLINS, S.M. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol. Mol.* V.10, p. 189– 202., 1998.

GIARONI, C., G. E. KNIGHT, H. Z. RUAN, R. GLASS, M. BARDINI, S. LECCHINI, G. FRIGO;G. BURNSTOCK. P2 receptors in the murine gastrointestinal tract. *Neuropharmacology* 43(8): 1313-1323, 2002.

GIROTTI, A. P.; MISAWA, R.; PALOMBIT, K.; MENDES, C. E.; BITTENCOURT, C. J.; CASTELUCCI, P. Differential effects of undernourishment on the differentiation 5 and maturation of rat enteric neurons. *Cell Tissue Res.*, v.353 n. 8, p. 367-380, 2013.

GIULIAN, D., J. LI, B. LEARA;C. KEENEN. Phagocytic microglia release cytokines;cytotoxins that regulate the survival of astrocytes;neurons in culture. *Neurochem Int* 25(3): 227-233, 1994.

GOMES, O. A.; CASTELUCCI, P.; FONTES, R. B. V.; LIBERTI, E. A. Effects of pre-and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: A quantitative morphological study. *Auton. Neurosc.*, v. 126-127, p. 277-284, 2006.

GONÇALEZ, P. O.; CLEBIS, N. K.; MARI, R. B.; GAGLIARDO, K. M.; STABILLE, S. R.; FARIA, H. G.; LIBERTI, E. A.; JR, J. R. Morphological effects of autoclaved dieton the myenteric neurons of rats. *World J. Gastroenterol.*, v. 17, n. 43, p. 4799-4803, 2011.

GONIAEW, K. Die nerven des nahrungsschlauches. Arch. Mikrosk. Anat., v. 11, p. 479-496, 1875.

GREGGIO FM, FONTES RBV, MAIFRINO L.B.M, CASTELUCCIP, SOUZA RR, LIBERTI EA. Effects of perinatal protein deprivation and recovery on esophageal myenteric plexus. World J Gastroenterology; v.16, n.5, p.563-570, 2010.

GULBRANSEN, B. D., M. BASHASHATI, S. A. HIROTA, X. GUI, J. A. ROBERTS, J. A. MACDONALD, D. A. MURUVE, D. M. MCKAY, P. L. BECK, G. M. MAWE, R. J. THOMPSON;K. A. SHARKEY. Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. Nat Med 18(4): 600-604, 2012.

GRUBIŠIĆ V, GULBRANSEN BD. Enteric glia: the most alimentary of all glia. J. Physiol. 2017; 595:557–570.

HANAUER, S. B. Update on the etiology, pathogenesis;diagnosis of ulcerative colitis. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 1(1): 26-31, 2004.

HEIZMANN, C. W. The multifunctional S100 protein family. Methods Mol Biol 172: 69-80, 2002.

HENLE, J. Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen. Band III., Abt. 2. Nervenlehre. Vieweg und Sohn, Braunschweig. 1871.

HIRATA, I., L. L. AUSTIN, W. H. BLACKWELL, J. R. WEBER;W. O. DOBBINS, 3RD. Immunoelectron microscopic localization of HLA-DR antigen in control small intestine;colon;in inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 31(12): 1317-1330, 1986.

HOFMAN, P., J. CHERFILS-VICINI, M. BAZIN, M. ILIE, T. JUHEL, X. HEBUTERNE, E. GILSON, A. SCHMID-ALLIANA, O. BOYER, S. ADRIOUCH;V. VOURET-CRAVIARI. Genetic;pharmacological inactivation of the purinergic P2RX7 receptor dampens inflammation but increases tumor incidence in a mouse model of colitis-associated cancer. Cancer Res 75(5): 835-845, 2015.

HUTTEMANN, E.; UKENA, D.; LENSCHOW, V.; SCHWABE, U. Ra adenosine receptors in human platelets. Characterization by 5'-Nethylcarboxamido [3H]adenosine binding in relation to adenylate cyclase activity. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., v. 325, p. 226-233, 1984.

JACOBSON, K.; MCHUGH, K.;COLLINS, S. M. The mechanism of altered neural function in a rat model of acute colitis. Gastroenterology, v.112,: p.156 –162, 1997.

JARVINEN, M. K.; WOLLMANN, W. J.; POWROZEK, T. A.; SCHULTZ, J. A.; POWLEY, T. L. Nitric oxide synthase-containing neurons in the myenteric plexus of the rat gastrointestinal tract: distribution and regional density. Anat. Embryol. (Berl), v. 199, p. 99-112, 1999. doi:10.1007/s004290050213

JENSEN, C. J.; MASSIE, A.; DE KEYSER, J. Immune players in the CNS: the astrocyte. J. Neuroimmune Pharmacol., v. 8 (4), p. 824-839, 2013.

JIANG, L. H.; MACKENZIE, A. B.; NORTH, R. A. Surprenant A. Brilliant Blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X7 receptors. *Mol. Pharmacol.*, v. 58, p. 82-88, 2000.

KHOR, B., A. GARDET; R. J. XAVIER. Genetics; pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474(7351): 307-317, 2011.

KIANK, C., Y. TACHE; M. LARAUCHE. Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease; post-infectious irritable bowel syndrome: role of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Behav Immun* 24(1): 41-48, 2010.

Kimball, B. C.; M. W. Mulholland. Enteric glia exhibit P2U receptors that increase cytosolic calcium by a phospholipase C-dependent mechanism. *J Neurochem* 66(2): 604-612, 1996.

KIRCHGESSNER, A. L., H. TAMIR; M. D. GERSHON. Identification; stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity. *J Neurosci* 12(1): 235-248, 1992.

KIRCHGESSNER, A. L.; TAMIR, H.; GERSHON, M. D. Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity. *J. Neurosci.*, v. 12, p. 235-248, 1992.

KOCH, T. R., J. A. CARNEY, V. A. MORRIS; V. L. GO. Somatostatin in the idiopathic inflammatory bowel diseases. *Dis Colon Rectum* 31(3): 198-203, 1988.

KORETZ, K., F. MOMBURG, H. F. OTTO; P. MOLLER. Sequential induction of MHC antigens on autochthonous cells of ileum affected by Crohn's disease. *Am J Pathol* 129(3): 493-502, 1987.

KOSTERLITZ, H. W.; LEES, G. M. Pharmacological analysis of intrinsic intestinal reflexes. *Pharmacol. Rev.*, v. 16, p. 301-339, 1964

KRAMMER, H. J., S. T. KARAHAN, W. SIGGE; W. KUHNEL. Immunohistochemistry of markers of the enteric nervous system in whole-mount preparations of the human colon. *Eur J Pediatr Surg* 4(5): 274-278, 1994.

KUNZE, W. A. A.; BORNSTEIN, J. C.; FURNESS, J. B. Identification of sensory nerve cells in a peripheral organ the intestine of a mammal. *Neuroscience*, v. 66, p. 1-4, 1995. [doi:10.1016/0306-4522\(95\)00067-S](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00067-S)

KUNZE, W. A. A.; CLERC, N.; BERTRAND, P. P.; FURNESS, J. B. Contractile activity in intestinal muscle evokes action potential discharge in guinea-pig myenteric neurons. *J. Physiol. (Lond.)*, v. 517, p. 547-561, 1999.

KUNZE, W. A. A.; FURNESS, J. B.; BERTRAND, P. P.; BORNSTEIN, J. C. Intracellular recording from myenteric neurons of the guinea-pig ileum that respond to stretch. *J. Physiol.*, v. 506, p. 827-842, 1998.

LAWRENTJEW, B. J. Experimentelle-morphologische Studien über den feineren Bau des autonomen Nervensystems. II. Über den Aufbau der Ganglien der Speiseröhre nebst einigen Bemerkungen über das Vorkommen und die Verteilung zweier Arten von Nervenzellen in dem autonomen Nervensystem. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, v. 18, p. 233-262, 1929.

LEE, H. Y. .; BARDINI, M.; BURNSTOCK G. P2X receptor immunoreactivity in the male genital organs of the rat. *Cell Tissue Res*, v. 300, p.321-30, 2000.

LI , Z. S.; FURNESS, J. B. Immunohistochemical localisation of cholinergic markers in putative intrinsic primary afferent neurons in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.*, v. 294, p. 35-43, 1998.

LI, P. L. The intramural nervous system of the small intestine with special reference to the innervation of the inner subdivision of its circular muscle. *J. Anat.*, v. 74, p. 348-359, 1940.

LI, Q.; LUO X.; ZENG, W.; MUALLEN S. Cell-specific behavior of P2X7 receptors in mouse parotid acinar and duct cells. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 47554-47561, 2003.

LINDEN, D.R.; COUVERTTTE, J.M.; CIOLINO, A.; MCQUOID, C.; BLASZYK, H.; SHARKEY K.A.; MAWE, G.M. Indiscriminate loss of myenteric neurons in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterol Motil* , v. 17, p. 751-760, 2005.

LIPPI, A.; SANTICIOLI, P.; CRISCUOLI, M.; MAGGI, C. A. Depolarization evoked co-release of tachykinins from enteric nerves in the guinea-pig proximal colon. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 357, p. 245-251, 1998.

LIVAK, K. J.;T. D. SCHMITTGEN. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR;the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4): 402-408, 2001.

LOFTUS, E. V., JR.. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence,;environmental influences. *Gastroenterology* 126(6): 1504-1517, 2004.

MAHID, S. S., K. S. MINOR, R. E. SOTO, C. A. HORNUNG;S. GALANDIUK. Smoking;inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 81(11): 1462-1471, 2006.

MANN, P. T.; FURNESS, J. B.; SOUTHWELL, B. R. Choline acetyltransferase immunoreactivity of putative intrinsic primary afferent neurons in the rat ileum. *Cell Tissue Res.*, v. 297, p. 241-248, 1999a. doi:10.1007/s004410051352

MATINI, P.; MAYER, B.; PELLEGRINI, M. S. F. Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life. *Cell Tissue Res.*, v. 288, p. 11-23, 1997.

MCKEOWN, S. J.; CHOW, C.W.; YOUNG, H.M. 2001. Development of the submucous plexus in the large intestine of the mouse. *Cell Tissue Res.*, v. 303, p. 301-305, 2001.

MISAWA, R.; GIROTTI, P. A.; MIZUNO, M. S.; LIBERTI, E. A.; CASTELUCCI, P. Effects of protein deprivation and re-feeding on P2X₂ receptors in enteric neurons. *World Journal of Gastroenterology*, v. 16, n. 29, p. 3651-3663, 2010.

MIZUNO, M. S.; CRISMA, A. R.; BORELLI, P.; CASTELUCCI, P. Expression of the P2X(2) receptor in different classes of ileum myenteric neurons in the female obese ob/ob mouse. *World J. Gastroenterol.*, v. 18, p. 4693-4703, 2012.

MIZUNO, M. S.; CRISMA, A. R.; BORELLI, P.; SCHÄFER, B.A.; SILVEIRA, M.P.; CASTELUCCI, P. Distribution of the P2X2 receptor and chemical coding in ileum enteric neurons of the obese male mouse (*ob/ob*). *World Journal of Gastroenterology*, v. 20 (38), p. 13911 - 13919, 2014.

NEUNLIST, M.; AUBERT, P.; TOQUET, C.; ORESHKOVA, T.; BAROUK, J.; SCHEMANN, M. Changes in chemical coding of my enteric neurons in ulcerative colitis. *Gut* v.52, p. 84-90, 2003.

NG, S.C., SHI, H.Y., HAMIDI, N., UNDERWOOD, F.E., TANG, W., BENCHIMOL, E. I., PANACCIONE, R., GHOSH, S. WU, J.C.Y., CHAN, F.K.L., SUNG, J.J.Y, KAPLAN, G.G. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2018; 390(10114):2769-2778.

NICHOLS, K.; KRANTIS, A.; STAINES, W. Histochemical localization of nitric oxide-synthesizing neurons and vascular sites in the guinea-pig intestine. *Neuroscience*, v. 51, n. 4, p. 791-9, 1992. doi:10.1016/0306-4522(92)90520-C

NICHOLS, K.; STAINES, W.; WU, J. Y.; KRANTIS, A. Immunopositive GABAergic neural sites display nitric oxide synthase-related NADPH diaphorase activity in the human colon. *J. Auton. Nerv. Syst.*, v. 50, p. 253-262, 1995. doi:10.1016/0165-1838(94)00096-3

NISHIDA A, INOUE R, INATOMI O, BAMBA S, NAITO Y, ANDOH A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol*. 2018;11(1):1-10.

O'CALLAGHAN, J. P. Quantitative features of reactive gliosis following toxicant-induced damage of the CNS. *Ann N Y Acad Sci* 679: 195-210.

OCHOA-CORTES F, TURCO F, LINAN-RICO A, SOGHOMONYAN S, WHITAKER E, WEHNER S, CUOMO R, CHRISTOFI FL. Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. *Infl Bowel Dis*. 2016; 22(2):433–449.

OHMAN, L.;M. SIMREN. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity;neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7(3): 163-173, 2010.

PALOMBIT, K. Estudo do receptor P2X₇ nas classes neuronais do íleo de ratos submetidos à isquemia intestinal com perfusão. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo,

PALOMBIT, K.; MENDES, C. E.; TAVARES DE LIMA, W.; CASTELUCCI, P. Effects of ischemia and reperfusion on subpopulations of rat enteric neurons expressing the P2X₇ receptor. *Dig. Dis. Sci.*, v. 58, p. 3429-3439, 2013.

PALOMBIT K, MENDES CE, TAVARES-DE-LIMA, W. CASTELUCCI P. Blockage of the P2X₇ receptor attenuates harmful changes produced by ischemia and reperfusion in myenteric plexus. **Digestive Diseases and Sciences**. DDSJ-D-17-01934, 2018.

PAULINO, A. S.; PALOMBIT, K.; CAVRIANI, G.; DE LIMA,W.; MIZUNO, M. S.; MAROSTI, A. M. B.; DA SILVA, M.; LIBERTI, E.; CASTELUCCI, P. Effects of ischemia

and reperfusion on P2X₂ receptor expressing neurons of the rat ileum enteric nervous system. *Dig. Dis. Sci.*, v. 56, n. 8, p. 2262-2275, 2011.

PENG, W.; COTRINA, M. L.; HAN, X.; YU, H.; BEKAR, L.; BLUM, L.; TAKANO, T.; TIAN, G. F.; GOLDMAN, S. A.; NEDERGAARD, M. Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X₇ improves recovery after spinal cord injury. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 106, p. 12489-12493, 2009.

POLI, E.; LAZZARETTI, M.; GRANDI, D.; and CORUZZI, G. Morphological and functional alterations of the myenteric plexus in rats with TNBS- Induced Colitis. *Neurochemical Research*, v. 26, n. 8-9 . p.1085-1093, 2001.

POMPOLO, S.; FURNESS, J. B. Quantitative analysis of inputs to somatostatin-immunoreactive descending interneurons in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.*, v. 294, n. 2, 219-226, 1998.

POOLE, D. P.; CASTELUCCI, P.; ROBBINS, H. L.; CHIOCCHETTI, R.; FURNESS J. B. The distribution of P2X₃ purine receptor subunits in the guinea-pig enteric nervous system. *Auton. Neurosci.*, v. 101, p. 39-47, 2002. [doi:10.1016/S1566-0702\(02\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S1566-0702(02)00179-0)

PORTBURY, A. L.; FURNESS, J. B.; SOUTHWELL, B. R.; WONG, H.; WALSH, J. H.; BUNNETT, N. W. Distribution of neurokinin-2 receptors in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.*, v. 286 p. 281-292, 1996a.

PORTER, A. J.; WATTCHOW, D. A.; BROOKES, S. J.; SCHEMANN, M.; COSTA, M. Choline acetyltransferase immunoreactivity in the human small and large intestine. *Gastroenterology*, v. 111, p. 401-408, 1996.

QU, Z. D.; THACKER, M.; CASTELUCCI, P.; BAGYÁNSZKI, M.; EPSTEIN. M. L.; FURNESS, J. B. Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. *Cell Tissue Res.*, v. 334, p. 147-61, 2008. RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.*, v.50, p.413-492, 1998.

RALEVIC, V.;G. BURNSTOCK. Receptors for purines;pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50(3): 413-492, 1998.

RAMOS, P.G; PAPADAKIS, A.K. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. *Mayo Clin Proc*, 2019

REMY, M. et al. An in vivo evaluation of Brilliant Blue G in animals and humans. *Br. J. Ophthalmol.*, v. 92, p. 1142-1147, 2008.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v. 17, p. 1208-1212, 1963.

RÜHL A. Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol. Motil.*, v. 17, p. 777-790, 2005.

RÜHL, A.; NASSER, Y.; SHARKEY, K. A. Enteric Glia. *Neurogastroenterology*, v. 16, p. 44-49, 2004.

RYU, J. K.; MCLARNON, J. G. Block of purinergic P2X(7) receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. *Neuroreport*, v. 19, p. 1715-1719, 2008.

SANDERS, K. M.; WARD, S. M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am. J. Physiol.*, v. 262, p. G379-G392, 1992.

SANOVIC, S.; LAMB, D. P.; BLENNERHASSETT, M. G. Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am. J. Pathol.* V.155, p.1051-1057, 1999.
São Paulo, 2011.

SARTOR, R. B. Clinical applications of advances in the genetics of IBD. *Rev Gastroenterol Disord* 3 Suppl 1: S9-17, 2003.

SARTOR, R. B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease;ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3(7): 390-407, 2006.

SAVIDGE, T. C., P. NEWMAN, C. POTHOUAKIS, A. RUHL, M. NEUNLIST, A. BOURREILLE, R. HURST;M. V. SOFRONIEW. Enteric glia regulate intestinal barrier function;inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 132(4): 1344-1358, 2007.

SCHABADASCH, A. Die Nerven des Magens der Katze. *Z. Zellforsch*, v. 10, p. 254-319, 1930a.

SCHABADASCH, A. Intramurale Nervengeflechte des Darmrohrs. *Z. Zellforsch*, v. 10, p. 320-385, 1930b

SCHEMANN, M.; SCHAAF, C. Differential projection of cholinergic and nitroxidergic neurons in the myenteric plexus of guinea pig stomach. *Am. J. Physiol.*, v. 269, p. G186-

SCHEMANN, M.;C. SCHAAF. Differential projection of cholinergic;nitroxidergic neurons in the myenteric plexus of guinea pig stomach. *Am J Physiol* 269(2 Pt 1): G186-195, 1995.

SLATER, M.; BARDEN, J. A.; MURPH, C. R. The purinergic calcium channels P2X_{1,2,5,7} are down-regulated while P2X_{3,4,6} are up-regulated during apoptosis in the ageing rat prostate. *Histochem. J.*, v. 32, p. 571-580, 2000.

SOLINI, A.; CHIOZZI, P.; FALZONI S. High glucose modulates P2X7 receptor-mediated function in human primary fibroblasts. *Diabetologia*; v.43, p.1248-56, 2000.

SOLINI, A.; CHIOZZI, P.; MORELLI, A. Human primary fibroblasts *in vitro* express a purinergic P2X7 receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release. *J Cell Sci*; v.11, p.:297-305, 1999.

STARK, M. E.; SZURSZEWSKI, J. H. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology*, v. 103, n. 6, p. 1928-1949, 1992.

STÖHR, P. Mikroskopische Studien zur Innervation des Magen-Darmkanales. *Z. Zellforsch*, v. 12, p. 66-154, 1930.

SUPLY, E., P. DE VRIES, R. SORET, F. COSSAIS;M. NEUNLIST. Butyrate enemas enhance both cholinergic;nitrgergic phenotype of myenteric neurons;neuromuscular transmission in newborn rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302(12): G1373-1380, 2012.

SURPRENANT, A.; RASSENDREN, F.; KAWASHIMA, E.; NORTH, R. A.; BUELL, G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor P2X₇. *Science*, v. 272, p. 735-738, 1996.

TASSELL, W.; SLATER, M.; BARDEN, J. A.; MURPHY, C. R. Endometrial cell death during early pregnancy in the rat. *Histochem. J.*, v. 32, p. 373-379, 2000.

THORSTEINSDOTTIR, S., T. GUDJONSSON, O. H. NIELSEN, B. VAINER;J. B. SEIDELIN. Pathogenesis;biomarkers of carcinogenesis in ulcerative colitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8(7): 395-404, 2011.

TOUMI, F.; NEUNLIST, M.; CASSAGNAU, E.; PAROIS, S.; LABOISSE, C. L.; GALMICHE, J. P.; JARRY, A. Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol. Motil.*, v. 15, p. 239-242, 2003.

VAN LIMBERGEN, J., G. RADFORD-SMITH;J. SATSANGI. Advances in IBD genetics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11(6): 372-385, 2014.

VAN NASSAUW, L., I. BROUNS, D. ADRIAENSEN, G. BURNSTOCK;J. P. TIMMERMANS. Neurochemical identification of enteric neurons expressing P2X(3) receptors in the guinea-pig ileum. *Histochem Cell Biol* 118(3): 193-203, 2002.

VILLANACCI, V., G. BASSOTTI, R. NASCIMBENI, E. ANTONELLI, M. CADEI, S. FISOGNI, B. SALERNI;K. GEBOES. Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterol Motil* 20(9): 1009-1016, 2008.

VOLONTÉ, C.; APOLLONI, S.; SKAPER, S. D.; BURNSTOCK, G. P2X₇ receptors: channels, pores and more. *CNS Neurol Disord Drug Targets.*, v. 11 (6), p. 705-721, 2012.

VULCHANOVA, L.; ARVIDSSON, U., RIEDL, M.; WANG, J.; BUELL, G.; SURPRENANT, A.; NORTH, R.A.; ELDE, R. Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry.*Proc Natl Acad Sci.* v.23;93, n.15 p:8063-8067, 1996.

VULCHANOVA, L.; ARVIDSSON, U.; RIEDHL, M.; WANG, J.; BUELL, G.; SUPRENANT, A.; NORTH, R. A. Differential distribution of two ATP-gated ion channels P2x receptors determined by immunohistochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 93, p. 8063-8067, 1996.

WATANABE, I.; YAMADA, E. The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingival. *Archivum Histologicum Japonicum*, v. 46, p. 173-182, 1983.

WATTCHOW, D. A., S. J. BROOKES;M. COSTA. The morphology;projections of retrogradely labeled myenteric neurons in the human intestine. *Gastroenterology* 109(3): 866-875, 1995.

WATTCHOW, D. A.; BROOKES, S. J. H.; COSTA, M. The morphology and projections of retrogradely labeled myenteric neurons in the human intestine. *Gastroenterology*, v. 109, p. 866-875, 1995.

WATTCHOW, D., S. BROOKES, E. MURPHY, S. CARBONE, D. DE FONTGALLAND; M. COSTA. Regional variation in the neurochemical coding of the myenteric plexus of the human colon; changes in patients with slow transit constipation. *Neurogastroenterol Motil* 20(12): 1298-1305, 2008.

WINSTON, J. H., Q. LI; S. K. SARNA. Paradoxical regulation of ChAT; nNOS expression in animal models of Crohn's colitis; ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305(4): G295-302, 2013.

WOOD, J. D. Effects of bacteria on the enteric nervous system: implications for the irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 41 Suppl 1: S7-19, 2007.

XIANG, Z.; G. BURNSTOCK. Development of nerves expressing P2X3 receptors in the myenteric plexus of rat stomach. *Histochem Cell Biol* 122(2): 111-119, 2004.

XIANG, Z.; G. BURNSTOCK. Distribution of P2Y2 receptors in the guinea pig enteric nervous system; its coexistence with P2X2; P2X3 receptors, neuropeptide Y, nitric oxide synthase; calretinin. *Histochem Cell Biol* 124(5): 379-390, 2005.

YIANGOU, Y.; FACER, P.; BAECKER, P. A.; FORD, A. P.; KNOWLES, C. H.; CHAN, C. L.; WILLIAMS, N. S.; ANAND, P. ATP-gated ion channel P2X(3) is increased in human inflammatory bowel disease. *Neurogastroenterol. Motil.*, v. 13, n. 4, p. 365-9, 2001.

YOUNG, H. M.; FURNESS, J. B.; POVEY, J. M. Analysis of connections between nitric oxide synthase neurons in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *J. Neurocytol.*, v. 24, p. 257-263, 1995

YU, Q., Z. ZHAO, J. SUN, W. GUO, J. FU, G. BURNSTOCK, C. HE; Z. XIANG. Expression of P2X6 receptors in the enteric nervous system of the rat gastrointestinal tract. *Histochem Cell Biol* 133(2): 177-188, 2010.

ZEMPLJIC, M., B. PEJKOVIC, I. KRAJNC; S. LIPOVSEK. Biological pathways involved in the development of inflammatory bowel disease. *Wien Klin Wochenschr* 126(19-20): 626-633, 2014.

ZHANG, W., B. J. SEGURA, T. R. LIN, Y. HU; M. W. MULHOLLAND. Intercellular calcium waves in cultured enteric glia from neonatal guinea pig. *Glia* 42(3): 252-262, 2003.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. *News Physiol. Sci.*, v. 19, p. 124-28, 2004. [doi:10.1152/nips.01519.2004](https://doi.org/10.1152/nips.01519.2004)

ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.*, v. 20, p. 1-15, 2006. [doi:10.1101/gad.1376506](https://doi.org/10.1101/gad.1376506)