CRISTINA EUSÉBIO MENDES

ESTUDO DO EFEITO DOS ANTAGOSNISTAS DO RECEPTOR P2X7 E PANEXINA-1 NAS CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS NO PROTOCOLO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

CRISTINA EUSÉBIO MENDES

ESTUDO DO EFEITO DOS ANTAGOSNISTAS DO RECEPTOR P2X7 E PANEXINA-1 NAS CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS NO PROTOCOLO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Castelucci

Versão integral

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Eusébio Mendes, Cristina
Estudo do efeito dos antagonistas do receptor P2X7 e Panexina-1 nas células gliais entéricas no protocolo de isquemia e reperfusão intestinal. / Cristina Eusébio Mendes; orientador Patricia Castelucci. -- São Paulo, 2017.
166 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Plexo Mioentérico. 2. Íleo. 3. Células Gliais Entéricas. 4. Brilliant Blue G. 5. Probenecida. I. Castelucci, Patricia , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cristina Eusébio Mendes

Título da Tese: Estudo do efeito dos antagonistas do receptor P2X7 e Panexina-1 nas células gliais entéricas no protocolo de isquemia e reperfusão intestinal

Orientador(a): Patricia Castelucci

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) **Aprovado(a)** ( ) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **126** nas fls. **93** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Patricia Castelucci, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo do efeito da isquemia e reperfusão intestinal sobre o receptor purina P2x7 e o sistema nervoso entérico do íleo de ratos** do qual participam o(s) alunos **Kelly Palombit, Cristina Eusébo *Mendes* e o pesquisador Wothan Tavares de Lima,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **25.10.2010, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 27 de outubro de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA – ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 063.13

São Paulo, 29 de agosto de 2013.

REF.: Protocolo nº 126/10.

"Estudo do efeito da isquemia e reperfusão intestinal sobre o receptor purina P2x7 e o sistema nervoso entérico do íleo de ratos"

Prezada Professora,

Sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 25.10.2016.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

p/ Simões

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Patrícia Castelucci
Departamento de Anatomia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

ICBUSP

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

Cidade Universitária "Armando de Salles 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 efeito da isquemia e reperfusão intestinal sobre o receptor purina P2X7 e o sistema nervoso entérico do íleo de ratos***", registrado sob o protocolo nº ***126/2016***, 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 ***19/12/2016*** 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: *Cristina Eusébio Mendes (Pós-graduando), Roberta Figueiroa de Souza (Iniciação científica), Thaira Thalita Alves Pereira (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 effects of ischemia and reperfusion in the enteric nervous system of the rat ileum***", protocol nº ***126/2016***, 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 ***12/19/2016*** 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: *Cristina Eusébio Mendes (Graduate Student), Roberta Figueiroa de Souza (Undergraduate Student), Thaira Thalita Alves Pereira (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	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Rattus norvegicus	*Wistar*	*Macho/Male*	*250-300 g*	*240*

São Paulo, 05 de janeiro de 2017.

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

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

Aos meus heróis, Pedro e Teresa Mendes.
A minha amada irmã Claudia.
Ao meu amado noivo Luciano.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pelo amparo nos momentos difíceis e por guiar e iluminar sempre o meu caminho.

Aos meus amados pais *Pedro e Teresa Mendes*,por serem o meu porto seguro.Tudo que sou é por causa de vocês.

À minha amada irmã *Claudia Eusébio Mendes Moreira*, meu exemplo, minha amiga. Amo você!

Ao meu amado noivo *Luciano Bottura Russo* por todo apoio, companheirismo, carinho, por compreender a falta de tempo em alguns momentos e paciência. Obrigada por fazer parte da minha vida. Amo-te!

Ao meu querido cunhado José *Roberto Ferreira Moreira* que sempre acompanhou o meu caminho e esteve disposto a dar conselhos, ouvir e apoiar.

À Profa. Dra. *Patrícia Castelucci*, pela orientação, presença constante e oportunidade.

A Profa. Dra. *Elen Haruka Miyabara*, Coordenadora da Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Aos membros da banca do exame de seleção para a entrada no programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Profa. Dra. *Maria Luiza Morais Barreto de Chaves*, Profa. Dra. *Elen Haruka Miyabara* e Prof. Dr. *Anselmo Sigari Mariscot*.

Aos membros da banca do exame de qualificação Profa. Dra. *Laura Beatriz Mesiano Maifrin*, Prof. Dr. *Ii-Sei Watanabe* e Profa. Dra. *Marucia Chacur*, pelas importantes sugestões.

Ao Prof. Dr. *Wothan Tavares de Lima*, do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade no ensino do modelo experimental de Isquemia e Reperfusão Intestinal.

Ao laboratório da Profa. Dra. *Maria Luiza Morais Barreto de Chaves* e sua equipe, por toda ajuda prestada e boa disposição em ajudar. Muito obrigada, meninas!

Aos demais Professores do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelos auxílios prestados.

As queridas amigas *Barbara Schäfer, Kelly Palombit* (Dupla) e *Mariana Póvoa*, formávamos um quarteto incrível. Cada uma com a sua importância em momentos distintos nessa jornada da pós-graduação. Obrigada Meninas!

Aos colegas e amigos de laboratório (os que estão e os que já passaram) .

Aos amigos *Cristina Freira, Cristiane C. Costa, Fernando do Vale, Luíz Eduardo Graton-Santos, Márcia Mizuno, Marcos V. da Silva, Simone Motta,* pela amizade, motivação e por estarem presentes todos esses anos.

Aos Colegas da Pós-Graduação, pelas trocas de experiências e conversas.

À querida Sra. *Rosana Duarte Prisco*, do Setor de Estatística do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela paciência, dedicação e amizade.

Ao Sr. *Roberto Cabado*, do Laboratório de Microscopia Confocal de Varredura a Laser, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela dedicação e paciência para obtermos as melhores imagens.

À Sra. *Rose Eli Grassi Rici*, pela ajuda na obtenção das últimas imagens para a conclusão deste trabalho.

As Secretárias do Departamento de Anatomia *Cristiane Vitor Pinheiro, Luciana Monteiro Silva* e *Patrícia Rodrigues de Campos Rocha* pela gentileza e apoio administrativo prestado.

Aos Funcionários do Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, *Alessandro Rodrigo Martins, Fábio França Luiz, e Renivaldo de Souza* pelo trabalho desempenhado.

Aos Funcionários da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela gentileza e colaboração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (*CAPES*) pelo auxílio pesquisa e pelo apoio na concessão da Bolsa de Estudos.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização dessa Tese de Doutorado.

Muito obrigada, a todos!!!

Não há nada como o sonho para criar o futuro. Utopoia hoje, carne e osso amanhã."

Victor Hugo

RESUMO

MENDES, C. E. **Estudo do efeito dos antagonistas do receptor P2X7 e Panexina-1 nas células gliais entéricas no protocolo de isquemia e reperfusão intestinal.** 2017. 166 p. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Evidências recentes indicam uma interação na comunicação glia-neurônio que contribui para a manutenção neuronal e que alterações nessas células (funcionais ou morfológicas) podem exercer um papel nas disfunções gastrintestinais. E é sabido que a isquemia e reperfusão intestinal (I/R) são eventos clínicos graves e comuns que desempenham papel fundamental em muitas doenças associadas com elevada taxa de mortalidade e morbidade e podem ocorrer a partir de diferentes fatores fisiopatológicos, que por consequência afetam os neurônios e células gliais entéricas. O ATP está envolvido na regulação de diversos processos fisiopatológicos, podendo ser co-liberado com outros neurotransmissores e sua sinalização extracelular pode acontecer via receptores da família P2X e P2Y. O receptor P2X7 tem papel em diversos eventos intracelulares e atua conjuntamente com o canal de Panexina-1. Este projeto visa estudar os efeitos dos antagonistas *Brilliant Blue G* (BBG) e de Probenecida (PB) nas células gliais entéricas do íleo de ratos que expressam o receptor P2X7 e Panexina-1 na I/R. Os vasos ileais foram ocluídos por 45 minutos com uma pinça vascular não traumática. Os períodos de reperfusão foram de 24 horas, 14 dias e 28 dias. Após a isquemia, os animais foram tratados com BBG (grupo I/R BBG), PB (I/R PB) ou Salina (I/R Salina). Os resultados de duplas marcações demonstraram que o receptor P2X7 estava presente em células gliais entéricas (S100β) e neurônios (Hu); que houve fenótipos diferentes de células glias entéricas, algumas células são imunorreativas (-IR) somente a S100β ou somente a GFAP e que, a Panexina-1 estava presente em células gliais entéricas (GFAP). As análises de densidade (células/cm^2) demonstraram diminuição do número de células-IR ao receptor P2X7, Panexina-1 e Hu no grupo I/R Salina, porém quando feito tratamento com BBG ou PB houve recuperação do número dessas células. Com as células gliais entéricas ocorreu aumento do número de células glias (S100β e GFAP) no grupo I/R Salina, no entanto, com o tratamento houve o reestabelecimento dessas células a parâmetros normais. A área do perfil celular (µm^2) dos neurônios Hu-IR apresentaram aumento no grupo de 28 dias e as células gliais S100β-IR apresentaram comportamento diferente dependendo do período, com 24 h de reperfusão as células gliais entéricas apresentaram diminuição da área, no entanto, com 14 dias e 28 dias de reperfusão apresentaram aumento da área. Com análise de microscopia eletrônica de transmissão foi possível visualizar a interação neurônio-glia em todos os grupos estudados. Houve alterações na expressão proteica de P2X7 e Panexina-1 e na atividade contrátil do intestino. Conclui-se que e a I/R afetou morfologicamente e funcionalmente o intestino, e que o uso de BBG e de PB foi eficaz na recuperação de células gliais entéricas e neurônios e, que os mesmos podem ser alvos terapêuticos no tratamento de doenças do trato gastrintestinal.

Palavras-chave: Plexo Mioentérico. Íleo. Célula Glial Entérica. *Brilliant Blue G*. Probenecida.

ABSTRACT

MENDES, C. E. **Study of the effect of P2X7receptor and Pannexin-1 antagonists on enteric glial cells in the intestinal ischemia and reperfusion protocol.** 2017. 166 p. Ph. D. thesis (Morphofuctional Sciences) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Recent evidence indicates an interaction in glia-neuron communication that contributes to neuronal maintenance and that changes in these cells (functional or morphological) may play a role in gastrointestinal dysfunctions. It is known that intestinal ischemia and reperfusion (I/R) are serious and common clinical events that play a fundamental role in many diseases associated with a high mortality and morbidity and can occur from different pathophysiological factors, which consequently affect the neurons and enteric glial cells. ATP is involved in the regulation of several pathophysiological processes and can be co-released with others neurotransmitters and its extracellular signaling can occur via P2X and P2Y family receptors. The P2X7 receptor plays a role in several intracellular events and acts with the Pannexin-1 channel. This study aims to study the effects of Brilliant Blue G (BBG) and Probenecid (PB) antagonists on the enteric glial cells of the ileum of rats expressing the P2X7 receptor and Pannexin-1 on I/R. The ileal vessels were occluded for 45 minutes with non-traumatic vascular tweezers. The reperfusion periods were 24 hours, 14 days and 28 days. After ischemia, the animals were treated with BBG (group I/R BBG), PB (I/R PB) or Saline (Saline I/R). The results of double labeling demonstrated that the P2X7 receptor was present in enteric glial cells (S100β) and neurons (Hu); there were different phenotypes of enteric glial cells, some cells were immunoreactive (-IR) only to S100β or only GFAP and Pannexin-1 was present in enteric glial cells (GFAP). Density (cell/cm^2) analyzes showed a decrease in the number of IR-cells to the P2X7 receptor, Pannexin-1 and Hu in the Salina I/R group, but after treated with BBG or PB there was recovery of the number of these cells. There was an increase in the number of glial cells (S100β and GFAP) in the Salina I/R group, however, with the treatment there was the reestablishment of these cells. The cell profile area (μm^2) of the Hu-IR neurons showed increase in the group of 28 days and the enteric glial cells S100β-IR presented different behavior depending on the period, with 24 h reperfusion the enteric glial cells presented decrease of the area, however, with 14 days and 28 days of reperfusion increased area. Scanning electron microscopy analysis showed the neuron-glia interaction in all the studied groups. There were changes in the protein expression of P2X7 receptor and Pannexin-1, and also changes in the contractile activity of the intestine. It is concluded that I/R affected morphologically and functionally the intestine, and that the use of BBG and PB has been effective in the recovery of enteric glial cells and neurons and that they may be therapeutic targets in the treatment of diseases of the gastrointestinal tract

Key words: Myenteric Plexus. Ileum. Enteric Glial Cell. Brilliant Blue G. Probenecid.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcento

°C - grau Celsius

µg - Micrograma

µl - Microlitro

µm - Micrômetro

μm^2 - Micrômetro quadrado

µM - Micromolar

ADO - Adenosina

ADP - Adenosina trifosfato

AMP - Adenosina monofosfato

AMS - Artéria mesentérica superior

ATP - Adenosina 5’ trifosfato

BBG - Brilliant Blue G

Ca^{2+} - Cálcio

$CaCl_2$ - Cloreto de cálcio

ChAT - Colina acetilfransferase

cm^2 - Centímetro quadrado

COX-2 - Ciclo-oxigenase 2

DMáx - Diâmetro máximo

DMín - Diâmetro mínimo

DTT - Ditiotreitol

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetracético

FC - Gliotoxina fluorocitrato

g - Gramas

GDNF- Fator neurotrófico derivado de célula glial

GFAP - Proteína fibrilar ácida glial

GS - Glutamina sintetase

GTP - Guanosina trifsfato

h - Horas

HCL - Ácido clorídrico

Hz - Hertz

I/R - Isquemia intestinal com reperfusão

ICB - Instituto de Ciências Biomédicas

Ils - Interleucinas

-IR - Imunorreativo (a)

K^+ - Potássio

KCl - Cloreto de potássio

Kg - Kilograma

M - Molaridade

Ml - Microlitro

mM - Milimolar

mg - Miligramas

$MgCl_2$ - Cloreto de magnésio

$MgSO_4$ - Sulfato de magnésio

ml - Mililitro

ms - Milissegundo

Na^+ - Sódio

NaCl - Cloreto de sódio

NANC - Neurotransmissor não adrenérgico e não colinérgico

$NaHCO_3$ - Bicarbonato de sódio

NaH_2PO_4 - Fosfato de sódio monobásico

NaOH - Hidróxido de sódio

nm - Nanômetro

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

P1 - Receptor purinérgico ativado pela adenosina

P2 - Receptor purinérgico ativado pelo ATP

P2X - Receptores ionotrópicos

P2Y - Receptores metabotrópicos

PB - Probenecida

PBS - Tampão Salina Fosfato

PLD - Fosfolipase D

PLA_2 - Fosfolipase A_2

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonilo

PM-ML - Plexo Mioentérico + Músculo Longitudinal

PPADS - Piridoxal-fosfato-6-azofenil-2’,4’-disulfonato

RNS - Espécie reativa de nitrogênio

ROS - Espécie reativa de oxigênio

Rpm - Rotação por minuto

SAPKs - Proteína ativa pelo stress

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SNA - Sistema Nervoso Autônomo

SNC - Sistema Nervoso Central

SNE - Sistema Nervoso Entérico

SNP - Sistema Nervoso Periférico

TBST - Tampão salina Tris com Tween

TG - Trato Gastintestinal

TNF-α - Fator de necrose tumoral α

Tris - Trisaminometano

UA - Unidade arbitrária

UTP - Uridina trifosfato

USP - Universidade de São Paulo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos anticorpos primários.....52

Tabela 2 - Características dos anticorpos secundários.....53

Tabela 3 - Efeito do carbacol nas concentrações 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 µM na atividade espontânea do íleo nos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do SNE do intestino delgado.....28

Figura 2 - Populações de células gliais entéricas no SNE.....29

Figura 3 - Células gliais entéricas como regulador central dos processos homeostáticos no SNE.....31

Figura 4 - Esquema da arquitetura geral dos receptores P1 e P2.....33

Figura 5 - Esquema da arquitetura geral das subunidades dos receptores P2X e P2X7.....35

Figura 6 - Esquema da arquitetura geral do canal de Panexina -1.....39

Figura 7 - Esquema de liberação e ação do ATP.....40

Figura 8 - Esquema de sinalização mediada por receptores de superfície e Panexina-1 em resposta a isquemia (retina).....41

Figura 9 - Esquema do protocolo adotado para administração de Salina, BBG e Probenicida.....50

Figura 10 - Obstrução do fluxo sanguíneo dos vasos ileais.....52

Figura 11 - Esquema adotado para obtenção de duplas e triplas marcações.....53

Figura 12 - Esquema dos experimentos adotados para registro miográficos *in vitro*.....57

Figura 13 - Peso dos animais (antes da cirurgia e após reperfusão).....60

Figura 14 - Dupla marcação de neurônios imunorrreativos ao Hu e receptor P2X7 no plexo mioentérico do íleo de ratos.....62

Figura 15 - Análise quantitativa da dupla marcação de neurônios imunorrreativos ao Hu e receptor P2X7 no plexo mioentérico do íleo de ratos.....63

Figura 16 - Dupla marcação de células gliais entéricas imunorrreativas a S100β e receptor P2X7 no plexo mioentérico do íleo de ratos.....65

Figura 17 - Análise quantitativa da dupla marcação de células gliais entéricas imunorreativas a S100β e receptor P2X7 no plexo mioentérico do íleo de ratos.....66

Figura 18 - Dupla marcação de células gliais entéricas S100β-IR e GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.....68

Figura 19 - Análise quantitativa da dupla marcação de células gliais entéricas imunorreativas a S100β e GFAP no plexo mioentérico do íleo de ratos.....69

Figura 20 - Dupla marcação de neurônios HU-IR e células gliais entéricas S100β-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.....71

Figura 21 - Análise quantitativa da dupla marcação de neurônios imunorreativos ao Hu e células gliais entéricas imunorreativas a S100β no plexo mioentérico do íleo de ratos.....72

Figura 22 - Marcação de neurônios Hu-IR e células gliais entéricas GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.....74

Figura 23 - Análise quantitativa da dupla marcação de Hu e GFAP no plexo mioentérico do íleo de ratos.....75

Figura 24 - Marcação de neurônios Hu-IR, células gliais entéricas S100β/GFAP-IR e células receptor P2X7-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos I/R Probenecida com 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão.....76

Figura 25 - Dupla marcação de Panexina-1 e células gliais entéricas GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.....79

Figura 26 - Análise quantitativa da dupla marcação de Panexina-1 e GFAP no plexo mioentérico do íleo de ratos.....80

Figura 27 - Densidade do receptor P2X7 dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....82

Figura 28 - Densidade da Panexian-1 dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....84

Figura 29 - Densidade das células gliais entéricas imunorreativas a S100β dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....86

Figura 30 - Densidade das células gliais entéricas imunorreativas a GFAP dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....88

Figura 31 - Densidade dos neurônios imunorreativos ao Hu dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....90

Figura 32 - Área do perfil do corpo celular (A), DMáx (B) e DMín (C) dos neurônios imunorreativos ao Hu dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....92

Figura 33 - Área do perfil do corpo celular (A), DMáx (B) e DMín (C) das células gliais entéricas imunorreativas a S100β dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....95

Figura 34 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) dos neurônios imunorreativos ao Hu no íleo de ratos dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....97

Figura 35 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) das células gliais entéricas imunorreativas a S100β no íleo de ratos dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....99

Figura 36 - Microscopia eletrônica de transmissão no plexo mioentérico do íleo de ratos com 24 h de reperfusão.....101

Figura 37 - Microscopia eletrônica de transmissão no plexo mioentérico do íleo de ratos com 14 dias de reperfusão.....103

Figura 38 - Microscopia eletrônica de transmissão no plexo mioentérico do íleo de ratos com 28 dias de reperfusão.....104

Figura 39 - Avaliação da expressão proteica do receptor P2X7 analisada por Western Blotting nos grupos Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB com 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão.....106

Figura 40 - Avaliação da expressão proteica de Panexina-1 analisada por Western Blotting nos grupos Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB com 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão.....107

Figura 41 - Segmentos de registros mecanográficos da atividade espontânea do íleo de ratos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....108

Figura 42 - Atividade espontânea do íleo nos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....110

Figura 43 - Atividade espontânea do íleo na presença de fluorocitrato nos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....112

Figura 44 - Atividade espontânea do íleo na ausência e na presença de fluorocitrato nos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....114

Figura 45 - Segmentos de registros mecanográficos dos efeitos contráteis do carbacol aplicado nas concentrações de 0,01 µM, 0,1 µM , 1 µM, 10 µM e 100 µM do íleo de ratos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....115

Figura 46 - Segmentos de registros mecanográficos que mostram os efeitos contráteis do estímulo elétrico aplicado nas frequências de 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz e 20 Hz do íleo de ratos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....119

Figura 47 - Efeito do estímulo elétrico na atividade espontânea do íleo nos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....122

Figura 48 - Segmentos de registros mecanográficos que mostram os efeitos de relaxamento do SNP na dose de 100 µM no íleo de ratos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....123

Figura 49- Efeito do SNP na atividade espontânea do íleo nos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....126

Figura 50 - Efeito do SNP na atividade espontânea do íleo nos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....128

Figura 51 - Efeito do SNP na atividade espontânea do íleo na ausência e na presença de fluorocitrato dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.....129

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....26
1.1 Sistema Nervoso Entérico.....27
1.2 Células Gliais Entéricas.....28
1.3 Receptores Purinérgicos.....31
1.3.1 Receptor P2X7.....34
1.3.2 Antagonistas do Receptor P2X7.....36
1.4 Canal de Panexina-1.....37
1.5 Isquemia e Reperfusão Intestinal (I/R).....41
1.6 Justificativa do Trabalho.....44
2 OBJETIVOS.....45
2.1 Objetivo Geral.....46
2.2 Objetivos Específicos.....46
3 MATERIAL E MÉTODOS.....47
3.1 Animais.....48
3.2 Grupos Experimentais.....48
3.3 Indução da Isquemia/Reperfusão Intestinal (I/R).....50
3.4 Preparação do Material para Imunohistoquímica.....51
3.5 Método de Duplas Marcações com Imunofluorescência.....51
3.6 Métodos das Análises Quantitativas de Imunohistoquimica.....53
3.6.1 Análise das Duplas Marcações.....53
3.6.2 Análise da Densidade Neuronal e Glial.....53
3.6.3 Análise Morfométrica.....54
3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....54
3.8 Método e Análise da Expressão Protéica (Western Blotting).....55
3.9 Registro miográfico in vitro.....55
3.10 Análise Estatística.....57
4 RESULTADOS.....58
4.1 Observações Gerais.....59
4.2 Análises dos Pesos dos Animais.....59
4.3 Análises Qualitativas e Quantitativas da Imunorreatividade do Receptor P2X7, S100β, GFAP, Hu e Panexina-1.....60

4.3.1 Dupla marcação de Hu/P2X7.....60
4.3.2 Dupla marcação de S100β/P2X7.....63
4.3.3 Dupla marcação de S100β/GFAP.....66
4.3.4 Dupla marcação de Hu/S100β.....69
4.3.5 Dupla marcação de Hu/GFAP.....72
4.3.6 Dupla marcação de Panexina-1/GFAP.....77
4.3.7 Efeito da I/R sobre a densidade Neuronal e Glial.....80
4.3.7.1 Receptor P2X7.....80
4.3.7.2 Canal de Panexina-1.....82
4.3.7.3 Célula Glial Entérica - S100β.....84
4.3.7.4 Célula Glial Entérica - GFAP.....86
4.3.7.5 Neurônios Hu.....88
4.3.8 Efeito da I/R na Área do Perfil Celular (Morfométria).....90
4.3.8.1 Neurônios - Hu.....90
4.3.8.2 Células Gliais Entéricas - S100β.....92
4.3.9 Distribuição dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao Hu de acordo com a área do perfil.....95
4.3.10 Distribuição das células gliais entéricas imunorreativas a S100β de acordo com a área do perfil.....97
4.4 Análise Ultra-estrutural.....99
4.5 Efeitos da I/R sobre a Expressão Proteica do receptor P2X7 e Panexina-1.....104
4.5.1 Receptor P2X7.....104
4.5.2 Panexina-1.....105
4.6 Efeitos da I/R sobre a atividade muscular contrátil do intestino.....106
4.6.1 Atividade Espontânea do íleo.....106
4.6.1.1 Atividade Espontânea do íleo.....108
4.6.1.2 Atividade Espontânea do íleo na presença de Fluorocitrato.....110
4.6.1.3 Atividade Espontânea do Íleo em Condições Normais e na Presença de Fluorocitrato.....112
4.6.2 Efeito do Carbacol na Atividade Espontânea do Íleo.....113
4.6.3 Efeito do Estímulo Elétrico na atividade espontânea do íleo.....117
4.6.4 Efeito do Nitroprussiato de Sódio (SNP) na Atividade Espontânea do Íleo.....122
4.6.4.1 Efeito do SNP na Atividade Espontânea do Íleo.....123
4.6.4.2 Efeito do SNP na Atividade Espontânea do Íleo na presença de Fluorocitrato.....126

4.6.4.3 Efeito do SNP na Atividade Espontânea do Íleo na ausência e na presença de Fluorocitrato.....128
5 DISCUSSÃO.....129
5.1 Considerações sobre a Isquemia Intestinal com Reperfusão.....130
5.2 Considerações Sobre a Expressão do Receptor P2X7, Panexina-1, Hu, S100β e GFAP
5.3 Considerações Sobre a Densidade Neuronal e Glial.....131
5.4 Considerações Sobre o Perfil Neuronal e análise ultra-estrutural.....138
5.5 Considerações Sobre Expressão Proteica e Atividade Contrátil do Intestino.....140
5.6 Considerações Finais.....142
6 CONCLUSÕES.....143
REFERÊNCIAS.....145

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Nervoso Entérico

O sistema nervoso entérico (SNE) é a maior divisão do sistema nervoso autônomo (SNA) e consiste em aproximadamente 100 milhões de neurônios entéricos que são cercados por 1 - 7 vezes o número de células gliais entéricas, dependendo da espécie (GRUBIŠIĆ; GULBRANSEN, 2016; GULBRANSEN, 2014). Os neurônios e as células gliais entéricas são derivados de precursores que se originam na crista neural, migram para o intestino e passam por um longo processo de desenvolvimento e maturação (BURNS; PACHNIS, 2009; GERSHON, 2010).

Portanto, o SNE engloba os circuitos neurais intrínsecos do trato gastrintestinal (TG), que estão organizados em uma vasta rede de gânglios interligada e distribuída em dois plexos, mioentérico e submucoso (Figura 1) (FURNESS, 2006; KABOURIDIS et al., 2015).

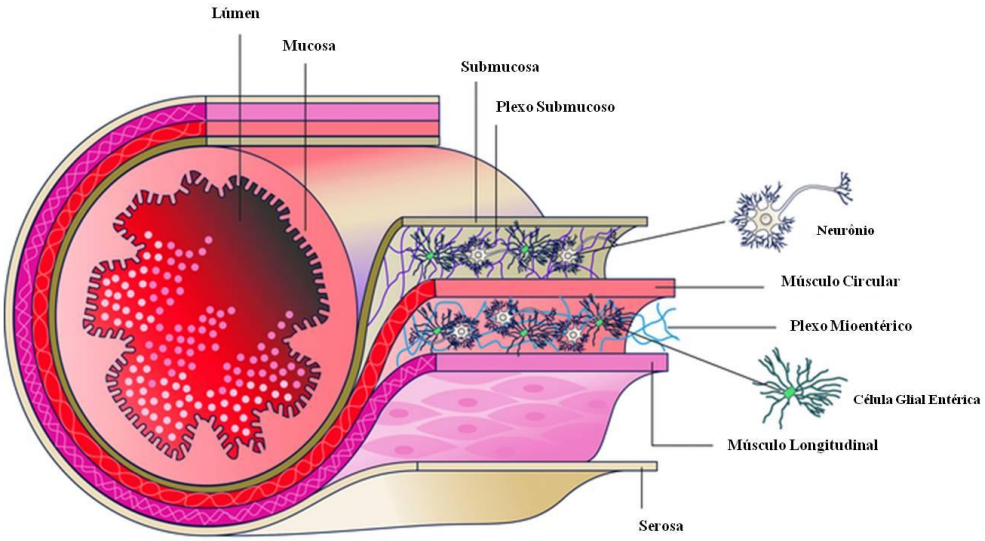
O plexo mioentérico (de Auerbach), localiza-se entre a camada muscular longitudinal externa e a camada do músculo circular, presente por todo trato digestório, do esôfago ao reto (FURNESS, 2006; SISU et al., 2008). Este plexo está envolvido na regulação reflexa das atividades contráteis do músculo circular e longitudinal, justamente por estar mais próxima ao músculo (LOMAX; FURNESS, 2000).

No entanto, o plexo submucoso (de Meissner) é encontrado predominante no intestino delgado e grosso, apresenta um gânglio menor e suas fibras interconectadas são mais finas quando comparadas ao plexo mioentérico (FURNESS, 2012; FURNESS, 2006). Tem papel direto no controle de secreção e absorção, através de neurônios motores que regulam a atividade secretomotora e vasomotora da mucosa (LOMAX; FURNESS, 2000; SONG; COSTA; BROOKES, 1998).

Assim, o SNE regula a maioria dos aspectos fisiológicos do TG, tais como peristalse, fornecimento de sangue para a parede do intestino, secreção e constituí uma rede na via neuro-endócrino bi-direcional que ligam o sistema digestório e o cérebro (COLLINS et al., 2014; FURNESS, 2006; KABOURIDIS et al., 2015).

Estes plexos podem sofrer alterações frente a diversos protocolos como: desnutrição/renutrição (CASTELUCCI et al., 2002a; GIROTTI et al., 2013; MISAWA et al., 2010), obesidade (MIZUNO et al. 2014, 2012) e isquemia/reperfusão (MAROSTI et al., 2015; MENDES et al., 2015; PALOMBIT et al., 2013; PAULINO et al., 2011) e inflamação intestinal (DA SILVA et al., 2015).

Figura 1 - Representação esquemática do SNE do intestino delgado.



Fonte: Adaptado de Grubišić, Gulbransen, 2016.

1.2 Células Gliais Entéricas

No SNE as informações sobre as células gliais entéricas precisam ser melhores esclarecidas, os plexos nervosos do trato gastrintestinal são supridos com células gliais entéricas, essas células abrangem diversas populações de células neuroectodermal que são essenciais para a organização e funcionamento do sistema nervoso (GABELLA, 1970; KABOURIDIS et al., 2015; VERKHRATSHY; BUTT, 2007).

As células gliais entéricas são pequenas, apresentam-se com formato de estrela com numerosas ramificações e processos que se misturam com os neurônios e com os feixes de axônios, não sintetizam mielina, possuem uma serie de canais iônicos dependente de voltagem, além disso, expressam receptores de neurotransmissores, tais como purinérgicos, adrenérgicos, receptores metabotrópicos do glutamato e são, portanto, capazes de modular a transmissão sináptica, com isso essas células exibem semelhanças morfológicas e moleculares com os astrócitos do sistema nervoso central (SNC) (CABARROCAS; SAVIDGE; LIBLAU, 2003; CLAIREMBAULT et al., 2014; HAGSTROM; OLSSON, 2010; NASSER et al., 2007; NASSER; HO; SHARKEY, 2006).

Para a identificação das células gliais entéricas utilizam-se frequentemente métodos imunohistoquímicos como a marcação de células que expressam proteína fibrilar ácida glial (GFAP) e/ou proteína ligante de cálcio S100/S100β. Visto que células gliais entéricas

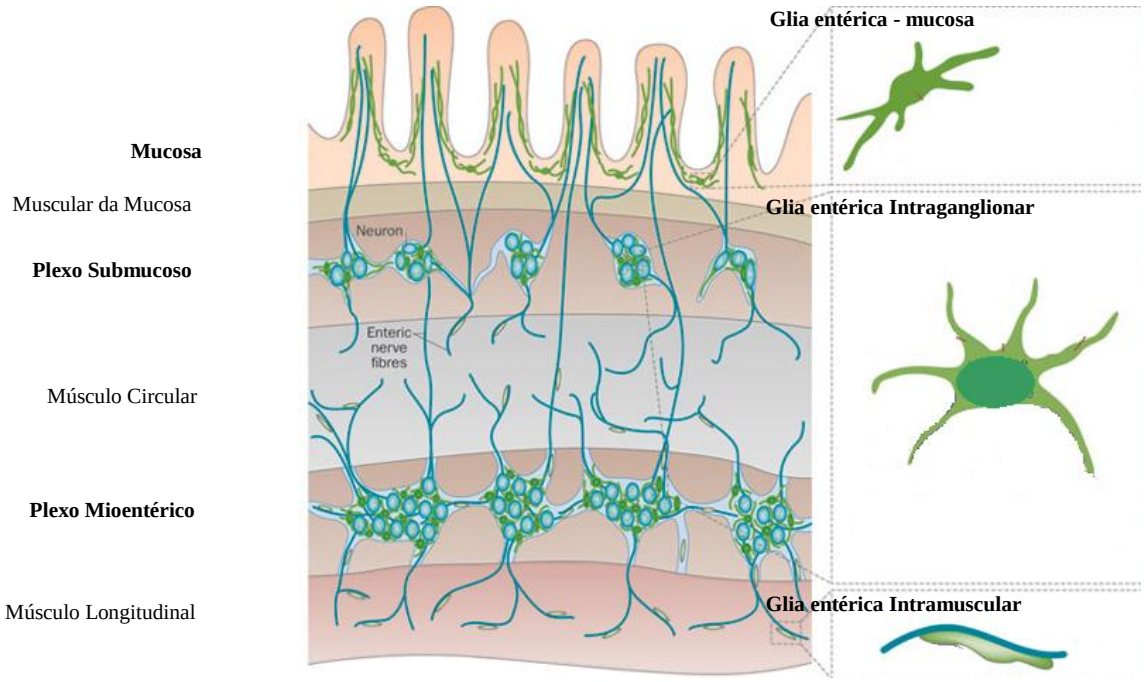
maduras expressam esses tipos de proteína (HAGSTRÖM; OLSSON, 2010; RÜHL; NASSER; SHARKEY, 2004).

A expressão de GFAP é modulada por proliferação de células gliais entéricas, diferenciação e inflamação (CIRILLO et al., 2011) e S100 é uma proteína ligante de cálcio que pode ser encontrada no núcleo/citoplasma e têm algumas funções, como a regulação da estrutura e função do citoesqueleto e a homeostase de cálcio no citoplasma das células gliais entéricas (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2003; HSIEH et al., 2004; RÜHL, 2005).

Apesar de todas as células gliais entéricas terem o indicativo de serem derivadas a partir de uma base comum de células progenitoras da crista-neural, é os microambientes únicos da parede do intestino que irão definir o fenótipo final dessas células. Portanto, as células gliais entéricas representam morfologicamente e funcionalmente, subtipos específicos dependendo da sua localização na parede intestinal (DULAC et al., 1991; GULKBRANSEN, SHARKEY, 2012; LARANJEIRA et al., 2009).

Com base nas características morfológicas e localização, as células gliais entéricas são subdivididas em: intraganglionares (residem dentro dos gânglios mioentéricos e submucoso), subepiteliais (dentro de feixes intraganglionares, fibras nervosas, abaixo das células epiteliais da mucosa) e intramusculares (associadas com as fibras nervosas intercaladas entre as células do músculo liso) (GULKBRANSEN, SHARKEY, 2012) (Figura 2).

Figura 2 - Populações de células gliais entéricas no SNE.



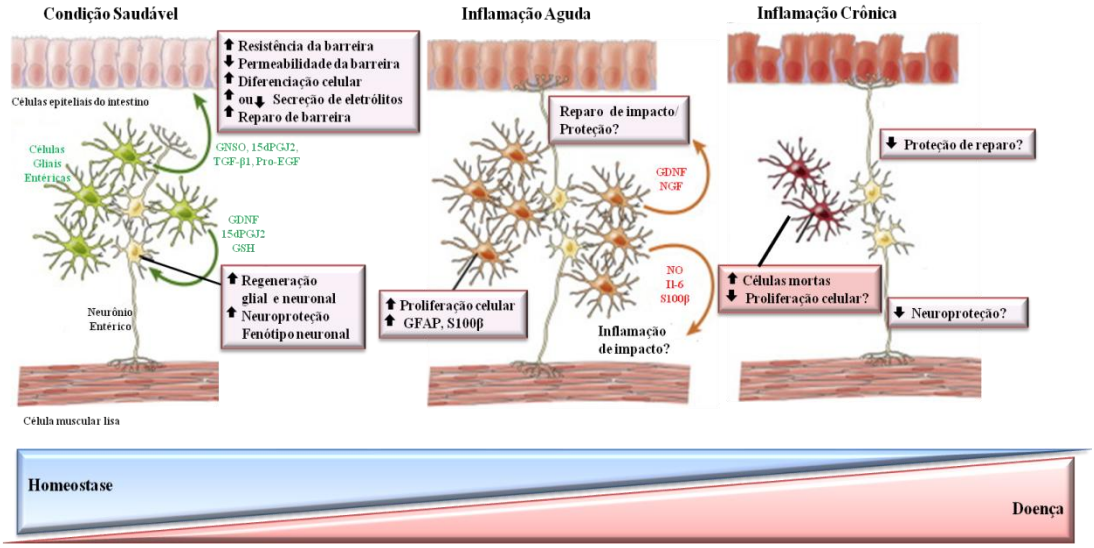
Fonte: Adaptado de Gulkbransen, Sharkey, 2012.

Além de seu papel de suporte e nutrição para os neurônios, as células gliais entéricas regulam a transmissão sináptica (BASSOTTI et al., 2007; CLARKE; BARRES, 2013), medeiam a comunicação entre o sistema nervoso e imunológico (JENSEN; MASSIE; DE KEYSER, 2013), cria um microambiente protetor (RÜHL, 2005; RÜHL; NASSER; SHARKEY, 2004), fazem regulação da barreira intestinal (FLAMANT et al., 2011; SAVIDGE et al., 2007), liberação de mediadores gliais como, glutationa, fator neurotrófico derivado de célula glial (GDNF) (BASSOTTI et al., 2007b; NEUNLIST et al., 2014; RODRIGUES et al., 2011) e homeostase neuronal (BASSOTTI et al., 2007b; RÜHL; NASSER; SHARKEY, 2004).

O déficit de células gliais entéricas estão associadas com desordens degenerativas, inflamatórias, além de desordens no desenvolvimento do sistema nervoso (KABOURIDIS et al., 2015; SKAPER; FACCI; GIUSTI, 2014). No entanto, trabalhos recentes indicam que as células gliais entéricas têm potencial neurogênico e são capazes de gerar neurônios entéricos em resposta a lesões (BOESMANS et al., 2012).

Com este conjunto de "funções" as células gliais entéricas tem papel como regulador central dos processos homeostáticos do intestino que são necessários para o bom funcionamento deste órgão (NEUNLIST et al., 2014) (Figura 3).

Figura 3 - Células gliais entéricas como regulador central dos processos homeostáticos no SNE.



Em condições fisiológicas, as células gliais entéricas regulam várias funções neuronais como a neuroproteção, expressão de neuromediadores, ou renovação neuronal via liberação de diferentes mediadores. Além disso, as células gliais entéricas são reguladores centrais na homeostase da barreira epitelial intestinal através da liberação de gliomediadores específicos (GSNO, 15DPG2, TGF-β1, pro-EGF). Com stress ambientais pode ocorrer gliose entérica reativa (semelhante à astrogliose no cérebro), o que poderia contribuir para o desenvolvimento de inflamação intestinal, mas também concomitantemente na proteção/reparação de lesões neuronais/barreira intestinal. Em situações com morte de células gliais entéricas, pode contribuir para a degeneração neuronal ou disfunções da barreira intestinal, características que são observadas em algumas doenças intestinais ou extra-intestinais crônicas.
Fonte: Adaptado de Neunlist et al., 2014.

1.3 Receptores Purinérgicos

Purinas (adenina, guanina e uridina) podem atuar como moléculas de sinalização na forma dos seus nucleotídeos 5’ trifosfato (adenosina trifosfato (ATP), guanosina trifosfato (GTP) e uridina trifosfato (UTP), adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) ou como um nucleosídeo (adenosina) (AGRAWAL; GARTLAND, 2015).

Portanto, a influência exercida pelo sistema purinérgico em funções motoras do TG tem sido observado desde a década de 70. Em 1972, foi proposto que a ATP é liberado pelos neurônios entéricos, comportando-se como um neurotransmissor não adrenérgico e não colinérgico (NANC) envolvido na regulação da motilidade intestinal (ANTONIOLI et al., 2013; BURNSTOCK, 2008).

A ATP está envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos e patológicos no meio extracelular (BOURS et al., 2006), sendo reconhecido como um neurotransmissor, pois é sintetizado e armazenado em terminais sinápticos e liberado após estímulo destes terminais

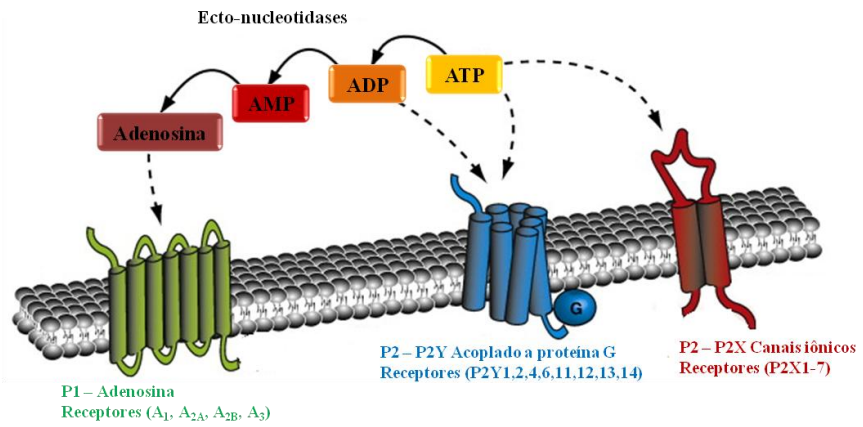
(BURNSTOCK, 2008). Além disso, pode ser co-liberado juntamente com vários neurotransmissores, como a acetilcolina, glutamato, noradrenalina, serotonina e GABA (NORTH; VERKHRATSKY, 2006).

Os nucleosídeos e nucleotídeos derivados de purinas atuam como moléculas sinalizadoras extracelulares em vários tecidos, por meio da ativação dos receptores purinérgicos (BURNSTOCK, 2008; BURNSTOCK; KNIGHT, 2004). Embora o catabolismo extracelular de ATP pela via das ecto-nucleotidases contribua parcialmente para a concentração de nucleotídeos no plexo mioentérico (CORREIA-DE-SÁ et al., 2006), este pode ser importante em diversas situações patológicas como a isquemia intestinal e inflamação, quando os níveis de ATP extracelular estão aumentados (DUARTE-ARAUJO et al., 2009).

Portanto, os receptores purinérgicos, são uma família de moléculas da membrana plasmática envolvidos em diversas funções celulares como a reatividade vascular, apoptose e secreção de citocinas (MEHTA et al., 2014; VIAL; ROBERTS; EVANS, 2004).

Estes receptores, com base nos seus mecanismos de ativação, são classificados em duas classes, P1 e P2. Tipo de receptor P1 é ativado por adenosina (ADO), enquanto que os receptores de classe P2 são ativados por ADP ou ATP (MEHTA et al., 2014; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998) (Figura 4).

Figura 4 - Esquema da arquitetura geral dos receptores P1 e P2.



Fonte: Adaptado de Guan; Osmond; Inscho, 2007.

Os receptores P1 são subdivididos de acordo com suas características moleculares, farmacológicas e bioquímicas em quatro subtipos A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3. Os receptores A1 são

abundantemente expressos no plexo mioentérico do trato gastrintestinal e têm um papel importante sobre o controle da motilidade (CHRISTOFI et al., 2001).

Os receptores P2 subdividem-se em receptores P2X que são canais iônicos e P2Y que são receptores acoplados a proteína G (ABBRACHIO et al., 2009; FREDHOLM et al., 1997; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

Os receptores P2Y são compostos por sete domínios hidrofóbicos transmembranares, com cadeias amino-terminal (extracelular) e carboxi-terminal (intracelular) curtas. Na família dos receptores P2Y existem 8 subtipos diferentes (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14), que são aceitos na literatura como P2Y funcionalmente expressos em mamíferos (ABBRACCHIO et al., 2003; BURNSTOCK; KNIGHT, 2004; GITTERMAN; EVANS, 2000; MARTEU et al., 2003).

Os receptores P2X são receptores ionotrópicos, seletivos para cátions nonovalentes e divalentes (Na^+, K^+ e Ca^{2+}) cuja velocidade de abertura dos canais é de aproximadamente 10 ms (NORTH, 2002; NORTH; SURPRENANT, 2000), possuem duas regiões transmembranais, com terminais amino e carboxi localizados intracelular, sendo que a maior porção da proteína é extracelular (DI VIRGILIO et al., 1998).

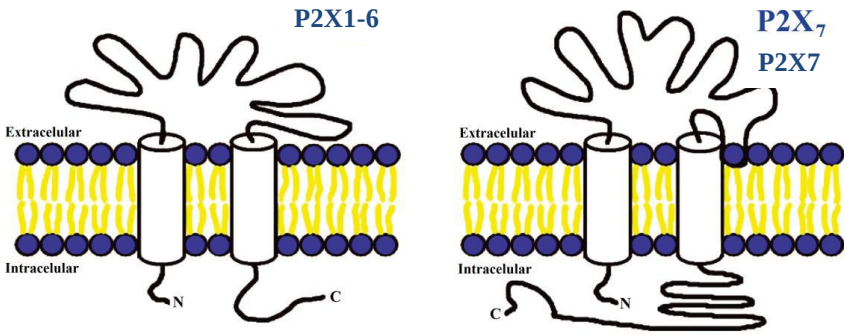
Atualmente foram clonados, caracterizados farmacologicamente e aceitos como válidos sete tipos diferentes na família dos receptores P2X (P2X1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Os receptores P2X são encontrados em células musculares lisas, neurônios, células gliais e apresentam um papel de mediador na neurotransmissão excitatória rápida nos SNC e sistema nervoso periférico (SNP) (ABBRACCHIO et al., 2009; COLLO et al., 1996; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

A unidade funcional do receptor P2X, assim como outros canais iônicos, é uma proteína oligomérica composta por mais de uma subunidade. Evidências funcionais e bioquímicas mostram que as subunidades dos receptores P2X podem formar complexos monoméricos e heteroméricos, como P2X2/P2X3, P2X1/P2X5 e P2X4/P2X6 (NORTH; SURPRENANT, 2000) e a combinação dos diferentes subtipos de receptores podem ter diferentes características dos receptores e aumentar a diversidade para a seletividade com os antagonistas e agonistas, transmissão de sinalização, propriedades dos canais e dessensibilização (VOLONTÉ; D’AMBROSI, 2009).

1.3.1 Receptor P2X7

O receptor P2X7 é codificado pelo gene P2RX7 que pertence à família de receptores P2X (BARTLETT; STOKE; SLUYTER, 2014; CODDOU et al., 2011). Da família P2X, a subunidade monómerica P2X7 é o maior, com um comprimento de 595 aminoácidos (BARTLETT; STOKE; SLUYTER, 2014). Cada subunidade é caracterizado por terminais amino relativamente curto e carboxi longo localizados intracelular, bem como dois segmentos que atravessam a membrana hidrofóbica (domínios transmembranares) separadas por um longo domínio extracelular glicolisado de ligação a ATP (BARTLETT; STOKE; SLUYTER, 2014) (Figura 5).

Figura 5 - Esquema da arquitetura geral das subunidades dos receptores P2X e P2X7.



Fonte: Di Virgilio et al.,1998.

Este receptor está amplamente distribuído por todo o corpo de um mamífero, originalmente foi pensado em estar presente somente em células das linhagens hematopoiéticas, no entanto, o receptor P2X7 está expresso em todo o intestino e em uma variedade de tipos de tecidos, incluindo células epiteliais, mastóscitos, mácrofagos, linfócitos, osteoblastos, fibroblastos, além de células do SNC e SNP (BARTLETT; STOKE; SLUYTER, 2014; BURNSTOCK; KNIGHT, 2004; CESARO et al., 2010; IDZKO; FERRARI; ELTZSCHIG, 2014; KUHNY et al., 2014; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998; SHOJI et al., 2014; SPERLÁGH et al., 2006;).

O receptor P2X7 também é expresso em gânglios entéricos de roedores, onde se verificou sua presença tanto em neurônios como em células gliais entéricas (CESARO et al., 2010; DA SILVA et al., 2015; DE CAMPOS et al., 2012; GULBRANSEN et al., 2012; PALOMBIT et al., 2013; VANDERWINDEN; TIMMERMANS; SCHIFFMANN, 2003). E foi demonstrado estar envolvido em processos fisiológicos e patológicos através da regulação

da proliferação celular, apoptose, respostas inflamatórias e tumorgênese (COUTINHO-SILVA et al., 1999; DI VIRGILIO, 2007; MAYO et al., 2008; WANG et al., 2015).

Portanto, sabe-se que este participa na regulação da permeabilidade celular, liberação de citocinas, apoptose, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e formação de fagossomos, (BARTLETT; STOKE; SLUYTER, 2014; COUTINHO-SILVA et al., 1999; SCHULZE-LOHOFF et al., 1998).

A ativação do receptor homomérico requer concentrações de ATP que são mais ou menos de 10-100 vezes maiores do que as necessárias para ativar os outros receptores P2X, sua ativação plena é atingida em concentrações de ordem milimolar de ATP (KIM et al., 2001; VERKHRATSKY; KRISHTAL et al., 2009). Baixas concentrações de ATP ativam os canais iônicos do receptor P2X7 para tornar-se permeável aos íons de pequeno porte, enquanto que, quando exposto a altas concentrações de ATP ou durante um longo período, pode ter seu canal iônico convertido em um grande poro transmembrana não-seletivo que permite a passagem não só de cátions, mas também de moléculas pequenas de até 900 daltons de tamanho que em última análise, causa a morte celular (BURNSTOCK et al., 2008; STAGG; SMYTH, 2010).

Apesar do receptor P2X7 possuir a mais baixa afinidade para o ATP (>100 µM) de entre todos os receptores P2X identificados (JARVIS; KHAKH, 2009), este pode ser ativado por níveis elevados do nucleotídeo durante estímulos nervosos de elevada intensidade ou em situações patológicas, tais como durante fenômenos de isquemia/ reperfusão ou situações de inflamação, sem apresentar dessensibilização significativa. Outra particularidade do receptor P2X7 é a sua inibição relativa na presença de cations divalentes (Ca^{2+}) no meio extracelular (JIANG, 2009; VIRGINIO et al., 1997; YAN et al., 2011).

O receptor P2X7 possui o terminal intracelular carboxi mais longo da sua classe o que permite a sua oligomerização com outros receptores, a translocação rápida do receptor para a membrana plasmática e a interação funcional com proteínas intervenientes em diversas cascatas de sinalização intracelular (fosfolipases, RhoA/ROCK) e com o citoesqueleto de actina envolvido em fenômenos de plasticidade membranar e formação de poros (ALLOISIO et al., 2010; NORTH, 2002; ROGER et al., 2010).

Em condições basais, a ativação do receptor P2X7 favorece a abertura do canal iónico permeável a cátions (Ca^{2+}, K^{+}, Na^{+}) (ROGER et al., 2010). No entanto, a ativação prolongada do receptor P2X7 promove a oligomerização de vários receptores P2X7 e, consequentemente, a abertura de poros permeáveis a moléculas com peso molecular inferior a 900 daltons na membrana plasmática (ALLOISIO et al., 2010). Alguns autores sugerem que a abertura de

poros na membrana plasmática depende da associação do receptor P2X7 com canais de panexina-1 (PELEGRIN; SUPERNANT, 2006; POORNIMA et al., 2012), embora exista alguma controvérsia na literatura sobre este assunto, já que em determinadas circunstâncias o bloqueio do canal de panexina-1 não preveniu a formação de poros na membrana plasmática (SPERLÁGH et al., 2014).

1.3.2 Antagonistas do Receptor P2X7

Estudos sugerem que o receptor P2X7 pode desempenhar papeis importantes em uma série de doenças inflamatórias, imunes, neurológicas ou perturbações musculoesqueléticas (BARTLETT; STOKE; SLUYTER, 2014). Dada à importância deste receptor tanto na saúde como na doença, estudos têm sido realizados para caracterizar e compreender melhor as funções deste receptor; assim auxiliar na geração de antagonistas seletivos e com isso obter um efeito terapêutico deste composto.

Vários antagonistas do receptor P2X7 têm sido identificados a fim de avaliar as funções deste receptor. Recentemente, foi publicado um estudo com a caracterização completa de um antagonista do receptor P2X7, AZ11645373, que mostrou alta afinidade pelo receptor de humanos, porém apresentou baixa afinidade por receptores de ratos (STOKES et al., 2006; VOLONTÉ et al., 2012). Outros antagonistas seletivos de P2X7 e com afinidade comparável em humanos, ratos e camundongos têm sido desenvolvidos e caracterizados (CARROLL et al., 2007; DONNELLY-ROBERTS et al., 2007).

No seguimento da identificação de antagonistas para o receptor P2X7 modificações estruturais destes compostos foram feitas na tentativa de melhorar suas propriedades e especificidade (BARTLETT; STOKE; SLUYTER, 2014).

O *Brilliant Blue G* (BBG) é um corante trifenilmetano (índice de cor 42655), com a fórmula $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$ e peso molecular de 854 g/mol; também conhecido como ácido azul 90 e Coomassie Azul (ENAIDA et al., 2006; NOTOMI et al., 2011). É amplamente utilizado como corante alimentar e não é considerado tóxico (BORZELLECA; DEPUKAT; HALLAGAN, 1990; SOOYEON; BRUCE, 2011). No campo biológico é utilizado para coloração de proteínas. Apesar de não existirem relatórios sobre o uso médico deste corante, há uma longa história de uso biológico no qual nenhuma toxicidade aparente tem sido relatada (ENAIDA et al., 2006).

Estudos mostram que BBG é o antagonista mais seletivo e potente, com seletividade de 30-50 vezes maior para o receptor P2X7 de ratos versus humano (JIANG; MACKENZIE;

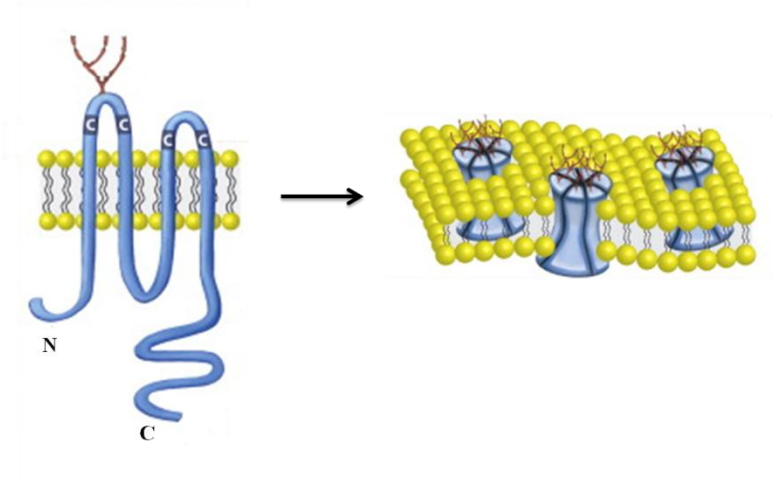
NORTH, 2000). A baixa toxicidade (REMY et al., 2008) e a alta seletividade do BBG (JIANG; MACKENZIE; NORTH, 2000) fazem desse composto um candidato ideal para bloquear o efeito adverso da ativação do receptor P2X7. Com este contexto, tem sido reconhecido como um potente agente farmacológico, particularmente no tratamento de condições que envolvam a morte neuronal (SOOYEON; BRUCE, 2011).

Trabalhos recentes têm demonstrado que a administração *in vivo* de BBG protege contra a perda neuronal em modelo de doença de Alzheimer (RYU; MCLARNON, 2008); atenua a apoptose neuronal e déficits motores em modelo de doença de Huntington em camundongo (DÍAZ-HERNÁNDEZ et al., 2009) e aumenta a taxa de sobrevivência de neurônios e reduz a morte celular por apoptose na área CA1 do hipocampo após isquemia/reperfusão em ratos (YU et al., 2013). Estudos de lesão da medula espinal mostraram que administração de BBG melhorou a recuperação e reduziu a resposta inflamatória local em ratos (MARCILLO et al., 2012; PENG et al., 2009). Resultados do laboratório com isquemia e reperfusão intestinal tem demonstrado que o uso do BBG protege os neurônios entéricos (PALOMBIT, 2014).

1.4 Canal de Panexina-1

Panexina é uma família de proteínas de membrana (panexina-1, -2 e -3) que são expressas tantos em vertebrados como em invertebrados, têm uma homologia sequencial em torno de 20% com as inexinas que formam junções de hiato (gap junctions) nos invertebrados e possui uma semelhança estrutural notável com as conexinas, no entanto, não compartilham com estas qualquer homologia sequencial e não formam junções de hiato (D'HONDT et al., 2009; MAKARENKOVA; SHESTOPALOV, 2014; PANCHIN et al., 2000). Estruturamente é constituída de um domínio amino-terminal, quatro domínios transmembranares com duas alças extracelulares e um domínio citosólico caboxilo-terminal (BOASSA et al., 2007; PENUELA et al., 2007; VELASQUEZ; EUGENIN, 2014). Experiências de metagênese dirigida ao local demonstraram que quatro resíduos de cisteína extracelulares conservados são necessários para a formação de canais de panexina-1 funcionais (BONDS, NAUS, 2014) (Figura 6).

Figura 6 - Esquema da arquitetura geral do canal de Panexina -1.



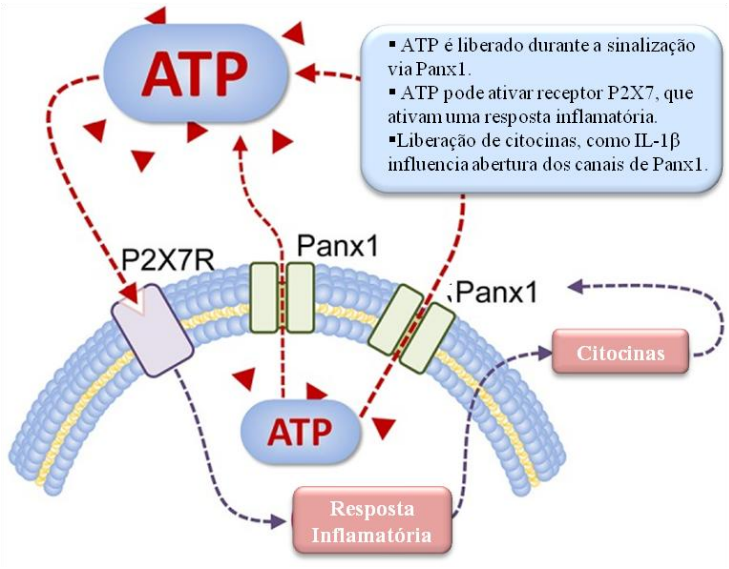
Fonte: Adaptado de Penuela et al., 2013.

Os canais de panexina-1 são não-seletivos e formam grandes poros na membrana plasmática (D'HONDT et al., 2009; VELASQUEZ; EUGENIN, 2014; YANG et al., 2015). Esses poros são abertos com estímulos de despolarização da membrana, quando há mudança na sinalização (concentração) de ca^{2+} intracelular, vasodilatação, vasocontrição, diferenciação celular, morte celular e durante respostas imunes inatas e adaptativas (CHEKENI et al., 2010; MacVICAR; THOMPSON, 2010; PROCHNOW et al., 2012; VELASQUEZ; EUGENIN, 2014).

Com a abertura dos canais de panexina, moléculas são liberadas para o meio extracelular como ATP e outros metabolitos que são importantes para a comunicação celular e sinalização autócrina/parácrina (CHEKEMI et al., 2010; JIANG; PEÑUELA, 2016; PEÑUELA et al., 2007; PEÑUELA et al., 2009; VELASQUEZ; EUGENIN, 2014).

É sabido que danos nos tecidos (por lesão ou por patologia) provoca a liberação de ATP, resultando em uma interação de sinalização entre receptores purinérgicos e canais de panexina-1, dando início ao um processo inflamatório (BOURS et al., 2006; KANNEGANTI et al., 2006; MARIATHASAN et al., 2006) (Figura 7).

Figura 7 - Esquema de liberação e ação do ATP.

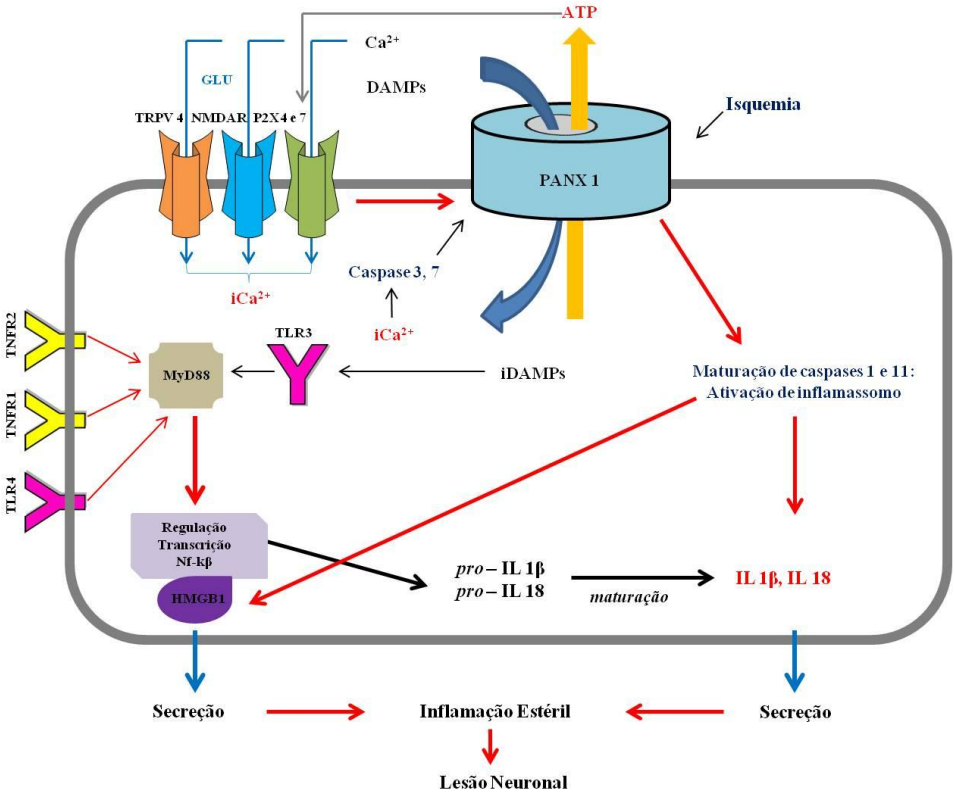


Fonte: adaptado de Diezmos; Bertrand; Liu, 2016.

Kawamura, Ruskin, Masino (2010) demonstraram essa relação entre panexina e receptores purinérgicos. O papel do canal de panexina-1 para a excitabilidade neuronal é mediada pela liberação de ATP e ativação dos receptores P2X. A associação do receptor P2X7 e panexina-1 constitui a base para a dilatação do poro do receptor P2X7 e aumento da permeabilidade da membrana (PELEGRIN; SUPERNANT, 2006; POORNIMA et al., 2012). É também conhecido que canais de panexina-1 medeia à liberação de ATP que estimula ação autócrina e parácrina do receptor P2X7 e promove o processo de ativação das citocinas pro-inflamatórias (ROMANOV et al. 2012). Há evidências que mostram uma relação entre panexina-1, ativação do receptor P2X7, processos de morte celular e ativação de inflamossomo, (complexo de proteínas: caspase-1, citocinas pro-inflamatórias, como Interleucina - 1β (IL-1β), e IL-18) (LOCOVEI et al., 2007; PELEGRIN; SUPERNANT, 2006; SILVERMAN et al., 2009) (Figura 8).

Gulbransen et al. (2012) demonstraram a colocalização de panexina-1 e do receptor P2X7 nos neurônios entéricos no cólon de camundongos, eles demonstraram que na colite experimental, a inflamação provoca a morte dos neurônios mioentéricos, ativando o receptor P2X7 e canais de panexina-1.

Figura 8 - Esquema de sinalização mediada por receptores de superfície e Panexina-1 em resposta a isquemia (retina).



Glu: glutamato; Damps: padrões moleculares associados a risco; iCa^{2+} : cálcio intracelular livre;TRPV: receptor de potencial transiente vanilóide; NMDAR: N-metil-D-aspartato; P2X: receptor purinérgico; TLR: receptor tipo Toll; TNFR: receptor do fator de necrose tumoral; HMGB1: proteina de alta mobilidade grupo tipo B1; NF-KB: fator nuclear-kappa B; Il: interleucinas.
Fonte: Adaptado de Shestapalov; Slepak, 2014.

Portanto, os canais de panexina-1 são amplamente expressos em vários tipos de células, e sugere-se que a inibição destes canais podem trazer benefícios terapêuticos em determinados contextos patofisiológicos, tais como asma, hipertensão, convulsões induzidas e isquemia (CHIU et al., 2014).

Alguns estudos têm realizado a inibição dos canais de panexina -1 com probenecida, que é considerado um inibidor dos transportadores de íons orgânicos, que tem sido utilizado como fármaco uricosúricos e vêm sendo sugerido para suprimir a inflamação inibindo a ativação de canais de panexina-1 (DAHL; KEANE, 2012; XIONG et al., 2014). O mesmo é considerado um potente inibidor específico dos canais de panexina-1 afetando a função de liberação de ATP (XIONG et al., 2014) e reduzindo a sobrecarga de Ca^{2+} (WEI et al., 2015).

Neste contexto, os mecanismos capazes de liberar ATP (canais de panexina-1), as enzimas responsáveis pelo catabolismo extracelular do ATP e os seus receptores específicos, que no seu conjunto podem ser designado por “purinoma”, parece desempenharem funções

muito relevantes na sinalização celular em diversas situações patológicas, como na isquemia/reperfusão e nos processos inflamatórios, passíveis de serem candidatos ao desenvolvimento de terapias inovadoras (ADAMON; LEITINGER 2014).

1.5 Isquemia e Reperfusão Intestinal (I/R)

A isquemia é uma condição de interrupção no suprimento de oxigênio e nutrientes para uma determinada área durante um período, devido a uma deficiência de fornecimento de sangue (SANTOS; PONTES; GOMES, 2006). A isquemia é ocasionada pela diminuição da luz de artérias, arteríolas ou capilares. Quando instalada, induz alterações do metabolismo celular que reduzem reservas energéticas, causam acúmulo de metabolitos tóxicos e eventualmente causando morte celular (CERQUEIRA; HUSSNI; YOSHIDA, 2005; SCARABELLI et al., 2002).

A isquemia intestinal é uma emergência abdominal com risco de vida, e seu prognóstico dependente crucialmente de um diagnóstico e tratamento rápido para prevenir um enfarte substancial do intestino. A taxa de mortalidade manteve-se elevada ao longo da última década variando entre 60%-80% e as incidências vêm aumentando consideravelmente (VOLLMAR; MENGER, 2011). Isquemia e reperfusão desempenham um papel fundamental em muitas doenças associadas com elevada taxa de mortalidade e de morbidade, tais como transplante, trombose mesentérica aguda venosa ou arterial, embolismo e obstrução intestinal (HAGLUND; BERGQVIST, 1999; MASSBERG; MESSMER, 1998; SOYDAN et al., 2009). Contudo, I/R de vasos intestinais são recorrentes em pacientes hospitalizados, especialmente aqueles que estão nas unidades de terapias intensivas (OLDENBURG et al., 2004). O distúrbio intestinal desses pacientes se associa a um maior tempo de internação (MYTHEN, 2005).

A isquemia aguda representa o primeiro nível de dano, por causa da diminuição dos níveis de oxigênio nos tecidos que provoca um acúmulo de lactato e com isso leva a uma diminuição do pH celular. Com transporte da membrana celular prejudicado, causa influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular, que provoca ativação de enzimas e acúmulo de mediadores pró-inflamátorios (MARRETA et al., 2012). Outros mecanismos podem ocorrer e sujeitar o intestino a um aumento de estresse oxidativo, com ativação subsequente de ROS e espécie reativa de nitrogênio (RNS) (CAMPOLO et al., 2013).

Os resultados da isquemia estão associados às alterações morfológicas e funcionais derivadas da necrose tecidual. Nas últimas décadas têm-se estudado também os aspectos de

morte celular programada. As alterações provocadas pela falta de suprimento sanguíneo desencadeiam processos metabólicos celulares que induzem a célula a sua autodestruição sem a característica reação inflamatória, conhecido como fenômeno de apoptose. Portanto, a necrose e apoptose celular podem ser utilizadas como indicadores das alterações de tecidos submetidos à isquemia (HENGARTNER, 2000; JONES; GORES, 1997; LOCKSHIN; ZACHERI, 2002).

O período de reperfusão que é o restabelecimento do fluxo sanguíneo é, na realidade, tão ou mais deletério que o período isquêmico, pois causa a geração e liberação para a circulação portal e sistêmica de uma série de mediadores químicos como por exemplo, TNF-α, interleucinas (ILs) 1, 6 e 10 e o óxido nítrico (NO) que afetam o metabolismo localmente, no intestino e em órgãos distantes (CARAMELO et al., 1996; CORNEJO et al., 2002; GARCIA-CRIADO et al., 1998; HARWARD et al., 1993).

Alguns estudos vêm demonstrando quão agressivo é o processo de reperfusão. Rivera et al. (2012) observaram em camundongos *knockout* para à NOS que após a I/R, danos na mucosa e músculo foram mais severos. Nas primeiras 24 horas há maior infiltração de neurófilos; dados imunohistoquímicos mostram perda significativa da proteína contrátil, α-actina e a parte funcional demonstra uma redução da atividade contrátil basal do músculo longitudinal e das respostas contráteis a estimulação dos nervos ou com um agonista muscarínico.

A ativação de receptores purinérgicos como o P2X7 por ATP exógeno pode ser outro mecanismo de estímulo para a morte celular. Em determinadas células, o ATP pode induzir a formação de poros na membrana plasmática, por ativação do receptor P2X7, levando a um aumento de íons dentro da célula, com desencadeamento de necrose e/ou apoptose e consequentemente morte celular (PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003). Dados indicam o envolvimento deste receptor na regulação de diversas funções neurais, como a modulação de liberação de neurotransmissores e a ativação da microglia e astroglia. Além disso, há indícios que o receptor P2X7 possa ter um potencial terapêutico em locais de desordens no sistema nervoso, como na I/R, na doença de Alzheimer e na dor neuropática (SPERLÁGH et al., 2006; SPERLÁGH; KOFALVI; DEUCHARS, 2002). Resultados do grupo têm demonstrado diminuição dos neurônios entéricos e alterações na expressão dos receptores P2X2 e P2X7 no protocolo de I/R (MAROSTI, et al., 2015; PALOMBIT et al., 2013; PAULINO et al., 2011). Palombit (2014) tem demonstrado que o uso do antagonista BBG protege os neurônios entéricos na isquemia e reperfusão.

Os autores Gulbransen e Sharkey (2012) propuseram que as purinas são os mediadores de comunicação neurônio-glia no SNE, e que a ativação dos neurônios entéricos provoca liberação de ATP e posterior ativação de receptores P2 em vários protocolos experimentais, evidências sugerem que as células gliais entéricas respondem a liberação de ATP a partir de nervos entéricos de populações distintas e em circunstâncias específicas de comunicação neurônio-glia.

Alguns estudos demonstram que as células gliais entéricas respondem a estímulos exógenos pró-inflamatórios e a mediadores liberados por células do sistema imunológico, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-6. Von Boyen et al. (2004) demonstraram que sob influência de citocinas pró-inflamatórias, células gliais entéricas que não são imunorreativas a GFAP podem se tornar GFAP positivas. O aumento da expressão de GFAP por células gliais é também observado em tecidos coletados de pacientes portadores de colite ulcerativa e doença de Crohn. Estes dados sugerem que as células gliais entéricas, participam ativamente do surgimento e desenvolvimento de inflamações intestinais (CIRILLO et al., 2011; VON BOYEN; STEINKAMP, 2011).

Bush et al. (1998), utilizaram camundongos adultos transgênicos para depletar as células imunorreativas a GFAP, com o objetivo de avaliar a importância das mesmas na fisiologia intestinal e, observaram que em 2 semanas, todos os animais morreram devido a um quadro de jejunoileíte fulminante. Esse quadro foi independente de processos infecciosos, sendo o mesmo caracterizado por degeneração de neurônios mioentéricos e hemorragia intestinal. Esses dados confirmam o papel das células gliais entéricas como mantenedora da integridade intestinal.

Mendes et al. (2015) tem demonstrado no protocolo de I/R que há um aumento no número de glias entéricas positivas a S100β, diminuição de neurônios e diminuição na motilidade intestinal nos grupos isquêmicos quando comparados ao grupos sham. Em outro trabalho, Mendes (2013) demonstra que há duas populações distintas de glias entéricas, as imunorreativas a S100β e a GFAP, que no protocolo de I/R apresentam comportamento distintos. A densidade de células gliais entéricas imunorreativas a S100β apresenta um aumento significante em tempos mais longos de reperfusão (14 dias), no entanto, as células gliais entéricas imunorreativas a GFAP apresentam um aumento significante nos grupos isquêmicos tanto em períodos considerados curtos (0 h e 24 h), como em período mais longo (14 dias).

1.6 Justificativa do Trabalho

Com base neste contexto, é mostrado que o modelo experimental de isquemia e reperfusão tem sua importância clínica, visto que há taxa de mortalidade de pacientes hospitalizados em enfermarias e em unidades de terapia intensiva que sofrem de comprometimento intestinal é alta. Além disso, o entendimento do papel da glia entérica neste processo, bem como esclarecimentos das interações do receptor P2X7/Panexina-1 com o uso dos antagonistas BBG e Probenecida poderiam vir a ser de extrema importância no desenvolvimento de fármacos e de estratégias terapêuticas para os transtornos gastrintestinais causados pela isquemia e reperfusão intestinal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho visa estudar o efeito da isquemia/reperfusão intestinal nas células gliais entéricas e nas interações receptor P2X7/Panexina-1, bem como a importância do uso dos antagonistas do receptor P2X7, o BBG e de panexina-1, o probenecida.

2.2 Objetivos Específicos

A) Analisar a colocalização (%) das células imunorreativas ao receptor P2X7, Panexina-1, S100β e GFAP (marcadores glial) e Hu (marcador pan-neuronal);

B) Analisar a densidade (cm^2) das células imunorreativas ao receptor P2X7, Panexina-1, S100β, GFAP e Hu;

C) Analisar a área do perfil (μm^2) das células imunorreativas a S100β e Hu;

D) Analisar a ultra-estrutura de células glias entéricas e neurônios;

E) Analisar expressão proteica do receptor P2X7 e Panexina-1;

F) Verificar a atividade muscular contrátil do intestino.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

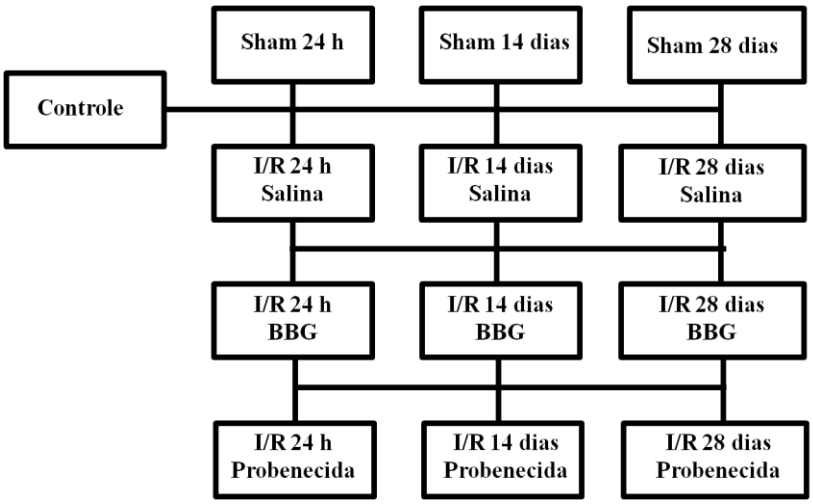
Ratos Wistar (*Rattus novergicus albinus*) com idade de 2 meses e peso entre 250 e 300 g, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) e alojados no Biotério do Departamento de Anatomia do ICB-USP. Os animais foram mantidos em condições de temperatura e umidade controladas e ciclo de claro-escuro de 12 horas (h), sem restrições a água e alimentação.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo com o protocolo n° 126/2016 com renovação até 2020.

Foram utilizados 169 ratos (*Rattus novergicus albinus*) machos, sendo distribuídos para diferentes técnicas: para as técnicas de immunohistoquimica e microscopia eletrônica de transmissão n= 5/grupo (65 ratos); para a técnica de Western blotting n=4/grupo (52 ratos) e para a atividade contrátil n= 4/grupo (52 ratos).

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 13 grupos experimentais:



Com relação às características dos grupos experimentais, o grupo Controle não sofreu nenhuma intervenção cirúrgica. Os grupos falsos operados (Sham) sofreram intervenção cirúrgica, porém não ocorreu a oclusão dos vasos ileais e, foram sacrificados após 24 h, 14 dias e 28 dias. Os grupos isquêmicos sofreram intervenção cirúrgica, com a oclusão dos vasos

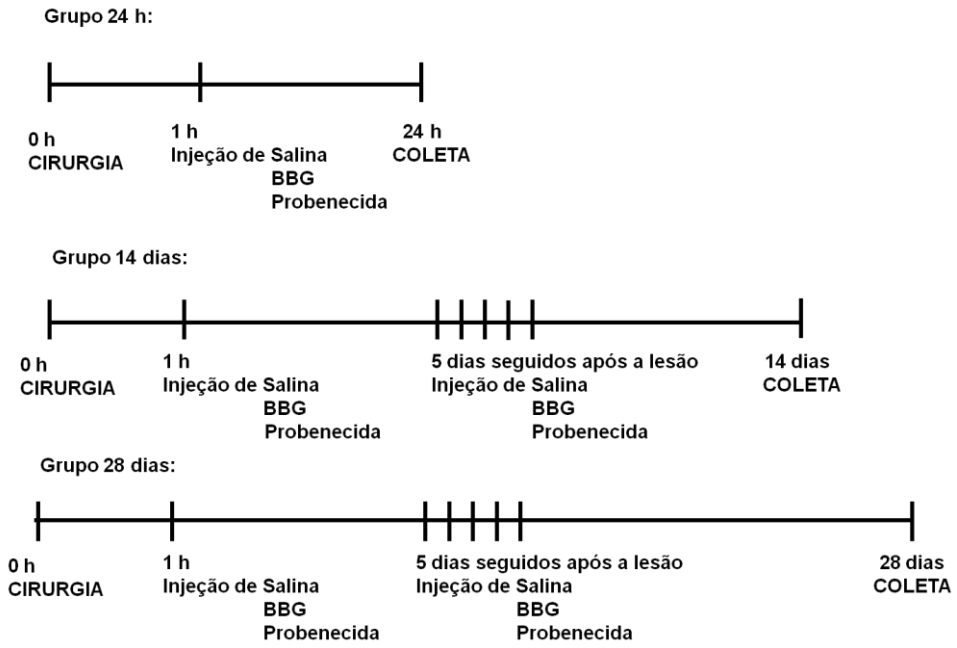
ileais por 45 minutos e foram eutanasiados com os períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão.

Os períodos de reperfusão escolhidos podem ser justificados da seguinte forma: o grupo I/R 24 h representa uma fase inicial de lesão, o grupo I/R 14 dias representa fase tardia de lesão e o grupo I/R 28 dias representa uma fase crônica de lesão.

Nos grupos isquêmicos tratados foi administrado por via subcutânea Salina (0,9% de NaCl), BBG (50 mg/kg) na quantidade de 1 ml/kg e Probenecida (antagonista da panexina-1) (5 mg/ml).

Para a preparação do BBG, o mesmo foi dissolvido em 0,9% de NaCl (PENG et al., 2009). Probenecida foi dissolvido em 1 ml de NaOH 2 mM e o pH foi ajustado para 7,0 com HCl 0,2 M. Em seguida, diluiu-se com NaCl a 0,9% para a concentração necessária (5 mg/ml) (WEI et al., 2015). A Figura 9 representa o esquema de protocolo adotado para administração de Salina, BBG e Probenecida.

Figura 9 - Esquema do protocolo adotado para administração de Salina, BBG e Probenicida.



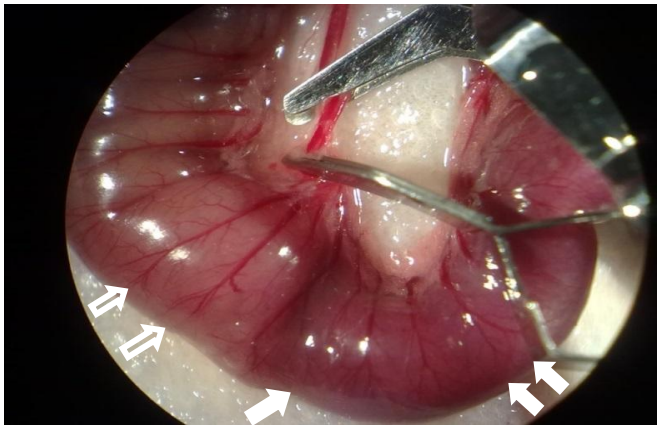
3.3 Indução da Isquemia/Reperfusão Intestinal (I/R)

Os ratos foram anestesiados via subcutânea, com uma mistura de xilazina (10 mg/kg), Ketamina (50 mg/kg) e acepromazina (2 mg/kg). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal numa prancha, com quatro alças elásticas que prenderam as porções distais dos membros anteriores e posteriores. Em seguida, os ratos foram submetidos à laparotomia mediana com exposição das alças intestinais. As alças da região do íleo distal (próxima ao ceco) foram exteriorizadas para o lado direito do corpo do animal, para realização da obstrução do fluxo sanguíneo dos vasos ileais (ramos da Artéria mesentérica superior (AMS)) com clipes microcirúrgicos removíveis (Figura 10). Os clipes utilizados para a indução da isquemia intestinal são clipes de aço confeccionados manualmente, que são utilizados em cirurgias de vascularização.

A oclusão foi realizada pelo período de 45 minutos. Durante o período de isquemia, nas regiões expostas do intestino foi colocado Tampão Fosfato Salina (PBS 0,15M NaCl 0.01M tampão fosfato de sódio, pH 7,2) aquecido (± 37 ºC) e em seguida as vísceras foram cobertas com plástico transparente, com objetivo de prevenir a perda de calor gerada pela exposição das alças (VON BAHTEN et al., 2006). Decorrido o tempo de isquemia, os clipes vasculares foram retirados e a reperfusão estabelecida, neste momento foi possível observar que a cor do íleo voltou ao normal. Em seguida a incisão mediana foi fechada com sutura contínua, em dois planos, com fio de *nylon* monofilamentar ou de algodão (MENDES et al., 2015; PALOMBIT et al., 2013). Durante os períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão, todos os animais foram acompanhados diariamente. Decorrido os períodos de reperfusão, os animais foram eutanasiados na câmara de CO_2 ou com dose excessiva de anestésico (material usado para imunohistoquímica, microscopia eletrônica de transmissão e western blotting) ou com 2, 2, 2 -Tribromoethanol (material usado para avaliação contrátil e citocinas (1 ml/100 g).

Após a eutanásia dos animais, a cavidade abdominal foi aberta novamente, e o segmento da região do íleo distal que sofreu isquemia foi coletado. Nos animais dos grupos Controle e Sham segmentos similares foram coletados.

Figura 10 - Obstrução do fluxo sanguíneo dos vasos ileais.



Oclusão dos vasos ileais de rato por clipes vasculares. Setas simples indicam o local da isquemia, com coloração hemorrágica. Setas vazadas indicam a área que não sofreu isquemia.

3.4 Preparação do Material para Imunohistoquímica

Os íleos foram obtidos de animais submetidos aos tratamentos descritos no item 3.3. Os segmentos do íleo foram colocados em PBS, foram limpos de seus conteúdos, abertos ao longo da borda mesentérica e colocados em balsas de madeira (9 cm de comprimento e 2 cm de largura) com a mucosa para baixo, e esticados por meio de alfinetes. Em seguida, foram imersos no fixador com 4% de paraformaldeído em 0.1M tampão fosfato de sódio, com pH 7,0 à 4 ºC, durante uma noite. No dia seguinte, os tecidos foram retirados do fixador e clareados com 3 lavagens de 10 minutos cada, em dimetilsulfóxido, seguido por 3 lavagens de 10 minutos cada, em PBS. Após, os tecidos fixados foram armazenados em PBS contendo sódio-azida (0,1%), em 4 ºC, para sua conservação.

3.5 Método de Duplas Marcações com Imunofluorescência

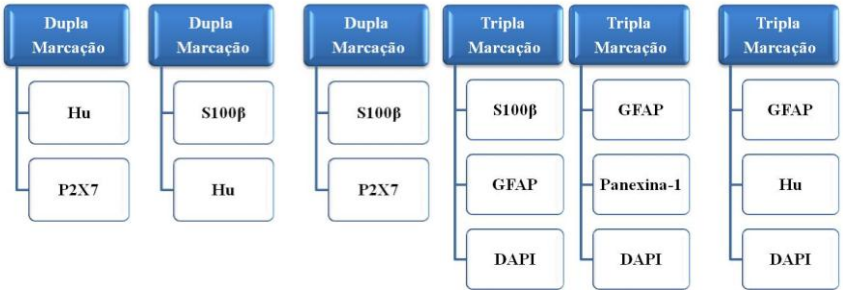
Depois da fixação e o clareamento dos tecidos, com auxílio do Microscópio estereoscópico ZM800 Nikon, o íleo de cada animal foi seccionado em cerca de 1 cm^2 com uma lâmina de bisturi nº.15, e utilizou-se para dissecção, uma placa de Petri para apoiar o tecido, duas pinças de ponta fina e um bisturi. Para a obtenção dos preparados de membrana, com auxílio da Lupa, os tecidos foram dissecados em camadas. A mucosa, a submucosa e a camada muscular circular foram removidas, mantendo somente a camada muscular longitudinal com o plexo mioentérico.

Antes das preparações serem incubadas em anticorpos primários, elas foram imersas em 10% de solução de soro normal de cavalo, 1,5% de Triton-X (Sigma) em PBS, por 45

minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas em anticorpos primários descritos na Tabela 1 e permaneceram por 48 h, à 4 ºC. Passado o tempo de incubação, os preparados de membrana foram lavados em PBS por 3 vezes de 10 minutos cada.

As marcações foram obtidas usando combinações, como demonstrado na figura 11.

Figura 11 - Esquema adotado para obtenção de duplas e triplas marcações.



Após a incubação do anticorpo primário, os tecidos foram lavados 3 vezes de 10 minutos cada, em PBS e em seguida incubados em anticorpos secundários, por 1 h, à temperatura ambiente (Tabela 2). Para finalizar, as preparações foram montadas em lâmina com glicerol tamponado com 0,5M tampão carbonato de cálcio (pH 8,6).

Para a identificação do núcleo das células, após a incubação do anticorpo secundário, as preparações foram lavadas 3 vezes de 10 minutos cada, em PBS e em seguida serão imersas em 15 µl de DAPI (Sigma 5 µg/ml) por 5 minutos, à temperatura ambiente. Decorrido os 5 minutos, as preparações foram lavadas 3 vezes de 5 minutos cada, em PBS e para finalizar, as preparações foram montadas em lâmina com glicerol tamponado com 0,5M tampão carbonato de cálcio (pH 8,6).

Tabela 1 - Características dos anticorpos primários.

Antígeno	Hospedeiro	Diluição	Referência
Receptor P2X7	Coelho	1:250	Millipore
Panexina-1	Cabra	1:100	Santa Cruz
Panexina-1	Coelho	1:100	Life Tech. Novex
S100β	Coelho	1:400	Dako
S100β	Camundongo	1:300	Millipore
GFAP	Coelho	1: 400	Dako
GFAP	Camundongo	1:200	Sigma
Hu	Camundongo	1:100	Molecular Probes

Tabela 2 - Características dos anticorpos secundários.

Anticorpo	Diluição	Fonte
Burro anti-coelho IgG 488	1:500	Molecular Probes
Burro anti-camundongo IgG 594	1:200	Molecular Probes
Cabra anti-camundongo IgG 488	1:200	Molecular Probes
Burro anti-carneiro IgG 594	1:100	Molecular Probes
Burro anti-cabra IgG 594	1:100	Molecular Probes
Burro anti-carneiro IgG 633	1:200	Molecular Probes

3.6 Métodos das Análises Quantitativas de Imunohistoquimica

3.6.1 Análise das Duplas Marcações

As análises foram feitas através das duplas marcações dos preparados de membrana. Primeiro, as células foram localizadas pela presença do fluoróforo que marca um antígeno, então o filtro foi mudado para determinar se o neurônio/célula glial entérica era ou não marcado por um segundo antígeno, localizado por um segundo fluoróforo de diferente cor. Foram analisados 100 neurônios e 100 células gliais entéricas de cada preparado de membrana, de cada animal dos grupos Controle, Sham e I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão. Os dados das duplas marcações são expressos com média ± desvio padrão, n=número de preparações.

3.6.2 Análise da Densidade Neuronal e Glial

A obtenção das densidades das células (células/cm^2) imunorreativas ao receptor P2X7, Panexina-1, dos neurônios imunorreativos ao Hu (neurônios/cm^2) e células gliais entéricas imunorreativa a S100β e GFAP (células gliais entéricas/cm^2) foram feitas em aumento de 100 X no microscópio de fluorescência Nikon 80i (área do campo microscópico 0,000379 cm^2) acoplado com filtros para discriminar entre a fluorescência 488 e Alexa 594. As contagens foram feitas em 40 campos, em 2 preparados de membrana de cada um dos 5 animais, dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB com 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão.

3.6.3 Análise Morfométrica

Para a obtenção da área do perfil do corpo celular (µm²), diâmetro máximo (DMáx - µm) e diâmetro mínimo (DMín - µm), foram fotografados 100 neurônios imunorreativos ao Hu e 50 células gliais imunorreativas a S100β de cada animal dos grupos Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB com 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão. As imagens foram obtidas pelo programa NIS Elements (Nikon) e as análises morfométricas foram feitas no programa Image-Pro Plus 4.1.0.0.

3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para analisar os aspectos ultra-estruturais dos componentes celulares (intracelular e extracelular) do íleo dos animais submetidos a I/R.

Para está técnica foram coletados fragmentos do íleo dos animais Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB com 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão.

Pequenos fragmentos do íleo, de 3 mm, foram coletados, colocados em PBS e Karnovesky inicialmente e após fixados em glutaraldeído a 2,5%, a 4 °C por uma noite. O material passou por 3 lavagens em PBS, e foi pós fixado com Tetróxido de Ósmio a 1% por 2 horas a 4°C. foram realizadas 3 lavagens com solução salina a 0,9%. O tecido então foi colocado em Uranila a 5% por uma noite à temperatura ambiente. Após, isso foi efetuada desidratação em série crescente de álcoois por 10 minutos cada (30°, 50°, 70°, 80°, 90°, 95°, e em álcool absoluto - três vezes de 10 minutos cada). Após, o material foi imerso em Óxido de Propileno, duas vezes de 10 minutos cada. As amostras foram colocadas em Resina Spurr com Óxido de Propileno por 40 minutos (proporção de 1:1). Em seguida, o tecido foi imerso nessa solução na proporção de 3:1 por 1 h e 30 minutos, estas duas últimas etapas em misturador rotatório. Finalmente as amostras foram colocadas em resina pura pelo período de 24 h. No dia seguinte, foi realizada a inclusão do material em Resina Spurr em moldes de silicone, que foram colocadas por 3 dias em estufa a 60 °C. Foi feita a trimagem do bloco para retirar o excesso de resina. O corte semi fino foi feito em ultra micrótomo Leica Ultracut UCT com 400 nm de espessura e o material foi corado com Azul de Toluidina 1% para a observação dos gânglios mioentéricos ao microscópio óptico.

Em um segundo momento, foi realizada nova trimagem para corte ultra fino com 60 nm. Os cortes foram coletados em telas de cobre de 200 “mesh”, contrastados com acetato de

uranila por 10 minutos e citrato de chumbo por 8 minutos (WATANABE; YAMADA, 1983; REINOLDS, 1963). Após, foram examinados no microscópico eletrônico Jeol-JEM-100 CXII do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e no microscópio eletrônico Morgagni 268D da Central de Facilidades à Pesquisa - Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem - do Departamento de Cirurgia do Setor de Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.8 Método e Análise da Expressão Protéica (Western Blotting)

As análises da expressão proteica do receptor P2X7 e Panexina-1 foram feitas através da técnica de western blotting.

Foram coletadas as porções do íleo de todos os grupos estudos e após a coleta os intestinos foram dissecados (ver item 3.4) à fresco e logo em seguida congelados (-20 °C).

A proteína total do plexo mioentérico + camada muscular longitudinal foi obtida usando 1 g de tecido/ 10 ml de tampão de digestão (0,1M KCl (SIGMA), 10mM HEPES (SIGMA), 3 mM de $MgCl_2$ (SIGMA), 5mM EDTA, 10% glicerol (GIBCO), 1 mM DTT (SIGMA), 10% SDS (GIBCO) e 0,1 mL de um coquetel de inibidores de proteinase (0,1 M PMSF (GIBCO), 1mM Leupeptina (SIGMA), 5 mM Aprotinina (SIGMA) e 1 mM Pepstatina (SIGMA). As concentrações da proteína foram analisadas pelo método de Bradford. 50 µg da proteína total foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Após a eletroforese, as proteínas totais presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Trans Blot Transfer Médium Pure Membrane-BIO-RAD) em um sistema semi-seco (Trans-Blot Semi-Dry Cell-BIO-RAD), sob 20 Volts de tensão. Após a transferência, a membrana foi corada com uma solução de Ponceau, para demonstrar a concentração da proteína. A membrana foi então lavada com TBST (Tampão Salina Tris com Tween) (Tris 50 mM, NaCl 150 mM e 2% Tween-20 pH 7,5) por 10 minutos em temperatura ambiente, e logo em seguida incubada com o anticorpo primário específico durante uma noite à 4 ^{o}C. No dia seguinte a membrana foi lavada e adicionado o anticorpo secundário conjugado à peroxidase diluído em TBST (1:20000) por 2 h à temperatura ambiente. A membrana foi lavada novamente em TBST e incubada com uma solução de ECL, que produziu um sinal quimioluminescente que foi detectado pela exposição ao filme de raio-X.

As bandas de proteína foram quantificadas usando densitometria, e a densidade da banda foi então calculada e expressa em unidades arbitrárias (UA). A β-actina (Santa Cruz) foi utilizada como normalizador.

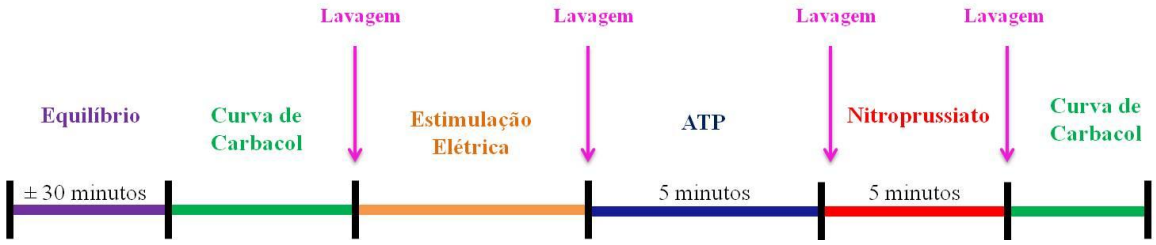
3.9 Registro miográfico in vitro

Para avaliar a atividade muscular contratil das preparações do íleo de ratos, estas foram ligadas a transdutores de força isómetrica (MLT/D, ADInstruments) e as alterações de tensão foram registradas continuamente usando um sistema informatizado de aquisição de dados BIOPAC System, Inc (USA). As preparações foram estiradas com uma tensão de aproximadamente de 1 g.

A Figura 12 A e B representa o esquema dos protocolos adotados para avaliar a atividade contratil dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB com 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão.

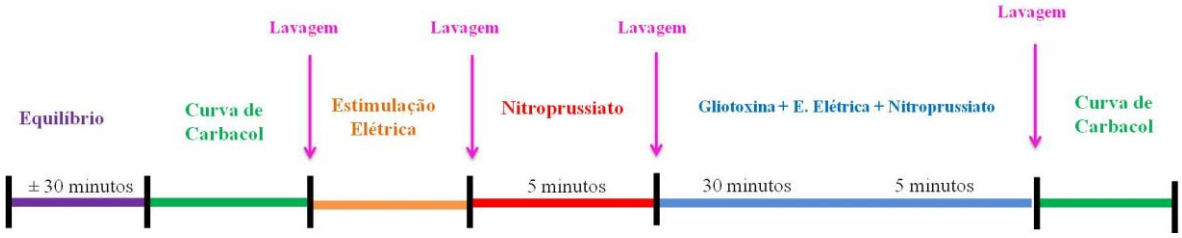
Figura 12 - Esquema dos experimentos adotados para registro miográficos *in vitro*.

Protocolo 1:



A

Protocolo 2:



B

Na Figura 12A - Protocolo 1 está representado o procedimento experimental adotado. Inicialmente as preparações de PM-ML foram equilibradas durante 30 minutos com uma solução de Krebs (118 NaCl, 4,8 KCl, 2,5 $NaHCO_3$, 25 NaH_2PO_4, 1,1 $MgSO_4$, 11,1 D-glucose, 2,5 $CaCl_2$) oxigenada. Seguiu-se a avaliação da resposta do tecido ao Carbacol (0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM, 10 µM e 100 µM); Carbacol é um agente promotor da motilidade intestinal, razão pela qual a curva de carbacol permitiu avaliar a capacidade contrátil do tecido (ajuste da tensão basal) e, consequentemente, a sua viabilidade. Após ± 20 minutos de lavagem, para remover o excesso de carbacol do tecido, procedeu à avaliação da resposta aos compostos de interesse.

No primeiro momento foi aplicado estimulo elétrico (2, 5, 10 e 20 Hertz) para verificar a resposta contrátil desse tecido. Para avaliar o relaxamento do tecido foi aplicado 100 µM de nitroprussiato. Ao final do período experimental, foi avaliado a viabilidade das preparações através da comparação da resposta à carbacol com os valores inicialmente obtidos.

Para o segundo protocolo (12B) seguiu-se os mesmos princípios adotados no protocolo 1, com a fase do equilíbrio e curva de carbacol. O que difere nesse protocolo é a aplicação da gliotóxina fluorocitrato, que é um metabólico gliotóxico que inibe a enzima ácido aconitase tricarboxílico (NASSER et al., 2006). Este composto é usado com a intenção de avaliar a capacidade contrátil do tecido sem a presença de células gliais entéricas.

Após a fase de equilíbrio e de curva de carbacol, foi aplicado isoladamente estímulos elétricos (2, 5, 10 e 20 Hertz) e o nitroprussiato (100 µM). Após, foi adicionado fluorocitrato (100 µM) ao meio de incubação por 30 minutos. Decorridos este período, foi aplicado novamente estímulos elétricos (2, 5, 10 e 20 Hertz) e nitroprussiato (100 µM) na presença da gliotóxina fluorocitrato (FC).

3.10 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada comparando os grupos Controle, Sham e isquêmicos tratados com BBG e PB e os diferentes períodos de reperfusão, verificando as variáveis das densidades neuronais e de células gliais entéricas (cm^2), e área do perfil celular (μm^2), dupla marcação (%).

Os dados foram comparados estatisticamente através da análise de variância Two-way Anova, tempo e tratamento, seguido pelo Teste de Tukey ou pelo teste de Bonferroni, no caso da análise da motilidade. Os testes foram realizados com nível de significância $p<0,05$.

4 RESULTADOS

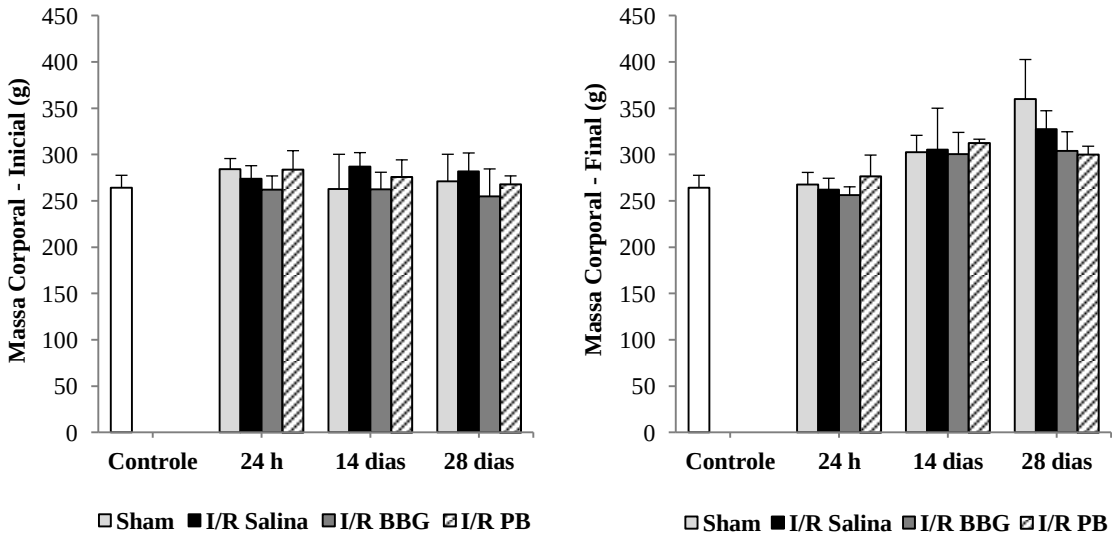
4.1 Observações Gerais

Durante o período de oclusão de 45 minutos, a região desprovida de fluxo sanguíneo apresentou mudança de cor, apresentando uma cor vermelho escuro. Ao ser restabelecido o fluxo sanguíneo, o tecido retornou a sua coloração normal. Após a cirurgia os animais foram acompanhados diariamente e retornaram a atividade normal. As regiões do íleo submetidas à isquemia e reperfusão demonstraram aparência normal na análise macroscópica.

4.2 Análises dos Pesos dos Animais

Os animais de todos os grupos estudados apresentaram homogeneidade de massa corporal antes do procedimento cirúrgico. No entanto, após o procedimento cirúrgico e os períodos de reperfusão foram observado diferenças de massa corporal entre os grupos/tempos, esta alteração é viável, visto que os períodos de reperfusão são longos e consequentemente à crescimento do animal (Figura 13).

Figura 13 - Peso dos animais (antes da cirurgia e após reperfusão).



Os dados são de n = 5 e expressos em Média ± desvio padrão.

4.3 Análises Qualitativas e Quantitativas da Imunorreatividade do Receptor P2X7, S100β, GFAP, Hu e Panexina-1

4.3.1 Dupla marcação de Hu/P2X7

Na análise qualitativa, a imunomarcação do receptor P2X7 pode ser observada nos neurônios imunorreativos ao Hu no plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB com 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão (Figura 14 e 24 A, B e C).

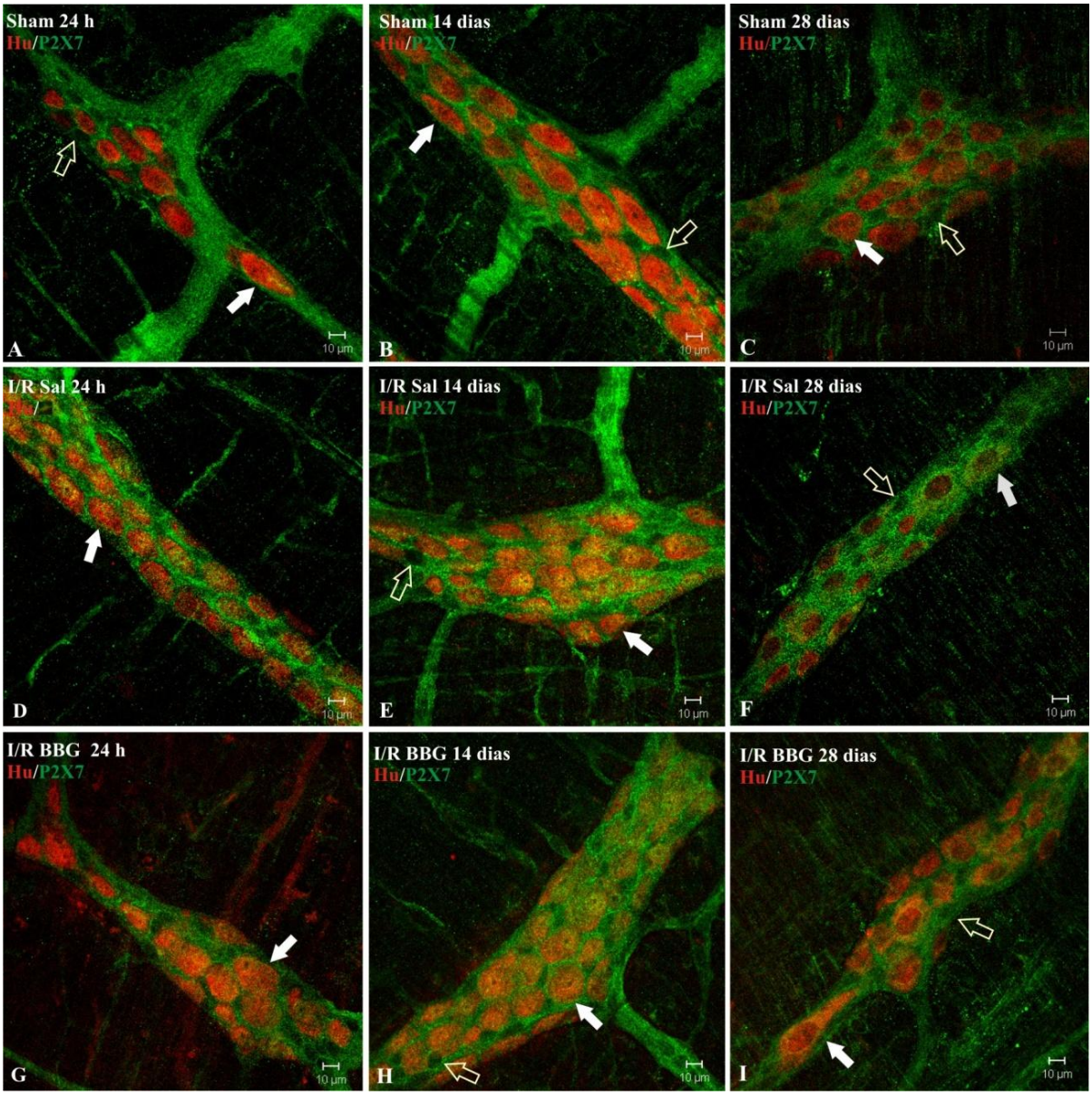
Nos gânglios foram observados neurônios imunorreativos ao Hu, com marcação no citoplasma e núcleo, com este tipo de imunomarcação foi possível evidenciar neurônios de diversos tamanhos (Figura 14 e 24 A, B e C).

Também, foi observado a dupla marcação de neurônios Hu-IR com o receptor P2X7, no entanto, houve presença de células imunorreativas somente ao receptor que não colocalizavam com neurônios Hu-IR (Figura 14 e 24 A, B e C).

Nas análises quantitativas, a dupla marcação demonstrou 100% de colocalização dos neurônios Hu-IR e receptor P2X7-IR (Figura 15 A).

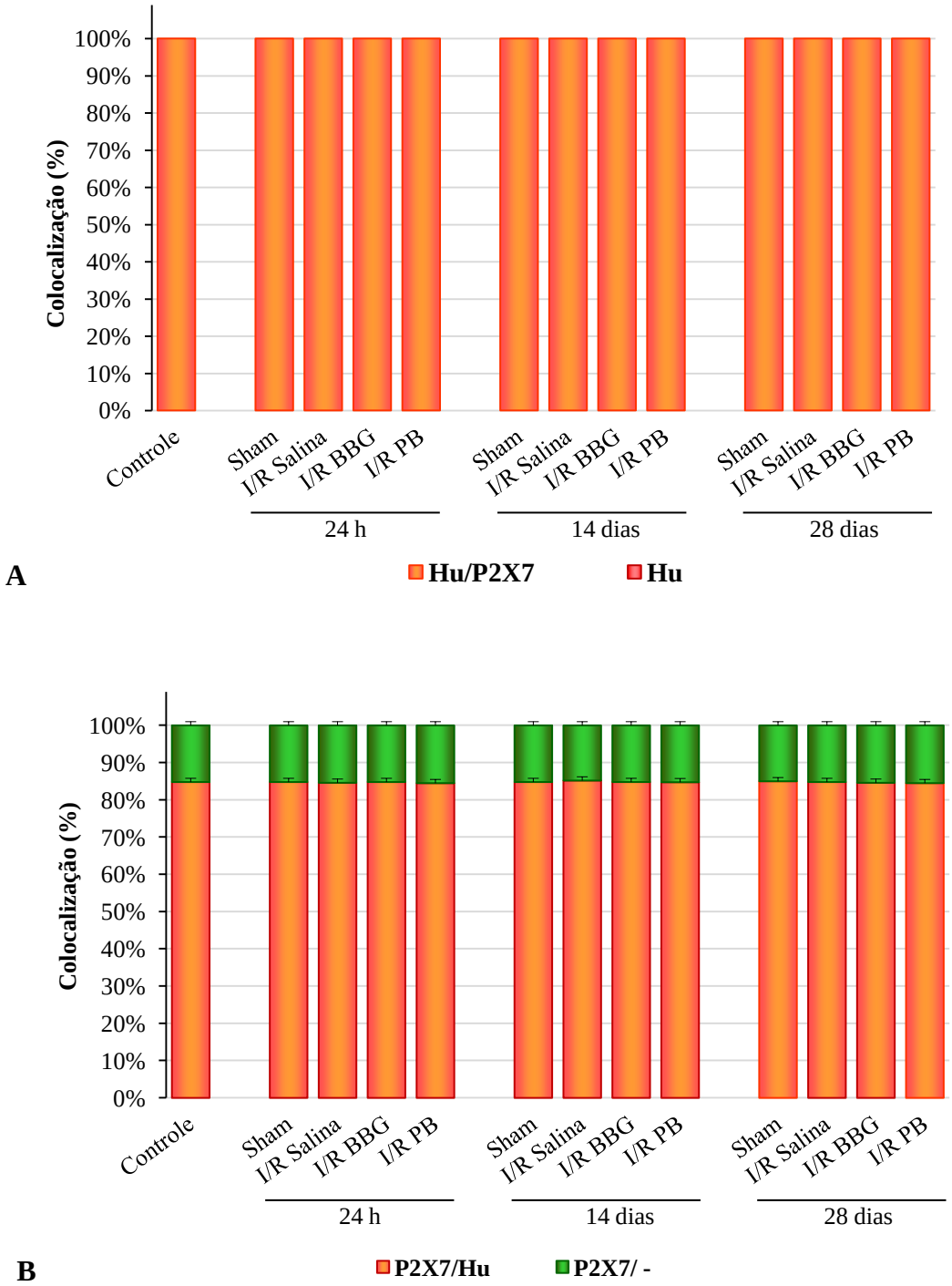
Ao realizar a análise inversa, a dupla marcação demonstrou que a colocalização do receptor P2X7-IR com neurônios Hu-IR é de 85±3%. Portanto, 15% de células imunorreativas ao receptor P2X7 não colocalizam com neurônios, podendo ser imunorreativos a outro tipo celular (Figura 15 B). Estes dados não apresentaram diferenças significantes entre os grupos e tempos estudados.

Figura 14 - Dupla marcação de neurônios imunorrreativos ao Hu e receptor P2X7 no plexo mioentérico do íleo de ratos.



Neurônios imunorreativos (Hu) ao receptor P2X7 do plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Sham 24 h, 14 dias e 28 dias (A-C), I/R Salina 24 h, 14 dias e 28 dias (D-F), I/R BBG 24 h, 14 dias e 28 dias (G-I). Setas simples indicam dupla marcação dos neurônios Hu-IR (vermelho) e P2X7-IR (verde); setas vazadas indicam células imunorreativas ao receptor P2X7 que não colocalizam com neurônios Hu-IR (Barra: 10 µm).

Figura 15 - Análise quantitativa da dupla marcação de neurônios imunorrreativos ao Hu e receptor P2X7 no plexo mioentérico do íleo de ratos.



Análise quantitativa de todos os grupos estudados da dupla marcação de Hu/P2X7 (A) e a análise inversa de P2X7/Hu (B). Os dados são de n = 5 e expressos em Média ± desvio padrão.

4.3.2 Dupla marcação de S100β/P2X7

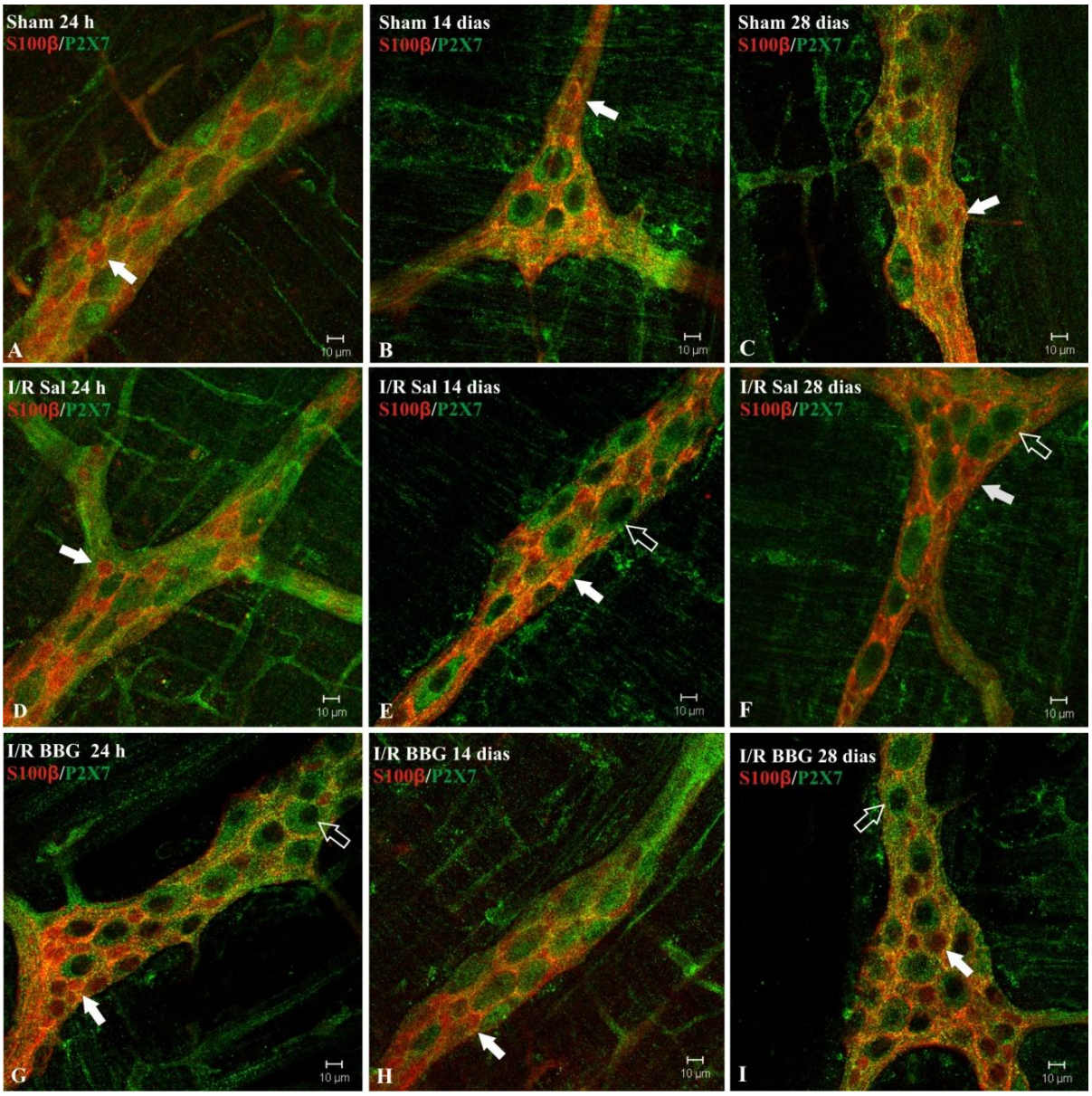
Visto que houve células imunorreativas somente ao receptor P2X7, foi investigada a dupla marcação deste receptor com as células gliais entéricas, utilizando o marcador S100β (marcador de células gliais entéricas). Ao realizar a marcação do receptor P2X7 com S100β, confirmou-se que as células gliais entéricas (imunorreativas a S100β) expressam o receptor purinérgico P2X7 (Figura 16 e 24 D, E e F).

As células gliais entéricas imunorreativas a S100β estavam presentes nos gânglios, tendo marcação de citoplasma e núcleo (Figura 16 e 24 D, E e F).

Na análise quantitativa pode-se observar que a dupla marcação de células gliais entérica S100β -IR e receptor P2X7 foi de 100% nos grupos estudados (Figura 17 A). No entanto quando feita a análise inversa, a dupla marcação do receptor P2X7/S100β foi de 38,7±2% (Figura 17 B).

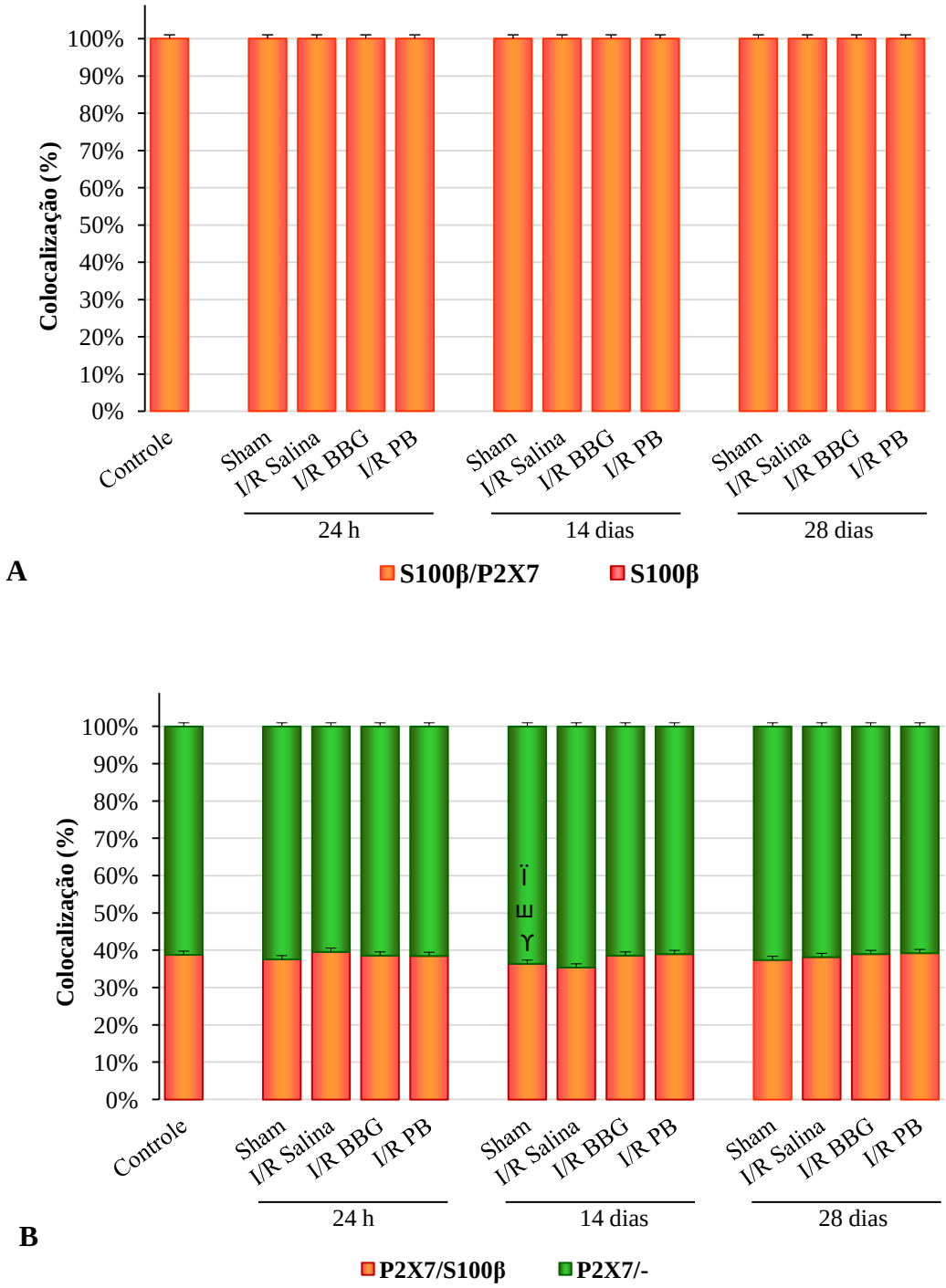
Nesta análise, foi detectado efeito de interação (Grupo X Tempo), onde se observar que o grupo I/R Salina 14 dias apresentou uma diminuição significante ($p<0,05$) de 11% quando comparado ao grupo I/R Salina 24 h e uma diminuição significante ($p<0,05$) de 8% e 10% quando comparado com os grupos I/R BBG 14 dias e I/R PB 14 dias, respectivamente (Figura 17 B).

Figura 16 - Dupla marcação de células gliais entéricas imunorrreativas a S100β e receptor P2X7 no plexo mioentérico do íleo de ratos.



Células gliais entéricas (S100β) imunorreativas ao receptor P2X7 do plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Sham 24 h, 14 dias e 28 dias (A-C), I/R Salina 24 h, 14 dias e 28 dias (D-F), I/R BBG 24 h, 14 dias e 28 dias (G-I). Setas simples indicam dupla marcação das células gliais entéricas S100β-IR(vermelho) e P2X7-IR (verde). Setas vazadas indicam células imunorreativas ao receptor P2X7 que não colocalizam com células gliais entéricas (S100β) (Barra: 10 µm).

Figura 17 - Análise quantitativa da dupla marcação de células gliais entéricas imunorreativas a S100β e receptor P2X7 no plexo mioentérico do íleo de ratos.



Análise quantitativa de todos os grupos estudados da dupla marcação de S100β/P2X7 (A) e a análise inversa de P2X7/S100β (B). Os dados são de n = 5 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) (^{Y} I/R Salina 14 dias *vs* I/R Salina 24 h; ^{ш} I/R Salina 14 dias *vs* I/RBBG 14 dias; ^{Ï} I/R Salina 14 dias *vs* I/R PB 14 dias).

4.3.3 Dupla marcação de S100β/GFAP

Nas figuras 18 e 24 G, H e I observou-se dupla marcação de S100β/GFAP, nesta análise pode-se observar células gliais entéricas imunorreativas somente a GFAP ou somente a S100β, sugerindo assim, que células gliais entéricas podem ter fenótipos diferentes. As células gliais entéricas imunorreativas a S100β estão presentes no gânglio, tendo a marcação do citoplasma e núcleo. As células gliais entéricas imunorreativas a GFAP apresentaram uma marcação filamentosa, com muitos prolongamentos (Figura 18 e 24 G, H e I).

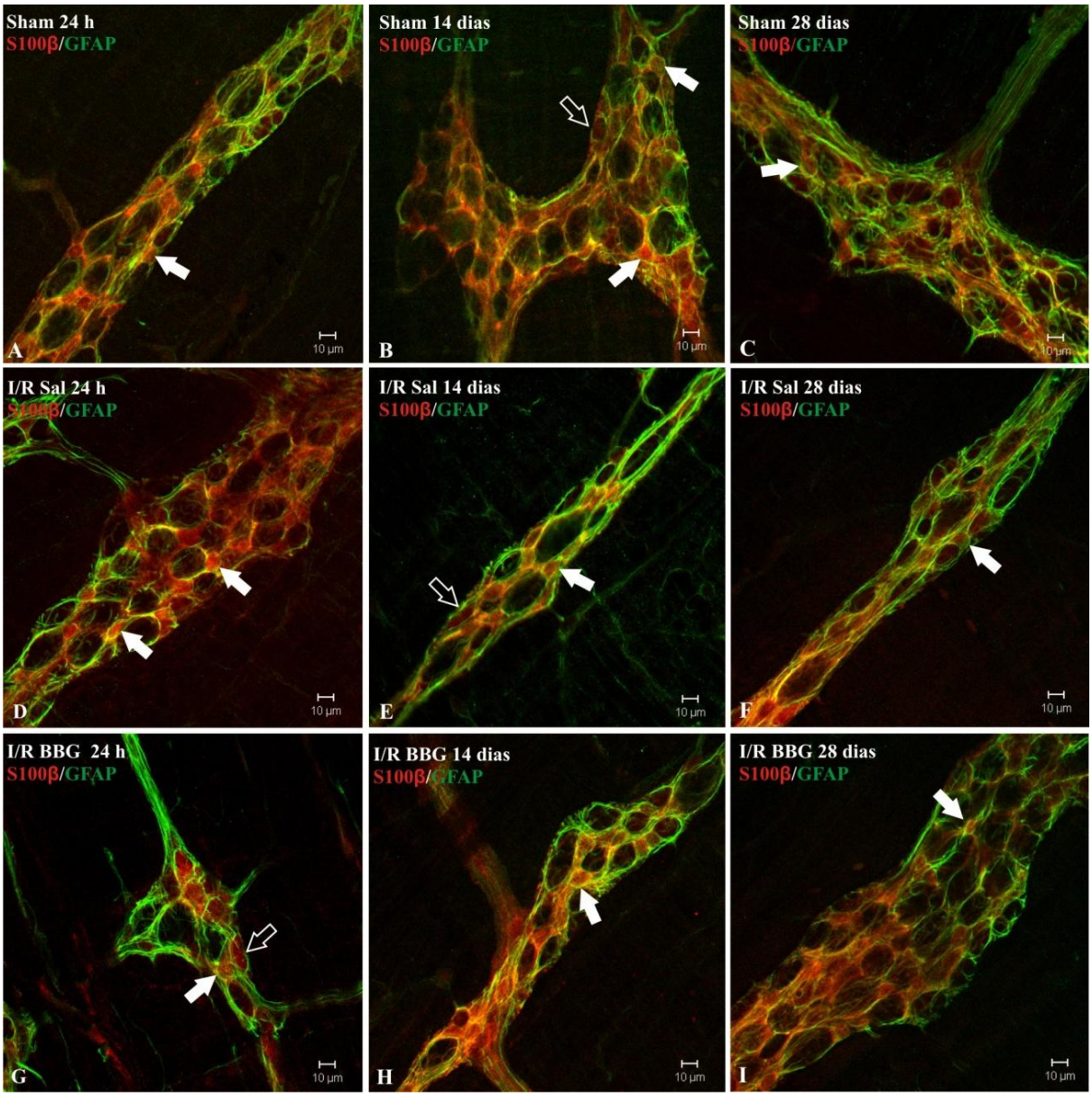
Na análise quantitativa pode-se observar que a dupla marcação de células gliais entérica imunorreativa a S100β e GFAP foi de 71±2%, portanto houve 29±2%, de células gliais entéricas imunorreativas somente a S100β (Figura 19 A).

Nesta análise, foi detectado efeito de interação (Grupo X Tempo). Pode-se observar que os grupos I/R Salina 24 h e 28 dias apresentaram uma diminuição significante ($p<0,05$) de 3% quando comparado aos seus respectivos grupos Sham. No entanto, o grupo I/R Salina 14 dias apresentou um aumento significante ($p<0,05$) de 3,4% quando comparado ao seu respectivo Sham (Figura 19 A).

O grupo I/R Salina 14 dias apresentou um aumento significante ($p<0,05$) quando comparado com os grupos I/R Salina 24 h (4%) e I/R Salina 28 dias (3%) (Figura 19 A).

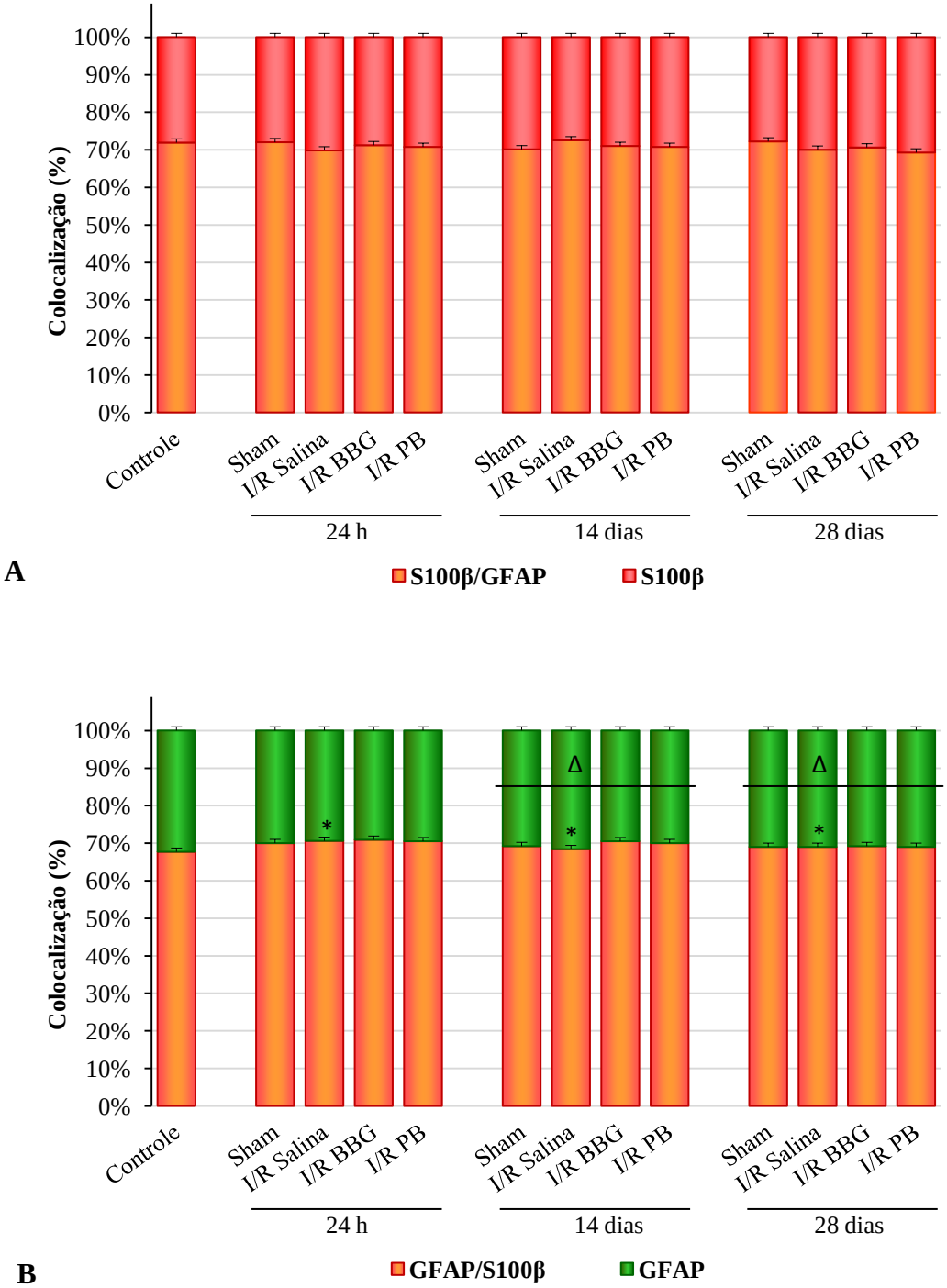
Fazendo a análise inversa da dupla marcação de células gliais entéricas imunorreativa a GFAP/S100β observou-se colocalização de 69,5±1,4% e 30,5±1,4% de células gliais entéricas imunorreativas somente a GFAP (Figura 19 B). Com essa análise foi detectado diferença significante entre os tempos; observou-se que os grupos de 14 dias e 28 dias apresentaram diminuição significante ($p<0,05$) de 2% quando comparado com o grupo de 24 h, essa diferença é independente do grupo.

Figura 18 - Dupla marcação de células gliais entéricas S100β-IR e GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.



Células gliais entéricas imunorreativas a S100β (vermelho), GFAP (verde) do plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos sham 24 h, 14 dias e 28 dias (A-C), I/R salina 24 h, 14 dias e 28 dias (D-F), I/R BBG 24 h, 14 dias e 28 dias (G-I). Setas simples indicam marcação das células gliais entéricas imunorreativas ao S100β e GFAP-IR. Setas vazadas indicam células gliais entéricas imunorreativas somente a S100β (Barra: 10 µm).

Figura 19 - Análise quantitativa da dupla marcação de células gliais entéricas imunorreativas a S100β e GFAP no plexo mioentérico do íleo de ratos.



Análise quantitativa de todos os grupos estudados da dupla marcação de S100β/GFAP (A) e a análise inversa de GFAP/S100β (B). Os dados são de n = 5 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) (*I/R Salina *vs* Sham; ϒ I/R Salina 14 dias *vs* I/R Salina 24 h; Δ14 dias e 28 dias *vs* 24 h).

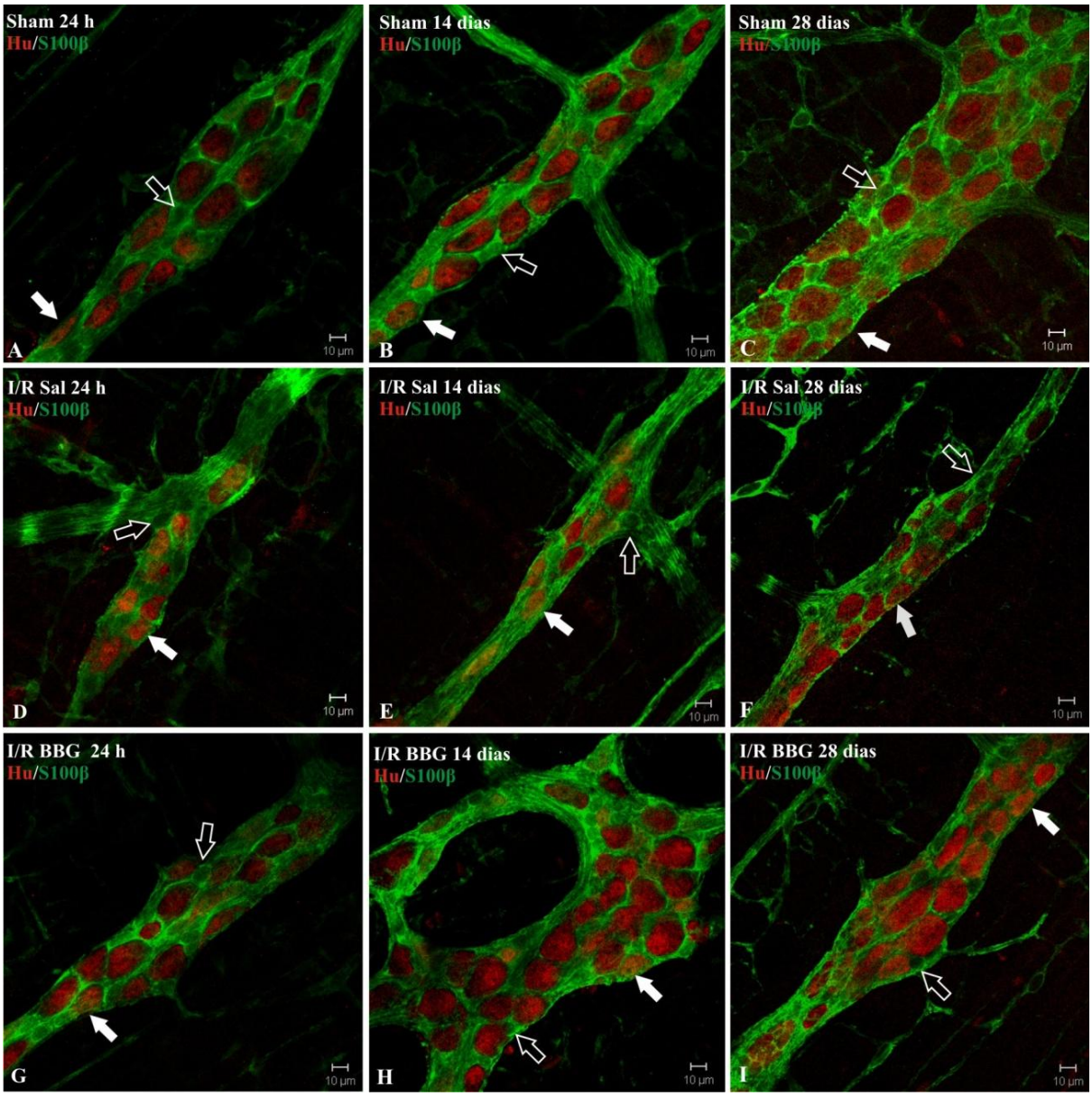
4.3.4 Dupla marcação de Hu/S100β

Na dupla marcação de Hu/S100β foi possível observar marcação no citoplasma e nos núcleos dos neurônios imunorreativos ao Hu, evidenciando neurônios de diferentes tamanhos. A marcação de S100β mostrou que células gliais entéricas estão distribuídas em todo gânglio (Figura 20 e 24 J, K e L).

Com essa marcação foi possível demonstrar a colocalização de Hu/S100β, essa colocalização é possível, pois alguns tipos de neurônios tem cálcio e a proteína S100β é um marcador de cálcio.

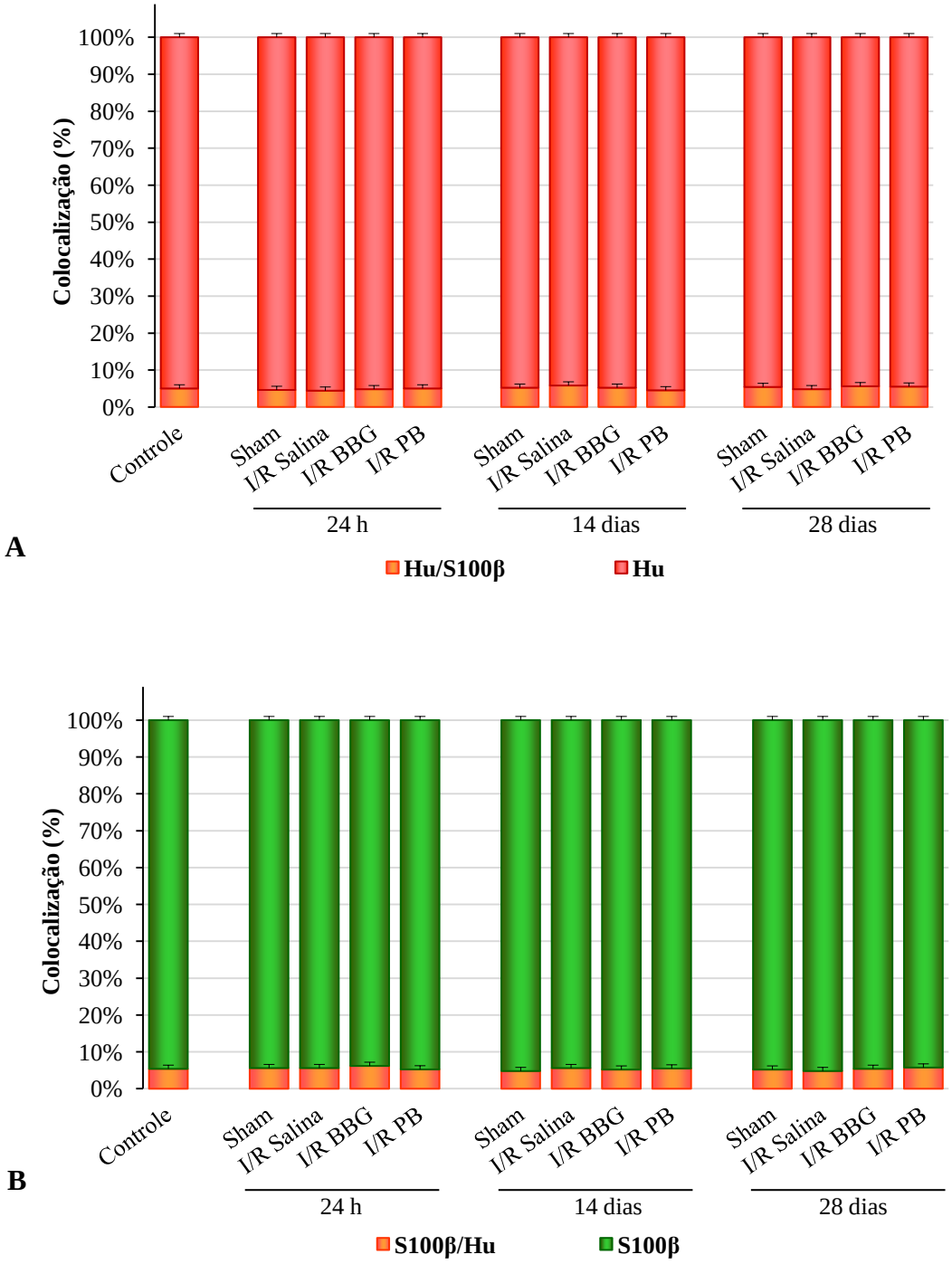
Nas análises quantitativas, a dupla marcação demonstrou 5% de colocalização dos neurônios Hu-IR e células gliais entéricas S100β-IR, portanto 95% de Hu/S100β não colocalizaram (Figura 21 A e B).

Figura 20 - Dupla marcação de neurônios HU-IR e células gliais entéricas S100β-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.



Neurônios imunorreativos ao Hu e células gliais entéricas imunorreativas a S100β do plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Sham 24 h, 14 dias e 28 dias (A-C), I/R Salina 24 h, 14 dias e 28 dias (D-F), I/R BBG 24 h, 14 dias e 28 dias (G-I). Setas simples indicam dupla marcação dos neurônios Hu-IR (vermelho) e S100β (verde); setas vazadas indicam células imunorreativas a S100β que não colocalizam com neurônios Hu-IR (Barra: 10 µm).

Figura 21 - Análise quantitativa da dupla marcação de neurônios imunorreativos ao Hu e células gliais entéricas imunorreativas a S100β no plexo mioentérico do íleo de ratos.



Análise quantitativa de todos os grupos estudados da dupla marcação de Hu/S100β (A) e a análise inversa de S100β/Hu (B). Os dados são de n = 5 e expressos em Média ± desvio padrão.

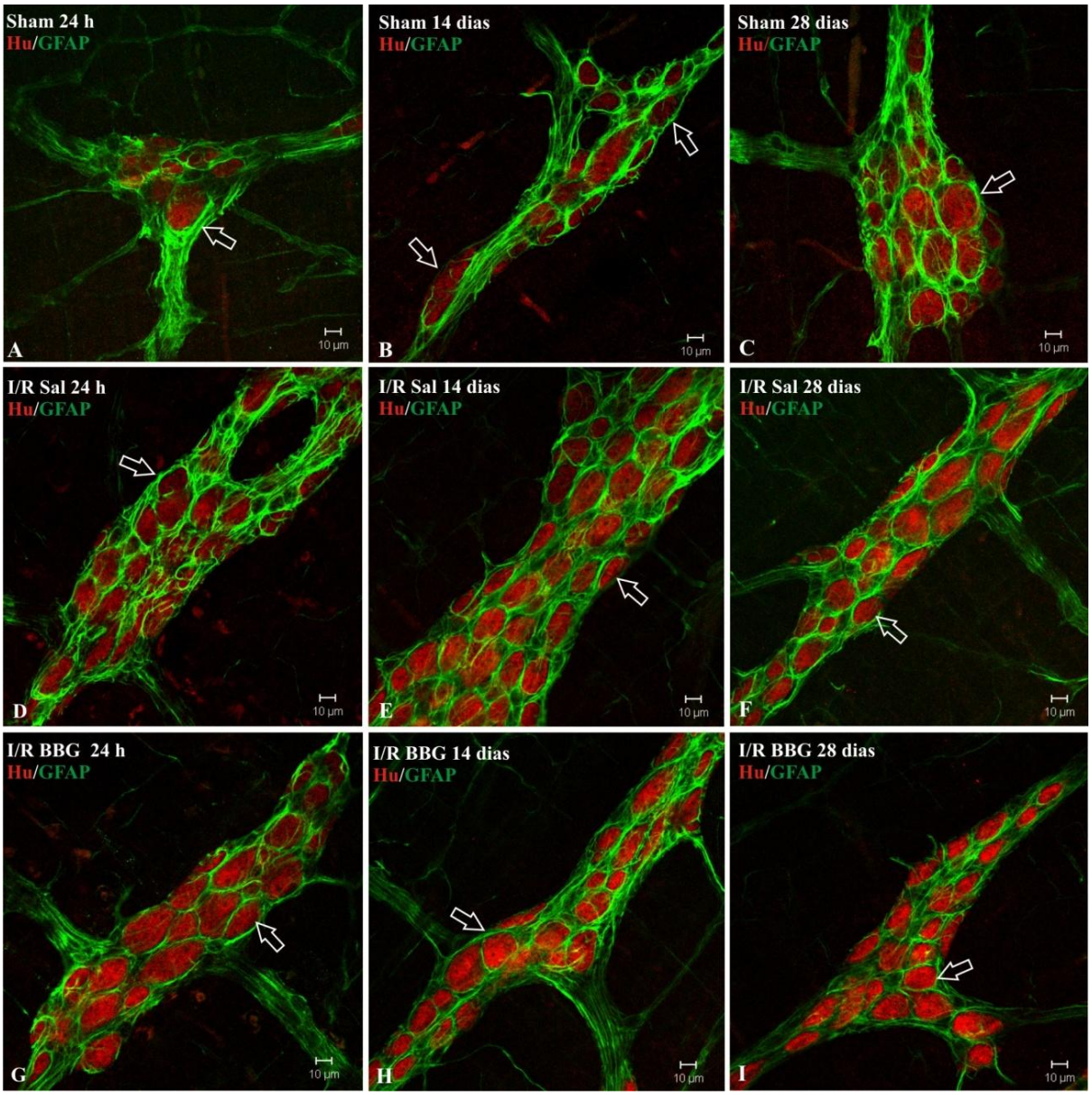
4.3.5 Dupla marcação de Hu/GFAP

Na figura 22 visualiza-se a marcação de Hu e GFAP, podendo assim, observar que não houve colocalização de neurônios imunorreativos ao Hu com GFAP (marcador de células gliais entéricas).

Na marcação de Hu foi possível observar marcação no citoplasma e nos núcleos dos neurônios. Esta imunomarcação demonstrou neurônios de diversos tamanhos. E a marcação de GFAP está presente em células glais entéricas, sendo que nos grupos isquêmicos houve aumento dos prolongamentos GFAP-IR (Figura 22).

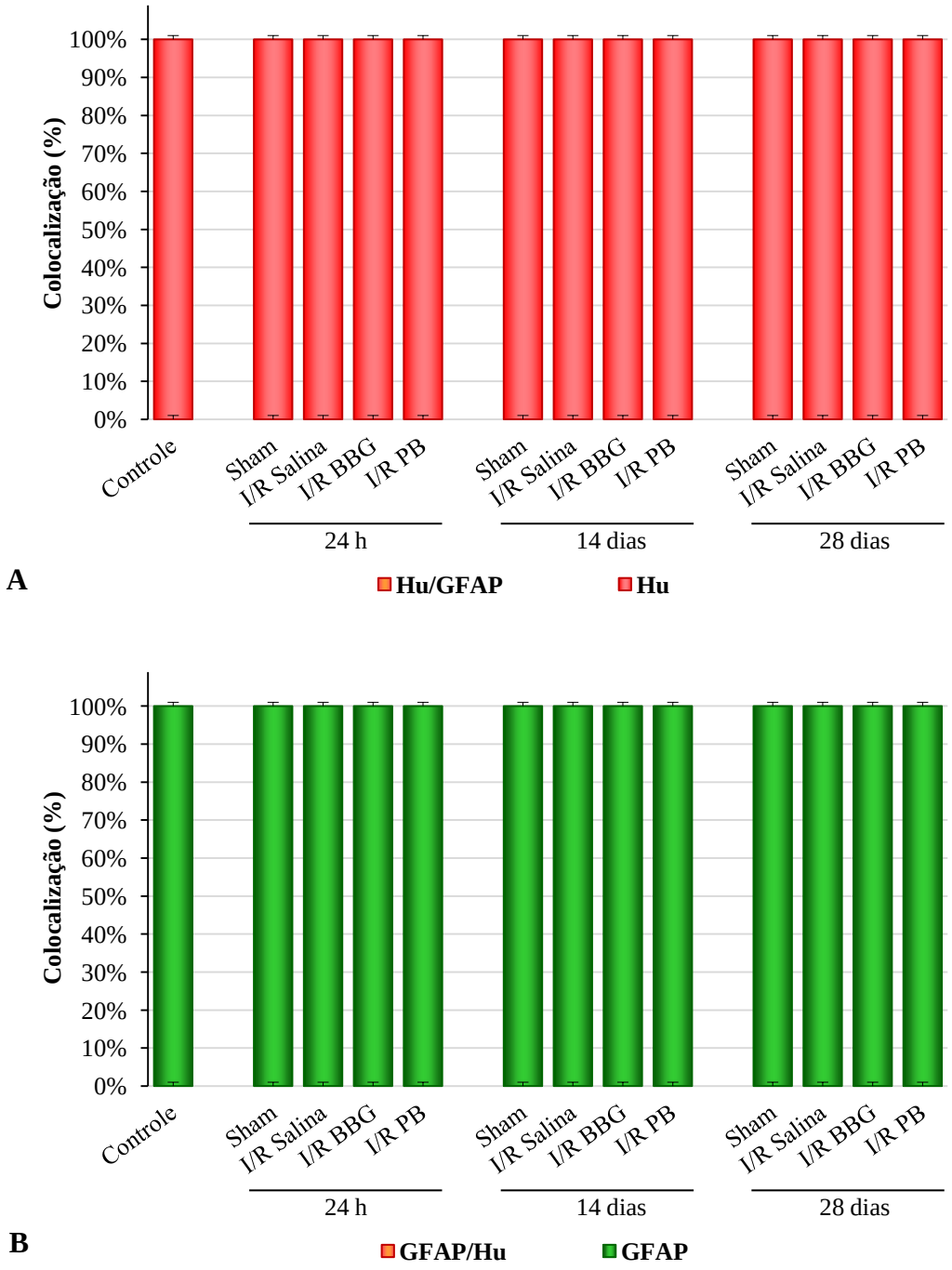
A analise quantitativa da dupla marcação de Hu/GFAP , demonstrou que 100% dos neurônios Hu positivos não são imunorreativos a GFAP. Inversamente pode se observar que 100% das células gliais entéricas imunorreativas a GFAP não colocalizam com Hu (Figura 23 A e B).

Figura 22 - Marcação de neurônios Hu-IR e células gliais entéricas GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.



Neurônios imunorreativos ao Hu (vermelho) e células gliais entericas imunorreativas a GFAP (verde) do plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos sham 24 h, 14 dias e 28 dias (A-C), I/R Salina 24 h, 14 dias e 28 dias (D-F), I/R BBG 24 h, 14 dias e 28 dias (G-I). Setas vazadas indicam neurônios Hu-IR que não colocalizam com células gliais entéricas GFAP-IR (Barra: 10 µm).

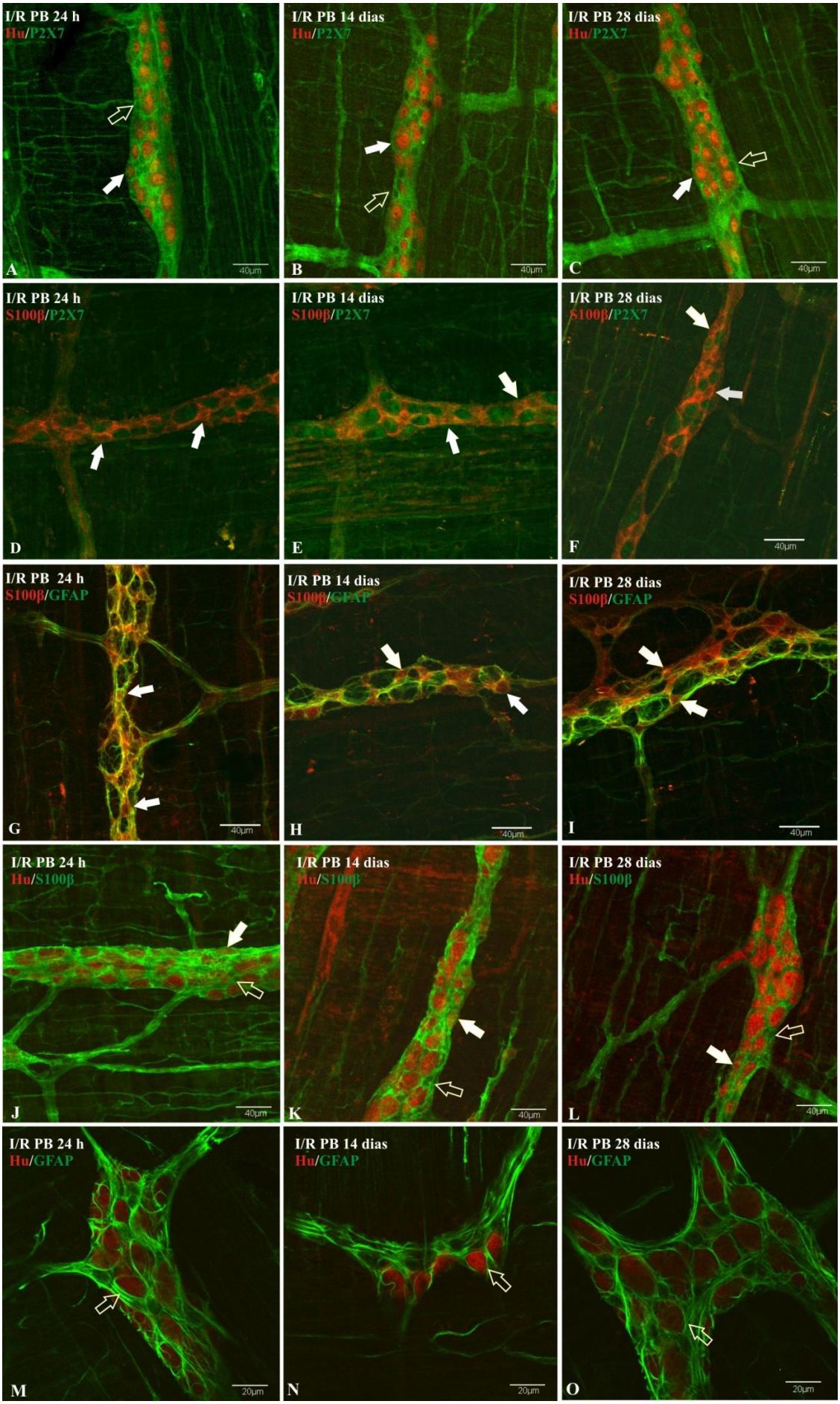
Figura 23 - Análise quantitativa da dupla marcação de Hu e GFAP no plexo mioentérico do íleo de ratos.



Análise quantitativa de todos os grupos estudados da dupla marcação de Hu/GFAP (A) e a análise inversa de GFAP/Hu (B). Os dados são de n = 5 e expressos em Média ± desvio padrão.

Figura 24 - Marcação de neurônios Hu-IR, células gliais entéricas S100β/GFAP-IR e células receptor P2X7-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos I/R Probenecida com 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão.

Duplas marcações do plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos I/R Probenecida com 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão. Neurônios Hu imunorreativos ao receptor P2X7 (A-C), setas simples indicam dupla marcação dos neurônios Hu-IR (vermelho) e P2X7-IR (verde); setas vazadas indicam células imunorreativas ao receptor P2X7 que não colocalizam com neurônios Hu-IR. Células gliais entéricas (S100β) imunorreativas ao receptor P2X7 (D-F), Setas simples indicam dupla marcação das células gliais entéricas S100β-IR(vermelho) e P2X7-IR (verde). Células gliais entéricas imunorreativas a S100β (vermelho), GFAP (verde) (G-I), Setas simples indicam marcação das células gliais entéricas imunorreativas ao S100β e GFAP-IR. Neurônios imunorreativos ao Hu e células gliais entéricas imunorreativas a S100β (J-L), Setas simples indicam dupla marcação dos neurônios Hu-IR (vermelho) e S100β (verde); setas vazadas indicam células imunorreativas a S100β que não colocalizam com neurônios Hu-IR. Neurônios imunorreativos ao Hu (vermelho) e células gliais entericas imunorreativas a GFAP (verde) (M-O), Setas vazadas indicam neurônios Hu-IR que não colocalizam com células gliais entéricas GFAP-IR (Barra: 40 µm)


I/R PB 24 h
Hu/P2X7
A
40µm
I/R PB 14 dias
Hu/P2X7
B
40µm
I/R PB 28 dias
Hu/P2X7
C
40µm
I/R PB 24 h
S100β/P2X7
D
I/R PB 14 dias
S100β/P2X7
E
I/R PB 28 dias
S100β/P2X7
F
40µm
I/R PB 24 h
S100β/GFAP
G
40µm
I/R PB 14 dias
S100β/GFAP
H
40µm
I/R PB 28 dias
S100β/GFAP
I
40µm
I/R PB 24 h
Hu/S100β
J
40µm
I/R PB 14 dias
Hu/S100β
K
40µm
I/R PB 28 dias
Hu/S100β
L
40µm
I/R PB 24 h
Hu/GFAP
M
20µm
I/R PB 14 dias
Hu/GFAP
N
20µm
I/R PB 28 dias
Hu/GFAP
O
20µm

4.3.6 Dupla marcação de Panexina-1/GFAP

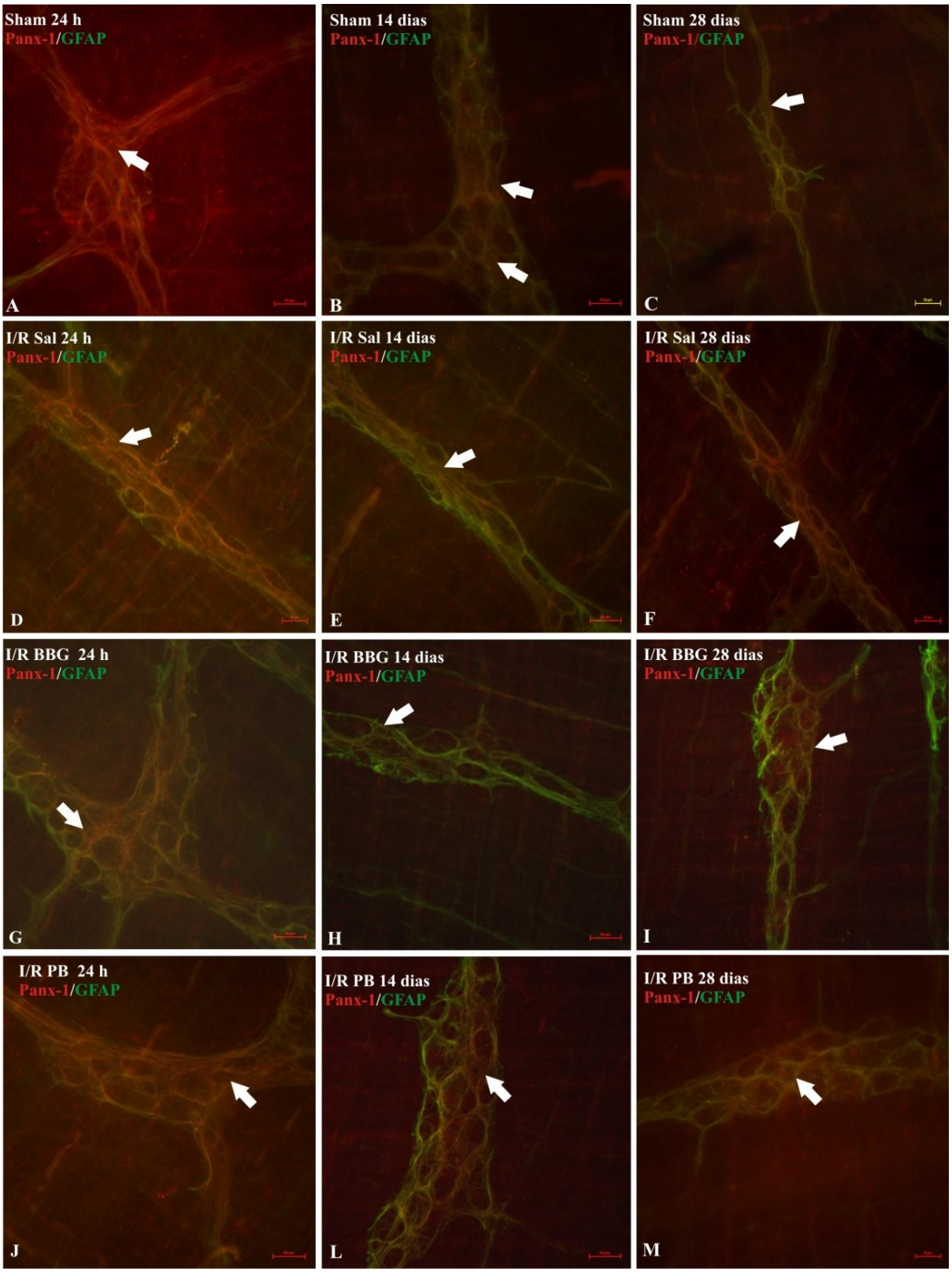
Na análise qualitativa, pode ser observado dupla marcação de Panexina-1 com células gliais entéricas GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB com 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão (Figura 25).

Nas análises quantitativas, a dupla marcação demonstrou 100% de colocalização de células gliais entéricas GFAP-IR e Panexina-1(Figura 26 A).

Ao realizar a análise inversa, a dupla marcação demonstrou que a colocalização de Panexina-1 com células gliais entéricas é de 37±1% (Figura 26 B).

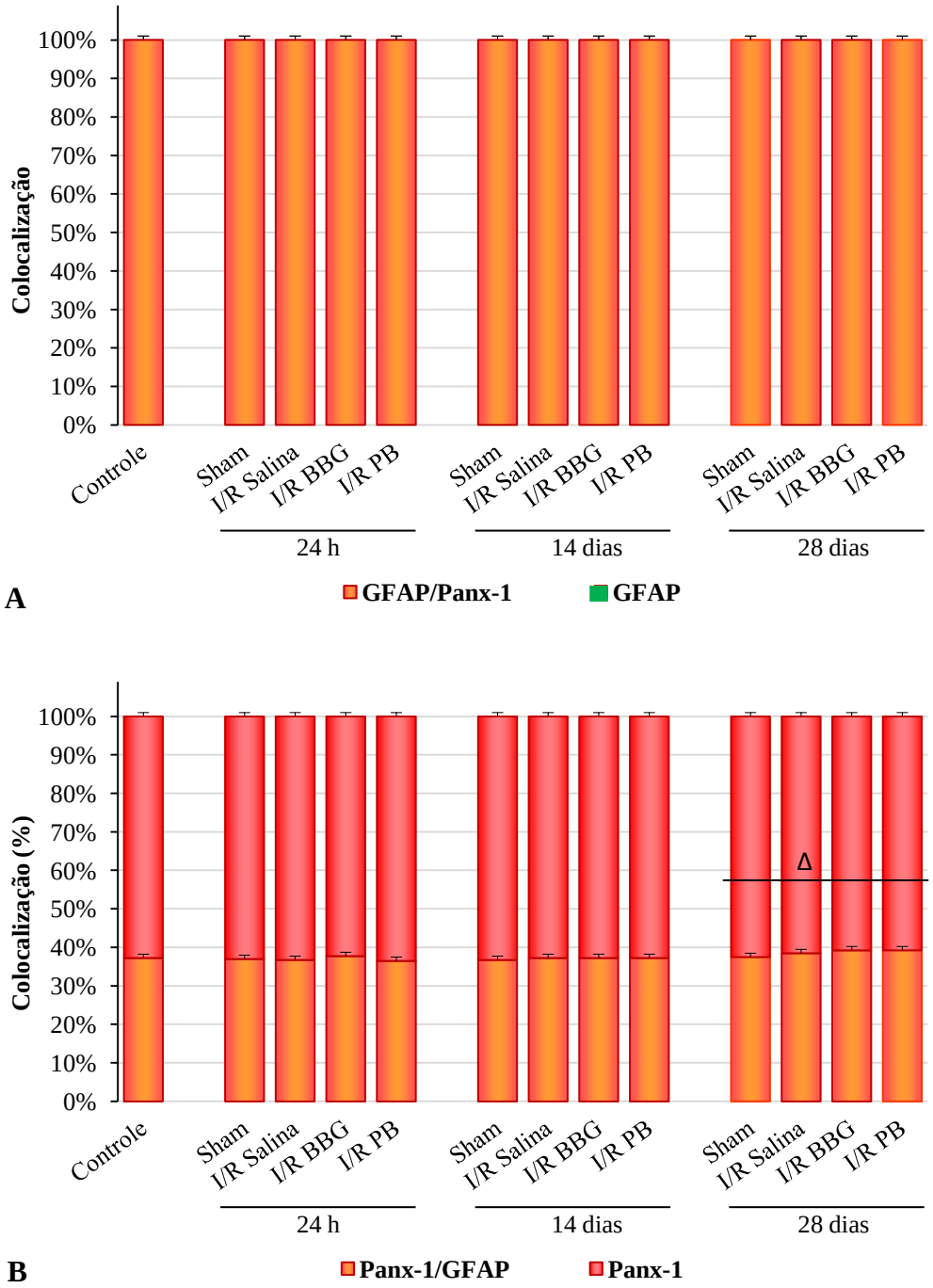
Estes dados apresentaram efeito de interação entre grupo e tempo. O grupo de 28 dias apresentou aumento significante ($p<0,05$) de 2% quando comparado com os grupos de 24 h e 14 dias respectivamente (Figura 26 B).

Figura 25 - Dupla marcação de Panexina-1 e células gliais entéricas GFAP-IR no plexo mioentérico do íleo de ratos.



Panexina-1 e células gliais entéricas imunorreativas a GFAP do plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos Sham 24 h, 14 dias e 28 dias (A-C), I/R Salina 24 h, 14 dias e 28 dias (D-F), I/R BBG 24 h, 14 dias e 28 dias (G-I). Setas simples indicam dupla marcação de Panexina-1 (vermelho) e GFAP (verde) (Barra: 50 µm).

Figura 26 - Análise quantitativa da dupla marcação de Panexina-1 e GFAP no plexo mioentérico do íleo de ratos.



Análise quantitativa de todos os grupos estudados da dupla marcação de GFAP/Panx-1 (A) e a análise inversa de Panx-1/GFAP (B). Os dados são de n =4 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05)
($^{\Delta}$ 28 dias *vs* 24 h e 14 dias).

4.3.6 Efeito da I/R sobre a densidade Neuronal e Glial

A densidade das células (células/cm^2) foi obtida a partir da contagem de células imunorreativas ao receptor P2X7, Panexina-1, S100β, GFAP e Hu em 40 campos (área do campo microscópico 0,000379 cm^2) com o aumento de 100 X.

4.3.7.1 Receptor P2X7

As células imunorreativas ao receptor P2X7 dos grupos I/R Salina 24 h, 14 dias e 28 dias apresentaram diminuição significante ($p<0,05$) de 37%, 28% e 24% respectivamente, quando comparadas aos seus respectivos grupos Sham. Quando feita a comparação I/R Salina vs I/R BBG, observa-se que os grupos isquêmicos tratados com BBG apresentaram um aumento significante ($p<0,05$) (24 h 21%, 14 dias 15% e 28 dias 24%) (Figura 27 A).

Os grupos I/R BBG 24 h, 14 dias e 28 dias apresentaram uma diminuição significante ($p<0,05$) de 23%, 16% e 5% respectivamente, quando comparado aos seus respectivos grupos Sham (Figura 27 A).

Os grupos I/R PB apresentaram diminuição significante ($p<0,05$) quando comparado com seus respectivos Sham (24 h 26%, 14 dias 28% e 28 dias 10%). A análise de comparação entre I/R PB *vs* I/R Salina, demonstrou que os grupos I/R PB 24 h e 28 dias apresentaram aumento significante ($p<0,05$) de 17% e 18%, respectivamente quando comparado com I/R Salina de 24 h e 28 dias (Figura 27 A).

A análise dos grupos isquêmicos tratados com BBG e PB, demonstrou que os grupos I/R PB apresentaram diminuição significante ($p<0,05$) (24 h 21%, 14 dias 15% e 28 dias 24%) quando comparado aos grupos I/R tratado com BBG (Figura 27 A).

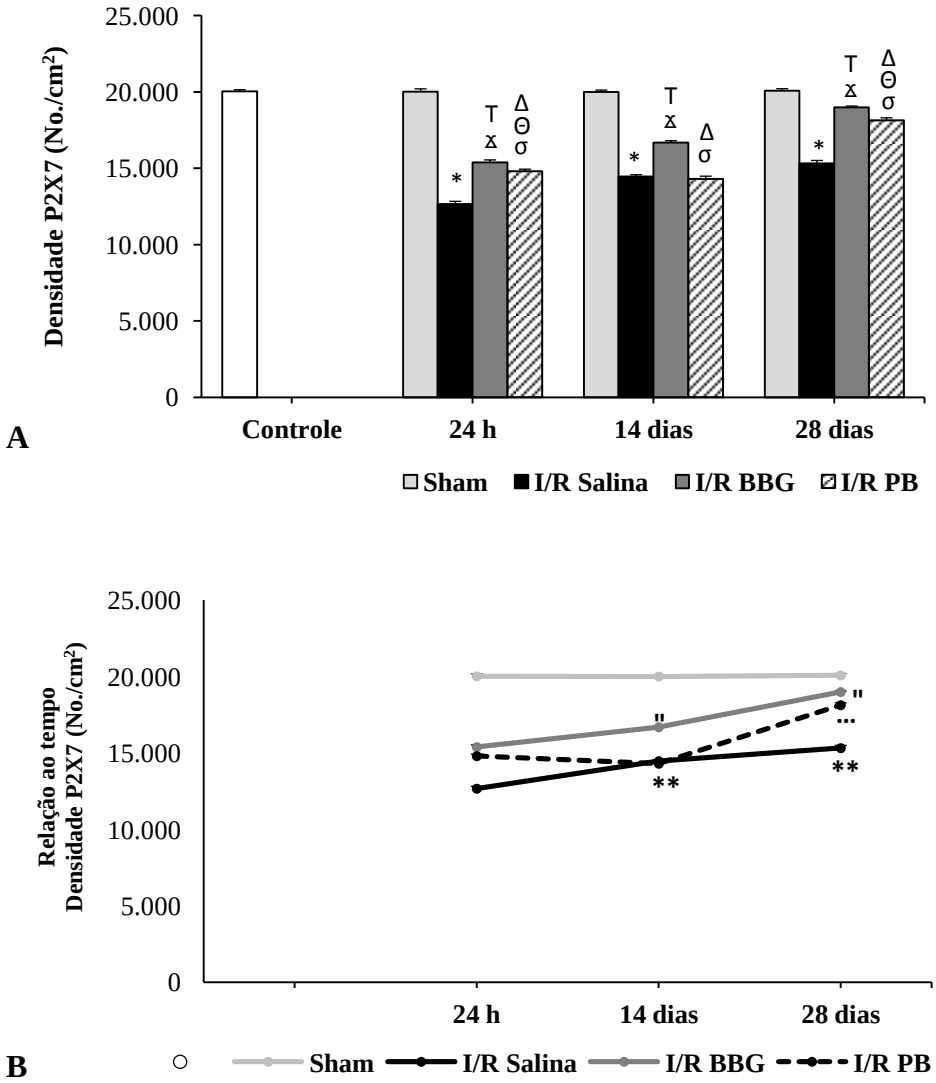
Foram avaliados dois fatores, os diferentes tempos de reperfusão e a comparação entre grupos. Com está avaliação foi possível detectar efeito de interação entre grupo e tempo. Levando em consideração o fator tempo foi demonstrado que os grupos I/R Salina 14 dias e 28 dias apresentaram um aumento significante ($p<0,05$) de 21% e 14%, respectivamente, quando comparado com o grupo I/R Salina 24 h, no entanto o grupo I/R Salina 28 dias apresentou um aumento significante ($p<0,05$) de 6% quando comparado com o grupo I/R Salina 14 dias (Figura 27 B).

Analisando os grupos I/R BBG pode-se observar um aumento da densidade em função do tempo, onde os grupos I/R BBG 14 dias e 28 dias apresentaram um aumento significante ($p<0,05$) de 23% e 8%, respectivamente, quando comparado com o grupo I/R BBG 24 h e o

grupo I/R BBG 28 dias apresentou um aumento significante (p<0,05) de 14% quando comparado com o grupo I/R BBG 14 dias (Figura 27 B).

E nos grupos I/R PB, o grupo I/R PB 28 dias apresentou um aumento significante (p<0,05) quando comparado com os grupos I/R PB 24 h (18%) e I/R PB 14 dias (21%) (Figura 27 B).

Figura 27 - Densidade do receptor P2X7 dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



Os dados são de n=5 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) (*I/R Salina *vs* Sham; ᵀI/R Salina *vs* I/R BBG; ˣ I/R BBG *vs* Sham; ᵒ I/R PB *vs* Sham; ᶿ I/R Salina *vs* I/R PB; ᴬI/R BBG *vs* I/R PB; **I/R Salina 14 dias e 28 dias *vs* I/R Salina 24 h; ¨ I/R BBG 14 dias e 28 dias *vs* I/R BBG 24 h; ···I/R PB 28 dias *vs* I/R PB 24 h e 14 dias).

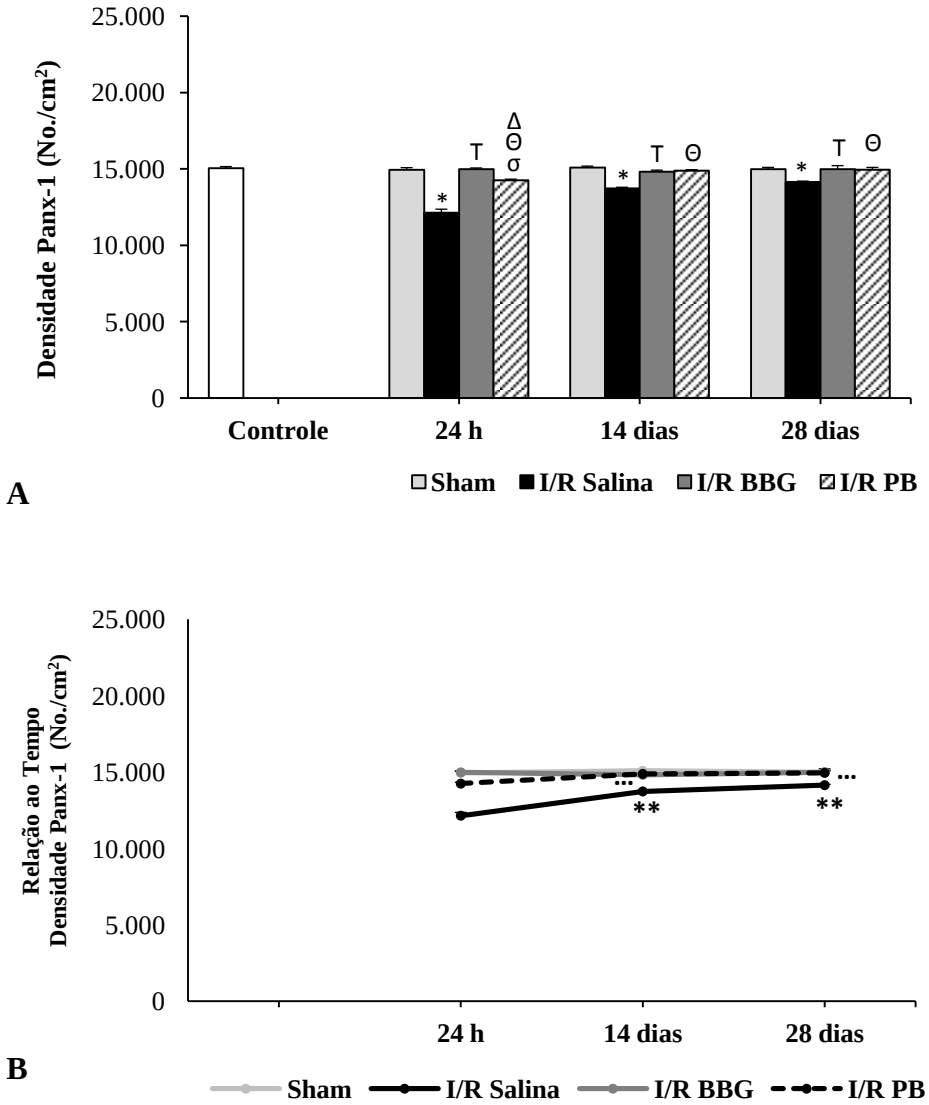
4.3.7.2 Canal de Panexina-1

As células imunorreativas ao canal de Panexina-1 dos grupos I/R Salina 24 h, 14 dias e 28 dias apresentaram diminuição significante ($p<0,05$) de 18%, 9% e 6% respectivamente, quando comparadas aos seus respectivos grupos Sham. Quando feita a
comparação dos grupos isquêmicos tratados com BBG e PB com I/R Salina, observar-se que tanto nos grupos isquêmicos tratados com BBG (24 h 23%, 14 dias 8% e 28 dias 6%) como tratados com PB (24 h 23%, 14 dias 8% e 28 dias 6%) apresentaram aumento significante ($p<0,05$) (Figura 28 A).

O grupo I/R PB com 24 h de reperfusão apresentou uma diminuição significante ($p<0,05$) de 6% quando comparado com seu respectivo Sham e com o grupo I/R BBG 24 h (Figura 28 A).

Nesta análise foram avaliados dois fatores, os diferentes tempos de reperfusão e a comparação entre grupos. Com está avaliação foi possível detectar efeito de interação entre grupo e tempo. Levando em consideração o fator tempo foi demonstrado que os grupos I/R Salina 14 dias e 28 dias apresentaram um aumento significante ($p<0,05$) de 16% e 13%, respectivamente, quando comparado com I/R Salina 24 h e os grupos isquêmicos tratados com PB com 14 dias e 28 dias de reperfusão apresentaram aumento significante ($p<0,05$) de 6% quando comparado com I/R PB 24 h (Figura 28 B).

Figura 28 - Densidade da Panexian-1 dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



Os dados são de n=4 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) (*I/R Salina *vs* Sham; ᵀI/R Salina *vs* I/R BBG; ᵟ I/R PB *vs* Sham; ᶿ I/R Salina *vs* I/R PB; ᴬI/R BBG *vs* I/R PB; **I/R Salina 14 dias e 28 dias *vs* I/R Salina 24 h;··· I/R PB 14 dias e 28 dias *vs* I/R PB 24 h).

4.3.7.3 Célula Glial Entérica - S100β

A densidade das células gliais entéricas imunorreativas a S100β dos grupos Sham 24 h e 28 dias apresentaram um aumento significante (p<0,05) de 2% quando comparado com o grupo Controle.

Na análise foi possível detectar efeito de interação entre grupo e tempo. Portanto, nos grupos I/R Salina 24 h, 14 dias e 28 dias foi observado um aumento significante (p<0,05) de 14%, 13% e 12% respectivamente, quando comparado aos seus respectivos Sham (Figura 29 A).

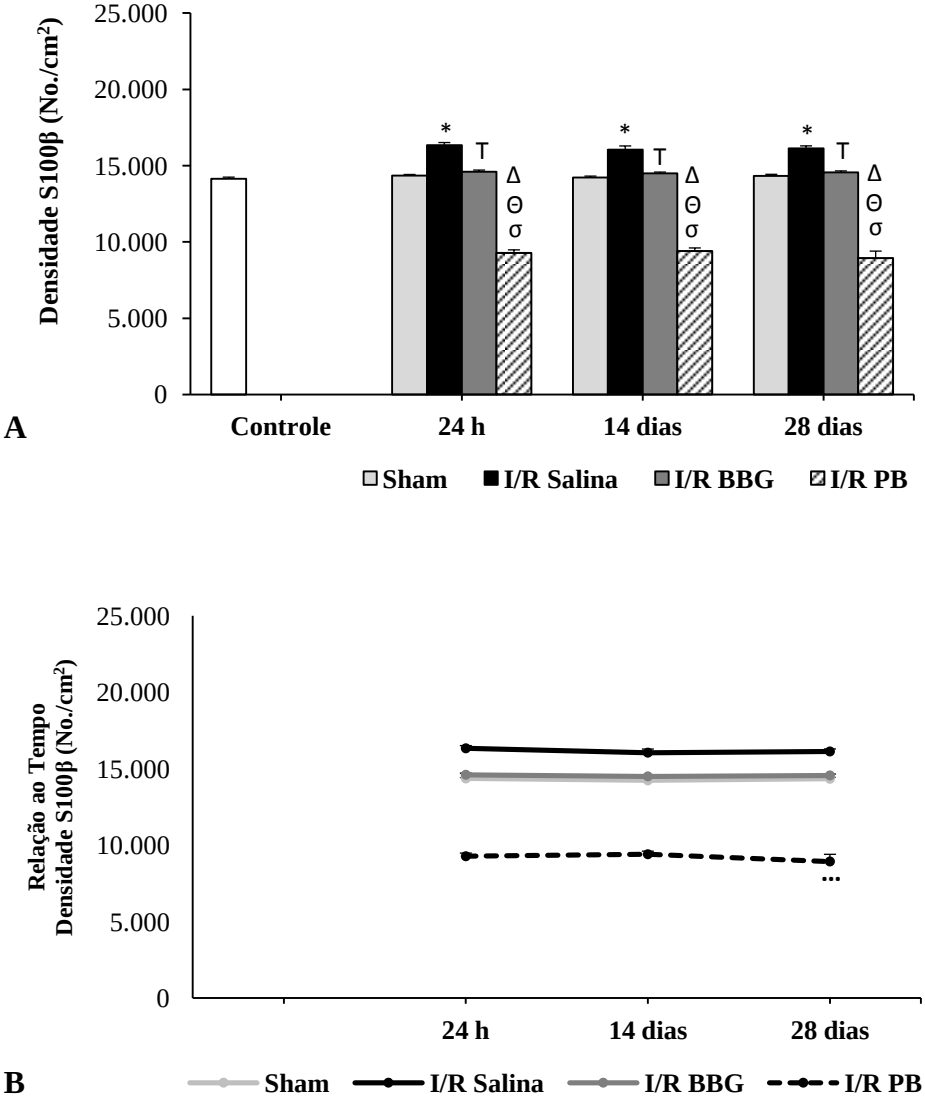
No entanto, quando feita a comparação de I/R BBG vs I/R Salina, os grupos I/R BBG apresentaram uma diminuição significante (p<0,05) (24 h 11%, 14 dias 11,5% e 28 dias 10%) (Figura 29 A).

Os grupos I/R PB 24 h, 14 dias e 28 dias apresentaram uma diminuição significante (p<0,05) de 35%, 34% e 38 % respectivamente, quando comparados aos seus respectivos Sham (Figura 24 A). Quando feita a comparação dos grupos I/R PB e I/R Salina, os grupos I/R PB 24 h, 14 dias e 28 dias apresentam uma diminuição significante (p<0,05) de 57%, 41% e 45% respectivamente, quando comparado com os grupos I/R Salina 24 h, 14 dias e 28 dias (Figura 29 A).

Realizando a comparação dos grupos isquêmicos tratados com BBG e PB foi possível observar que o grupo I/R PB apresentou uma diminuição significante (p<0,05) (24 h 36%, 14 dias 35% e 28 dias 38%) em relação ao grupo I/R BBG (Figura 29 A).

Foram avaliados dois fatores, os diferentes tempos de reperfusão e a comparação entre grupos. Pela análise dos resultados, detecta-se diferença significante no fator grupo/tempo. O grupo I/R PB 28 dias apresentou uma diminuição significante (p<0,05) de 5% comparado ao grupo I/R PB 14 dias (Figura 29 B).

Figura 29 - Densidade das células gliais entéricas imunorreativas a S100β dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



Os dados são de n=5 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) (*I/R Salina *vs* Sham; ᵀI/R Salina *vs* I/R BBG; ˣ I/R BBG *vs* Sham; ᵟ I/R PB *vs* Sham; ᶿ I/R Salina *vs* I/R PB; ᴬI/R BBG *vs* I/R PB; ···I/R PB 28 dias *vs* 14 dias).

4.3.7.4 Célula Glial Entérica - GFAP

A densidade das células gliais entéricas imunorreativas a GFAP dos grupos Sham 14 dias e 28 dias apresentaram uma diminuição significante (p<0,05) de 4% e 11%, respectivamente, quando comparado com o grupo Controle.

O grupo Sham 28 dias apresentou uma diminuição significante, quando comparado com os grupos Sham 24 h (7%) e 14 dias (9%).

Os grupos I/R Salina 24 h, 14 dias e 28 dias apresentaram aumento significante (p<0,05) de 13%, 38% e 14% respectivamente, quando comparado aos seus respectivos grupos Sham. Quando feita a comparação dos grupos I/R BBG *vs* I/R Salina pode-se observar uma diminuição significante (p<0,05) dos grupos I/R BBG (11% 24 h, 16% 14 dias e 6% 28 dias) (Figura 30 A).

Os grupos I/R BBG 14 dias e 28 dias apresentaram aumento significante (p<0,05) de 16% e 7%, em relação aos seus respectivos Sham (Figura 30 A).

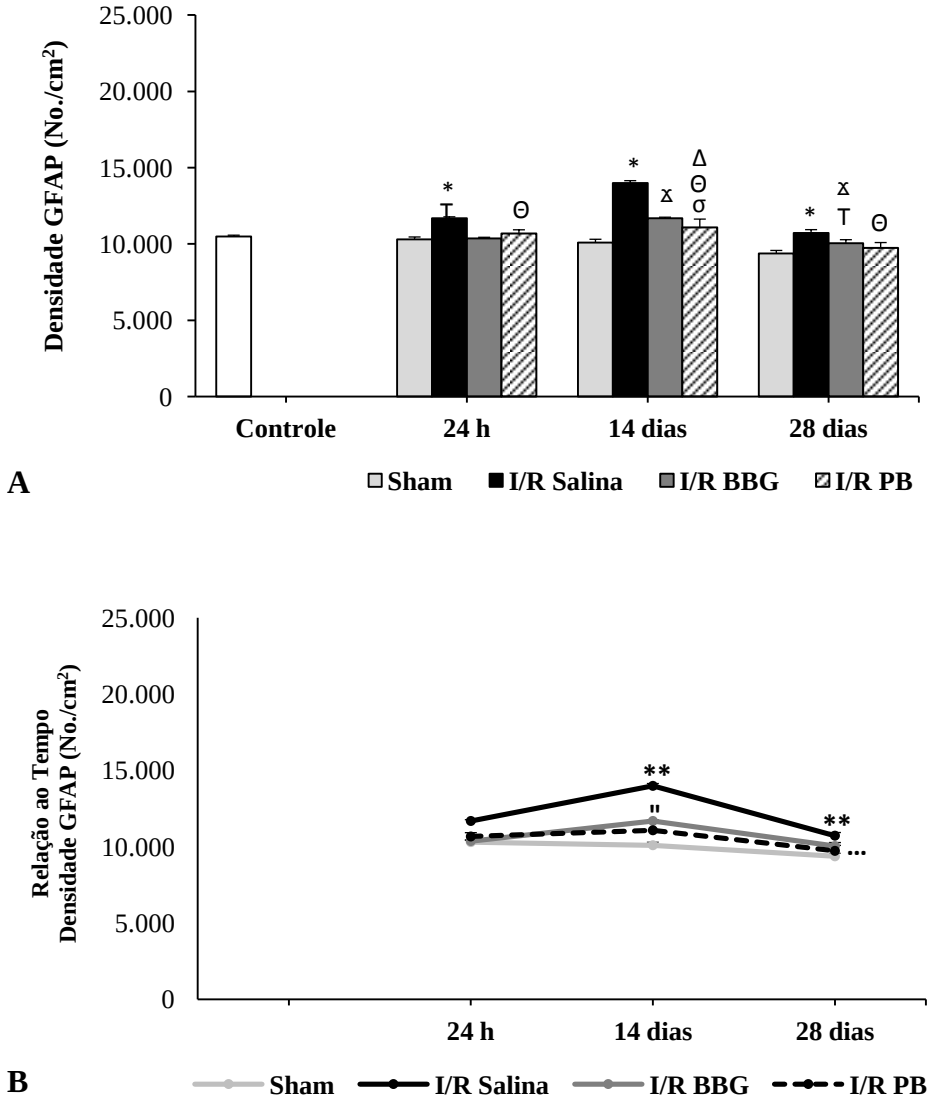
O grupo I/R PB 14 dias apresentou um aumento significante (p<0,05) de 10% quando comparado com seu respectivo Sham. Quando feita a comparação entre os grupos I/R PB vs I/R Salina foi possível observar que os grupos I/R PB apresentaram diminuição significante (p<0,05) (24 h 9%, 14 dias 21% e 28 dias 9%) (Figura 30 A).

Quando feita a análise dos grupos I/R tratados com BBG e PB foi detectado que somente o grupo de 14 dias apresentou diferença significante, podendo observar que o grupo I/R PB 14 dias apresentou uma diminuição significante (p<0,05) de 5% quando comparado com I/R BBG 14 dias (Figura 30 A).

Foram avaliados dois fatores, os diferentes tempos de reperfusão e a comparação entre grupos. Pela análise dos resultados, detecta-se diferença significante no fator grupo/tempo. Portanto, nos grupos I/R Salina foi detectado que o grupo de 14 dias apresenta aumento significante (p<0,05) de 20% quando comparado com o grupo I/R Salina 24 h, no entanto, o grupo I/R Salina 28 dias apresenta diminuição significante (p<0,05) de 8% e 23% respectivamente, quando comparado com I/R Salina 24 h e 14 dias (Figura 30 B).

Nos grupos I/R BBG foi possível observar que o grupo I/R BBG 14 dias apresenta aumento significante (p<0,05) de 13% quando comparado com I/R BBG 24 h, no entanto quando feita a comparação dos tempos 14 dias e 28 dias, observa-se que o grupo I/R BBG 28 dias apresenta diminuição significante (p<0,05) de 14% (Figura 25 B). E nos grupos I/R PB observa-se que o grupo I/R PB 28 dias apresenta uma diminuição significante (p<0,05) quando comparado com I/R PB 24 h (9%) e I/R PB 14 dias (12%) (Figura 30 B).

Figura 30 - Densidade das células gliais entéricas imunorreativas a GFAP dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



Os dados são de n=5 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) (*I/R Salina *vs* Sham; ᵀI/R Salina *vs* I/R BBG; ˣ I/R BBG *vs* Sham; ᵒ I/R PB *vs* Sham; ᶿ I/R Salina *vs* I/R PB; ᴬI/R BBG *vs* I/R PB; **I/R Salina 14 dias e 28 dias *vs* I/R Salina 24 h; ¨ I/R BBG 14 dias *vs* I/R BBG 24 h e 28 dias; ···I/R PB 28 dias *vs* I/R PB 24 h e 14 dias).

4.3.7.5 Neurônios Hu

Os neurônios imunorreativos ao Hu dos grupos I/R Salina 24 h, 14 dias e 28 dias apresentaram diminuição significante ($p<0,05$) de 17%, 18% e 25% respectivamente, quando comparadas aos seus respectivos grupos Sham (Figura 31 A).

Quando feita a comparação dos grupos I/R BBG com os seus respectivos Sham foi observado uma diminuição significante ($p<0,05$) dos grupos I/R BBG (24 h 15%, 14 dias 13% e 28 dias 18%). No entanto, quando comparado os grupos I/R BBG com os grupos I/R Salina, pode-se observar um aumento significante ($p<0,05$) dos grupos I/R BBG 14 dias (5,5%) e 28 dias (9%) (Figura 31 A).

Na análise dos grupos I/R PB com os seus respectivos Sham pode-se observar uma diminuição significante ($p<0,05$) dos grupos I/R PB (24 h 8%, 14 dias 10% e 28 dias 19%). Quando feita a comparação I/R PB vs I/R Salina, detectou-se um aumento significante ($p<0,05$) dos grupos I/R PB 24 h (11%), I/R PB 14 dias (9%) e I/R PB 28 dias (8%) (Figura 31 A).

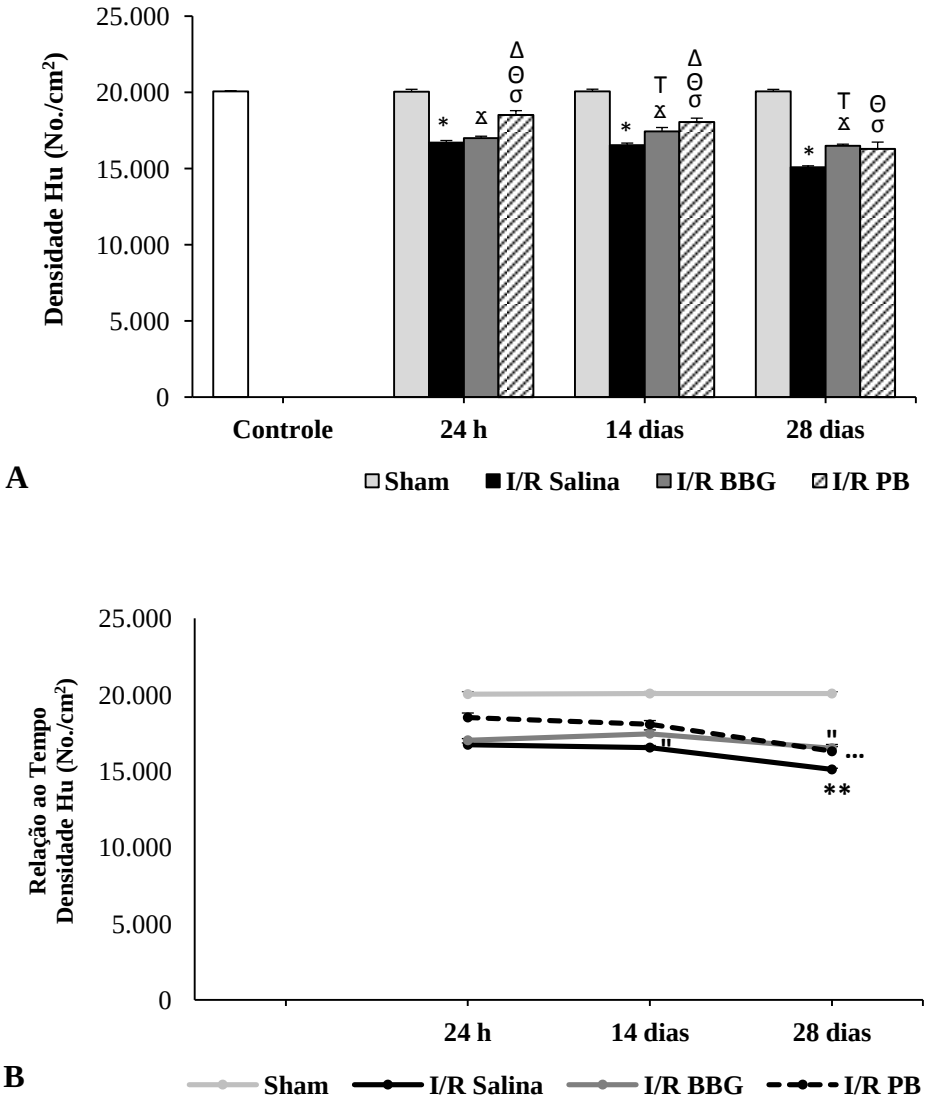
Quando feita a comparação dos grupos isquêmicos tratados com BBG e PB, foi possível observar que somente os grupos com 24 h e 14 dias de reperfusão apresentaram diferenças significantes, portanto os grupos I/R PB 24 h e I/R PB 14 dias apresentaram aumento significante ($p<0,05$) de 9% e 4% respectivamente, quando comparado com I/R BBG 24 h e 14 dias (Figura 31 A).

Na análise, foi observado efeito de interação entre grupo e tempo, portanto, considerando o fator tempo, o grupo I/R Salina 28 dias apresentou uma diminuição significante ($p<0,05$) de 9%, quando comparado aos grupos I/R Salina 24 h e 14 dias (Figura 31 B).

Os grupos I/R BBG também apresentaram diferenças significantes ($p<0,05$), quando considerado o tempo. O grupo I/R BBG 24 horas apresentou uma diminuição significante ($p<0,05$) de 3%, quando comparado com os grupos I/R BBG 14 dias e 28 dias (Figura 31 B).

Nos grupos I/R PB foi possível observar uma diminuição significante ($p<0,05$) do grupo I/R PB 28 dias, quando comparado com os grupos I/R PB 24 h (14%) e I/R PB 14 dias (11%) (Figura 31 B) .

Figura 31 - Densidade dos neurônios imunorreativos ao Hu dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



Os dados são de n=5 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) (*I/R Salina *vs* Sham; ᵀI/R Salina *vs* I/R BBG; ˣ I/R BBG *vs* Sham; ᵒ I/R PB *vs* Sham; ᶿ I/R Salina *vs* I/R PB; ᴬI/R BBG *vs* I/R PB; **I/R Salina 14 dias e 28 dias *vs* I/R Salina 24 h; ¨ I/R BBG 14 dias e 28 dias *vs* I/R BBG 24 h; ···I/R PB 28 dias *vs* I/R PB 24 h e 14 dias).

4.3.8 Efeito da I/R na Área do Perfil Celular (Morfométria)

4.3.8.1 Neurônios - Hu

Foram avaliados a área do perfil do corpo celular (µm²), o diâmetro máximo (DMáx - µm) e o diâmetro mínimo (DMín - µm) das células imunorreativas ao Hu.

A análise da área do perfil dos neurônios imunorreativos ao Hu demonstrou um aumento significante (p<0,05) de 17% do grupo Sham 28 dias ao ser comparado ao grupo Sham 14 dias

Foram avaliados dois fatores, os diferentes tempos de reperfusão e a comparação entre grupos. Pela análise dos resultados, observou-se que a área do perfil celular apresentou diferenças significantes entre os grupos e entre os tempos.

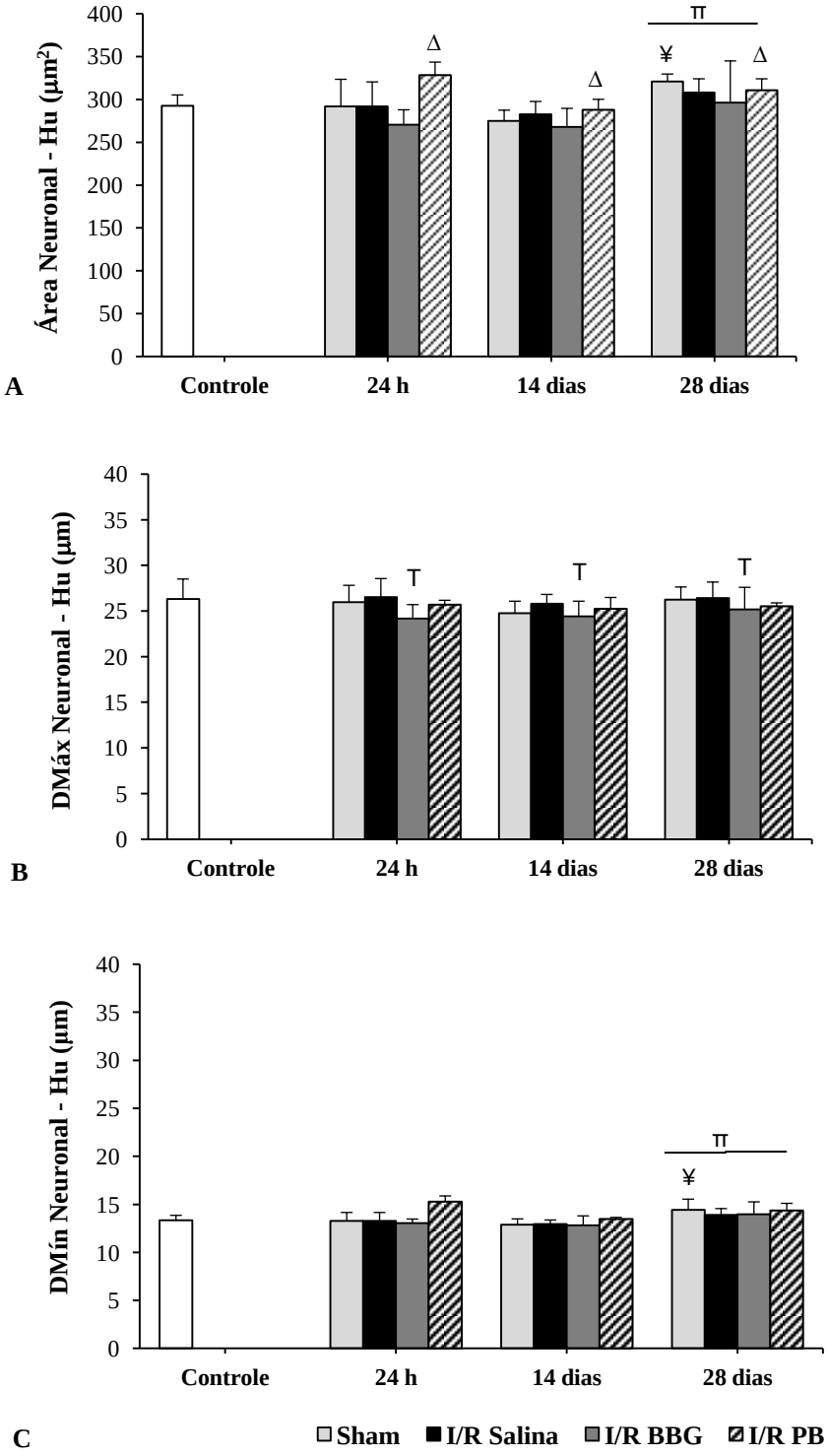
No fator grupo observa-se que o grupo I/R PB apresentou um aumento significante (p<0,05) de 11% quando comparado com o grupo I/R BBG. No entanto, quando considerado o fator tempo foi possível detectar que o grupo de 28 dias apresentou um aumento significante (p<0,05) de 11% quando comparado com o grupo de 14 dias (Figura 32 A).

Na análise do DMáx observa-se que o grupo I/R BBG apresentou uma diminuição significante (p<0,05) de 6%, quando comparado ao grupo I/R Salina. Ao ser considerado o fator tempo, não foi detectado diferenças significantes no DMáx (Figura 32 B).

A análise do DMín, demonstra que o grupo Sham 28 dias apresentou um aumento significante (p<0,05) de 12%, quando comparado com o grupo Sham 14 dias (Figura 32 C).

A análise de dois fatores, os diferentes tempos de reperfusão e a comparação entre grupos, demonstrou diferenças significantes no DMín. Considerando o fator grupo, observa-se que o grupo I/R PB apresentou um aumento significante (p<0,05) de 6%, 7,4% e 7,5% quando comparado com os grupos Sham, I/R Salina e I/R BBG, respectivamente (Figura 32 C). Porém no fator tempo foi possível detectar que o grupo de 14 dias apresentou uma diminuição significante (p<0,05) de 5% e 8% quando comparado com os grupos de 24 h e 28 dias, respectivamente (Figura 32 C).

Figura 32 - Área do perfil do corpo celular (A), DMáx (B) e DMín (C) dos neurônios imunorreativos ao Hu dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



Os dados são de n=5 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) ($^{¥}$Sham 28 dias *vs* Sham 14 dias; ^{T}I/R BBG *vs* I/R Salina; $^{\Delta}$I/R PB *vs* I/R BBG; $^{\pi}$comparação com relação ao tempo 28 dias *vs* 24 h e 14 dias).

4.3.8.2 Células Gliais Entéricas - S100β

Foram avaliados a área do perfil do corpo celular (µm²), o diâmetro máximo (DMáx - µm) e o diâmetro mínimo (DMín - µm) das células gliais entéricas imunorreativas a S100β.

A análise da área do perfil das células gliais entéricas imunorreativas a S100β demonstrou um aumento significante ($p<0,05$) de 40% e 61% do grupo Sham 28 dias ao ser comparado aos grupos Sham 24 h e 14 dias, respectivamente (Figura 33A).

Foram avaliados dois fatores, os diferentes tempos de reperfusão e a comparação entre grupos. Pela análise dos resultados, detectou-se efeito de interação entre grupo e tempo.

No fator grupo observa-se que a área do perfil celular S100β do grupo I/R Salina 24 h apresentou uma diminuição significante ($p<0,05$) de 45% quando comparado ao seu Sham. Quando feita a comparação I/R BBG 24 h ou I/R PB 24 h *vs* I/R Salina 24 h detectou-se que tanto o grupo I/R BBG 24 h (121%) como o grupo I/R PB 24 h (102%) apresentaram aumento significante ($p<0,05$) (Figura 33 A).

O grupo I/R Salina de 14 dias apresentou aumento significante ($p<0,05$) de 54% quando comparado com o seu respectivo Sham e quando feita a comparação de I/R BBG 14 dias *vs* Sham 14 dias, observou-se que o grupo I/R BBG 14 dias apresentou aumento significante ($p<0,05$) de 56% (Figura 33 A).

O grupo I/R PB 28 dias apresentou diminuição significante ($p<0,05$) quando comparado com seu respectivo Sham (20%) e quando comparado com o grupo I/R BBG (22%) (Figura 33 A).

Considerando o fator tempo, observou que o grupo I/R Salina de 14 dias e 28 dias apresentaram um aumento significante ($p<0,05$) de 26% e 35%, respectivamente, quando comparado com o grupo I/R Salina 24 h (Figura 33 A).

A análise do DMáx das células gliais entéricas imunorreativas a S100β demonstrou um aumento significante ($p<0,05$) de 19% e 26% do grupo Sham 28 dias ao ser comparado aos grupos Sham 24 h e 14 dias, respectivamente (Figura 33 B).

Foram avaliados dois fatores, os diferentes tempos de reperfusão e a comparação entre grupos. Pela análise dos resultados, observou-se efeito de interação entre grupo e tempo.

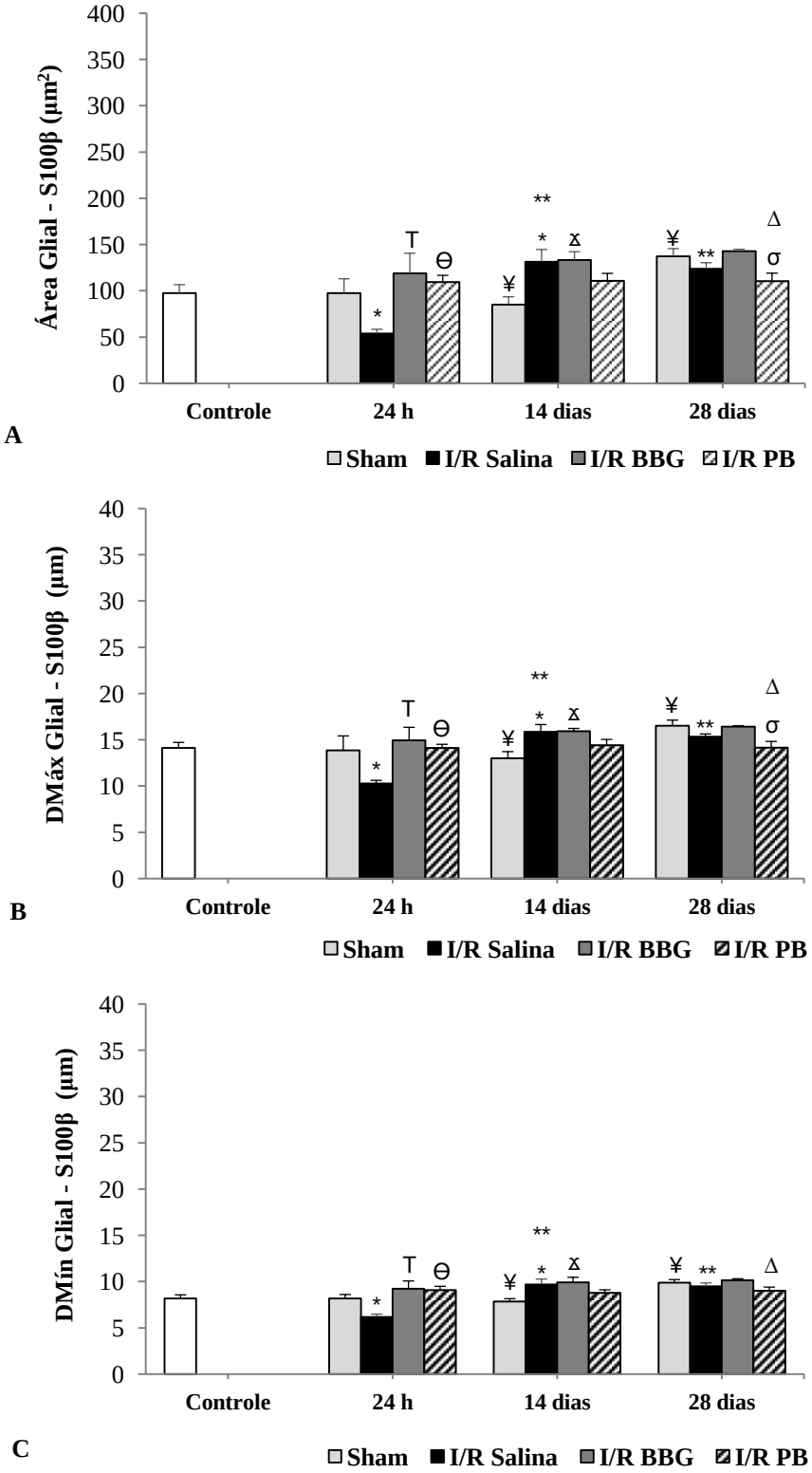
No fator grupo observa-se que o DMáx das células S100β-IR do grupo I/R Salina 24 h apresentou uma diminuição significante ($p<0,05$) de 25% quando comparado ao seu Sham. Quando feita a comparação I/R BBG 24 h ou I/R PB 24 h *vs* I/R Salina 24 h detectou-se que tanto o grupo I/R BBG 24 h (45%) como o grupo I/R PB 24 h (37%) apresentaram aumento significante ($p<0,05$) (Figura 33 B). O grupo I/R Salina de 14 dias apresentou aumento

significante (p<0,05) de 21% quando comparado com o seu respectivo Sham e quando feita a comparação de I/R BBG 14 dias *vs* Sham 14 dias, observou-se que o grupo I/R BBG 14 dias apresentou aumento significante (p<0,05) de 22% (Figura 33 B). O grupo I/R PB 28 dias apresentou diminuição significante (p<0,05) quando comparado com seu respectivo Sham (13%) e quando comparado com o grupo I/R BBG (14%) (Figura 33 B). Considerando o fator tempo, observou que o grupo I/R Salina de 14 dias e 28 dias apresentam um aumento significante (p<0,05) de 54% e 49%, respectivamente, quando comparado com o grupo I/R Salina 24 h (Figura 33 B).

A análise do DMín das células gliais entéricas (S100β) demonstrou um aumento significante (p<0,05) de 21% e 26% do grupo Sham 28 dias ao ser comparado aos grupos Sham 24 h e 14 dias, respectivamente. Foram avaliados dois fatores, os diferentes tempos de reperfusão e a comparação entre grupos. Pela análise dos resultados, observou-se efeito de interação entre grupo e tempo.

No fator grupo observa-se que o DMín das células S100β-IR do grupo I/R Salina 24 h apresentou uma diminuição significante (p<0,05) de 25%, 50% e 48% quando comparado com os grupos Sham 24 h, I/R BBG 24 h e I/R PB 24 h, respectivamente (Figura 33 C). Os grupos I/R Salina 14 dias e I/R BBG 14 dias apresentaram um aumento significante (p<0,05) de 22% e 26%, respectivamente, quando comparado com o grupo Sham 14 dias (Figura 33 C). O grupo I/R PB 28 dias apresentou diminuição significante (p<0,05) de 11% quando comparado com o grupo I/R BBG 28 dias (Figura 33 C). Considerando o fator tempo, observou que o grupo I/R Salina de 14 dias e 28 dias apresentam um aumento significante (p<0,05) de 57% e 54%, respectivamente, quando comparado com o grupo I/R Salina 24 h (Figura 33 C).

Figura 33 - Área do perfil do corpo celular (A), DMáx (B) e DMín (C) das células gliais entéricas imunorreativas a S100β dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



Os dados são de n=4 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) ($^{¥}$Sham 28 dias *vs* Sham 24 h e14 dias;*I/R Salina *vs* Sham; ^{x} I/R BBG *vs* Sham; $^{\sigma}$ I/R PB *vs* Sham; ^{T}I/R Salina *vs* I/R BBG; $^{\Theta}$ I/R Salina *vs* I/R PB; $^{\Delta}$I/R BBG *vs* I/R PB; **I/R Salina 14 dias e 28 dias *vs* I/R Salina 24 h).

4.3.9 Distribuição dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao Hu de acordo com a área do perfil

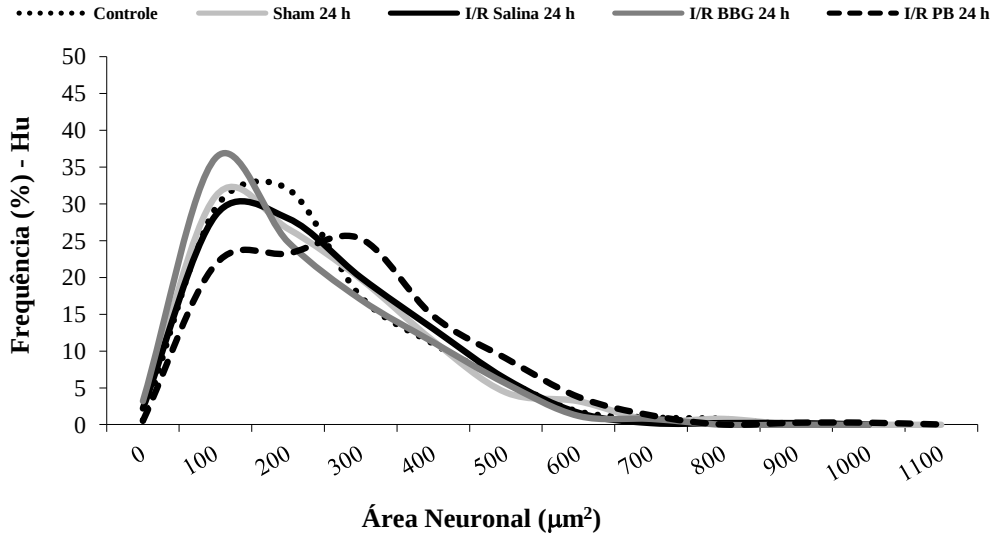
Na análise dos neurônios imunorreativos ao Hu, observou-se que no grupo Controle a área do perfil obteve uma variabilidade de 50 a 900 μm^2, sendo que 61% dos neurônios estavam entre 100 e 300 μm^2 (Figura 34).

No grupo 24 h a área do perfil variou de 50 a 1100 μm^2 . No grupo Sham 24 h (57%), I/R Salina 24 h (56%) e I/R BBG 24 h (61%) os neurônios estavam entre 100 - 300 μm^2 , no grupo I/R PB 24 h 49% dos neurônios estavam entre 200 - 400 μm^2 (Figura 34 A).

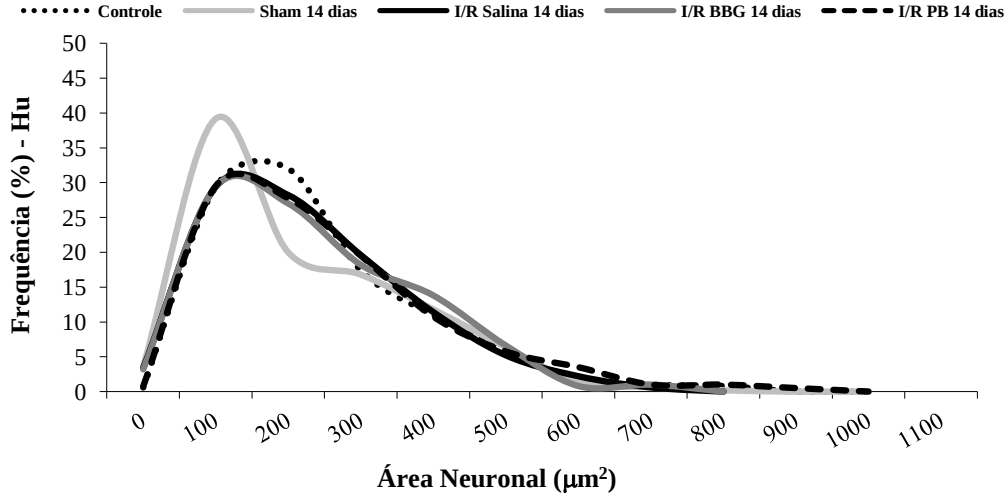
No grupo 14 dias a área do perfil teve uma variabilidade de 50 - 1000 μm^2 . No grupo Sham 14 dias 59% dos neurônios estavam entre 100 -300 μm^2, nos grupos I/R Salina 14 dias, I/R BBG 14 dias e I/R PB 14 dias em torno de 58% dos neurônios estavam entre 100 e 300 μm^2 (Figura 34 B).

No grupo 28 dias a área do perfil variou de 50 - 1000 μm^2 . No grupo Sham 28 dias 72% dos neurônios estavam entre 100 e 400 μm^2 . Nos grupos I/R Salina 28 dias (54%) e I/R BBG 28 dias (59%) os neurônios estavam entre 100 - 300 μm^2. No grupo I/R PB 28 dias 60% dos neurônios estavam entre 100 e 300 μm^2 (Figura 34 C).

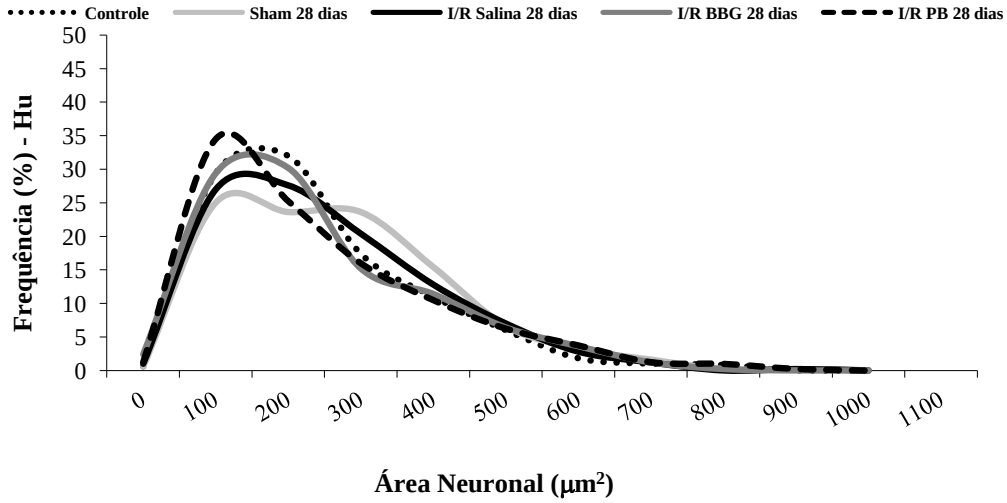
Figura 34 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) dos neurônios imunorreativos ao Hu no íleo de ratos dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



A



B



C

Os dados são de n=5

4.3.10 Distribuição das células gliais entéricas imunorreativas a S100β de acordo com a área do perfil

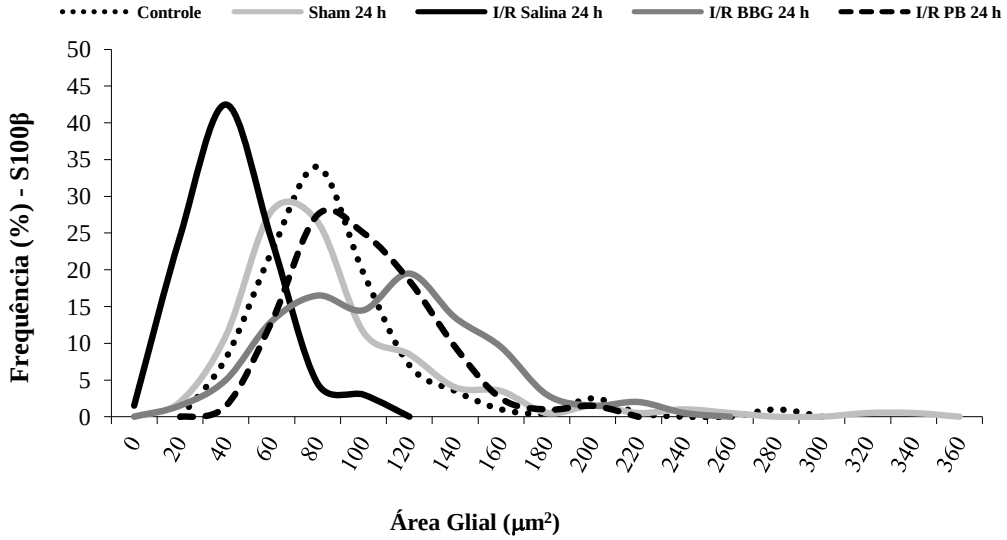
Na análise das células gliais entéricas imunorreativas a S100β, observou-se que no grupo Controle a área do perfil obteve uma variabilidade de 40 a 300 μm^2, sendo que 56% das células gliais entéricas estavam entre 60 - 100 μm^2 (Figura 35).

No grupo 24 h a área do perfil variou de 20 a 360 μm^2. No grupo Sham 24 h 54% das células gliais entéricas estavam entre 60 - 100 μm^2, no grupo I/R Salina 24 h 68% das células gliais entéricas estavam entre 40 e 60 μm^2, no grupo I/R BBG 24 h 33% das células gliais entéricas estavam entre 100 e 140 μm^2, no grupo I/R PB 24 h 52% das células gliais entéricas estavam entre 80 - 120 μm^2 (Figura 35 A).

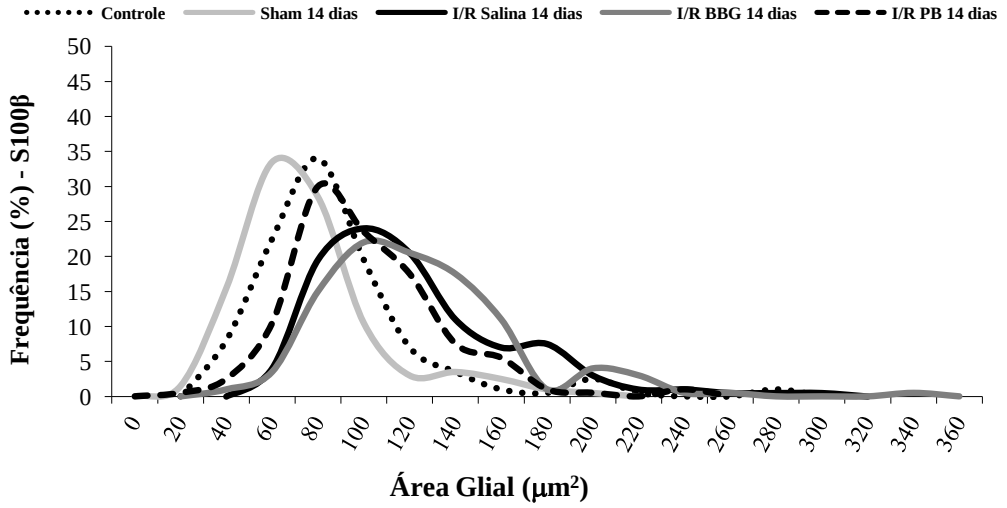
No grupo 14 dias a área do perfil variou de 20 a 360 μm^2. No grupo Sham 14 dias 62% das células gliais entéricas estavam entre 60 - 100 μm^2, no grupo I/R Salina 14 dias 54% das células gliais entéricas estavam entre 80 e 140 μm^2, no grupo I/R BBG 14 dias 42% das células gliais entéricas estavam entre 100 e 160 μm^2, no grupo I/R PB 14 dias 53% das células gliais entéricas estavam entre 80 - 120 μm^2 (Figura 35 B).

No grupo 28 dias a área do perfil variou de 40 a 360 μm^2 . No grupo Sham 28 dias 45% das células gliais entéricas estavam entre 120 e 160 μm^2 , no grupo I/R Salina 28 dias 52% das células gliais entéricas estavam entre 100 e 140 μm^2 , no grupo I/R BBG 28 dias 47% das células gliais entéricas estavam entre 120 e 160 μm^2 e no grupo I/R PB 28 dias 40% das células gliais entéricas estavam entre 80 e 120 μm^2 (Figura 35 C).

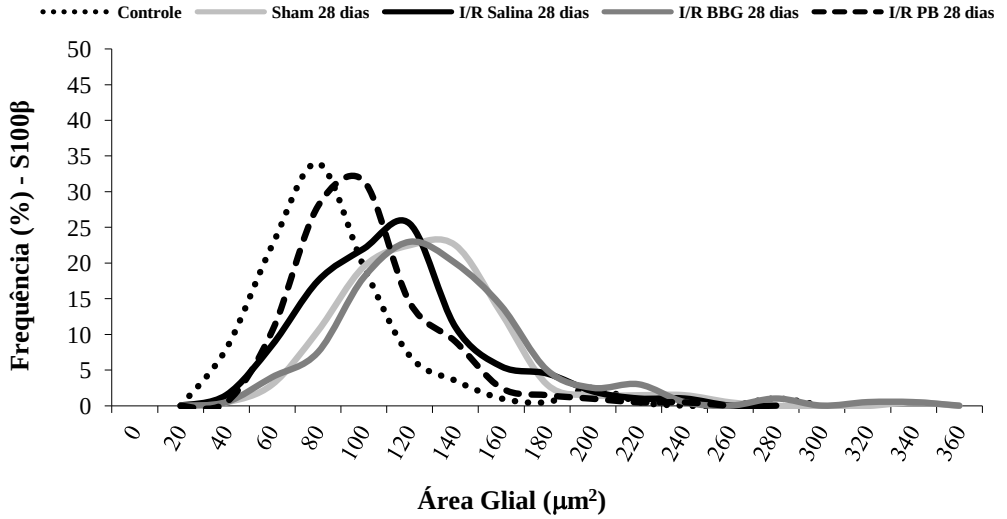
Figura 35 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) das células gliais entéricas imunorreativas a S100β no íleo de ratos dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



A



B



C

Os dados são de n=4

4.4 Análise Ultra-estrutural

A análise de microscopia eletrônica de transmissão demonstrou, nos grupos estudados, neurônios, células gliais entéricas, fibras de colágeno e mitocôndrias.

Foram consideradas como células gliais entéricas as células que apresentavam núcleo com superfície irregular (Figuras 36 B, D, F e H; 37 A, B, C, F, G e I; 38 D, E, F, G, H e I) e considerados como neurônios, células que apresentavam núcleos grandes e mais arredondado (Figuras 36 A, C, E e G; 37 D, E e H; 38 A, B e C).

No grupo 24 h pode-se observar neurônios e células gliais entéricas estas circundadas por tecido colágeno tanto em animais Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB (Figura 36). Neste mesmo grupo observa-se interação de neurônio - glia (figura 36 F e H).

No grupo 14 dias também foi possível observar neurônios e células gliais entéricas ambas envoltos por tecido colágeno (Figura 37).

As fibras de colágeno foram identificadas tanto em cortes transversais como longitudinais (Figura 37 B).

O grupo de 28 dias apresentou neurônios, células gliais entéricas, mitocôndrias, mastócitos e fibras de colágeno (Figura 38).

Figura 36 - Microscopia eletrônica de transmissão no plexo mioentérico do íleo de ratos com 24 h de reperfusão.

A: Neurônio (N) e célula glial entérica (G) circundadas por fibras de colágeno no grupo Sham 24 h (x12000). B: Célula glial entérica (G) e adipócito (A) circundadas por colágeno e presença de mitocôndria (seta branca) (x12000). C: Neurônio (N) circundado por fibras de colágeno em cortes transversais (seta cinza) (x12000). D: Célula glial entérica (G) envolta por colágeno (seta cinza) (x6000). E: Neurônio (N) (x12000) F: interação neuronio (N) - glia (G) (x6000). G: Neurônio (N) (x11000). H: Células gliais entéricas (G) (x5600).

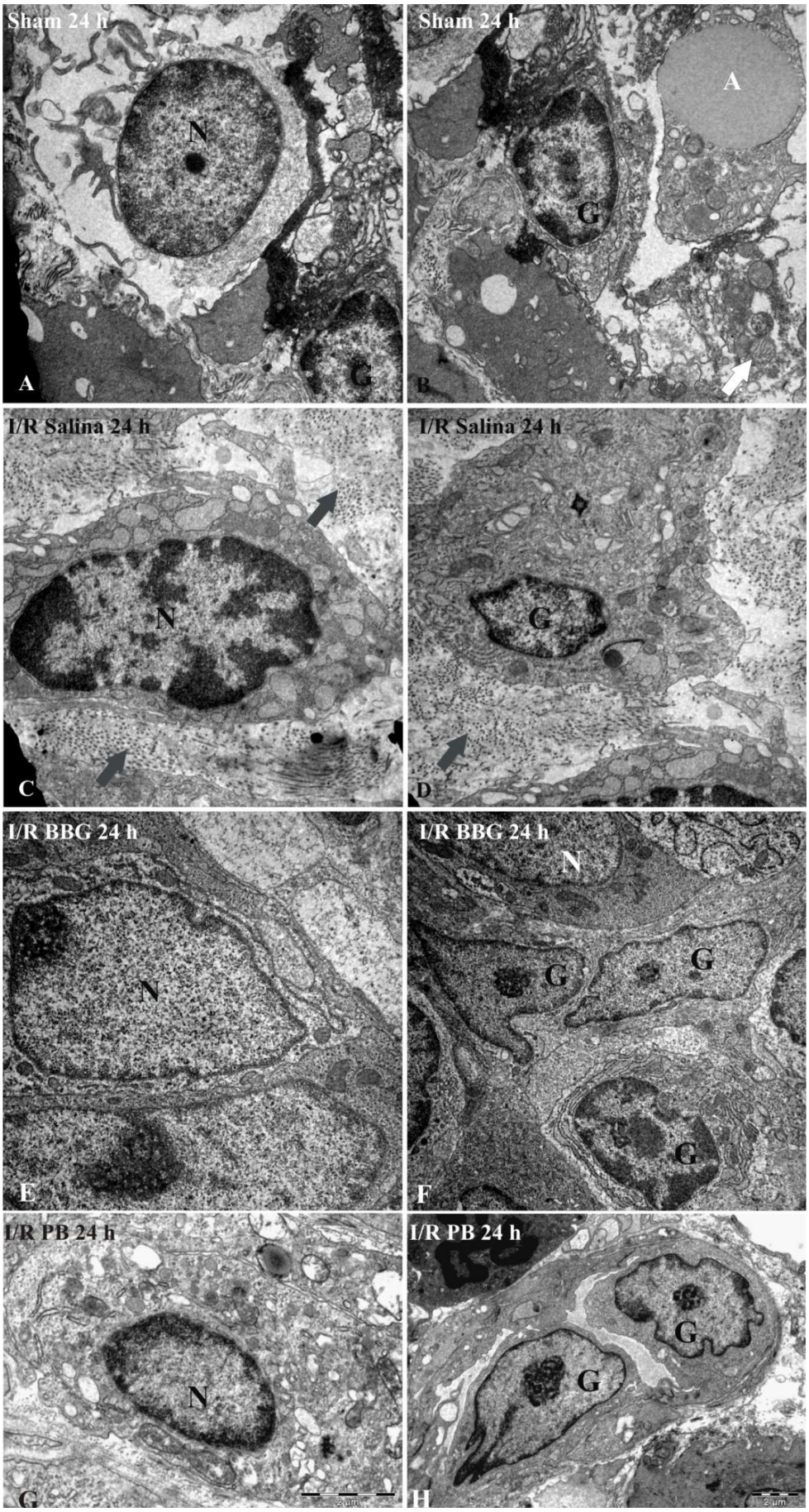
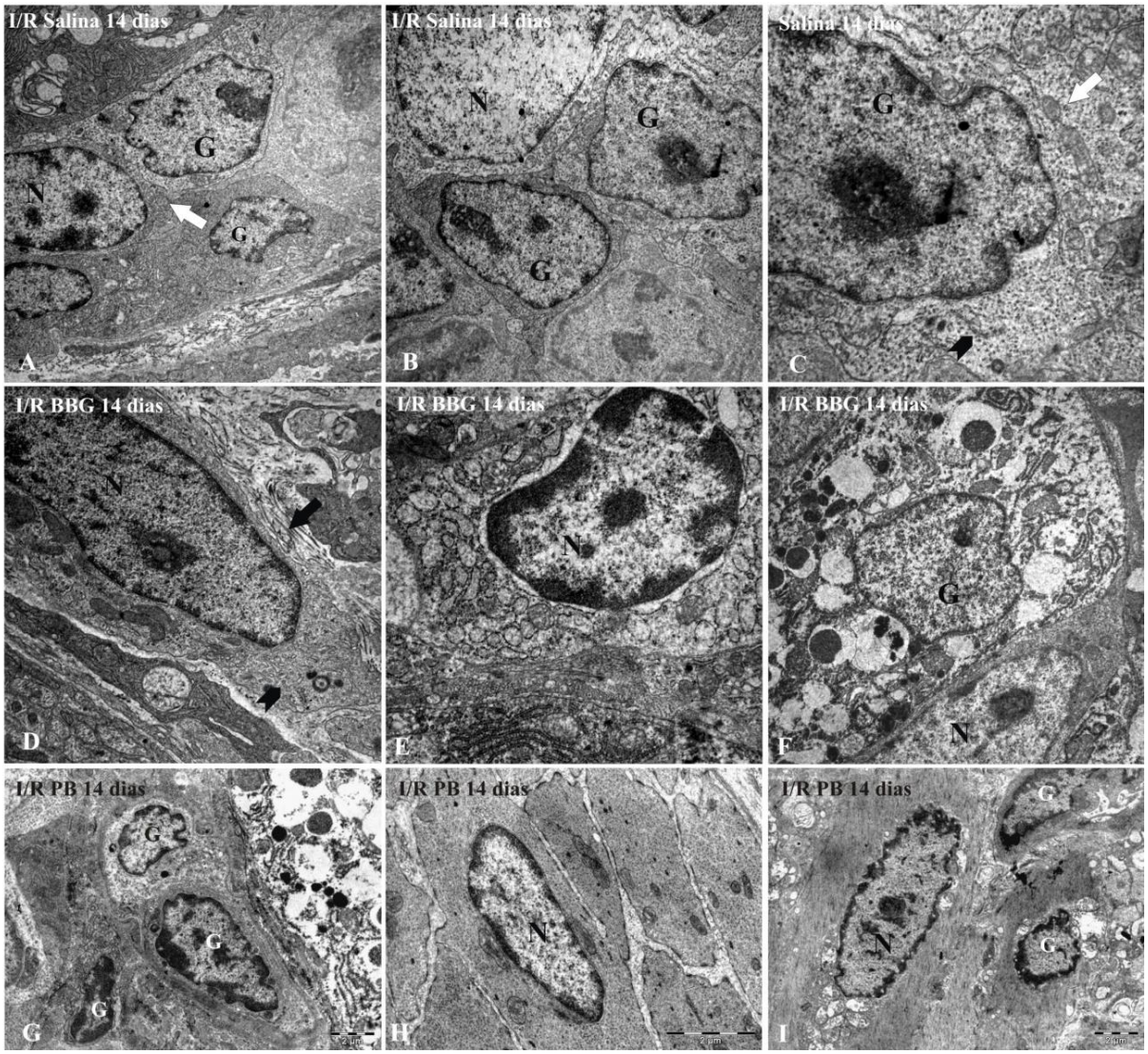
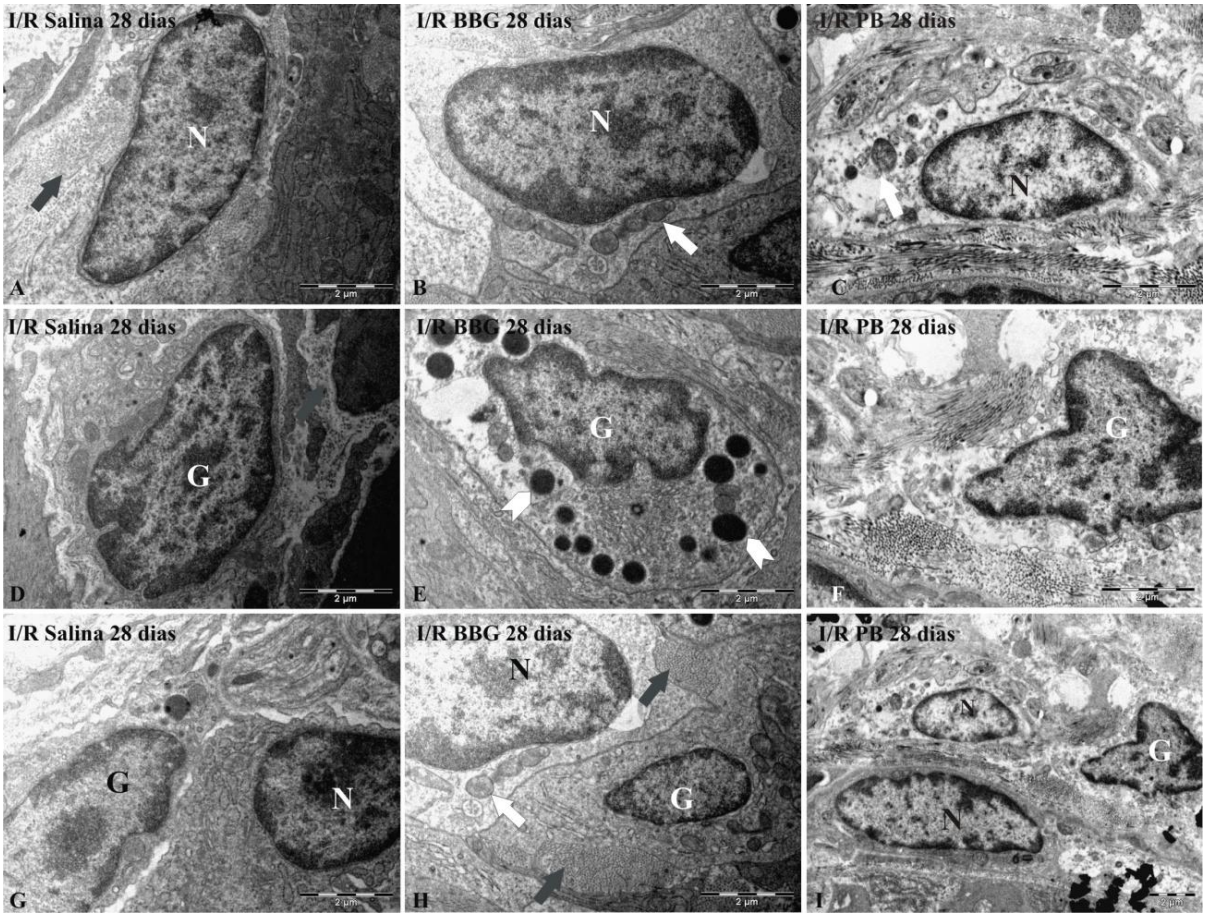

Sham 24 h
N
G
A
Sham 24 h
A
G
B
I/R Salina 24 h
N
C
I/R Salina 24 h
G
D
I/R BBG 24 h
N
E
I/R BBG 24 h
N
G
G
G
F
I/R PB 24 h
N
G
I/R PB 24 h
G
G
H

Figura 37 - Microscopia eletrônica de transmissão no plexo mioentérico do íleo de ratos com 14 dias de reperfusão.



A: interação neurônio (N) e células gliais entéricas (G) com presença de mitocôndria (seta branca) no grupo I/R Salina 14 dias (x6000). B: interação neurônio (N) e células gliais entéricas (G) (x6000). C: núcleo de célula glial entérica (G) com sua porção citoplasmática (cabeça de seta) e mitocôndria (seta branca) (x12000). D: núcleo de neurônio (N) alongado com sua porção citoplasmática (cabeça de seta) (x12000). E: Neurônio (N) (x12000). F: interação neurônio (N) e célula glial entérica (G) (x6000). G: conjunto de células gliais entéricas (G) (x5600). H: neurônio (N) (x11000). I: interação neurônio (N) e células gliais entéricas (G) (x5600).

Figura 38 - Microscopia eletrônica de transmissão no plexo mioentérico do íleo de ratos com 28 dias de reperfusão.



A: neurônio (N) circundado por colágeno (seta cinza). B: neurônio (N) circundado por colágeno e com presença de mitocôndria (seta branca). C: neurônio (N). D: célula glial entérica (G) com superfície irregular. E: célula glial entérica (G) com superfície irregular e presença de mastócitos (cabeça de seta branca) na porção citoplasmática. F: célula glial entérica (G). G: interação neurônio (N)-glia(G). H: interação neurônio (N)- glia (G) circundada por fibras de colágeno (seta cinza) e presença de mitocôndria (seta branca) (x11000). I: interação neurônio (N) e glia (G) (x5600).

4.5 Efeitos da I/R sobre a Expressão Proteica do receptor P2X7 e Panexina-1

A expressão proteica do receptor P2X7 e Panexina-1 foram avaliadas por western blotting nos extratos do plexo mioentérico juntamente com o músculo longitudinal de ratos Sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG 24 h, I/R PB 24 h, Sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG 14 dias, I/R PB 14 dias, Sham 28 dias, I/R salina 28 dias, I/R BBG 28 dias e I/R PB 28 dias (n=4).

A β-actina foi utilizada como normalizador. A expressão proteica do receptor P2X7 e Panexina-1 foram quantificadas através da análise densitométrica e os valores são expressos em UA.

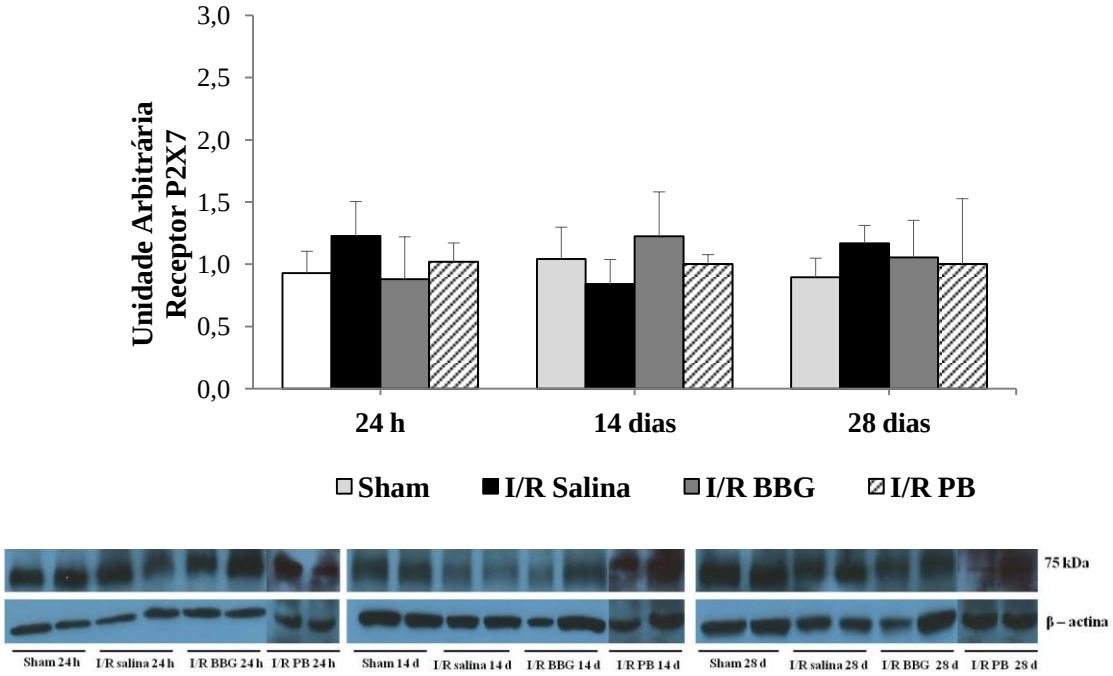
4.5.1 Receptor P2X7

Os animais dos grupos Sham, I/R Salina, I/R BBG, I/R PB 24 h não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si. Porém foi observado uma tendência de aumento de 32% da expressão do receptor no grupo I/R Salina 24 h quando comparado ao grupo Sham (Figura 39).

Os animais dos grupos Sham, I/R Salina, I/R BBG, I/R PB 14 dias também não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si. No entanto foi observado uma tendência de aumento de 17% da expressão do receptor no grupo I/R BBG 14 dias quando comparado com seu respectivo Sham (Figura 39).

Os animais dos grupos Sham, I/R Salina, I/R BBG, I/R PB 28 dias não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si (Figura 39).

Figura 39 - Avaliação da expressão proteica do receptor P2X7 analisada por Western Blotting nos grupos Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB com 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão.

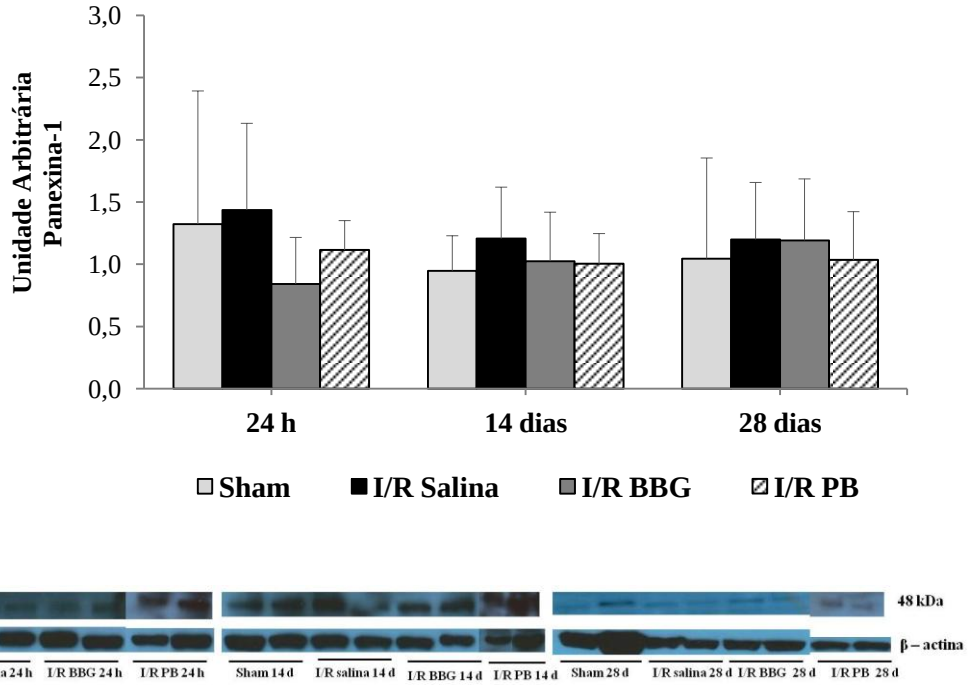


Os dados são de n= 3-5

4.5.2 Panexina-1

Os animais dos grupos Sham, I/R Salina, I/R BBG, I/R PB com os diferentes períodos de reperfusão (24 h, 14 dias e 28 dias) não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si (Figura 40).

Figura 40 - Avaliação da expressão proteica de Panexina-1 analisada por Western Blotting nos grupos Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB com 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão.



Os dados são de n=4

4.6 Efeitos da I/R sobre a atividade muscular contrátil do intestino.

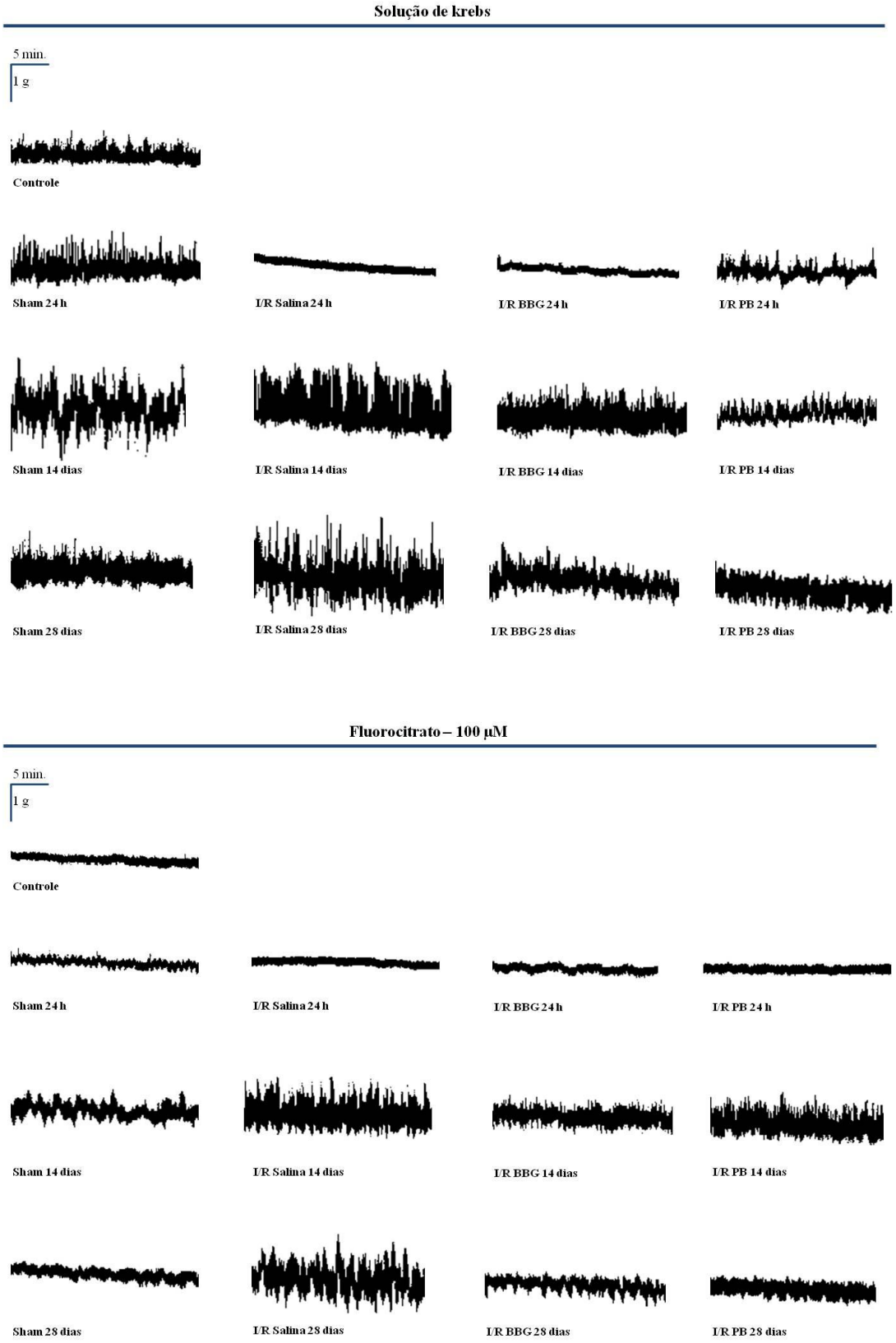
4.6.1 Atividade Espontânea do íleo

Os tecidos passaram por uma fase de equilíbrio, ao termino desta fase foi realizada a medida da atividade espontânea do íleo, em todos os grupos estudados (n=4).

A primeira análise da atividade espontânea do íleo foi realizada na ausência de fluorocitrato (gliotoxina), posteriormente foi feita uma segunda análise da atividade espontânea do íleo na presença de fluorocitrato 100 μM.

O índice de motilidade variou entre 1,0 - 1,8 entre os grupos.

Figura 41 - Segmentos de registros mecanográficos da atividade espontânea do íleo de ratos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



4.6.1.1 Atividade Espontânea do íleo

Os grupos Sham (24 h, 14 dias e 28 dias) não apresentaram diferenças significantes na atividade espontânea quando comparado com o grupo controle (Figura 42 A).

Os grupos I/R Salina 14 dias e 28 dias apresentaram um aumento significante ($p<0,05$) de 5% e 10% respectivamente da atividade espontânea, quando comparado aos seus respectivos grupos Sham. Quando feita a comparação I/R Salina vs I/R BBG, observa-se que os grupos isquêmicos tratados com BBG comportam-se de maneira diferente conforme o período de reperfusão. O grupo 24 h não apresentou diferença significante; o grupo de 14 dias tratado com BBG apresentou um aumento significante ($p<0,05$) de 7%, no entanto no período de 28 dias apresentou diminuição significante de ($p<0,05$) 10% (Figura 42 A). Em relação a comparação de I/R Salina vs I/R PB só foi possível observar diferença significante no grupo de 14 dias, onde o grupo isquêmico tratado com PB apresentou diminuição significante ($p<0,05$) de 5% da atividade espontânea (Figura 42 A).

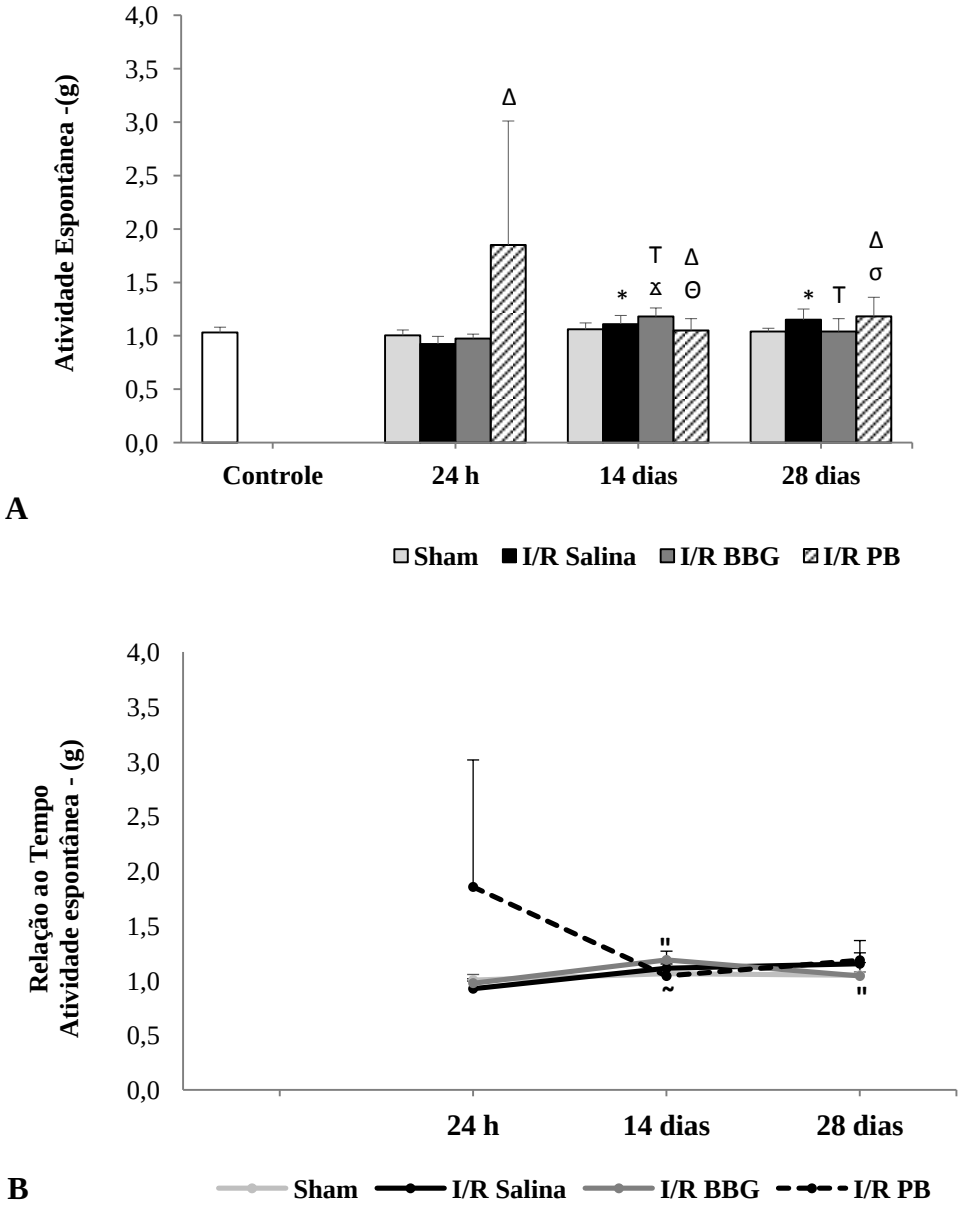
O grupo I/R BBG 14 dias apresentou um aumento significante ($p<0,05$) de 12 % da atividade espontânea quando comparado com o seu respectivo grupo Sham e o grupo I/R PB 28 dias também apresentou um aumento significante ($p<0,05$) de 13% quando comparado com o seu respectivo grupo Sham (Figura 42 A).

Ao realizar a comparação dos grupos isquêmicos tratados com BBG e PB foi possível observar que o grupo I/R PB apresentou um aumento significante da atividade espontânea nos períodos de 24 h (90%) e 28 dias (14%), no entanto no período de 14 dias foi observado uma diminuição significante (11%) ($p<0,05$) (Figura 42 A).

Quando considerado o fator tempo pode-se observar que o grupo I/R BBG 14 dias e 28 dias apresentaram aumento significante de 22% e 7% respectivamente, quando comparado com o grupo I/R BBG 24 h (Figura 42 B).

Os grupos I/R PB também apresentaram diferenças significantes ($p<0,05$), quando considerado o fator tempo. O grupo I/R PB 14 dias apresentou diminuição significante quando comparado com os grupos I/R 24 h (42%) e 28 dias (11%) (Figura 42 B).

Figura 42 - Atividade espontânea do íleo nos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



Os dados são de n=4 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) (*I/R Salina *vs* Sham; ᵀI/R Salina *vs* I/R BBG; ˣ I/R BBG *vs* Sham; ᵒ I/R PB *vs* Sham; ᶿ I/R Salina *vs* I/R PB; ᴬI/R BBG *vs* I/R PB; ¨ I/R BBG 14 dias e 28 dias *vs* I/R BBG 24 h; ~I/R PB 14 dias *vs* I/R PB 24 h e 28 dias).

4.6.1.2 Atividade Espontânea do íleo na presença de Fluorocitrato

Os grupos Sham 14 dias e 28 dias apresentaram aumento significante na atividade espontânea ($p<0,05$) de 12% e 7% respectivamente, quando comparado com o grupo controle (Figura 43 A).

Os grupos I/R Salina 24 h (7%) e 14 dias (8%) apresentaram aumento significante ($p<0,05$) da atividade espontânea quando comparado com os seus respectivos grupos Sham. Quando feita a comparação I/R Salina vs I/R BBG, observa-se que os grupos isquêmicos tratados com BBG apresentaram redução significante da atividade espontânea nos períodos de 24 h (5,5%) e 14 dias (6,5%) de reperfusão (Figura 43 A).

Ao fazer a comparação de I/R Salina vs I/R PB, foi possível detectar que os grupos isquêmicos tratados com PB apresentaram aumento significante ($p<0,05$) de 53% da atividade espontânea no grupo de 24 h, no entanto nos grupos de 14 dias e 28 dias apresentaram redução significante ($p<0,05$) de 13% e 9% respectivamente (Figura 43 A).

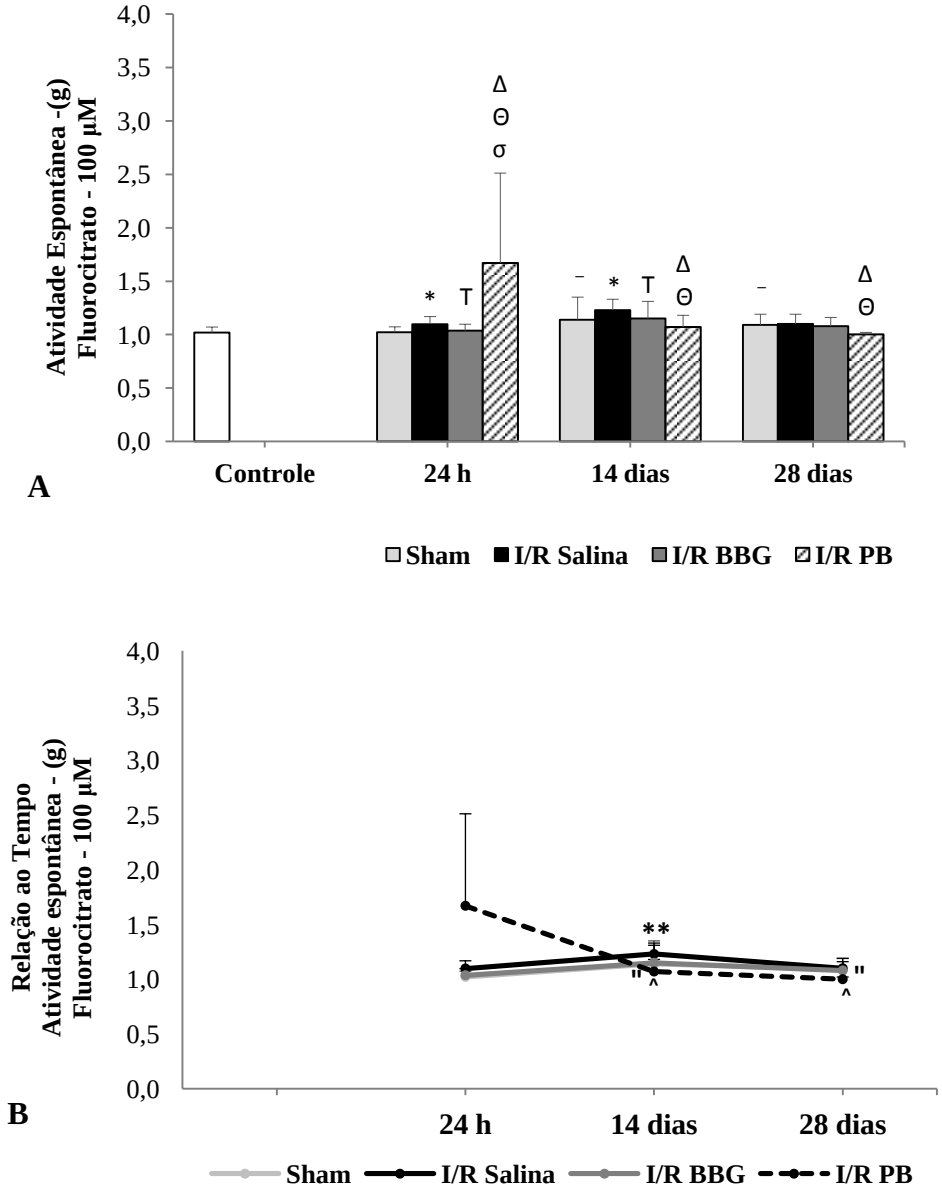
O grupo I/R PB 24 h apresentou aumento significante ($p<0,05$) de 64% da atividade espontânea quando comparado com o seu respectivo grupo Sham, porém o grupo I/R PB 14 dias apresentou redução significante ($p<0,05$) de 6% quando comparado com o seu respectivo grupo Sham (Figura 43 A).

Ao realizar a comparação entre os tratamentos (BBG vs PB) foi possível detectar que o grupo I/R PB apresentou aumento significante ($p<0,05$) da atividade espontânea no grupo 24 h (62%), no entanto nos grupos 14 dias e 28 dias observou-se redução significante ($p<0,05$) de 7,5% da atividade espontânea quando comparado com o tratamento de BBG (figura 43 A).

Quando considerado o fator tempo pode-se observar que o grupo I/R Salina 14 dias apresentou aumento significante ($p<0,05$) de 13% quando comparado com I/R Salina 24 h. Ao fazer essa mesma análise para o grupo I/R BBG, detecta-se que os grupos I/R BBG 14 dias e 28 dias apresentaram aumento significante de 12% e 6% respectivamente, da atividade espontânea quando comparado com o grupo I/R BBG 24 h (Figura 43 B).

Os grupos I/R PB também apresentaram diferenças significantes ($p<0,05$), quando considerado o fator tempo. Os grupos I/R PB 14 dias (35%) e 28 dias (40%) apresentaram redução significante ($p<0,05$) da atividade espontânea quando comparado com o grupo I/R PB 24 h (Figura 43 B).

Figura 43 - Atividade espontânea do íleo na presença de fluorocitrato nos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias



Os dados são de n=4 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) (⁻Sham *vs* Controle; *I/R Salina *vs* Sham; ᵀI/R Salina *vs* I/R BBG; ᵟ I/R PB *vs* Sham; ᵊ I/R Salina *vs* I/R PB; ᵃI/R BBG *vs* I/R PB; **I/R Salina 14 dias e 28 dias *vs* I/R Salina 24 h; ¨ I/R BBG 14 dias e 28 dias *vs* I/R BBG 24 h; ^I/R PB 14 dias e 28 dias *vs* I/R PB 24 h).

4.6.1.3 Atividade Espontânea do Íleo em Condições Normais e na Presença de Fluorocitrato

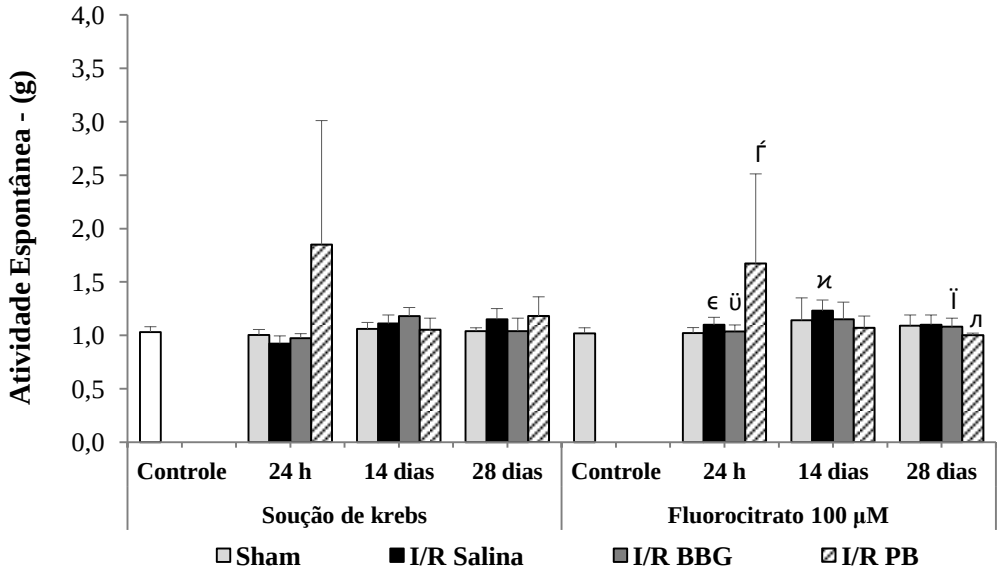
Está análise deve como objetivo observar o comportamento da atividade espontânea na ausência (solução de krebs) e na presença de fluorocitrato.

Nos grupos controle não foi detectado diferenças significantes ($p<0,05$) na atividade espontânea na presença de fluorocitrato.

Os grupos I/R Salina 24 h e 14 dias apresentaram aumento significante (24 h : 9%, 14 dias: 11%) ($p<0,05$) da atividade espontânea na presença de fluorocitrato, no entanto o grupo I/R Salina 28 dias apresentou diminuição significante ($p<0,05$) de 4% da atividade espontânea com fluorocitrato (Figura 44).

Nos grupos I/R BBG 24 h (6%) e 28 dias (5%) foi possível detectar aumento significante ($p<0,05$) da atividade espontânea na presença de fluorocitrato. No entanto, nos grupos I/R PB 24 h e 28 dias foi detectado diminuição significante ($p<0,05$) de 10% e 15 % respectivamente, da atividade espontânea na presença de fluorocitrato (Figura 44).

Figura 44 - Atividade espontânea do íleo na ausência e na presença de fluorocitrato nos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



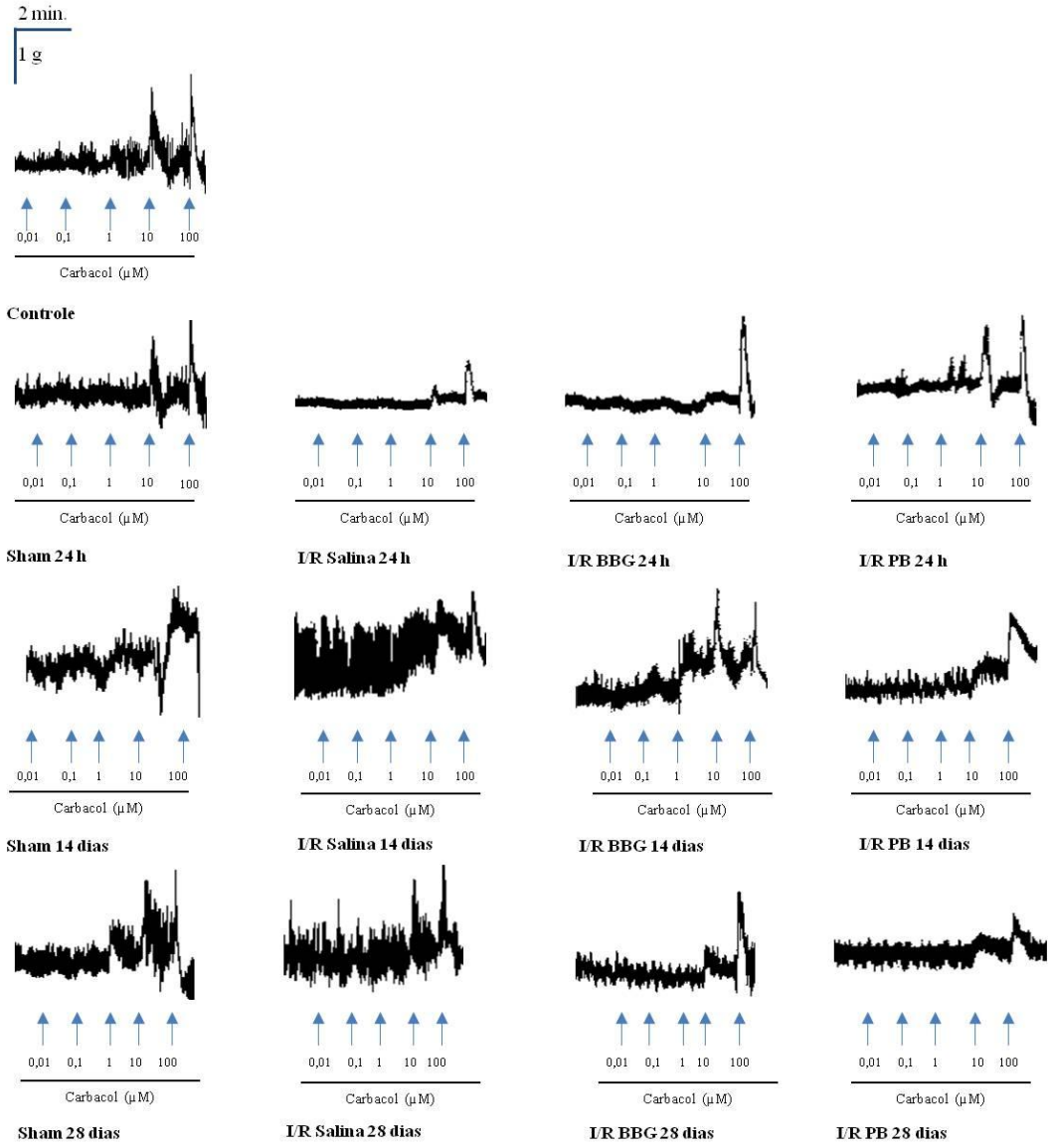
Os dados são de n=4 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) ([є]I/R Salina 24 h (fluorocitrato) *vs* I/R Salina 24 h (solução de Krebs); [и]I/R Salina 14 dias (fluorocitrato) *vs* I/R Salina 14 dias (Solução de Krebs); [ü]I/R BBG 24 h (fluorocitrato) *vs* I/R BBG 24 h (solução de Krebs); [ї]I/R BBG 28 dias (fluorocitrato) *vs* I/R BBG 28 dias (solução de Krebs); [ѓ]I/R PB 24 h (fluorocitrato) *vs* I/R PB 24 h (Solução de Krebs); [л]I/R PB 28 dias (fluorocitrato) *vs* I/R PB 28 dias (Solução de Krebs).

4.6.2 Efeito do Carbacol na Atividade Espontânea do Íleo

A contratilidade do músculo liso do íleo foi analisada em resposta a estimulação colinérgica pela administração de carbacol no banho de órgãos. Foi realizada uma curva cumulativa nas concentrações de 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM e 100 µM.

Foi possível observar a formação de picos de contração crescente quando as diferentes doses de carbacol foram adicionadas (Figura 45).

Figura 45 - Segmentos de registros mecanográficos dos efeitos contráteis do carbacol aplicado nas concentrações de 0,01 µM, 0,1 µM , 1 µM, 10 µM e 100 µM do íleo de ratos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



O Carbacol nas concentrações de 0,01 μM e 0,1 μM apresentaram comportamento de contratilidade do intestino muito similar e o índice de motilidade variou de 0,95 a 1,87 g entre os grupos (Tabela 3).

Dos grupos estudados, os grupos I/R PB 24 h e 28 dias nas concentrações citadas foram os que apresentaram aumento significante (p<0,05) da contratilidade do intestino.

Pode-se observar que o grupo I/R PB 24 h apresentou diferença significante (p<0,05) quando comparado com Sham 24 h (0,01 μM: 77%; 0,1 μM: 86%), I/R Salina 24 h (0,01 μM: 87%; 0,1 μM: 97%) e I/R BBG 24 h (0,01 μM: 86%; 0,1 μM: 95%) (Tabela 3).

O mesmo se observa para o grupo I/R PB 28 dias que apresentou diferença significante (p<0,05) quando comparado com Sham 28 dias (0,01 μM: 29%; 0,1 μM: 30%), I/R Salina 28 dias (0,01 μM: 57%; 0,1 μM:28%) e I/R BBG 28 dias (0,01 μM:75%; 0,1 μM: 28%) (Tabela 3)

Quando considerado o fator tempo nessas concentrações 0,01 μM e 0,1 μM também foi observado similaridade, onde pode-se constatar que os grupos: I/R Salina 14 e 28 dias de ambas as concentrações apresentaram aumento significante (p<0,05) quando comparado com os grupos I/R Salina 24 h (14 dias: 0,01 μM: 25%; 0,1 μM: 29%; 28 dias: 0,01 μM: 42%; 0,1 μM: 43%) (Tabela 3).

O grupo I/R BBG 14 dias também apresentou aumento significante (p<0,05) quando comparado com os grupos I/R BBG 24 h (0,01 μM: 23%; 0,1 μM: 38%) (Tabela 3).

Os grupos I/R PB 14 dias e 28 dias apresentaram redução significante (p<0,05) da contratilidade do intestino quando comparado com os grupos I/R 24 h PB (14 dias: 0,01 μM: 40%; 0,1 μM: 24%; 28 dias 0,01 μM: 41%; 0,1 μM: 28%) (Tabela 3)

Nas concentrações de 1 μM e 10 μM o índice de motilidade variou de 0,95 a 2,26 g entre os grupos (Tabela 3).

O grupo I/R BBG 14 dias apresentou aumento significante (p<0,05) da contratilidade do intestino tanto na concentração de 1 μM como na de 10 μM, quando comparado ao seu respectivo Sham (1 μM: 26%; 10 μM: 35%), esse mesmo comportamento não foi observado no grupo I/R BBG 28 dias que apresentou redução significante (p<0,05) da contratilidade, quando comparado com seu respectivo grupo Sham (1 μM: 14%; 10 μM: 19%) (Tabela 3).

A comparação entre I/R BBG vs I/R Salina, mostrou que o grupo I/R 14 dias tratado com BBG (1 μM: 14%; 10 μM: 32%) apresentou aumento significante (p<0,05) da contratilidade quando comparado com I/R Salina 14 dias em ambas concentrações (Tabela 3).

O grupo I/R PB 24 h apresentou aumento significante (p<0,05) quando comparado com I/R BBG 24 tanto na concentração de 1 μM (123%) como na de 10 μM (107%) e esse

aumento da contratilidade também foi observado no grupo I/R PB 28 dias (24%) na concentração de 1 μM (Tabela 3).

Porém, o período de 14 dias dos grupos I/R PB apresentaram redução significante (p<0,05) da contratilidade do intestino em ambas concentrações quando comparado com I/R BBG 14 dias (1 μM: 22%; 10 μM: 31%) (Tabela 3).

Com relação ao tempo os grupos I/R Salina 14 dias e 28 dias apresentaram aumento significante (p<0,05) quando comparado com I/R Salina 24 h (14 dias: 1 μM: 38%; 10 μM: 25%; 28 dias: 1 μM: 38%; 10 μM: 28%) (Tabela 3).

O grupo I/R BBG 14 dias apresentou aumento significante (p<0,05) quando comparado com I/R BBG 24 h (1 μM: 55%; 10 μM: 71%). Os grupos I/R PB 14 dias e 28 dias apresentaram redução significante (p<0,05) quando comparado com I/R PB 24 h (1 μM: 44%; 10 μM: 44%) (Tabela 3).

Na concentração de 100 μM foi observado que o grupo Sham 28 dias apresentou aumento significante (p<0,05) de 38% da contratilidade quando comparado com o grupo Controle (Tabela 3)

O grupo I/R PB 24 h apresentou aumento significante (p<0,05) da contratilidade quando comparado com o grupo I/R Salina 24 h (119%) e quando comparado com o seu respectivo grupo Sham (99%) (Tabela 3).

Ao considerar o fator tempo observou-se que o grupo I/R Salina 28 dias apresentou aumento significante (p<0,05) de 43% da contratilidade quando comparado com o I/R Salina 24 h. O I/R BBG 14 dias também apresentou aumento significante (p<0,05) de 30% quando comparado com I/R BBG 24 h (Tabela 3).

Os grupos I/R PB 14 dias e 28 dias apresentaram redução significante (p<0,05) de 34% da contratilidade quando comparado com I/R Salina 24 h (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito do carbacol nas concentrações 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 µM na atividade espontânea do íleo nos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.

		Carbacol				
		0,01 µM	**0,1 µM**	**1 µM**	**10 µM**	**100 µM**
	Controle	1,03±0,06	1,05±0,06	1,09±0,08	1,18±0,12	1,17±0,14
24 h	Sham	1,01±0,05	1,00±0,50	1,01±0,04	1,15±0,03	1,20±0,08
	I/R Salina	0,95±0,04	0,94±0,04	0,95±0,04	0,98±0,05	1,10±0,07
	I/R BBG	0,95±0,04	0,95±0,04	0,97±0,04	1,06±0,10	1,22±0,16
	I/R PB	1,79±1,12 ΘΔ	1,87±1,18 σΘΔ	2,16±1,05 σΘΔ	2,26±1,49 σΘΔ	2,39±1,56 σΘ
14 dias	Sham	1,07±0,08	1,15±0,15	1,19±0,17	1,35±0,11	1,24±0,13
	I/R Salina	1,20±0,13**	1,22±0,13	1,30±0,18 **	1,37±0,20 **	1,43±0,12
	I/R BBG	1,18±0,08 "	1,32±0,12 "	1,50±0,15 x T "	1,83±0,22 x T "	1,60±0,35
	I/R PB	1,07±0,13 ^	1,10±0,13 Δ ^	1,15±0,11 Δ ^	1,25±0,16 Δ ^	1,59±0,23 ^
28 dias	Sham	1,05±0,04	1,04±0,04	1,16±0,06	1,37±0,13	1,63±0,12 _
	I/R Salina	1,14±0,13**	1,14±0,11	1,19±0,13 **	1,35±0,09 **	1,57±0,17 **
	I/R BBG	1,02±0,12	1,00±0,13	0,99±0,12 T	1,11±0,14 x "	1,31±0,17 "
	I/R PB	1,35±0,14 σΘΔ ^°	1,35±0,14 σΘΔ ^	1,23±0,19 Δ ^	1,25±0,33 ^	1,54±0,34 ^

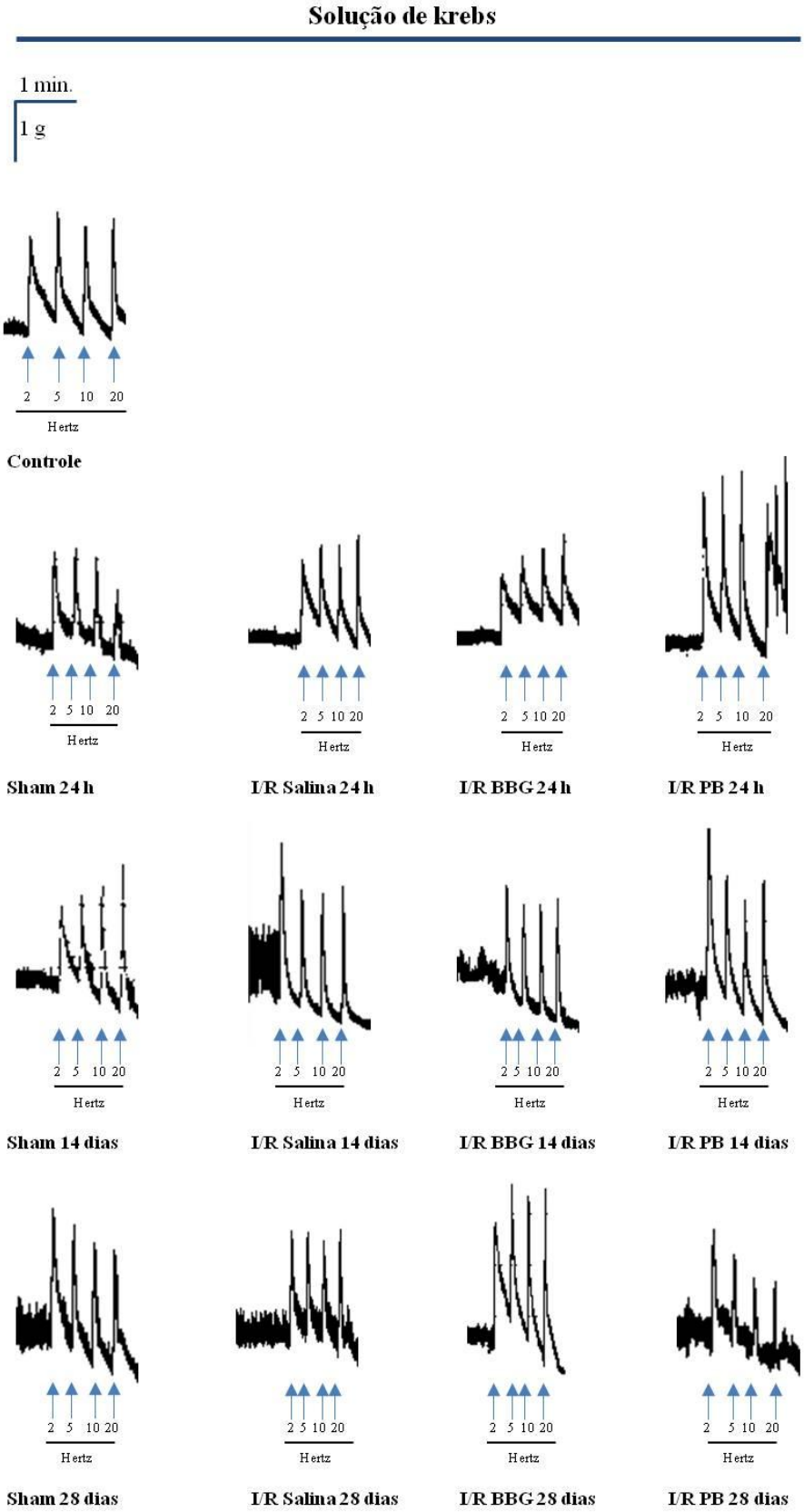
dados são de n=4 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) (^{T}I/R Salina *vs* I/R BBG; ^{x} I/R BBG *vs* Sham; $^{\sigma}$ I/R PB *vs* Sham; $^{\Theta}$ I/R Salina *vs* I/R PB; $^{\Delta}$I/R BBG *vs* I/R PB; **I/R Salina 14 dias e 28 dias *vs* I/R Salina 24 h; $^{"}$ I/R BBG 14 dias *vs* I/R BBG 24 h; ^I/R PB 14 dias e 28 dias *vs* I/R PB 24 h; °I/R PB 28 dias *vs* I/R 14 dias).

4.6.3 Efeito do Estímulo Elétrico na atividade espontânea do íleo

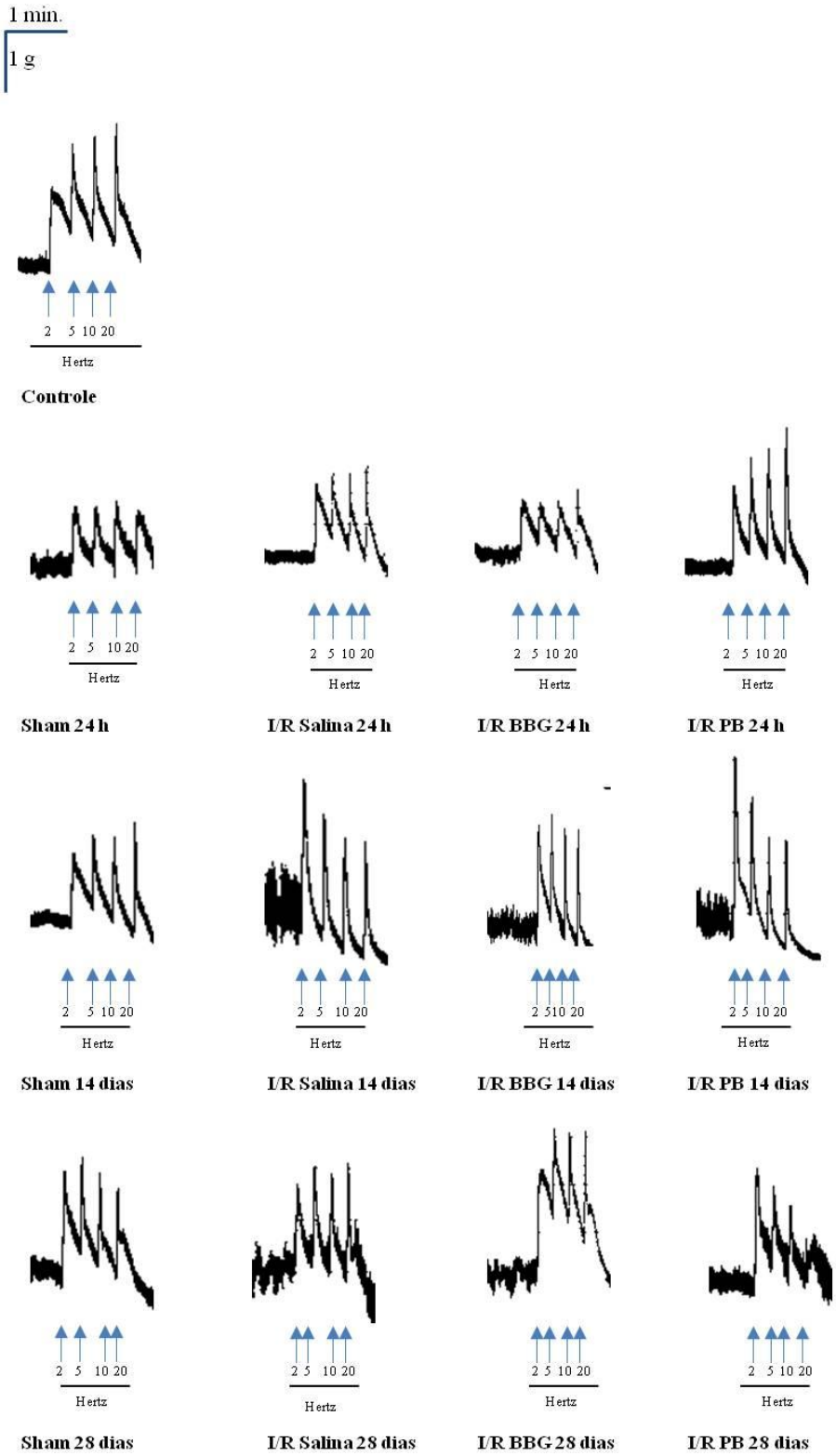
A contratilidade do músculo liso do íleo foi analisada em resposta a estímulos elétricos com voltagem de 100 volts, duração de 5 segundos e com aplicação de diferentes frequências (2, 5, 10 e 20 Hertz)

Foi possível observar a formação de picos de contração a cada aplicação dos estímulos (Figura 46).

Figura 46 - Segmentos de registros mecanográficos que mostram os efeitos contráteis do estímulo elétrico aplicado nas frequências de 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz e 20 Hz do íleo de ratos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



Fluorocitrato – 100 µM

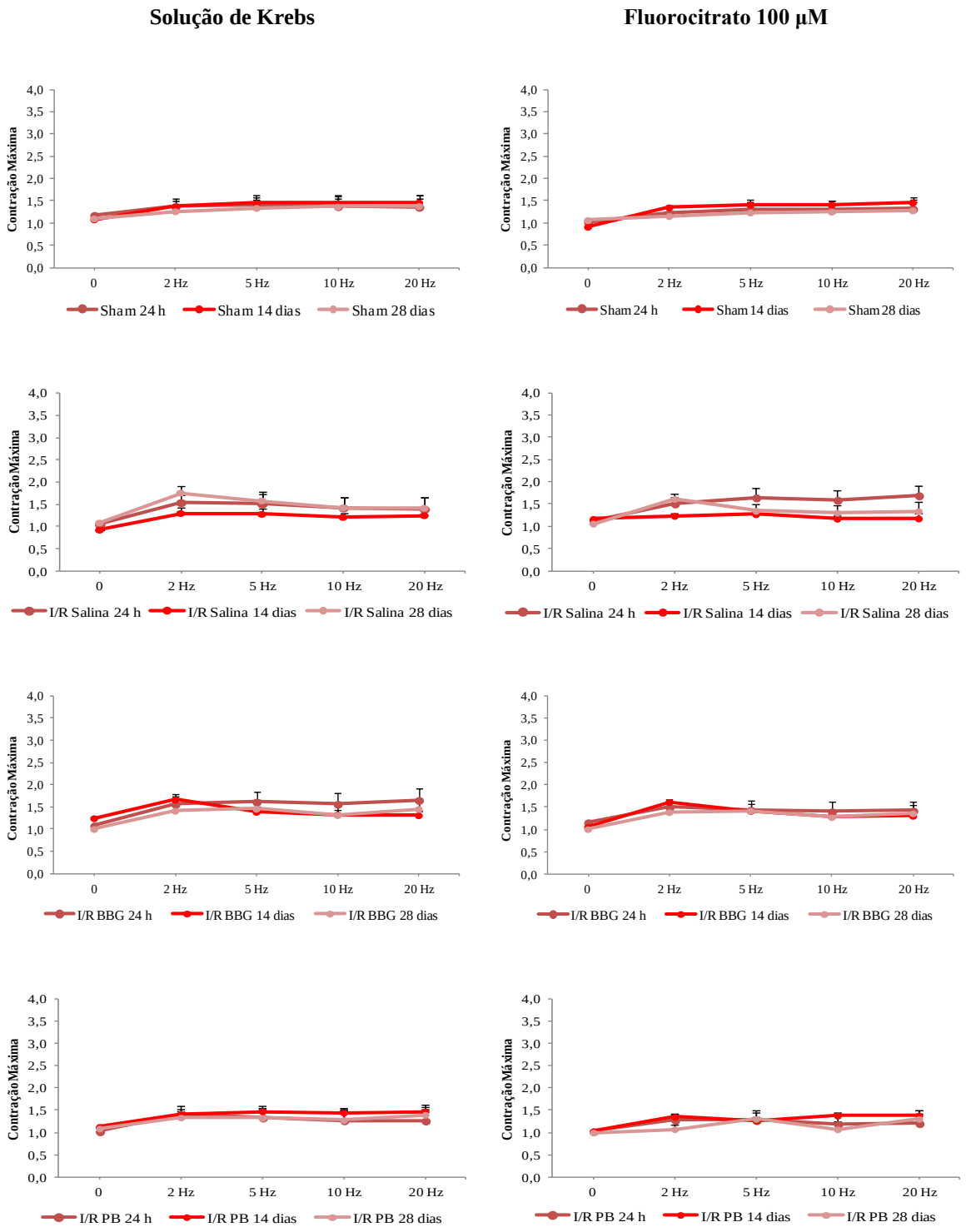


As aplicações dos estímulos foram aplicadas tanto na ausência como na presença de fluorocitrato.

No entanto, não foram identificadas diferenças significantes entre frequência, grupo e tempo independente se o intestino estava na presença ou na ausência de fluorocitrato.

Todos os grupos e tempos estudados apresentaram comportamento semelhante aos estímulos aplicados, como pode-se observar na figura 47.

Figura 47 - Efeito do estímulo elétrico na atividade espontânea do íleo nos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.

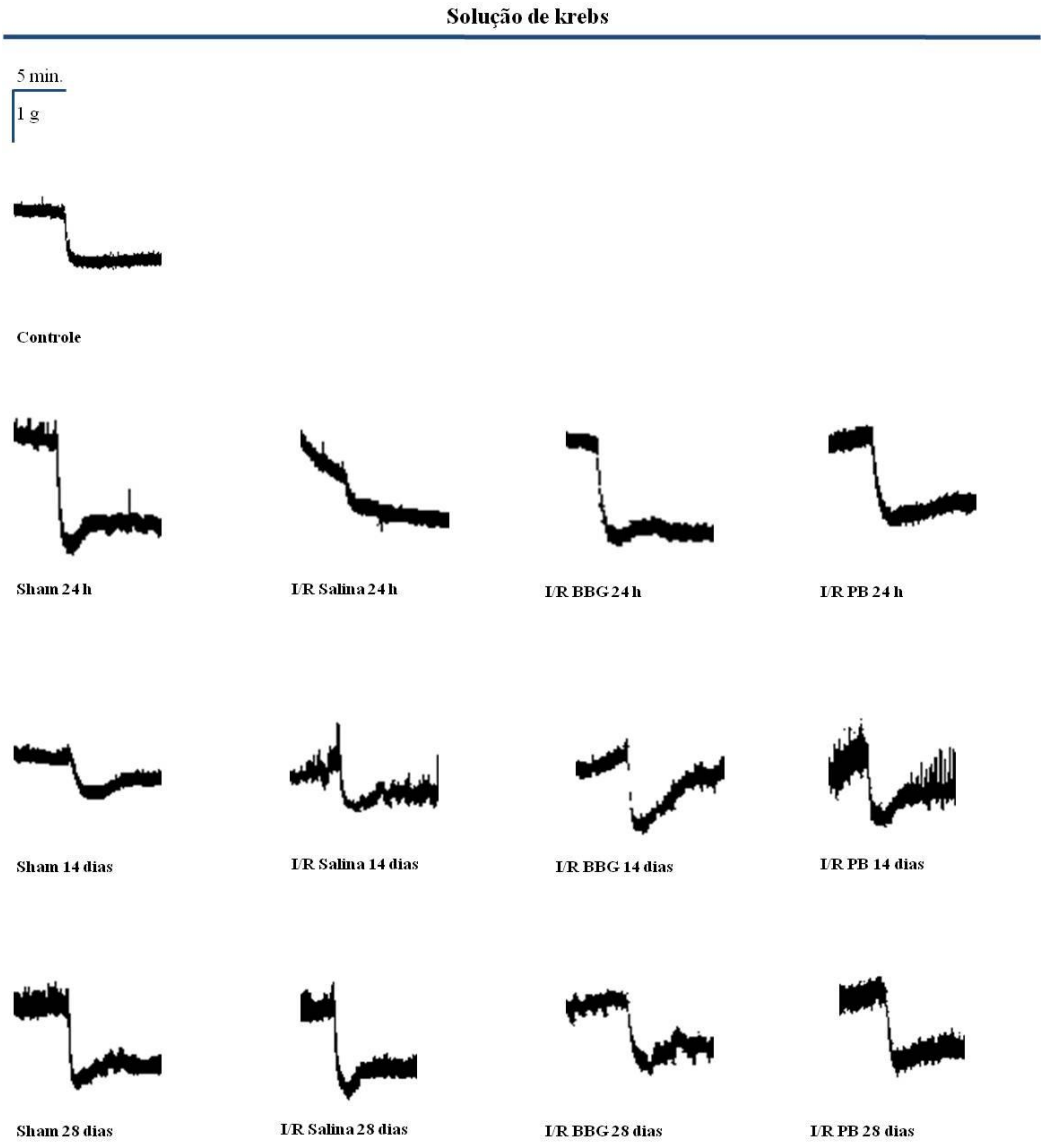


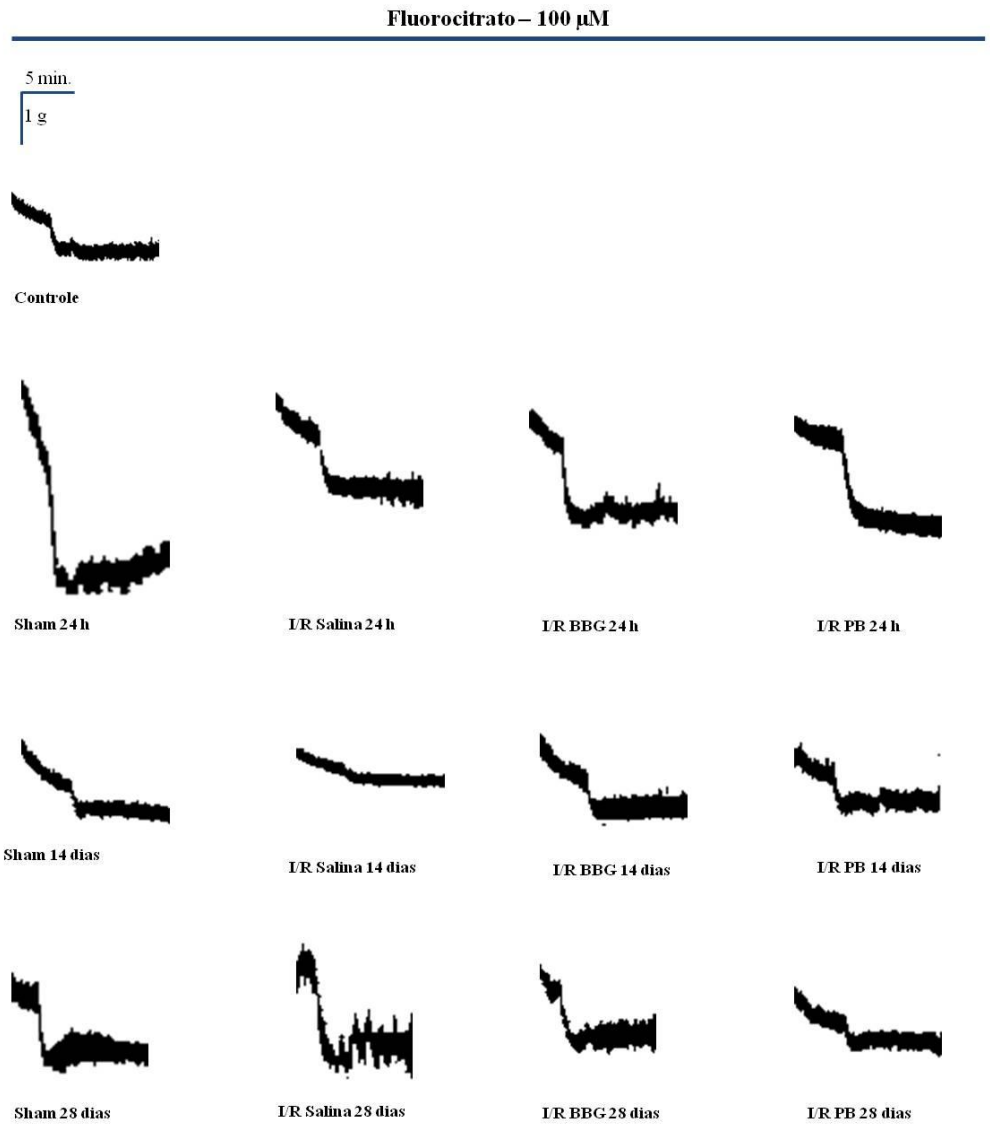
Os dados são de n=4 e expressos em Média ± desvio padrão.

4.6.4 Efeito do Nitroprussiato de Sódio (SNP) na Atividade Espontânea do Íleo

O SNP foi aplicado em dose única de 100 µM, e induziu o relaxamento do íleo que ocorreu imediatamente após a aplicação da droga (Figura 48)

Figura 48 - Segmentos de registros mecanográficos que mostram os efeitos de relaxamento do SNP na dose de 100 µM no íleo de ratos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.





4.6.4.1 Efeito do SNP na Atividade Espontânea do Íleo

Quando feita análise entre os grupos Controle e Sham não foi observado nenhuma diferença significante.

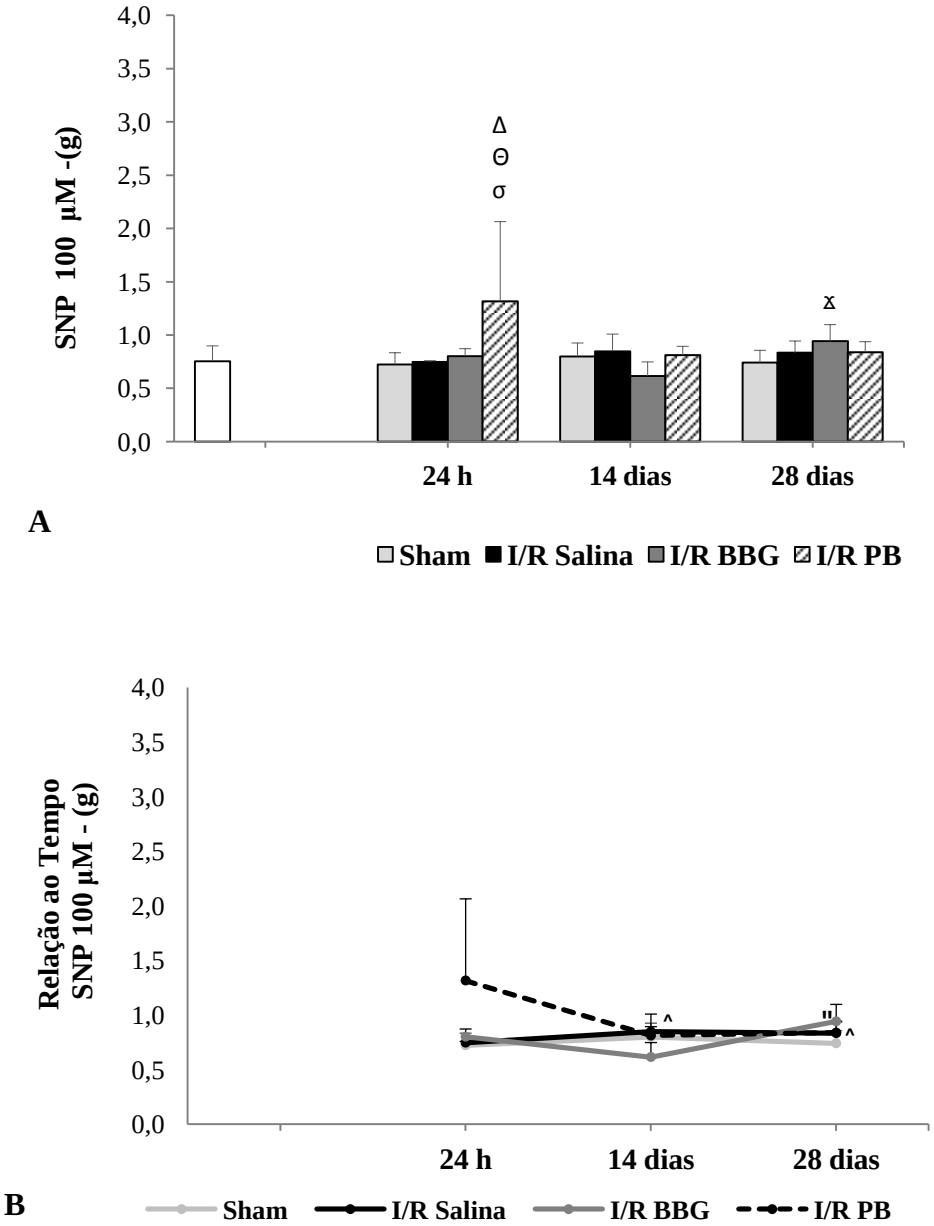
O grupo I/R PB 24 h apresentou aumento significante ($p<0,05$) de 80% do relaxamento quando comparado com o seu respectivo Sham e este aumento de relaxamento (74%) também foi detectado quando feito a comparação I/R PB 24 h vs I/R Salina 24 h (Figura 49 A).

Quando feito a comparação entre os tratamentos, o grupo I/R PB 24 h apresentou aumento significante ($p<0,05$) do relaxamento em 62% quando comparado com I/R BBG 24 h (Figura 49 A).

O grupo I/R BBG 28 dias apresentou aumento significante ($p<0,05$) do relaxamento em 27% quando comparado com o seu respectivo grupo Sham (Figura 49 A).

Considerando o fator tempo, o grupo I/R BBG 28 dias apresentou aumento do relaxamento significante ($p<0,05$) quando comparado com I/R BBG 24 (17%) e 14 dias (54%) (Figura 54 B). E os grupos I/R PB 14 dias e 28 dias apresentaram redução significante ($p<0,05$) do relaxamento em 36,5% quando comparado com I/R PB 24 h (Figura 49 B).

Figura 49- Efeito do SNP na atividade espontânea do íleo nos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



Os dados são de n=4 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) (^{x}I/R BBG *vs* Sham; $^{\sigma}$I/R PB *vs* Sham; $^{\Theta}$I/R Salina *vs* I/R PB; $^{\Delta}$I/R BBG *vs* I/R PB; ¨ I/R BBG 28 dias *vs* I/R BBG 24 h; ^I/R PB 14 dias e 28 dias *vs* I/R PB 24 h).

4.6.4.2 Efeito do SNP na Atividade Espontânea do Íleo na presença de Fluorocitrato

Quando feita análise entre os grupos Controle e Sham não foi observado nenhuma diferença significante.

O grupo I/R PB 24 h apresentou aumento significante ($p<0,05$) de 81% do relaxamento quando comparado com o seu respectivo grupo Sham (figura 50 A).

A análise de I/R PB 24 h vs I/R Salina 24 h demonstrou que o grupo I/R PB 24 h apresentou aumento significante ($p<0,05$) de 60% do relaxamento (Figura 55 A).

Quando feito a comparação dos tratamentos também pode-se observar que o grupo I/R PB 24 h apresentou aumento significante ($p<0,05$) do relaxamento em 71% quando comparado com I/R BBG 24 h (Figura 50 A).

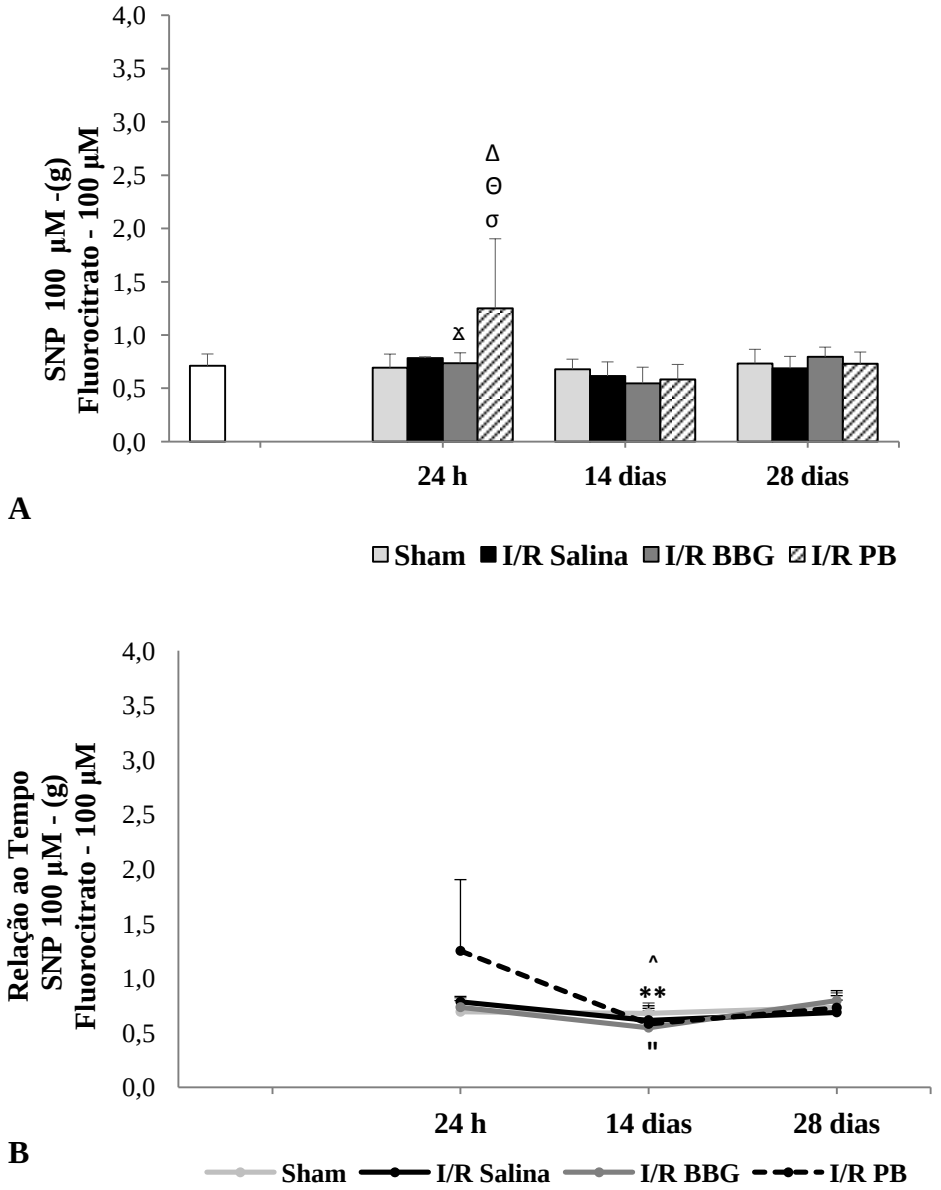
O grupo I/R BBG 14 dias apresentou redução significante ($p<0,05$) do relaxamento em 19% quando comparado com o seu respectivo grupo Sham (Figura 50 A).

Considerando o fator tempo, foi detectado que o grupo I/R Salina 14 dias (21%) apresentou redução significante do relaxamento quando comparado com I/R Salina 24 h (Figura 50 B)

No grupo I/R BBG, o período de 14 dias apresentou redução significante ($p<0,05$) de 26% do relaxamento quando comparado com 24 h e o período de 28 dias apresentou aumento significante ($p<0,05$) de 46% do relaxamento quando comparado com 14 dias (Figura 50 B).

E o grupo I/R PB 14 dias (53%) apresentou redução significante ($p<0,05$) do relaxamento quando comparado com I/R PB 24 h (Figura 50 B).

Figura 50 - Efeito do SNP na atividade espontânea do íleo nos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



Os dados são de n=4 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) (ˣ I/R BBG *vs* Sham; σ I/R PB *vs* Sham; Θ I/R Salina *vs* I/R PB; Δ I/R BBG *vs* I/R PB; ** I/R Salina 14 dias *vs* I/R Salina 24 h; ¨ I/R BBG 14 dias *vs* I/R BBG 24 h; ^I/R PB 14 dias *vs* I/R PB 24 h).

4.6.4.3 Efeito do SNP na Atividade Espontânea do Íleo na ausência e na presença de Fluorocitrato

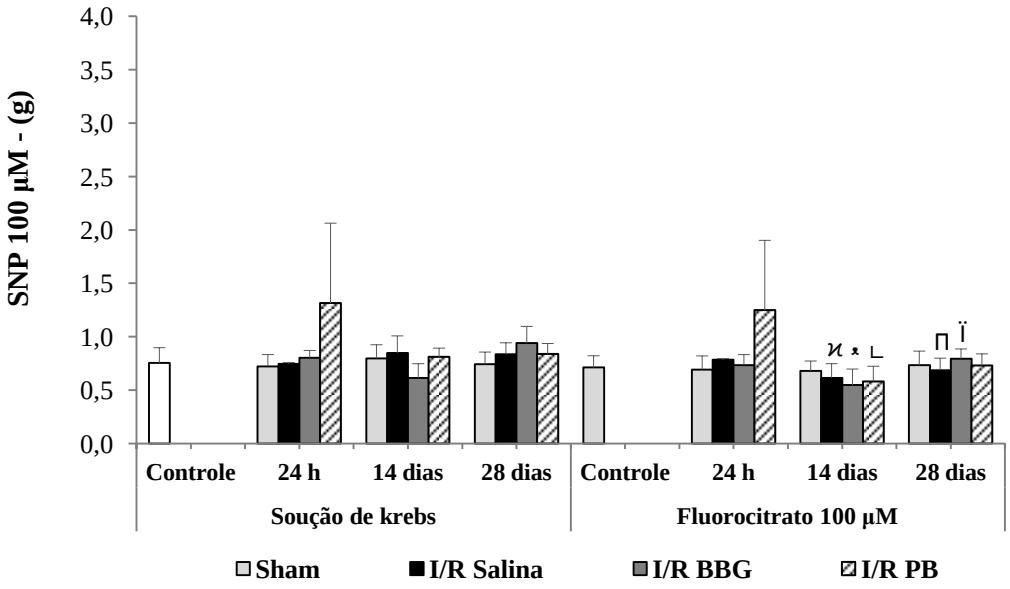
Está análise deve como objetivo observar o comportamento do relaxamento na ausência e na presença de fluorocitrato

Nos grupos Controle e Sham não foram detectado diferenças significantes (p<0,05) no relaxamento quando feita a comparação sem fluorocitrato vs com fluorocitrato.

Nos grupos I/R Salina de 14 dias e 28 dias foram observados redução significante (p<0,05) do relaxamento em 27% e 17% respectivamente, na presença de fluorocitrato. Os grupos I/R BBG 14 dias (32%) e 28 dias (16%) também apresentaram redução significante (p<0,05) do relaxamento na presença de fluorocitrato (Figura 51).

O grupo I/R PB 14 dias também apresentou redução significante (p<0,05) de 28% do relaxamento do intestino na presença de fluorocitrato (Figura 51). Não houve diferença significante entre os grupo I/R PB 28 dias.

Figura 51 - Efeito do SNP na atividade espontânea do íleo na ausência e na presença de fluorocitrato dos grupos Controle, Sham, I/R Salina, I/R BBG e I/R PB nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias.



Os dados são de n=4 e expressos em Média ± desvio padrão. (p<0,05) ([ϰ]I/R Salina 14 dias (fluorocitrato) *vs* I/R Salina 14 dias (Solução de Krebs); [ɲ]I/R Salina 28 dias (fluorocitrato) *vs* I/R Salina 28 dias (Solução de Krebs); [*]I/R BBG 14 dias (fluorocitrato) *vs* I/R BBG 14 dias (solução de Krebs); [ï]I/R BBG 28 dias (fluorocitrato) *vs* I/R BBG 28 dias (solução de Krebs); [└]I/R PB 14 dias (fluorocitrato) *vs* I/R PB 14 dias (Solução de Krebs).

5 DISCUSSÃO

5.1 Considerações sobre a Isquemia Intestinal com Reperfusão

O intestino é o órgão mais sensível a lesões causadas por isquemia e reperfusão entre os órgãos internos (CAGIN et al., 2016; SASAKI; JOH, 2007; TAKEYOSHI et al., 1996). Os enterócitos, as células predominantes na mucosa do intestino, são facilmente lesionados por episódios de isquemia e reperfusão (CAGIN et al., 2016; TAKEYOSHI et al., 1996).

Existem diversos modelos na literatura de fenômenos de isquemia e reperfusão. A isquemia pode ser total ou parcial e, pode haver comprometimento arterial isoladamente ou, em conjunto com componente venoso. A interrupção do fluxo arterial ou artério-venoso pode ser mantida durante todo o experimento ou, pode se estabelecer períodos variáveis de isquemia e reperfusão (DOCKENDORF et al., 1993; GRANGER et al., 1980; IKEDA et al., 1998).

Sob condições normais, 30% do sangue em circulação passa através do TG, mas sob condições de isquemia, baixa perfusão e hipóxia ocorre graves alterações no TG, levando a deficiência da respiração mitocondrial e aumento da glicólise, exaustão de ATP celular e danos na mucosa, o que eventualmente resulta em disfunções da barreira intestinal e translocação de bactérias e endotóxinas (CAMPOLLO et al., 2013; GROOTJANS et al., 2010; LIU et al., 2009; MALLICK et al., 2004; XU et al., 2015; YASUHARA, 2005).

A isquemia intestinal tem uma incidência de 8,6: 100.000 pessoas na população em geral, embora 1-2: 1.000 são casos entre pacientes hospitalizados (ACOSTA et al., 2004; CAGEN et al., 2016). Portanto a isquemia intestinal apresenta altas taxas de mortalidade, que podem variar de 60% a 100% dos casos devido à dificuldade do diagnóstico precoce (RIBEIRO; YOSHIDA, 2005).

Roedores são comumente utilizados como modelos de pesquisa e, têm fornecido conhecimentos em relação à fisiologia e patogênese na I/R (SLONE; FLEMING, 2014). No presente trabalho, utilizou-se rato, pois este apresenta facilidade de manejo, adequabilidade ao protocolo e disponibilidade. A constituição anatômica visceral do rato é similar à do homem. Além disso, o rato apresenta porte pequeno, sendo de fácil manuseio cirúrgico para abordagem das artérias e veias.

A duração da isquemia influencia a gravidade da lesão e da mortalidade. No presente estudo o protocolo de isquemia foi induzido por um período de 45 minutos, e todos os animais sobreviveram ao período máximo de reperfusão utilizado neste trabalho (28 dias). Durante o período de oclusão dos vasos sanguíneos a porção do íleo tornou-se púrpura, e ao final da isquemia o tecido retornou a sua coloração rósea. Trabalhos da literatura sobre

isquemia e reperfusão intestinal têm demonstrado resultados similares com relação à coloração do intestino durante a I/R (MAROSTI et al., 2015; MENDES et al., 2015; PALOMBIT et al., 2013; RIVERA et a., 2012; 2009). O uso dos antagonistas BBG e PB não acarretaram alterações funcionais deletérias nos animais estudados.

Estudos demonstraram que o ato da cirurgia e da manipulação podem levar alterações no trato gastrintestinal. O intestino delgado está em estado constante de auto-regeneração (GENG et al., 2013). No trabalho de Simmy et al. (2001) foi observado em ratos Wistar submetidos a cirurgia abdominal com manipulação intestinal, alterações no epitélio intestinal com diminuição da viabilidade celular e das células da cripta, com alterações na fisiologia gastrintestinal. Outro trabalho indica que o fato de se fazer laparotomia, é suficiente para causar stress oxidativo nos enterócitos e provocar alterações funcionais do intestino (ANUP; SUSAMA; BALASUBRAMA, 2000).

5.2 Considerações Sobre a Expressão do Receptor P2X7, Panexina-1, Hu, S100β e GFAP

Trabalhos de métodos de imunohistoquímica demonstraram a presença ou ausência de substâncias neurais dentro de células nervosas, isso tem sido importante para o entendimento dos aspectos morfofuncionais de cada neurônio entérico e do funcionamento do sistema gastrintestinal (FURNESS, 2006; TAN; BORNSTEIN; ANDERSON, 2010).

O presente trabalho utilizou anticorpos utilizados na literatura para evidenciar o receptor P2X7, canal de Panexina-1, o pan-neuronal Hu e para as células gliais entéricas S100β e GFAP (DA SILVA et al., 2015; GULBRANSEN et al., 2012; JSAKSON; THOMPSON, 2014; MAROSTI et al., 2015; MENDES et al., 2015; PALOMBIT et al., 2013).

A presença de receptores P2X em neurônios entéricos e células gliais entéricas têm sido descrita através de métodos imunohistoquímicos (CASTELUCCI et al., 2002a; MAROSTI et al., 2015; MENDES et al., 2015; RATHBONE et al., 1999; VANDERWIDEN; TIMMERMANS; SCHIFFMANN, 2003; VULCHANOVA et al., 1996). Alguns trabalhos evidenciaram o código químico dos neurônios entéricos imunorreativos ao receptor P2X2 (CASTELUCCI et al., 2002a), ao receptor P2X3 (POOLE et al., 2002) e ao receptor P2X7 (HU et al., 2001). Nas células gliais entéricas têm-se descrito a presença dos receptores P2X2 (MAROSTI, et al., 2015; MENDES et al., 2015), P2X6 (VAN CROMBRUGGEN et al., 2007) e P2X7 (VANDERWIDEN; TIMMERMANS; SCHIFFMANN, 2003). Os canais de Panexina-1 também foram descritos no SNE (GULBRASEN et al., 2012).

Para a identificação dos neurônios foi utilizado um marcador pan-neuronal Hu, este é usado para analisar a população total de neurônios do SNE em diferentes espécies, como por exemplo, em ratos, cobaias, humanos e equinos (FREYTAG et al., 2008; GANNS et al., 2006; LIN et al., 2002; PHILLIPS et al., 2004). A proteína Hu pertence à família de proteínas ligantes de RNA-ELAV (*embryonic lethal abnormal visual*) (NABORS; FURNEAUX; KING, 1998). No presente trabalho, os neurônios entéricos Hu-IR apresentaram marcação do corpo celular e núcleo em todos os grupos estudados, resultados semelhantes foram descritos no SNE de equinos (FREYTAG et al., 2008), camundongos (QU et al., 2008) e ratos (MENDES et al., 2015; PALOMBIT et al., 2013).

No presente trabalho foi feita análise quantitativa, da dupla marcação de neurônios Hu-IR com o receptor P2X7 no plexo mioentérico de ratos Controle, Sham e Isquêmicos com diferentes períodos de reperfusão e tratamentos. Os resultados demonstraram que o receptor P2X7 estava presente em 100% dos neurônios nos grupos estudados. Da Silva et al. (2015) e Palombit et al. (2013) descreveram que 100% dos neurônios Hu positivos colocalizam com o receptor P2X7, esses dados corroboram com o presente trabalho. No entanto, alguns trabalhos demonstram alterações da expressão do receptor P2X7 no plexo mioentérico nos protocolos de desnutrição e renutrição (GIROTI, et al., 2013), na I/R (PALOMBIT, et al., 2013) e na colite ulcerativa (DA SILVA, et al., 2015).

Nos grupos estudados, quando feita à análise inversa da dupla marcação do receptor P2X7 com neurônios Hu-IR, observou-se que em torno de 16% de células eram imunorrreativas somente ao receptor P2X7 e não aos neurônios. Isto sugere que o receptor P2X está localizado em outras células que não eram neurônios, e que poderiam ser células gliais entéricas. Trabalhos de Marosti et al. (2015) e Mendes et al. (2015) mostraram em protocolos de I/R que ao redor de 18% e 8% de células receptor P2X2-IR não colocalizavam com neurônios, respectivamente. Os autores Da Silva et al. (2015) e Palombit et al. (2013) descreveram que 20% e 15% de células receptor P2X7-IR não eram imunorreativos ao Hu, em protocolos de colite ulcerativa e I/R (íleo), respectivamente.

No presente trabalho, ao verificar a presença do receptor P2X7 nas células gliais entéricas, constatou-se que o receptor estava presente em 100% nas gliais entéricas em todos os grupos estudados. Resultados da literatura corroboram com estes achados, como os autores Da Silva et al. (2015) que identificaram a presença de 100% deste receptor em células gliais entéricas no plexo miontérico do cólon distal de ratos.

A expressão do receptor P2X7 em células gliais entéricas tem sido descrita, assim como, a alteração da sua expressão em condições neuropatológicas (BASSOTTI et al., 2008;

VANDERWIDEN; TIMMERMANS; SCHIFFMANN, 2003). No SNC, patologia de células gliais tem sido relacionada a vários receptores purinérgicos. O ATP atua no receptor P2X7 que é essencialmente expresso na microglia ativa, e associa-se ao processo inflamatório mediado por citocinas e neurodegeneração (COLLO et al., 1997; LE FEUVRE; BROUGH; ROTHWELL, 2002).

O ATP liberado pela glia e a adenosina gerada da hidrólise do ATP podem influenciar a função neuronal entérica via receptores P2 e P1, respectivamente. A modulação da atividade sináptica pela glia entérica pode, portanto ser um componente necessário para a sinalização neuronal entérica e motilidade (BASSOTTI et al., 2008; GULBRANSEN; SHARKEY, 2009).

Para a identificação das células gliais entéricas foram usados dois marcadores: S100β e GFAP. A família S100 foi, originalmente, caracterizada como um grupo de pequenas proteínas citosólicas diméricas do tipo ligadora de cálcio, existe em variadas formas, dependendo de sua estrutura de cadeias α e β, e estão em abundância em tecido nervoso (OLIVEIRA; IKUTA; REGNER, 2008).

De acordo com Donato (2003), intracelularmente as proteínas S100 têm sido implicadas na regulação de fosforilação de proteínas, na dinâmica dos constituintes do citoesqueleto, na homeostase de Ca^{2+}, na atividade enzimática, nos fatores de transcrição, crescimento e diferenciação celular, e na resposta inflamatória.

No presente trabalho, as células gliais entéricas imunorreativas a S100β apresentaram marcação de núcleo e citoplasma em todos os grupos estudados, sendo que algumas células apareceram aumentar a intensidade de S100β nos grupos isquêmicos, resultados similares foram observados em Marosti et al. (2015).

Outro marcador de células gliais entéricas, GFAP é uma proteína estrutural, da classe dos filamentos intermediários (ENG; GHIRNIKAR; LEE, 2000). Na maioria das células, uma extensa rede de filamentos intermediários envolve o núcleo e se estende até a periferia, aonde se liga à membrana plasmática. Filamentos intermediários são particularmente concentrados em células submetidas a estresse mecânico, como as epiteliais e as musculares (ENG; GHIRNIKAR; LEE, 2000). A marcação de GFAP no presente trabalho apresentou marcação de filamentos e aumento da arborização nos grupos isquêmicos, com retorno similar aos grupos Sham nos grupos tratados com BBG e PB

Para estudar o fenótipo das células gliais entéricas na I/R no presente trabalho, foi feito a dupla marcação de S100β e GFAP. Os resultados demonstraram que houve colocalização de 72% de gliais entérica a S100β-IR e GFAP-IR, sendo que em torno de 29% das gliais entéricas eram imunorreativos somente a um único tipo de marcador S100β ou

GFAP nos grupos estudados. Neste aspecto, estudos vêm demonstrando a heterogeneidade fenotípica das células gliais entéricas, com expressão diferencial de S100 e GFAP representando a alta plasticidade dessas células (BOESMANS et al., 2014; GRUNDMANN et al., 2016; RAO et al., 2015). Pode-se indicar que uma subpopulação de células gliais S100-positiva/GFAP-negativa representa uma fase mais precoce das células gliais entéricas com um potencial de linhagem neuronal (GRUNDMANN et al., 2016).

Estudos relataram a importância das células gliais entéricas na biologia e função dos neurônios entéricos, como na codificação neuroquímica, liberação e degradação de substâncias neuroativas e neuroproteção; todos esses mecanismos foram mostrados a serem modulados por células gliais entéricas (ABDO et al., 2012; 2010; AUBE et al., 2006; FLETCHER et al., 2002; LE BERRE-SCOUL et al., 2016; NAGAHAMA et al., 2001; SAROSI et al., 1998). No trabalho de Le Berre-Scoul e colaboradores (2016) foi demonstrada uma nova função das células gliais entéricas relacionada com a formação de circuitos, estendendo assim a importância da comunicação glia-neurônio para o bom funcionamento do SNE.

A marcação de S100β e Hu, mostrou colocalização de 5%. Estudos mostraram que no plexo mioentérico há um grupo de células S100 com propriedades intermediárias neurônio - glial, principalmente nas regiões do dudodeno, jejuno e íleo. Essa subpopulação é muito pequena e apoia a ideia que as células gliais entéricas ou as células precursoras da célula de Schwann, servem de células precursoras de neurônios entéricos durante a homeostase no período pós-natal, quando o desenvolvimento do SNE é mais influenciado por fatores ambientais (JOSEPH et al., 2011; GRUNDMANN et al., 2016; UESAKA et al., 2015).

Trabalhos recentes sugerem que as células precursoras da célula de Schwann ou as células gliais entéricas se transdiferenciam em neurônios nas fases pós-natal em condições fisiológicas ou em condições de seguidas doenças ou lesões intestinal (BELKIND-GERSON et al., 2015; GRUNDMANN et al., 2016; JOSEPH et al., 2011; LARANJEIRA et al., 2011; UESAKA et al., 2015;).

Em contra partida não foi observado colocalização na dupla marcação de GFAP e Hu. GFAP tem predominância de filamentos intermediários na sua composição (ENG; GHIRNIKAR; LEE, 2000) e este componente não compete e/ou interfere nessa dupla marcação, sendo assim, é possível mostrar com confiabilidade os diferentes tipos celulares.

Panexina-1 forma canais de membrana nas células e mecanismo de liberação de ATP mediada por este canal pode envolver aumento na liberação de Ca^{2+} a partir do retículo endoplasmático (BAO; LOCOVEI; DAHL, 2004; BARANOVA et al., 2004 DIEZMOS et al.,

2013; LOCOVEI; WANG; DAHL, 2006). A panexina-1 é estabelecida como um mediador para a liberação de IL-1β em associação com o receptor P2X7, que conduz à inflamação e morte celular (DIEZMOS et al., 2015; LOCOVEI et al., 2007; SURPRENANT; NORTH, 2009).

Com relação à marcação de Panexina-1 e GFAP, foi possível observar que se tem 100% da presença deste canal em células gliais entéricas. É sabido que sob estímulos de lesões/patologias, o canal pode abrir e liberar ATP do meio intracelular para o meio extracelular (BECKEL et al., 2014; LOCOVEI; WANG; DAHL, 2006; XIA et al., 2012) . Está ação pode agravar ainda mais o processo inflamatório.

5.3 Considerações Sobre a Densidade Neuronal e Glial

Avaliações na densidade neuronal do plexo mioentérico, submetidos a diferentes técnicas de neuromarcação, têm sido realizado em várias partes do trato gastrintestinal, com diferentes protocolos como desnutrição/renutrição (CASTELUCCI et al., 2002b; GIROTTI et al., 2013; GOMES et al., 2006; GREGGIO et al., 2010; MISAWA et al., 2010), isquemia/reperfusão (MAROSTI et al., 2015; PALOMBIT et al., 2013; PAULINO et al., 2011) e obesidade (MIZUNO et al., 2014; 2012) e colite ulcerativa (DA SILVA et al., 2015).

A densidade neuronal do Hu apresentou uma diminuição significante nos grupos isquêmicos quando comparados aos grupos Sham, sugerindo morte neuronal. Porém para afirmar que houve morte neural, há a necessidade da utilização de outras técnicas como, por exemplo, a marcação pelo TUNEL (marcação de terminações dUTP pela deoxinucleotidil tranferase terminal) que detecta terminações 3’-hidroxila características da apoptose (MATSUO et al., 2013; OTSUKI; LI; SHIBATA, 2003). Os autores Marosti et al. (2015), Mendes et al., (2015) e Palombit et al. (2013) também registraram diminuição de neurônios Hu-IR nos diferentes períodos de I/R. Lindeström e Ekblad (2004) demonstraram uma diminuição no número total de neurônios entéricos na isquemia, nos plexos mioentérico e submucoso, porém, não identificaram as classes de neurônios afetadas e seus códigos químicos.

Durante um processo de insulto, as concentrações locais de ATP extracelular estão elevadas, muitas vezes, por consequência de danos celulares e lise. O ATP extracelular circulante pode-se ligar ao receptor P2X7, o que resulta na formação de poros, que acarreta o efluxo de K^+, e influxo de Ca^{2+} causando alteração do potencial de membrana intracelular e assim estimulando a formação de inflamossomo, conversão da pro-caspase-1 em caspase-1

madura e liberação de Il-1β (ARULKUMARAN; UNWIN; TAM, 2011; DINARELLO, 2002; FERRARI et al., 2006; MACKENZIE et al., 2001).

Evidências experimentais suportam que uma resposta inflamatória atenuada com o uso de antagonistas de do receptor P2X7, podem estar diretamente relacionado com a inibição da liberação de IL-1β. Porém, respostas inflamatórias atenuadas também podem estar relacionadas à ausência de indução de outros mediadores inflamatórios (ARULKUMARAN; UNWIN; TAM, 2011; MACKENZIE et al., 2001; PARVATHENANI et al., 2003).

No presente trabalho o uso do BBG e PB, proporcionram recuperação dos neurônios Hu-IR. Palombit (2014), apresenta dados que corroboram com o presente trabalho, mostrando que houve diminuição da densidade neuronal na I/R e recuperação destes neurônios quando utilizado BBG. Peng et al. (2009) demonstraram que houve recuperação de lesão mecânica da medula espinhal após uso de BBG. Adicionalmente, o uso de PB tem se mostrado protetivo contra lesões de privação de oxigênio e glicose, regulando a atividade de inflamassomo (JIAN et al., 2016). O estudo de Wei et al. (2015) mostrou que o PB tem efeito neuroprotetor contra lesões de isquemia e reperfusão cerebral; outro trabalho também relata que o PB suprime o processos inflamatórios e reduz a liberação do grupo de alta mobilidade box 1 (citocina pró-inflamatória) de neurônios após isquemia cerebral (XIONG et at al.,2014). No entanto, os mecanismos da ação do BBG no receptor P2X7 e do PB no canal de panexina permanecem não esclarecidos.

Com relação à densidade das células imunorreativas ao receptor P2X7, foi encontrada uma diminuição significante nos grupos I/R Salina 24h, 14 dias e 28 dias quando comparado aos grupos Sham. Com o uso do BBG e PB houve recuperação das células imunorreativas ao receptor P2X7 nos grupos com 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão. Dados apresentados por Palombit (2014) com relação ao BBG, também mostraram recuperação das células P2X7-IR com o uso do BBG no protocolo de I/R com 0 h, 24 h e 14 dias de reperfusão. A recuperação das células P2X7-IR com uso de PB, pode ser reflexo da interação P2X7/Panexina-1. Diversos estudos demonstraram que o receptor P2X7 e Panexina-1 podem agir sinergicamente (GULBRASEN et al., 2012; LOCOVEI et al., 2007; PELEGRIN; SURPRENANT, 2006). Adicionalmente, BHASKARACHARYA et al. (2014) demonstraram que o PB tem um efeito direto como inibidor do receptor P2X7. Com o bloqueio dos canais de Panexina-1, não houve interação e assim, pode haver uma preservação do receptor P2X7, no entanto, mas estudos precisam ser realizados para confirmar essa hipótese.

Os dados de Palombit et al. (2013) mostraram que os neurônios imunorreativos ao receptor P2X7 tiveram uma diminuição significante na densidade nos grupos isquêmicos com

6, 24, 72 h e 1 semana de reperfusão. Estes dados são similares aos resultados encontrados no presente trabalho, onde foi verificado que a densidade do receptor P2X7 sofreu uma diminuição nos grupos isquêmicos. Da Silva et al. (2015) também demonstrou diminuição de células P2X7-IR no colo distal de ratos submetidos a colite experimental.

A densidade de Panexina-1 mostra uma diminuição dos grupos I/R Salina quando comparado aos grupos Sham e uma recuperação quando tratados com BBG e PB. Este comportamento é muito similar ao do receptor P2X7, indicando que esta via P2X7/Panexina-1 pode ser sincronizada.

Ao analisar as células gliais entéricas S100β-IR e GFAP-IR, foi observado aumento na densidade glial nos períodos de 24 h, 14 dias e 28 dias de reperfusão. Mendes et al. (2015) também observaram aumento da densidade de células gliais entéricas tanto S100β como GFAP no protocolo de I/R. Thacker et al. (2011), observaram diminuição no número de neurônios do plexo mioentérico e distorção de células gliais entéricas na I/R. A diferença de resultados encontrada no presente trabalho com de Thacker et al. (2011) em relação as células gliais entéricas, pode ser explicada pelo protocolo utilizado, no trabalho de Thacker et al. (2011) a isquemia foi de 3 h e no presente trabalho o tempo de isquemia foi de 45 minutos. O aumento das células gliais entéricas no presente trabalho, poderia ser justificado pela ação protetiva das células gliais entéricas sobre os neurônios em injúrias no SNE. Ao usar o BBG, constatou-se uma diminuição da densidade glial (S100β e GFAP). Este fato pode ser explicado, visto que tanto nas células glias entéricas como nos neurônios se tem a presença do receptor P2X7,e com o uso do BBG, estes receptores são bloqueados. Sendo assim, haveria a recuperação dos neurônios e com isso, diminuindo a necessidade de uma atividade compensatória das células gliais. Este dado mostra a ação protetiva que o BBG vem exercendo. Dados recentes indicam que a deleção genética ou bloqueio farmacológico de P2X7 alteram a capacidade de resposta em protocolos de acidente vascular cerebral, neurotrauma, epilepsia, doença de Parkinson e doença de Huntington. Este dado é importante, visto que este receptor tem um papel proeminente na regulação de citocinas e respostas inflamatórias (SPERLÁGH; ILLES, 2014).

Com relação aos efeitos de PB sobre as células gliais entéricas, pode-se observar que houve um efeito diferenciado sobre as células imunorreativas a GFAP e a S100β. O papel do PB sobre as células positivas a GFAP mostrou ser eficaz e similar ao BBG. No entanto, observou-se uma diminuição acentuada das células imunorreativas a S100β nos grupos tratados com PB, quando comparadas com os demais grupos. Estes resultados podem demonstrar que o PB tenha um efeito específico sobre as células imunorreativas a S100β.

Donato (2003) descreveu que S100 tem sido implicado na regulação de Ca^{2+}. Sabe-se que PB tem ação direta para reduzir a sobrecarga de Ca^{2+} (WEI et al., 2015). Essa diminuição acentuada do número de células gliais S100β-IR pode-ser devido a ação que o PB exerce sobre o cálcio, porém há necessidades de mais estudos.

Von Boyen et al. (2004) demonstraram que, sob influência de citocinas pró-inflamatórias, células gliais entéricas que não eram IR a GFAP podem se tornar GFAP positivas. O aumento da expressão de GFAP por células gliais é também observado em tecidos coletados de pacientes portadores de colite ulcerativa e doença de Crohn.

No SNE não se têm trabalhos com o antagonista dos canais de panexina-1, Probenecida, no entanto, um trabalho recente sobre isquemia cerebral demonstrou que o tamanho do infarto é reduzido e a evolução neurológica melhora quando os canais de panexina (Panexina-1 e -2) são bloqueados em camundongos (BARGIOTAS et al., 2011). Outro estudo mostra que probenecida também tem um efeito direto como inibidor do receptor P2X7 (BHASKARACHARYA et al., 2014). Além disso, diversos estudos demonstram que o receptor P2X7 e Panexina-1 podem agir sinergicamente (GULBRANSEN et al., 2012; LOCOVEI et al., 2007; PELEGRIN; SURPRENANT, 2006) e que funcionam da mesma cascata de sinalização deletério que conduz a morte neuronal e de tecidos (CISNEROS-MEJORADO et al., 2015). Portanto, os canais de panexina podem ser um alvo potencial farmacológico para a prevenção da lesão de isquemia e reperfusão (WEI et al., 2015).

5.4 Considerações Sobre o Perfil Neuronal e análise ultra-estrutural

A avaliação morfométrica (medida da área do perfil celular) tem sido muito estudada em diferentes protocolos experimentais. Como exemplo, a morfometria realizada nos neurônios mioentéricos de ratos submetidos à dieta autoclavada (GONÇALEZ et al., 2011). Gonçalez et al. (2011) mostraram que a utilização de uma dieta autoclavada durante a gravidez, lactação e pós-desmame não altera a quantidade de neurônios reativos a NADH-diaforase no jejuno, mas interfere com a área do corpo celular, impedindo que o corpo da célula neuronal atinja dimensões semelhantes às observadas em animais com dieta não autoclavada, sugerindo uma atividade metabólica mais baixa para os neurônios. Em protocolos de desnutrição e renutrição, os neurônios mioentéricos do intestino delgado e grosso de ratos sofreram redução da área (CASTELUCCI et al., 2002b; GIROTTI et al., 2013; MISAWA et al., 2010).

No presente trabalho, ao ser obtido a área do perfil neuronal de Hu positivos, foi encontrada uma ampla variedade de tamanhos de neurônios, entre pequenos, médios e grandes entre os grupos analisados, portanto não foi detectado diferença entre os grupos. Outra explicação para não haver diferença entre os grupos é que o Hu foi usado como um pan-neuronal que marca neurônios de diversas classes neuronais. Os autores Marosti et al. (2015) e Palombit et al. (2013) demonstraram que a I/R afeta diferentemente a área do perfil neuronal dos neurônios nitrergicos, colinérgicos e intrínsecos aferentes primários, e houve a recuperação da área com uso do BBG (PALOMBIT, 2014). Adicionalmente, no presente trabalho, não foi possível detectar alterações na área do perfil, DMáx e DMín dos neurônios Hu-IR, quando fazemos comparações entre grupos. Com relação ao tempo de reperfusão, foi verificado um aumento da área do perfil celular do grupo de 28 dias, este aumento pode ser consequência de uma adaptação celular frente a lesão sofrida.

A análise do histograma de distribuição de frequência da área dos neurônios Hu-IR apresentou maior concentração de neurônios entre 150-300 μm^2 em todos os grupos estudados. Estes dados estão de acordo com a literatura (MAROSTI et al., 2015; PALOMBIT et al., 2013).

Com relação à distribuição das glias entéricas , demonstrou-se que no grupo de I/R 24 h houve uma maior porcentagem entre 60-80 μm, diferentemente de outros grupos que se mantiveram entre 80-200 μm, isto pode implicar que as células glias entéricas S100β positivas podem ser mais vulneráveis nos períodos iniciais da reperfusão. Mendes et al. (2015) também evidenciaram no protocolo de I/R área do perfil entre 60-80 μm nos períodos iniciais de reperfusão 24 h e 72 h.

O uso da técnica de microscopia eletrônica possibilitou uma melhor análise das estruturas celulares, com este recurso foi possível observar que as células gliais entéricas e os neurônios nos gânglios entéricos apresentam-se, circundada por tecido colágeno, sem sinais de apoptose, tais como cariorrexe ou cariopicnose, membranas nucleares sem sinais de desmembramento, estes dados são semelhantes aos encontrados por Stenkamp-Strahm et al. (2013) que analisou a morfologia das células gliais entéricas num protocolo de dieta rica em gordura.

Segundo Chen et al. (2012) a morfologia normal de um neurônio apresenta membrana nuclear bem delimitada, núcleo redondo ou oval e cromatina perinuclaear. Essas características foram evidenciadas no presente trabalho.

5.5 Considerações Sobre Expressão Proteica e Atividade Contrátil do Intestino

Em condições normais o ATP extracelular está presente em baixas concentrações, porém em condições inflamatórias *in vivo* e em resposta a traumas (isquemia/hipóxia) está concentração de ATP aumenta significativamente (DENG et al., 2015). A literatura demonstra que a ativação do receptor P2X7 pode estimular múltiplos processos celulares, incluindo a síntese e liberação de diversos mediadores inflamatórios (DENG et al., 2015; LENERTZ et al., 2011).

O trabalho de Deng et al. (2015) mostrou que a hipóxia intermitente induz aumento da expressão proteica de P2X7. Em protocolo de lesão isquêmica do miocárdio foi observado aumento da expressão proteica do receptor P2X7 e com o uso do BBG a expressão proteica do grupo com isquemia foi atenuada (KONG et al., 2013).

Dados de Diezmos et al. (2013) mostraram que a proteína de panexina-1 estava presente em todas as camadas do intestino grosso de humano, e que a expressão desta proteína esta diminuída na região muscular do colon na doença de Crohn.

No aspecto da atividade contrátil do intestino, alguns trabalhos sugerem que circuitos neurais intrínsecos podem ser prejudicados por consequência de isquemia e reperfusão; alguns neurônios podem morrer, enquanto outros podem sofrer alterações após a lesão (BALLABENI et al., 2002; CARPANESE et al., 2014; LINDESTRON; EKBLAD, 2004).

Uma vez que tanto a motilidade intestinal e secreção são amplamente dependentes da atividade de circuitos intrínsecos do intestino, estudos sobre o efeito das lesões de IR em neurônios entéricos têm evidenciado mudanças tanto na morfologia, distribuição e função de algumas vias neuronais (CALCINA et al., 2005; CARPANESE et al., 2014; GIARONI et al., 2011; RIVERA et al., 2011; 2009).

A motilidade do intestino delgado consiste em contrações espontâneas e rítmicas de ondas lentas e movimentos de massa periódico, como complexos motores migrantes (RYOO et al., 2015). No presente trabalho, a atividade contrátil do músculo do íleo exibiu regulares alterações rítmicas da tensão, e em alguns grupos isquêmicos as contrações foram menores, no entanto, com o uso do BBG e do PB houve recuperação da motilidade intestinal.

O agonista do receptor muscarínico, o carbacol induziu contrações sustentadas, ou seja, as contrações foram aumentando conforme as doses de carbacol, em todos os grupos, o trabalho de Rivera et al. (2012) também observou essas concentrações sustentadas, quando usado carbacol nas concentrações de 0,1 1 e 10 μM.

O fluorocitrato é um metabólico que inibe a enzima ácido aconitase tricarboxílica, é muito usado no SNC, pois provoca uma ruptura reversível e seletiva na função dos astrócitos (FONNUM et al., 1997; HASSEL et al., 1994; NASSER et al., 2006; OMARA; SISODIA, 1990; SWANSON; GRAHMAN, 1994; WILLOUGHBY et al., 2003). Este composto é utilizado para estudar o papel de astrócitos na fisiologia, metabolismo e neutramissão do cérebro (FONNUM et al., 1997; GORDON et al., 2005; NASSER et al., 2006; OMARA; SISODIA, 1990; SWANSON; GRAHMAN, 1994; WILLOUGHBY et al., 2003).

A literatura demonstra pouquissímos trabalhos com o uso do fluorocitrato no SNE. O trabalho de Nasser e colaboradores (2006) mostraram que segmentos de íleo de ratos incubados com fluorocitrato não apresentaram nenhum dano mascroscópico evidente. A citoarquitetura de neurônios e células gliais entéricas do plexo mioentérico estavam preservadas. O fluorocitrato teve um efeito dependente da dose sobre a tensão gerada nos tecidos, sendo observado diminuição da contratilidade do intestino quando aplicado estímulo elétrico na presença de fluorocitrato a 100 μM (NASSER et al., 2006). No presente trabalho não houve diferenças significantes na contratilidade do intestino quando aplicado estimulo elétrico. Essa diferença de resultados pode-se pelo método empregado, visto que no trabalho de Nasser et al. (2006) fluorocitrato foi adicionado ao banho de órgãos e aplicado intraperitonial antes do experimento e no presente trabalho o fluorocitrato foi aplicado somente no banho de órgãos pelo período de 30 minutos (na hora do experimento).

No entanto, em protocolo de separação materna mais estress agudo o fluorocitrato (100 μM) teve efeito inibitório sobre a contração colônica induzida por estímulo elétrico (FUJIKAWA et al., 2015).

O SNP é um sal de sódio solúvel em água composto por ferro, óxido nítrico (NO) e 5 anions de cianeto e é um doador de NO (RAGY; ELBASSUONI, 2012). NO atua como uma molécula de sinalização em tecido vascular e musculo liso do TG, é um mediador em diversos processos fisiológicos e inflamatórios e tem uma ação inibidora (MONCADA; PALMER; HIGGS,1991; RAGY; ELBASSUONI, 2012; SANDERS; WARD, 1992). Essa ação inibidora foi estudada em músculo liso do TG, incluindo duodeno e íleo de rato e cobaia e duodeno de cão (IRIE et al., 1991; TODA; BABA; OKAMURA, 1990). No presente trabalho foi observado que a adição de SNP no banho causou inibição das contrações espontâneas, portanto produziu uma ação de relaxamento do íleo. O mesmo efeito foi constato no trabalho de Ragy e Elbassuoni (2012), no íleo de coelhos. Caballero-Alomar et al. (2003) também observaram efeito inibitório do SNP sobre as contrações espontâneas do segmento proximal *Taenia coaci* de cobaias.

Com relação ao efeito do SNP na presença de fluorocitrato, não foi constatado nenhum trabalho na literatura. No presente trabalho, o efeito inibitório do SNP sobre as contrações foram atenuadas em alguns grupos, quando a análise foi feita comparado na ausência ou na presença de fluorocitrato. A redução do efeito inibitório do SNP na presença de fluorocitrato, pode ser consequência da redução ou eliminação de células gliais entéricas devido ao fluorocitrato (gliotóxina), o que pode se inferir que as células gliais entéricas poderiam interferir na motilidade intestinal, mas para confirmar essa hipótese é necessário mais estudos.

5.6 Considerações Finais

O protocolo de isquemia e reperfusão intestinal tem sua importância clínica, visto que a incidência desta patologia é alta e o diagnóstico precoce é dificil.

O presente estudo demonstrou que a I/R está associada com a perda significativa de neurônios e para compensar essa perda se têm um aumento do número de células glias entéricas, além disso, a atividade contrátil do intestino também sofre alterações com este protoloco.

A importância deste trabalho está em demonstrar os efeitos da isquemia com diferentes períodos de reperfusão sobre as células gliais entéricas imunorreativas a S100β e GFAP. Além disso, demonstrar que o uso do BBG e do PB são eficazes na recuperação das células gliais entéricas e neurônios e que podem ser alvos terapêuticos no tratamento de doenças do trato gastrintestinal.

6 CONCLUSÕES

Com base nos objetivos estabelecidos, a metodologia empregada e os resultados obtidos, conclui-se que:

1. O receptor purinérgico P2X7 foi identificado em neurônios e em células gliais entéricas em todos os grupos estudados e foram afetados pela I/R;
2. A panexina-1 foi identificada em células gliais entéricas e em neurônios em todos os grupos estudados;
3. As células gliais entéricas apresentaram fenótipos diferentes, ou seja, existe uma população que é imunorreativa só a S100β, outras só a GFAP e outra que é S100β e GFAP;
4. A manipulação visceral acarretou como consequência alterações na densidade, o que pode ser observado no grupo Sham.
5. O uso dos antagonistas BBG e PB demonstraram ser eficientes na recuperação dos neurônios e células glias entéricas na I/R e na motilidade; no entanto, o PB não recuperou as células gliais entéricas S100β-IR.
6. O uso do fluorocitrato demonstrou que a célula glial entérica tem participação na motilidade intestinal.
7. A isquemia com diferentes períodos de reperfusão tem demonstrado ser um modelo experimental importante para o estudo do SNE, sendo que esta pode provocar alterações na densidade, morfologia tanto de neurônios como de células gliais entéricas e também causa alterações funcionais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A.; ZIMMERMANN, H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends Neurosci.**, v. 32, n. 1, p. 19-29, 2009.

ABBRACCHIO, M. P.; BOEYNAEMS, J. M.; BARNARD, E. A.; BOYER, J. L.; KENNEDY, C.; MIRAS-PORTUGAL, M. T.; KING, B. F.; GACHET, C.; JACOBSON, K. A.; WEISMAN, G. A.; BURNSTOCK, G. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family[1]. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24, n. 2, p. 52-55, 2003.

ABDO, H.; DERKINDEREN, P.; GOMES, P.; CHEVALIER, J.; AUBERT, P.; MASSON, D.; GALMICHE, J. P.; VANDEN BERGHE, P.; NEUNLIST, M.; LARDEUX, B. Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione. **FASEB J**., v. 24, p. 1082–1094, 2010.

ABDO, H.; MAHE, M. M.; DERKINDEREN, P.; BACH-NGOHOU, K.; NEUNLIST, M.; LARDEUX, B. The omega-6 fatty acid derivative 15-deoxy-δ(1)(2),(1)(4)-prostaglandin J2 is involved in neuroprotection by enteric glial cells against oxidative stress. **J Physiol.,** v. 590, p. 2739–2750, 2012.

ACOSTA, S.; ÖGREN, M.; STERNBY, N.H.; BERGQVIST, D.; BJÖRCK, M. Incidence of acute thrombo-embolic occlusion of the superior mesenteric artery – a population-based study. **Eur J Vasc Endovasc Surg**., v. 27, p.145–150, 2004.

ADAMSON, S. E.;LEITINGER, N. The role of pannexin1 in the induction and resolution of inflammation. **FEBS Lett.,** v. 588 n.8, p. 1416 – 1422, 2014.

AGRAWAL, A.; GARTLAND, A. P2X7 receptors: role in bone cell formation and fuction. **J. Mol. Endocrinol**., v. 54, n.2, p.R75-88, 2015.

ALLOISIO, S.; DI GARBO, A.; BARBIERI, R.; BOZZO, L.; FERRONI, S.; NOBILE, M. Evidence for two conductive pathways in P2X receptor: differences in modulation and selectivity. **J Neurochem**., v. 113, p. 796-806, 2010.

ANTONIOLI, L.; COLUCCI, R.; PELLEGRINI, C.; GIUSTARINI, G.; TUCCORI, M.; BLANDIZZI, C.; FORNAI, M. the role of purinergic pathways in the pathophysiology of gut diseases pharmacological modulation and potential therapeutic aplications. **Pharmacol.,** v. 139, n. 2, p. 157-188, 2013.

ANUP, R.; SUSAMA, P.; BALASUBRAMA, K. A. Role of xanthine oxidase in small bowel mucosal dysfunction after surgical stress. **British Journal of Surgery,** v. 87, p. 1094-1101, 2000.

---

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ARULKUMARAN, N.; UNWIN, R. J.; TAM, F. W. A Potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatmet of inflammatory diseases. Expert Opin Investig Drugs., v. 20, n. 7, p. 897-915, 2011.

AUBE, A. C.; CABARROCAS, J.; BAUER, J.; PHILIPPE, D.; AUBERT, P.; DOULAY, F.; LIBLAU, R.; GALMICHE, J. P.; NEUNLIST, M. Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. **Gut.,** v.55, p. 630–637, 2006.

BALLABENI, V.; BAROCELLI, E.; BERTONI, S.; IMPICCIATORE, M. Alterations of intestinal motor responsiveness in a model of mild mesenteric ischemia/reperfusion in rats. **Life Sci.,** v. 71, p. 2025–2035, 2002.

BAO, L.; LOCOVEI, S.; DAHL, G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP**.FEBS Lett**. v. 572, p. 65–68, 2004.

BARANOVA, A,; IVANOV, D.; PETRASH, N.; PESTOVA, A.; SKOBLOV, M.; KELMANSON, I.; SHAGIN, D.; NAZARENKO, S.; GERAYMOVYCH, E.; LITVIN, O.; TIUNOVA, A.; BORN, T.L.; USMAN, N.;STAROVEROV, D.; LUKYANOV, S.; PANCHIN, Y. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. Genomics., v. 83, p. 706-716, 2004.

BARGIOTAS, P.; KRENZ, A.; HORMUZDI, S. G.; RIDDER, D. A.; HERB, A.; BARAKAT, W.; PENUELA, S.; VON ENGELHARDT, J.; MONYER, H.; SCHWANINGER, M. Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration. Proc **Natl Acad Sci USA**, v. 108, n. 51, p. 20772-20777, 2011.

BARTLETT, R.; STOKES, L.; SLUYTER, R. The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. **Pharmacol Rev.,** v. 66, n.3, p. 638 - 675, 2014.

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.; 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.; 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.

BECKEL, J. M.; ARGALL, A. J.; LIM, J. C.; XIA, J.; LU, W.; COFFEY, E. E.; MACARAK, E. J.; SHAHIDULLAH, M.; DELAMERE, N. A.; ZODE, G. S.; SHEFFIELD, V. C.; SHESTOPALOV, V. I.; LATIES, A. M.; MITCHELL, C. H. Mechanosensitive release of adenosine 5'-triphosphate through pannexin channels and mechanosensitive upregulation of pannexin channels in optic nerve head astrocytes: a mechanism for purinergic involvement in chronic strain. **Glia.**, v. 62, p. 1486–1501, 2014.

BELKIND-GERSON, J.; HOTTA, R.; NAGY, N.; THOMAS, A. R.; GRAHAM, H.; CHENG, L.; SOLORZANO, J.; NGUYEN, D.; KAMIONEK, M.; DIETRICH, J.; CHERAYIL, B. J .; GOLDSTEIN, A. M. Colitis induces enteric neurogenesis through a 5-HT4-dependent mechanism**. Inflamm. Bowel Dis.,** v. 21, p. 870-878, 2015.

BHASKARACHARYA, A.; DAO-UNG, P.; JALILIAN, I.; SPILDREJORDE, M.; SKARRATT, K. K.; FULLER, S. J.; SLUYTER, R.; STOKES, L. probenecid blocks human p2x7 receptor-induced dye uptake via a pannexin-1 independent mechanism. **PLos One.,** v. 9, n. 3, p. E93058, 2014.

BOASSA, D.; AMBROSI, C.; QIU, F.; DAHL, G.; GAIETTA, G.; SOSINSKY, G. Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. **J. Biol. Chem.,** v. 282, p. 31733–31743, 2007.

BOESMANS, W.; CIRILLO, C.; VAN DEN ABBEEL, V.; VAN DEN HAUTE, C.; DEPOORTERE, I.; TACK, J.; VANDEN BERGHE, P. Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells. **Neurogastroenterol. Motil.,** v. 25, n. 2, p. 151-160, 2012.

BOESMANS, W.; LASRADO, R.; VANDEN BERGHE, P.; PACHINIS, V. Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial in the mammalian enteric nervous system. **Glia.** v. 63, p. 229-241, 2014.

BOND, S. R.; NAUS, C. C.; The pannexins: past and present. **Front Physiol**., v. 19, p. 1-25, 2014.

BORZELLECA, J. F.; DEPUKAT, K.; HALLAGAN, J. B. Lifetime toxicity/carcinogenicity studies of FD & C blue No. 1 (brilliant blue FCF) in rats and mice. **Food Chem toxicol.,** v. 28, p. 221-234, 1990.

BOURS M. J., SWENNEN E. L., DI VIRGILIO F., CRONSTEIN B. N., DAGNELIE P. C. Adenosine 5′-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation.**Pharmacol. Ther**., v. 112, p. 358 -404, 2006.

BURNS, A. J.; PACHNIS, V. Development of the enteric nervous system: bringing together cells, signals and genes. **Neurogastroenterol Motil.,** v. 21, p. 100–102, 2009.

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.; KNIGHT, G. E.; Celullar distribution and function of P2 receptor subtypes in different systems. **Int. Rev. Cytol.**, v. 240, p. 31-304, 2004.

BUSH, T. G.; SAVIDGE, T. C.; FREEMAN, T. C.; COX, H. J.; CAMBELL, E. A.; MUCKE, L.; JOHNSON, M. H.; SOFRONIEW, M. V. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. **Cell.**, v. 93, n. 2, p. 189-201, 1998.

CABALLERO-ALOMAR, C.; SANTOS, C.; LOPEZ, D.; METAFILE, M. T.; PUING-PARELLADA, P. sources and implications of basal nitric oxide in spontaneous contractions of guinea pig *Taenia caeci*. **Am J Physiol.,** v. 285, p. 747-753, 2003.

CABARROCAS, J.; SAVIDGE, T. C.; LIBLAU, R. S. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. **Glia**, v. 41, p. 81-93, 2003.

CAGIN, Y. F.; ATAYAN, Y.; SAHIN, N.; PARLAKPINAR, H.; POLAT, A.; VARDI, N.; TAGLUK, M. E.; TANBEK, K.; YILDIZ, A. Beneficial effects of dexpanthenol on mesenteric ischemia and reperfusion injury in experimental rat model. **Free RadicRes.,** v. 50 (3), p. 354-365, 2016.

CALCINA, F.; BAROCELLI, E.; BERTONI, S.; FURUKAWA, O.; KAUNITZ, J.; IMPICCIATORE, M.; STERNINI, C. Effect of N-methyl-d-aspartate receptor blockade on neuronal plasticity and gastrointestinal transit delay induced by ischemia/reperfusion in rats. **Neuroscience.** v. 134, p. 39–49, 2005.

CAMPOLO, M.; DI PAOLA, R.; IMPELLIZZERI, D.; CRUPI, R.; MORITTU, V. M.; PROCOPIO, A.; PERRI, E.; BRITTI, D.; PELI, A.; ESPOSITO, E.; CUZZOCREA, S. Effects of a polyphenol present in olive oil,oleuropein aglycone, in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion injury**. J. of Leukocyte Biology.,** v. 93, n. 2, p. 277-287, 2013.

CARAMELO, C.; ESPINOSA, G.; MANZARBEITIA, F.; CERNADAS, M. R.; PÉREZ TEJERIZO, G.; TAN, D.; MOSQUERA, J. R.; DIGIUNI, E.; MONTÓN, M.; MILLÁS, I.; HERNANDO, L.;CASADO, S.; LÓPEZ-FARRÉ, A**.** Role of endothelium-related mechanisms in the pathophysiology of renal ischemia/reperfusion in normal rabbits. **Circ. Res**., v. 79, n. 5, p. 1031-1038, 1996.

CARPANESE, E.; MORETTO, P.; FILPA, V.; MARCHET, S.; MORO, E.; CREMA, F.; FRIGO, G.; GIARONI, C. Antagonism of ionotropic glutamate receptors attenuates chemical ischemia-induced injury in rat primary cultured myenteric ganglia. **PLos One.,** v. 9, n. 11, p. 113-613, 2014.

CARROLL ,W. A.; KALVIN, D. M.; PEREZ MEDRANO, A.; FLORJANCIC, A. S.; WANG, Y.; DONNELLY-ROBERTS, D. L.; NAMOVIC, M. T.; GRAYSON, G.; HONORÉ, P.; JARVIS, M. F. Novel and potent 3-(2,3-dichlorophenyl)-4-(benzyl)-4H-1,2,4-triazole P2X7 antagonists. **Bioorg. Med. chem. Lett.**, v. 17, n. 14, p. 4044-4048, 2007.

CASTELUCCI, P.; ROBBINS, H. L.; FURNESS, J. B. $P2X_2$ purine receptor immunoreactivity of intraganglionic laminar endings in the mouse gastrointestinal tract. **Cell Tissue Res.,** v. 312, p. 167-174, 2003.

CASTELUCCI, P.; ROBBINS, H. L.; POOLE, D. P.; FURNESS, J. B. The distribution of purine $P2X_2$ receptors in the guinea pig enteric nervous system. **Histochem. Cell Biol.**, v. 117, p. 415-422, 2002a.

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.

CERQUEIRA, N.F.; HUSSNI, C.A.; YOSHIDA, W.B. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. **Acta Cir. Bras.,** v. 20, n. 4, p. 336-343, 2005.

CESARO, A.; BREST, P.; HOFMAN, V.; HEBUTERNE, X.; WILDMAN, S.; FERRUA, B.; MARCHETTI, S.; DOGLIO, A.; VOURET-CRAVIARI, V.; GALLAND, F.; NAQUET,

P.; MOGRABI, B.; UNWIN, R.; HOFMAN, P. Amplification loop of the inflammatory process is induced by P2X7R activation in intestinal epithelial cells in response to neutrophil transepithelial migration. *Am. J. Physiol.* **Gastrointest. Liver Physiol.,** v. 299, p. 32–42, 2010.

CHEKENI, F. B.; ELLIOTT, M. R.; SANDILOS, J. K.; WALK, S. F.; KINCHEN, J. M.; LAZAROWSKI, E. R.; ARMSTRONG, A. J.; PENUELA, S.; LAIRD, D. W.; SALVESEN, G. S.; ISAKSON, B. E.; BAYLISS, D. A.; RAVICHANDRAN, K. S. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. **Nature,** v. 467, n. 7317, p. 863–867, 2010.

CHEN, J.; TERADA, N.; OHNO, N.; SAITOH, S.; SAITOH, Y.; OHNO, S. Immunolocalization of membrane skeletal protein, 4.1G, in enteric glial cells in the mouse large intestine. **Neurosci Lett.,** v. 488, p. 193-198, 2011.

CHIU, Y. H.; RAVICHANDRAN, K. S.; BAYLISS, D. A. Intrinsic properties and regulation of Pannexin 1 channel. **Channels (Austin).**, v. 8, n. 2, p. 1- 7, 2014.

CHRISTOFI, F. L.; ZHANG, H.; YU, J. G.; GUZMAN, J.; XUE, J.; KIM, M.; WANG, Y. Z.; COOKE, H. J. Differential gene expression of adenosine A1,A2a, A2b, and A3 receptors in the human enteric nervous system. **J. Comp. Neurol.,** v. 439, p. 46-64, 2001.

CIRILLO, C.; SARNELLI, G.; TURCO, F.; MANGO, A.; GROSSO, M.; APREA, G.; MASONE, S.; CUOMO, R. Proinflamatory stimuli activates human-derived enteroglial cells and induces autocrine nitric oxide production. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 23, p. 372-382, 2011.

CISNEROS-MEJORADO, A.; GOTTLIEB, M.; CAVALIERE, F.; MAGNUS, T.; KOCH-NOLTE, F.; SCEMES, E.; PÉREZ-SAMARTÍN, A.; MATUTE, C. Blockade of P2X7 receptors or pannexin-1 channels similarly attenuates post ischemia damage. **J Cereb Blood Flow Metab.,** v. 35, n. 5, p. 843-850, 2015.

CLAIREMBAULT, T.; LECLAIR-VISONNEAU, L.; NEUNLIST, M.; DERKINDEREN, P. Enteric glial cells: New players in Parkinson's disease? **Mov. Disorg.,** v. 30, n. 4, p. 494-498, 2014.

CLARKE, L. E.; BARRES, B. A. Glia kepp synapse distribution under wraps. **Cell.**, v. 152, n. 2, p. 267, 2013.

CODDOU. C.; YAN, Z.; OBSIL, T.; HUIDOBRO-TORO, J. P.; STOJILKOVIC, S. S. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. **Pharmacol Rev**.,v. 63, p. 641–683, 2011.

COLLINS, J.; BOROJEVIC, R.; VERDU, E.F.; HUIZINGA, J.D.; RATCLIFFE, E.M. Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. **Neurogastroenterol. Motil.,** v. 26, p. 98-107, 2014.

COLLO, G.; NORTH, R. A.; KAWASHIMA, E.; MERLO-PICH, E.; NEIDHART, S.; BUELL, G. Cloning of $P2X_5$ and $P2X_6$ receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 2495-2507, 1996.

CORNEJO, R.; GATICA, H.; SEGOVIA, E.; CORTES, C. Intestinal necrosis as clinical presentation of takayasu's arteritis: reporto f one case. **Rev. Med. Chil**., v. 130, n. 10, p. 1159-1164, 2002.

CORREIA-DE-SÁ, P.; ADÃES, S.; TIMÓTEO, M.A.; VIEIRA, C.; MAGALHÃES-CARDOSO, T.; NASCIMENTO, C. & DUARTE-ARAÚJO, M. Fine-tuning modulation of myenteric motoneurons by endogenous adenosine: On the role of secreted adenosine deaminase. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical.** v. 126-127, p. 211-224, 2006.

COUTINHO-SILVA, R.; PERSECHINI, P. M.; BISAGGIO, R. D.; PERFETTINI, J. L.; NETO, A. C.; KANELLOPOULOS, J. M.; MOTTA-LY, I.; DAUTRY-VARSAT, A.; OJCIUS, D. M. P2Z/P2X7 receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. C1139-C1147, 1999.

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, n. 2, p. 171-184, 2015.

DAHL, G.; KEANE, R. W. Pannexin: from discovery to bedside in 11±4 years? **Brain Res.,** v.1487, p. 150-159, 2012.

DE CAMPOS, N. E.; MARQUES-DA-SILVA, C.; CORREA, G.; CASTELO-BRANCO, M. T.; DE SOUZA, H. S.; COUTINHO-SILVA, R. Characterizing the presence and sensitivity of the P2X7 receptor in different compartments of the gut. **J. Innate Immun.,** v. 4, p. 529–541, 2012.

DENG ,Y.; GUO, X. L.; YUAN, X.; SHANG, J.; ZHU, D.; LIU, H. G. P2X7 receptor antagonism attenuates the intermittent hypoia-induced spatial deficits in murine model of sleep apnea via inhibiting neuroinflammation and oxidative stress. **Chin Med J Engl.,** v. 128, n. 16, p. 2168-2175, 2015.

D'HONDT, C.; PONSAERTS, R.; DE SMEDT, H.; BULTYNCK, G.; HIMPENS, B. Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions?. **Bioessays.,** v. 31, p. 953–974, 2009.

DI VIRGILIO, F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. **Trends Pharmacol. sci.,** v. 28, n. 9, p. 465-472, 2007.

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. 191-199, 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.

DIEZMOS, E. F.; SANDOW, S. L.; MARKUS, I.; PERERA, D.S.; LUBOWSKI, D. Z.; KING, D. W.; BERTRAND, P. P.; LIU, L. Expression localization of pannexin-1 hemichannels in human colon in health and disease. **Neurogastroenterol Motil.,** v. 25, n. 6, p. 3945-405, 2013.

DIEZMOS, E. F.; SANDOW, S. L.; PERERA, D. S.; KING, D. W.; BERTRAND, P. P.; LIU, L. Pannexin-2 is expressed in the human colon with extensive localization in the enteric nervous system. **Neurogastroenterol Motil.,** v. 27, n. 5, p. 672-683, 2015.

DIEZMOS, E. F.; BERTRAND, P. P.; LIU, L. Purinergic signaling in gut inflammation: The role of connexins and pannexins. **front neurosci.,** v. 10, p. 311, 2016.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annu Rev Immunol.,** v. 27, p. 519-550, 2009.

DINARELLO, C. A. The il-1 family and inflammatory diseases. **Clin Exp Rheumatol.,** v. 20, p. 1-13, 2002.

DOCKENDORF, B. L.; FRAZEE. R. C.; PETERSON, W. G.; MYERS, D. Treatment of acute intestinal ischemia with hyperbaric oxygen. **South Med. J**., v. 86, n. 5, p. 518-520, 1993.

DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. **Microscopy Research and Technique,** Perugia, Italy, v. 60, p. 540-551, 2003.

DONNELLY-ROBERTS, D.; MCGARAUGHTY, S.; SHIEH, C. C.; HONORE, P.; JARVIS, M. F. Painful Purinergic receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 324, n. 2, p. 409-415, 2007.

DUARTE-ARAÚJO, M.; NASCIMENTO, C.; TIMÓTEO, MA.; MAGALHÃES-CARDOSO, MT.; CORREIA-DE-SÁ, P. Relative contribution of ecto-ATPase and ecto-ATPDase pathways to the biphasic effect of ATP on acethylcoline release from myenteric motoneurons, **British Journal of Pharmacol.,** v 156, p. 519-533, 2009.

DULAC, C.; LE DOUARIN, N. M. Phenotypic plasticity of Schwann cells and enteric glial cells in response to the microenvironment. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 6358–6362, 1991.

ENAIDA, H.; HISATOMI, T.; HATA, Y.; UENO, A.; GOTO, Y.; YAMADA, T.; KUBOTA, T.; ISHIBASHI, T. Brilliant blue G selectively stains the internal limiting membrane/brilliant blue G - assited membrane peeling. **Retina.,** v. 26, n. 6, p. 631-636, 2006.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochem., Res.**, v. 25, p. 1439-1451, 2000.

FERRARI, D.; PIZZIRANI, C.; ADINOLFI, E.; LEMOLI R, M.; CURTI, A.; IDZKO, M.; PANTHER, E.; DI VIRGILIO, F. The P2X7 receptor: a Key player in IL-1 processing and release. **J. Immunol.,** v. 176, n. 7, p. 3877-3883, 2006.

FLAMANT, M.; AUBERT, P.; ROLLI-DERKINDEREN, M.; BOURREILLE, A.; NEUNLIST, M. R.; MAHÉ, M. M.; MEURETTE, G.; MARTEYN, B.; SAVIDGE, T.; GALMICHE, J. P.; SANSONETTI, P. J.; NEUNLIST, M. Enteric glia protect against Shigella flexneri invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. **Gut,** v. 60, n. 4, p. 473-483, 2011.

FLETCHER, E. L.; CLARK, M. J.; FURNESS, J. B. Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus. **Cell Tissue Res.,** v. 308, p.339–346, 2002.

FONNUM, F.; JOHNSEN, A.; HASSEL, B. Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. **Glia.,** v. 21, p. 106–113, 1997.

FREDHOLM, B. B.; ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; DUBYAK, G. R.; HARDEN, T. K.; JACOBSON, K. A.; CHWABE, U.; WILLIAMS, M. Towards a revised nomenclature for Pl and P2 receptors. **TiPS**, v. 18, p. 79-82, 1997.

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. 244, p. 53-64, 2008.

FUJIKAWA,Y.; TOMINAGA, K.; TANAKA, F.; TANIGAWA, T.; WATANABE, T.; FUJIWARA, Y.; ARAKAWA, T. Enteric glial cells are associated with stress-induced colonic hyper-contraction in maternally separated rats. **Neurogastroenterol Motil.,** v. 27, n. 7, p. 1010-1023, 2015.

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, 2006.

GABELLA, G. Glial cells in the Myenteric Plexus. **Z. Naturforsch.**, v. 26b, p. 244-245, 1970.

GANNS, D.; SCHRÖDL, F.; NEUHUBER, W.; BREHMER, A. Investigation of general and cytoskeletal markers to estimate numbers and proportions of neurons in human intestine. **Histol. Histopathol.,** v. 21, p. 41-51, 2006.

GARCIA-CRIADO, F. J.; ELENO, N.; SANTOS-BENITO, F.; VALDUNCIEL, J. J.; REVERTE, M.; LOZANO-SÁNCHEZ, F. S.; LUDEÑA, M. D.; GOMEZ-ALONSO, A.; LÓPEZ-NOVOA, J. M. Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. **Transplantation.** v. 66, n. 8, p. 982-990, 1998.

GENG, Y.; LI, J.; WANG, F.; LI, Q.; WANG, X.; SUN, L.; LI, W. Epidermal Growth Factor Promotes Proliferation and Improves Restoration After Intestinal Ischemia–Reperfusion Injury in Rats. **Inflammation**, v. 9, 2013.

GERSHON, M. D. Developmental determinants of the independence and complexity of the enteric nervous system. **Trends Neurosci.,** v. 33, p. 446–456, 2010.

GIARONI, C.; ZANETTI, E.; GIULIANI, D.; OLDRINI, R.; MARCHET, S.; MORO, E.; BORRONI, P.; TRINCHERA, M.; CREMA, F.; LECCHINI, S.; FRIGO, G. Protein kinase C modulates NMDA receptors in the myenteric plexus of the guinea pig ileum during in vitro ischemia and reperfusion. **Neurogastroenterol Motil.,** v. 23, p. 91–103, 2011.

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.

GITTERMAN, D. P.; EVANS, R. J. Properties of P2X and P2Y receptors are dependent on artery diameter in the rat mesenteric bed. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, p. 1561-1568, 2000.

GOMES, P.; CHEVALIER, J.; BOESMANS, W.; ROOSEN, L.; VAN DEN ABBEEL, V.; NEUNLIST, M.; TACK, J.; VANDEN BERGHE, P. ATP-dependent paracrine communication between enteric neurons and glia in a primary cell culture derived fromembryonic mice**. Neurogastroenterol. Motil.,** v. 21, n. 8, p. 862-870, 2009.

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.

GONZALEZ-MARTINEZ, P.; PEREZ-PIÑERA, P.; DÍAZ-ESNAL, B.; VEJA, J. A. S100 proteins in the human peripheral nervous system. **Microscopy Researchand Technique.,** v. 60, p. 633-638, 2003.

GORDON, G. R.; BAIMOUKHAMETOVA, D. V.; HEWITT, S. A.; RAJAPAKSHA, W. R.; FISHER, T. E.; BAINS, J. S. Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. **Nat Neurosci.,** v. 8, p. 1078–1086, 2005.

GRANGER, D. N.; RICHARDSON, P. D.; KVIETYS, P. R.; MORTILLARO, N. A. Intestinal blood flow. **Gastroenterology**, v. 78, n. 4, p. 837-863, 1980.

GREGGIO, F. M.; FONTES, R. B. V.; MAIFRINO, L. B. M.; CASTELUCCI, P.; SOUZA. R. R.; LIBERTI, E. A. Effects of perinatal protein deprivation and recovery on esophageal myenteric plexus. **World J. Gastroenterol.**, v. 16, n. 5, p. 563-570, 2010.

GROOTJANS, J.; LENAERTS, K.; DERIKX, J. P.; MATTHIJSEN, R. A.; DE BRUINE, A. P.; VAN BIJNEN, A. A.; VAN DAM, R. M.; DEJONG, C. H.; BUURMAN, W. A. Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: experiences from a new translational model. **Am J Pathol.,** v. 176, p. 2283–2291, 2010.

GRUBIŠIĆ, V.; GULBRANSEN, B. D. Enteric glia: the most alimentary of all glia. **J Physiol.,** 2016. *in print*

GRUNDMANN, D.; MARKWART, F.; SCHELLER, A.; KIRCHHOFF, F.; SCHÄFER, K. H. Phenotype and distribution pattern of nestin-GFP- expressing cells in murine myenteric plexus. **Cell Tissue Res.,** v. 366, n. 3, p. 573-586, 2016.

GUAN, Z.; OSMOND, D. A.; INSCHO, E.W. Purinoceptors in the kidney. **Exp. Biol. Med. (Maywood).**, v. 232, n. 6, p. 715-726, 2007.

GULBRANSEN, B. D. Enteric glia. (doi: 10.4199/C00113ED1V01Y201407NGL002) Morgan &Claypool Publishers, San Rafael, 2014.

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

GULBRANSEN, B. D.; SHARKEY, K. A. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.** v. 9, n. 11, p. 625-632, 2012.

GULBRANSEN, B. D.; SHARKEY, K. A. Purinergic neuron-to-glia signaling in the enteric nervous system. **Gastroenterology**, v. 136, p. 1349-1358, 2009.

HAGLUND, U.; BERGQVIST, D. Intestinal ischemia - the basics. **Langenbeck's Arch. Surg.**, v. 384, p. 233-238, 1999.

HAGSTRÖM, C.; OLSSON, C. Glial cells revealed by GFAP immunoreactivity in fish gut. **Cell Tissue Res**., v. 341, p. 73-81, 2010.

HARWARD, T. R.; BROOKS, D. L.; FLYNN, T. C.; SEEGER, J. M. Multiple organ dysfunction after mesenteric artery revascularization. **J. Vasc. Surg.,** v. 18, p. 459-467, 1993.

HASSEL, B.; SONNEWALD, U.; UNSGARD, G.; FONNUM, F. NMR spectroscopy of cultured astrocytes: effects of glutamine and the gliotoxin fluorocitrate. **J Neurochem.,** v. 62, p. 2187–2194, 1994.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of opoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HSIEH, H.L.; SCHÄFER, B.W.; WEIGLE,B.; HEIZMANN, C.W. S100 protein translocation in response to extracellular S100 is mediated by receptor for advanced glycation endproducts in human endothelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications,v. 316, p. 949–959, 2004.

HU, H. Z.; GAO, N.; LIN, Z.; GAO, C.; LIU, S.; REN, J.; XIA, Y.; WOOD, J. D. P2X7 receptors in the enteric nervous system of guinea-pig small intestine. **J. Comp. Neurol.**, v. 440, p. 299-310, 2001.

IDZKO, M.; FERRARI, D.; ELTZSCHIG, H. K. Nucleotide signalling during inflammation. **Nature**., v. 509, p. 310–317, 2014.

IKEDA, H.; SUZUKI, Y.; SUZUKI, M.; KOIKE, M.; TAMURA, J.; TONG, J.; NOMURA, M.; ITOH, G. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischemia and ischemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. **Gut**, v. 42, p. 530-537, 1998.

IRIE, K.; MURAKI, T.; FURUKAWA, F.; NOMOTO, T. L-NG-nitro-arginine inhibits nicotine-induced relaxation of isolated rat duodenum. **Eur J Pharmacol.,** v. 202, p. 285–288, 1991.

JARVIS, M. F.; KHAKH, B. S. ATP-gated P2X cation-channels. **Neuropharmacol.**, v. 56, p. 208-215, 2009.

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

JIAN, Z.; DING, S.; DENG, H.; WANG, J.; YI, W.; WANG, L.; ZHU, S.; GU, L.; XIONG, X. Probenecid protects against oxygen-glucose deprivation injury in primary astrocytes by regulating inflammasome activity. **Brain Res.,** v. 1643, p. 123-129, 2016.

JIANG, J. X.; PENUELA, S. Connexin and pannexin channels in cancer. **BMC Cell Biol.,** v.17, p. 1-12, 2016.

JIANG, L. H. Inhibition of P2X7 receptors by divalent cations: old action and new insight. **Eur Biophys J.,** v. 38, p. 339-346, 2009.

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.

JONES B. A.; GORE G. J. physiology and pathology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas and intestine. **Am. J. Pysiol.**, v. 273, p. 1174-1188, 1997.

JOSEPH, N. M.; HE, S.; QUINTANA, E.; KIM, Y. G.; NUNEZ, G.; MORRISON, S. J. Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. **J. Clin. Invest.,** v. 121, p. 3398-3411, 2011.

JSAKSON, B. E.; THOMPSOM, R. J. Pannexin-1 as a pontentiator of ligand-gated receptor signaling. **Channels (austin).,** v. 8, n. 2, p. 118-123, 2014.

KABOURIDIS, P.S.; LASRADO, R.; MCCALLUM, S.; CHNG, S.H.; SNIPPERT, H.J.; CLEVERS, H.; PETTERSSON, S.; PACHNIS, V. Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. **Neuron.,** v. 85, n. 2, p. 289 - 295, 2015.

KANNEGANTI, T. D.; BODY-MALAPEL, M.; AMER, A.; PARK, J. H.; WHITFIELD, J.; FRANCHI, L.; TARAPOREWALA, Z. F.; MILLER, D.; PATTON, J. T.; INOHARA, N.; NÚÑEZ, G. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. **J. Biol. Chem.,** v. 281, p. 36560–36568, 2006.

KAWAMURA, M. Jr.; RUSKIN, D.N.; MASINO, S.A. Metabolic autocrine regulation of neurons involves cooperation among pannexin hemichannels, adenosine receptors, and KATP channels. **J Neurosci.,** v.17;30, n. 11, p. 3886-95, 2010.

KIM, M.; JIANG, L. H.; WILSON, H. L.; NORTH, R. A.; SURPRENANT, A. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. **EMBO J**. v. 20, n. 22, p. 6347-6358, 2001.

KONG, F.; LIU, S.; XU, C.; LIU, J.; LI, G.; L,I G.; GAO, Y.; LIN, H.; TU, G.; PENG, H.; QIU, S.; FAN, B.; ZHU, Q.; YU, S.; ZHENG, C.; LIANG, S. Electrophysiological studies of upregulated P2X7 receptors in rat superior cervical ganglia after myocardial ischemic injury. **Neurochem Int**., v. 63, n. 3, p. 230-237, 2013.

KUHNY, M.; HOCHDORFER, T.; AYATA, C. K.; IDZKO, M.; AND HUBER, M. CD39 is a negative regulator of P2X7-mediated inflammatory cell death in mast cells. ***Cell Commun. Signal.,*** v. 12, p. 40, 2014.

LARANJEIRA, C.; SANDGREN, K.; KESSARIS, N.; RICHARDSON, W.; POTOCNIK, A.; VANDEN BERGHE, P.; PACHNIS, V. Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. **J. Clin. Invest.,** v. 121, p. 3412-3424, 2011.

LE BERRE-SCOUL, C.; CHEVALIER, J.; OLEYNIKOVA, E.; COSSAIS, F.; TALON, S.; NEUNLIST, M.; BOUDIN, H. A novel enteric neuron-glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development. J. Phisiol., 2016.

LE FEUVRE, R.; BROUGH, D.; ROTHWELL, N. Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. **Eur. J. Pharmacol**., v. 447, p. 261-269, 2002.

LENERTZ, L. Y.; GAVALA, M. L.; ZHU, Y.; BERTICS, P. J. Transcriptional control mechanisms associated with the nucleotide receptor P2X7, a critical regulator of immunologic, osteogenic, and neurologic functions. **Immunol Res.,** v. 50, p. 22-38, 2011.

LIN, Z.; GAO, N., HU, Z. H.; LIU, S.; GAO, C.; REN, J.; XIA, J.; PECK, C. O.; WOOD, D. Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. **Neurogastroenterol. Mot.,** v. 14, p. 197-204, 2002.

LINDESTRÖM, L.; EKBLAD, E. Structural and Neuronal Changes in Rat Ileum After Ischemia with Reperfusion. **Dig. Dis. Sci.**, v. 49, p. 1212-1222, 2004.

LIU, K. X.; LI, Y. S.; HUANG, W. Q.; CHEN, S. Q.; WANG, Z. X.; LIU, J. X.; XIA, Z. Immediate postconditioning during reperfusion attenuates intestinal injury. **Intensive Care Med.,** v. 35, p.933–942, 2009.

LOCHSHIN, R. A.; ZACHERI, Z. Caspase-independent cell death. **Curr. Cell Biol.,** v. 14, p. 727-733, 2002.

LOCOVEI, S.; SCEMES, E.; QIU, F.; SPRAY, D. C.; DAHL, G. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. **FEBS Lett.,** v. 581, n. 3, p. 483-488, 2007.

LOCOVEI, S.; WANG, J.; DAHL, G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium.FEBS Lett., v. 580, p. 239–244, 2006.

LOMAX, A. E.; FURNESS, J. B. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon.**Cell Tissue Res.,** v. 302, p. 59-72, 2000.

MACKENZIE, A.; WILSON, H. L.; KISS-TOTH, E.; DOWER, S. K.; NORTH, R. A.; SURPRENANT, A. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. **Immunity.**, v.15, p. 825-835, 2001.

MacVicar, B. A.; THOMPSON, R. J. Non-junction functions of pannexin-1 channels. **Trends Neurosci.,** v. 33, p. 93–102, 2010.

MAKARENKOVA, H. P.; SHESTOPALOV, V. I. The role of pannexin hemichannels in inflammation and regeneration. **Front Physiol.,** v. 25, p. 1- 8, 2014.

MALLICK, I.H.; YANG, W.; WINSLET, M.C.; SEIFALIAN, A. M. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. **Dig Dis Sci.,** v. 49, p.1359–1377, 2004.

MARCILLO, A.; FRYDEL, B.; BRAMLETT, H. M.; DIETRICH, W. D. A reassessment of P2X7 receptor inhibition as a neuroprotective strategy in rat models of contusion injury. **Exp. Neurol.,** v. 233, p. 687-692, 2012.

MARETTA, M.; TÓTH, S.; BUJDOS, M.; TÓTH, S. JR; JONECOVÁ, Z.; VESELA, J. Alterations of epithelial layer after ischemic preconditioning of small intestine in rats. **J. Mol. Hist.,** v. 43, n. 2, p. 171-178, 2012.

MARIATHASAN, S.; WEISS, D. S.; NEWTON, K.; MCBRIDE, J.; O'ROURKE, K.; ROOSE-GIRMA, M.; LEE, W. P.; WEINRAUCH, Y.; MONACK, D. M.; DIXIT, V. M. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature,** v. 440, p. 228–232, 2006.

MAROSTI, A. R.; DA SILVA, M. V.; PALOMBIT, K.; MENDES, C. E.; TAVARES DA SILVA, W.; CASTELUCCI, P. Differential effects of intestinal ischemia and reperfusion in rat enteric neurons and glial cells expressing P2X2 receptors. **Histology and Histopathol.**, v. 30, n. 4, p. 489-501, 2015.

MARTEU, F.; LE POUL, E.; COMMUNI, D.; LABOURET, C.; SAVI, P.; BOEYNAEMS, J. M.; GONZALEZ, N. S. Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor. **Mol. Pharmacol.,** v. 64, n. 1, p. 104-112, 2003.

MASSBERG, S.; MESSMER, K. The nature of ischemia/reperfusion injury. **Transplant. Proc.**, v. 30, p. 4217-4223, 1998.

MATSUO, S.; YANG, W. L.; AZIZ, M.; JACOB, A.; WANG, P. Cyclic arginine-glycin-espartate attenuates acute lung injury in mice after intestinal ischemia/reperfusion.**Crit. Care**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2013.

MAYO, C.; REN, R.; RICH, C.; STEPP, M. A.; TRINKAUS-RANDALL, V. Regulation by P2X7: epithelial migration and stromal organization in the cornea.**Invest. Ophthalmol. vis. Sci.,** v. 49, n. 10, p. 4384-4391, 2008.

MEHTA, N.; KAUR, M.; SINGH, M.; CHAND, S.; VYAS, B.; SILAKARI, P.; BAHIA, M.S.; SILAKARI, O. Purinergic receptor $P2X_7$: a novel target for anti-inflammatory therapy.**Bioorg. Med. Chrm**., v. 22, p. 54-88, 2014.

MENDES, C.E. **Estudo das células gliais entéricas imunorreativas aos receptores $P2X_2$ e $P2X_7$ do íleo de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal.** 2013. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MENDES, C.E.; PALOMBIT, K.; VIEIRA, C.; SILVA, I.; CORREIA-DE-SÁ, P.; CASTELUCCI, P. The Effect of Ischemia and Reperfusion on Enteric Glial Cells and Contractile Activity in the Ileum.Dig Dis Sci. v. 60, n. 9, p. 2677-2689, 2015.

MISAWA, R.; GIROTTI, P. A.; MIZUNO, M. S.; LIBERTI, E. A.; CASTELUCCI, P. Effects of protein deprivation and re-feeding on $P2X_2$ receptors in enteric neurons. **World J. of Gastroenterol.**, 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. of Gastroenterol.,** v. 18, n. 34, 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 J. of Gastroenterol.,** v. 20, n. 38, p. 13911 - 13919, 2014.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev.,** v. 43, p.109–142, 1991.

MYTHEN, M. G**.** Postoperative gastrointestinal tract dysfunction. **Anesth Analg.,** v. 100, n. 1, p. 196-204, 2005.

NABORS, L. B.; FURNEAUX, H. M.; KING, P. H. HuR, a novel target of anti-Hu antibodies, is expressed in non-neural tissues. **J. Neuroimmunol.**, v. 92, p. 152-159, 1998.

NAGAHAMA, M.; SEMBA, R.; TSUZUKI, M.; AOKI, E . L-Arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. **Biol Signals Recept.,** v. 10, p. 336–340, 2001.

NASSER, Y.; HO, W.; SHARKEY, K. A. Distribution of adrenergic receptors in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse, and rat. **J Comp Neurol.,** v. 495, n. 5, p. 529-553, 2006.

NASSER, Y.; FERNANDEZ, E.; KEENAN, C.M.; HO, W.; OLAND, L. D.; TIBBLES, L. A.; SCHEMANN, M.; MACNAUGHTON, W. K.; RÜHL, A.; SHARKEY, K. A. Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 291, n. 5, p.912-27, 2007.

NEUNLIST, M.; ROLLI-DERKINDEREN, M.; LATORRE, R.; VAN LANDEGHEM, L.; CRON, E.; DERKINDEREN, P.; DE GIORGIO, R. Enteric glial cells recent developments and future directions. **Gastroenterology,** v. 147, n. 6, p. 1230-1237, 2014.

NORTH, R. A.; SURPRENANT, A. Pharmacology of cloned P2X receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 40, p. 563-580, 2000.

NORTH, R.A.; VERKHRATSKY A. Purinergic transmission in the central nervous system.**Pflugers Arch.,** v. 452, n. 5, p. 479-85, 2006.

NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiol Rev.,** v. 82, n. 4, p. 1013 - 1067, 2002.

NOTOMI ,S.; HISATOMI, T.; KANEMARU, T.; TAKEDA, A.; IKEDA, Y.; ENAIDA, H.; KROEMER, G.; ISHIBASHI, T. Critical Involvement of Extracellular ATP Acting on P2RX7 Purinergic Receptors in Photoreceptor Cell Death. **Am J Pathol.,** v. 179, n. 6, p. 2798-2809, 2011.

OLDENBURG, A.; LAU, L. L.; RODENBERG, T. J.; EDMONDS, H. J.; BURGER, C. D. Acut mesenteric ischemia. A clinical review. **Arc. Inter. Med.**, v. 164, p. 1054-1061, 2004.

OLIVEIRA, C. O.; IKUTA, N.; REGNER, A. Biomarcadores prognósticos no traumatismo crânio-encefálico grave. **Rev. Bras. de Terap. Inten.,** Canoas, RS, Brasil, v. 20, n. 4, p. 134-139, 2008.

OMARA, F.; SISODIA, C. S**.** Evaluation of potential antidotes for sodium fluoroacetate in mice. **Vet Hum Toxicol**., v. 32, p. 427–431, 1990

OTSUKI, Y.; LI, Z.; SHIBATA, M. Apoptotic detection methods-from morphology to gene. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 38, n. 3, p. 275-340, 2003.

PALOMBIT, K. **Papel do antagonista Brilliant Blue G sobre os neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X7 do íleo de ratos submetidos à isquemia/reperfusão intestinal.** 2014. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PALOMBIT, K.; MENDES, C. E.; TAVARES DE LIMA, W.; CASTELUCCI, P. Effects of ischemia and reperfusion on subpopulations of rat enteric neurons expressing the $P2X_7$ receptor. **Digestive Diseases and Sciences**, 2013. v.58, p. 3429-3439, 2013.

PANCHIN, Y.; KELMANSON, I.; MATZ, M.; LUKYANOV, K.; USMAN, N.; LUKYANOV, S. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. **Curr Biol.,** v. 10, n. 13, p. R473-4, 2000.

PACHIN, Y. V. Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative. **J Exp Biol.,** v. 208, n. 8, p. 1415 - 1419, 2005.

PARVATHENANI, L. K.; TERTYSHNIKOVA, S.; GRECO, C. R.; ROBERTS, S. B.; ROBERTSON, B.; POSMANTUR, R. P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of alzheimer's disease. **J Biol Chem.,** v.278, p. 13309-13317, 2003.

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.

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.

PELEGRIN, P.; SURPRENANT, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the atp-gated p2x7 receptor. **Embo J.,** v. 25, n. 21, p. 5071-5082, 2006.

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.

PENUELA, S.; BHALLA, R.; GONG, X. Q.; COWAN, K. N.; CELETTI, S. J.; COWAN, B. J.; BAI, D.; SHAO, Q.; LAIRD, D. W. Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. **J Cell Sci.,** v. 120, n. 21, p. 3772–3783, 2007.

PENUELA, S.; BHALLA, R.; NAG, K.; LAIRD, D.W. Glycosylation regulates pannexin intermixing and cellular localization. **Mol Biol Cell.,** v. 20, n. 20, p.4313–23, 2009.

PENUELA, S.; GEHI, R.; LAIRD, D. W. The Biochemistry and function of pannexin channels. **Biochim. Biophys. Acta**., v. 1828, n. 1, p. 15-22, 2013.

PHILLIPS, R. J.; HARGRAVE, S. L.; RHODES, B. S.; ZOPF, D. A.; POWLEY, T. L. Quantification of neurons in the myenteric plexus: an evaluation of putative pan-neuronal markers. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 133, p. 99–107, 2004.

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.

POORNIMA, V.; MADHUPRIYA, M.; KOOTAR, S.; SUJATHA, G.; KUMAR, A.; BERA, A. K. P2X7 receptor- pannexin 1 hemichannel association: effect of extracellular calcium on membrane permeabilization. J Mol Neurosci., v. 46, n. 3, p. 585-594, 2012.

PROCHNOW, N.; ABDULAZIM, A.; KURTENBACH, S.; WILDFÖRSTER, V.; DVORIANTCHIKOVA, G.; HANSKE, J.; PETRASCH-PARWEZ, E.; SHESTOPALV, V. I.;DERMIETZEL, R.; MANAHAN-VAUGHAN, D.; ZOIDL, G. Pannexin1 stabilizes synaptic plasticity and is needed for learning. **PLoS ONE**, v. 7, p. 51767, 2012.

PROSKURYAKOV, S. Y. A.; KONOPLYANNIKOV, A. G.; GABAI, V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Exper. Cell Res.**, v. 283, p. 1-16, 2003.

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. 147-161, 2008.

RAGY, M.; ELBASSUONI, E. The role of nitric oxide and L-type calcium channel blocker in the contractility of rabbit ileum in vitro. **J Physiol Biochem.,** v. 68, n. 4, p. 521-528, 2012.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, p. 413-492, 1998.

RAO, M.; NELMS, B. D.; DONG, L.; SALINAS-RIOS, V.; RUTLIN, M.; GERSHON, M. D.; CORFAS, G. Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. **Glia,** v. 63, p. 2040–2057, 2015.

RAO, K. M.; PORTER, D. W.; MEIGHAN, T.; CASTRANOVA, V. The sources of inflammatory mediators in the lung after silica exposure. **Environ Health Perspect.** v. 112, n. 17, p. 1679-1686, 2004.

RATHBONE, M. P.; MIDDLEMISS, P. J.; GYSBERS, J. W.; ANDREW, C.; HERMAN, M. A. R.; REED, J. K.; CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Neurobiology,** v. 59, p. 663-690, 1999.

REMY, M.; et al. An in vivo evaluation of Brilliant Blue G in animals and humans. **Br. J. Ophtalmol.,** 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 Biol.**, v. 17, p. 1208-1212, 1963.

RIBEIRO, M. E.; YOSHIDA, W. B. Reperfusion injury after intestinal ischemia: pathophysiology and experimental models. **J. Vasc. Br.**, v. 4, n. 2, p. 183-194, 2005.

RIVERA, L. R.; PONTELL, L.; CHO, H. J.; CASTELUCCI, P.; THACKER, M.; POOLE, D. P.; FRUGIER, T.; FURNESS, J. B. Knock out of neuronal nitric oxide synthase exacerbates intestinal ischemia/reperfusion injury in mice. **Cell and Tissue Research,** v. 349, p. 565-576, 2012.

RIVERA, L. R.; THACKER, M.; PONTELL, L.; CHO, H. J.; FURNESS, J. B. Deleterious effects of intestinal ischemia/reperfusion injury in the mouse enteric nervous system are associated with protein nitrosylation. **Cell Tissue Res.,** v. 344, p.111–123, 2011.

RIVERA, L. R.; THACKER, M.; CASTELUCCI, P.; BRON, R.; FURNESS, J. B. The reactions of specific neuron types to intestinal ischemia in the guinea-pig enteric nervous. **Acta Neuropathol.**, v. 118, p. 261-270, 2009.

RODRIGUES, D. M.; LI, A. Y.; NAIR, D. G.; BLENNERHASSETT, M. G. Glial cell line-derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 23, p. 44-56, 2011.

ROGER, S.; GILLET, L.; BAROJA-MAZO, A.; SURPRENANT, A.; PELEGRIN, P. C-terminal calmodulin-binding motif differentially controls human and rat P2X7 receptor current facilitation. **J Biol Chem.,** v. 285, p.17514-17524, 2010.

ROMANOV, R. A.; ROGACHEVSKAIA, O. A.; KOLESNIKOVA, A. S.; KHOKHLOV, A. A.; KOLESNIKOV, S. S. Permeability of pannexin 1 channels to large anions. **Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova.** v. 12, p. 1578 – 1586, 2012.

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

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

RYOO, S. B.; OH, H. K.; MOON, S. H.; CHOE, E. K.; YU, S. A.; PARK, S. H.; PARK, K. J. Electrophysiological and Mechanical Characteristics in Human Ileal Motility: Recordings of Slow Waves Conductions and Contractions, In vitro. **Korean J Physiol Pharmacol.,** v. 6, p. 533-542, 2015.

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. 379–392, 1992.

SANTOS, C. H. M.; PONTES, J. C. D. V.; GOMES, O. M. Terapêutica medicamentosa na isquemia e reperfusão mesentérica: revisão da literatura. **Rev. Bras. Coloproct.,** v. 26, n. 1, p. 28-33, 2006.

SAROSI, G. A.; BARNHART, D. C.; TURNER, D. J.; MULHOLLAND, M. W. Capacitative Ca^{2+} entry in enteric glia induced by thapsigargin and extracellular ATP. **Am J Physiol.,** v. 275, p. 550–555, 1998.

SASAKI, M.; JOH, T. Oxidative stress and ischemia–reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents. **J Clin Biochem Nutr**., v. 40, p. 1-12, 2007.

SAVIDGE, T. C. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. **Gastroenterol.**, v. 132, p. 1344-1358, 2007.

SCARABELLI, T. M.; PASINI, E.; STEPHANOU, A.; COMINI, L.; CURELLO, S.; RADDINO, R.; FERRARI, R.; KNIGHT, R.; LATCHMAN, D. S. Urocortin promotes hemodynamic and bioenergetic recovery and improves cell survival in the isolated rat heart exposed to ischemia/reperfusion. **J Am Coll Cardiol.,** v. 40, n. 1, p. 155 -161, 2002.

SCHULZE-LOHOFF, E.; HUGO, C.; ROST, S.; ARNOLD, S. GRUBER, A; BRUNE, B.; STERZEL, R. B. Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X$_7$ receptors. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. F962-F971, 1998.

SHESTOPALOV, V. I.; SLEPAK, V. Z. Molecular pathways of pannexin1-mediated neurotoxicity. **Front. Physiol.,** v. 11, p. 5-23, 2014.

SHOJI, K. F.; SAEZ, P. J.; HARCHA, P. A.; AGUILA, H. L.; AND SAEZ, J. C. Pannexin1 channels act downstream of P2X 7 receptors in ATP-induced murine T-cell death. **Channels.,** v. 8, p. 142–156, 2014.

SILVERMAN, W. R.; DE RIVERO VACCARI, J. P.; LOCOVEI, S.; QIU, F.; CARLSSON, S. K.; SCEMES, E.; KEANE, R. W.; DAHL, G. The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. **J Biol Chem.**, v. 284, n. 27, p.18143-18151, 2009.

SILVERMAN, W.; LOCOVEI, S.; DAHL, G. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 chanels. **Am J Physiol Cell Physiol.,** v. 295, n. 3, p. 761-767, 2008.

SIMMY, T.; ANUP, R.; PRABHU, R.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Effect of surgical manipulation of the rat instestine on enterocyte populations. **Surgery**, v. 130, n. 3, p. 479-488, 2001.

SISU, A. M.; PETRESCU, C. I.; CEBZAN, C. C.; NICULESCU, M. C.; NICULESCU, V.; MATUSZ, P. L.; RUSU, M. C. Enteric nervous system development in cavitary viscera allocated to the celiac plexus. **Romanian Journal of Morphology and Embryol.,** v. 49, n. 1, p. 63-67, 2008.

SKAPER, S.D.; FACCI, L.; GIUSTI, P. Mast cells, glia and neuroinflammation: partners in crime? **Immunol.**. v. 141, p. 314-327, 2014.

SLONE, E. A.; FLEMING, S. D. Membrane lipid interactions in intestinal ischemia/reperfusion-induced Injury. **Clin Immunol**., v. 153, n. 1, p. 228-240, 2014.

SONG, Z. M.; COSTA, M.; BROOKES, S. J. H. Projections of submucous neurons to the myenteric plexus in the guinea pig small intestine**. J. Comp. Neurol.,** v. 399, p. 255-268, 1998.

SOOYEON, J. O.; BRUCE, P. B. Inhibition of Neuronal Voltage-Gated Sodium Channels by Brilliant Blue G. **Mol Pharmacol.,** v. 80, n. 2, p. 247-257, 2011.

SOYDAN, G.; SÖKMENSÜER, C.; KILINÇ, K.; TUNCER, M. The effects of sildenafil on the functional and structural changes of ileum induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. **European Journal of Pharmacology,** v. 610, p. 87-92, 2009.

SPERLÁGH, B.; KOFALVI, A.; DEUCHARS, J. Involvement of $P2X_7$ receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. **J. Neurochem.**, v. 81, p. 1196-1211, 2002.

SPERLÁGH, B.; ILLES, P. P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. **Trends Pharmacol Sci.,** v. 35, n. 10, p.537-547, 20014.

SPERLÁGH, B.; VIZI, E. S.; WIRKNER, K.; ILLES, P. $P2X_7$ receptors in the nervous system. **Prog. Neurobiology**, v. 78, p. 327-346, 2006.

STAGG, J.; SMYTH, M. J. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. **Oncog.**, v. 29, n. 39, p. 5346-5358, 2010.

STENKAMP-STRAHM, C.; PATTERSON, S.; BOREN. J.; GERICKE, M.; BALEMBA, O. High-fat diet and age-dependent effects on enteric glial cell populations of mouse small intestine. **Auton Neurosci.** v. 177, n.2, p. 199-210, 2013.

STOKES, L.; JIANG, L. H.; ALCARAZ, L.; BENT, J.; BOWERS, K.; FAGURA, M.; FURBER, M.; MORTIMORE, M.; LAWSON, M.; THEAKER, J.; LAURENT C.; BRADDOCK, M.; SURPRENANT, A. Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X(7) receptors, AZ11645373. **Br J Pharmacol.,** v. 149, n. 7, p. 880-887, 2006.

SURPRENANT, A.; NORTH, R. A. Signaling at purinergic P2X receptors. **Annu Rev Physiol.,** v. 71, p. 333–359, 2009.

SWANSON, R. A.; GRAHAM, S. H. Fluorocitrate and fluoroacetate effects on astrocyte metabolism in vitro. **Brain Res**., v. 664, p.94–100, 1994.

TAKEYOSHI, I.; ZHANG, S.; NAKAMURA, K.; IKOMA, A.; ZHU, Y.; STARZL, T.E.; T ODO, S. Effect of ischemia on the canine large bowel: a comparison with the small intestine. **J Surg Res.,** v.62, p.41, 1996.

TAN, L. L.; BORNSTEIN, J. C.; ANDERSON, C. R. The neurochemistry and innervations patterns of extrinsic sensory and sympathetic nerves in the myenteric plexus of the C57BL6 mouse jejunum. **Neurosc.,** v. 166, p. 564-579, 2010.

THACKER, M.; RIVERA, L. R.; CHO, H. J.; FURNESS, J. B.; The relationship between glial distortion and neuronal changes following instestinal ischemia and reperfusion. **Neurogastroenterol. Motil**., v. 1, p. 1-10, 2011.

TODA, N.; BABA, H.; OKAMURA, T. Role of nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic nerve mediated relaxation in dog duodenal longitudinal muscle strips. **Jpn J Pharmacol.,** v. 53, p. 281–284, 1990.

UESAKA, T.; NAGASHIMADA, M.; ENOMOTO, H. Neuronal differentiation in schwann cell lineage underlies postnatal neurogenesis in the enteric nervous system. **J. Neurosci.,** v. 35, p. 9879-9888, 2015.

VAN CROMBRUGGEN, K.; VAN NASSAUW, L.; TIMMERMANS, J. P.; LEFEBVRE, R. A. Inhibitory purinergic P2 receptor characterisation in rat distal colon. **Neuropharmacol.,** v. 53, p. 257-271, 2007.

VANDERWINDEN, J. M.; TIMMERMANS, J. P.; SCHIFFMANN, S. N. Glial cells, but not interstitial cells,express $P2X_7$, an ionotropic purinergic receptor, in rat gastrointestinal musculature. **Cell Tissue Res**., v. 312, p. 149-154, 2003.

VELASQUEZ, S.; EUGENIN, E. A. Role of Pannexin-1 hemichannels and purinergic receptors in the pathogenesis of human diseases. **Front Physiol.,** v. 14, p. 5 - 96, 2014.

VERKHRATSKY A.; BUTT A.M. **Glial Neurobiology,** John Wiley & Sons; Chichester, UK, 2007, 214 p.

VERKHRATSKY, A., O. A. KRISHTAL. Purinoceptors on neuroglia. **Mol Neurobiol.,** v. 39, n. 3, p. 190-208, 2009.

VIAL, C.; ROBERTS, J. A.; EVANS, R. J. Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. **Trends Pharmacol Sci.,** v. 25, n. 9, p. 487 - 493, 2004.

VIRGINIO, C.; CHURCH, D.; NORTH, R. A.; SURPRENANT, A. Effects of Divalent Cations, Protons and Calmidazolium at the Rat P2X7 Receptor. **Neuropharmacol.,** v.36, p. 1285-1294, 1997.

VOLLMAR, B.; MENGER, M. D. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. **Langenbecks Arch Surg.**, v. 396, p. 13-29, 2011.

VOLONTÉ, C.; D'AMBROSI, N. Membrane compartments and purinergic signalling: the purione, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. **FEBS Journ**., v. 33, p. 265-271, 2009.

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

VON BAHTEN, L. C.; MANTOVANI, M.; NICOLUZZI, J. E. L.; SILVEIRA, F.; VON BAHTEN, A. C. Heat loss caused by bowel exposition to room temperature in rats. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 33, p. 265-271, 2006.

VON BOYEN, G. B.; STEINKAMP, M.; REINSHAGEN, M.; SCHAFER, K. H.; ADLER, G.; KIRSCH, J. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. **Gut,** v. 53, p. 222-228, 2004.

VON BOYEN, G.; STEINKAMP, M. The role of enteric glia in gut inflammation. **Neuron glia biol.**, v. 6, n. 4, p. 231-236, 2011.

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.

WANG, J.; LIU, S.; NIE, Y.; WU, B.; WU, Q.; SONG, M.; TANG, M.; XIAO, L.; XU, P.; TAN, X.; ZHANG, L.; LI, G.; LIANG, S.; ZHANG, C. Activation of P2X7 receptors decreases the proliferation of murine luteal cells. **Reprod. Fertil. Dev.** v. 27, n.8, p. 1268-1271, 2015.

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.

WEI, R.; WANG, J.; XU, Y.; YIN, B.; HE, F.; DU, Y.; PENG, G.; LUO, B. Probenecid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting lysosonal and inflammatory damage in rats. **Neuroscience**. v. 301, p. 168-177, 2015.

WILLOUGHBY, J. O.; MACKENZIE, L.; BROBERG, M.; THOREN, A. E.; MEDVEDEV, A.; SIMS, N. R.; NILSSON, M. Fluorocitrate-mediated astroglial dysfunction causes seizures. **J Neurosci Res.,** v.74, p.160–166, 2003.

XIA, J.; LIM, J. C.; LU, W.; BECKEL, J. M.; MACARAK, E. J.; LATIES, A. M.; MITCHELL, C. H. Neurons respond directly to mechanical deformation with pannexin-mediated ATP release and autostimulation of P2X7 receptors. **J. Physiol**.,v. 590, n. 10, p. 2285–2304, 2012.

XIONG, X. X.; GU, L. J.; SHEN, J.; KANG, X. H.; ZHENG, Y. Y.; YUE, S. B.; ZHU,S.M.Probenecid protects against transient focal cerebral ischemic injury by inhibiting H MGB1 release and attenuatingAQP4 expression in mice. **Neurochem Res.,** v. 39, n. 1, p.216 - 224, 2014.

XU, X.; LI, D.; GAO, H.; GAO, Y.; ZHANG, L.; DU, Y.; WU, J.; GAO, P. Protective effect of the traditional Chinese medicine xuesaitong on intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. **Int J clin Exp Med.,** v. 8, n. 2, p. 1768-1779, 2015.

YAN, Z.; KHADRA, A.; SHERMAN, A.; STOJILKOVIC, S. S.; Calcium-dependent block of P2X7 receptor channel function is allosteric. **J Gen Physiol.,** v.138, p. 437-452, 2011.

YANG, D.; HE, Y.;, MUÑOZ-PLANILLO, R.;LIU, Q.; NÚÑEZ, G. Caspase-11 requires the pannexin-1 channel and the purinergic P2X7 pore to mediate pyroptosis and endotoxic shock. **Immunity.,** v. 43, n. 7, p. 923-932, 2015.

YASUHARA H. Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. **Surg Today.,** v. 35, p.185–195, 2005.

YU, Q.; GUO, Z.; LIU, X.; OUYANG, Q.; HE, C.; BURNSTOCK, G.; YUAN, H,; XIANG, Z. Block of P2X7 receptors could partly reverse the delayed neuronal death in area CA1 of the hippocampus after transient global cerebral ischemia. **Purinergic Signal.,** v. 9, n. 4, p. 633-675, 2013.