KELLY PALOMBIT

**PAPEL DO ANTAGONISTA *BRILLIANT BLUE G* SOBRE OS
NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS IMUNORREATIVOS AO RECEPTOR
P2X7 DO ÍLEO DE RATOS SUBMETIDOS À
ISQUEMIA/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
2014

KELLY PALOMBIT

**PAPEL DO ANTAGONISTA *BRILLIANT BLUE G* SOBRE OS
NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS IMUNORREATIVOS AO RECEPTOR
P2X7 DO ÍLEO DE RATOS SUBMETIDOS À
ISQUEMIA/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 original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Palombit, Kelly.

Papel do antagonista *Brilliant Blue G* sobre os neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X7 do íleo de ratos submetidos à isquemia/reperfusão intestinal / Kelly Palombit. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Patricia Castelucci.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Análise morfofuncional do sistema nervoso entérico.

Versão do título para o inglês: Role of the *Brilliant Blue G* antagonist on the myenteric neurons immunoreactive for the P2X7 receptor of the ileum rats following the intestinal ischemia and reperfusion.

1. *Brilliant Blue G* 2. Isquemia intestinal 3. Motilidade 4. Receptor P2X7 5. Reperfusão 6. Sistema nervoso entérico I. Castelucci, Prof. Dr. Patricia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB099/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Kelly Palombit.

Título da Tese: Papel do antagonista *Brilliant Blue G* sobre os neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X7 do íleo de ratos submetidos à isquemia/reperfusão intestinal.

Orientador(a): Profa. Dra. 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,

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

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

“Dedico este trabalho a todas as pessoas que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à *Deus* por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais, *Helena Teresinha* e *Antonio Palombit*, que me deram não somente a vida, mas principalmente a minha educação e condições de estudo. Aos meus irmãos, *Adriano* e *Mauricio*, por sempre torcerem por mim.

À minha Vovó e ao meu Vovô, *Herta* e *João Ricardo Sirtuli*, agradeço todo o amor, carinho e compreensão. E agradeço a toda minha *Família*, que sempre me apoiou em todos os momentos da minha vida. Meu *Tudo!*

Agradeço à minha Orientadora Profa. Dra. *Patricia Castelucci*, por sua paciência nesses sete anos de laboratório, pela oportunidade oferecida, pela orientação, confiança e pela amizade.

Às Minhas Colegas de Laboratório, *Bárbara Tavares Schäfer*, *Mariana Póvoa Silveira* e *Maria Brito* agradeço pela nossa amizade, companheirismo e ajuda, fatores muito importantes na realização desta Tese e que me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação. Também uma referência especial à amiga *Cristina Eusébio Mendes*, minha “dupla”, pela enorme amizade que criamos. Agradeço-lhe os bons momentos vividos, a ajuda e os estímulos nos momentos de desânimo.

Em especial aos amigos *Cristiane C. C. Vilela*, *Cristina Freire*, *Fernando A. Vale*, *Simone C. Motta*, *Márcia Sanae Mizuno*, *Marcos V. da Silva* e *Marília Bianca Teixeira*, agradeço pelo convívio e pela amizade compartilhada todo esse tempo.

À minha “2ª família” *Daniela S. Carvalho*, *Laurizi Schmidt* e *Gustavo S. Carvalho*, que sempre torceram por mim e me incentivaram. E tenho certeza que continuarão me incentivando. Daqui até a eternidade...

Aos amigos da Academia Espaço Aberto, *Leandro Buffoni Roque*, *Pricila Barbosa*, *Rodrigo Emming* e *Zaine Oliveira*, agradeço pelos bons momentos, não acadêmicos, mas fundamentais nessa fase. Ao *Carlos Augusto Ribeiro*, um agradecimento especial pelo apoio, amizade e pela transmissão de confiança e força em todos os momentos.

Ao Professor *Newton Sabino Canteras*, chefe do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Aos Professores *Fabíola Taufic Mônica Iglesias, Jackson Cioni Bittencourt e Maria Luíza Morais Barreto de Chaves*, meus agradecimentos pelo auxílio na pesquisa.

À Banca da qualificação, Profa. Dra. *Laura Beatriz Mesiano Maifrino*, Prof. Dr. *Romeu Rodrigues de Souza* e Prof. Dr. *Isei Watanabe*, pelas valiosas sugestões.

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

Aos colegas *Ana Paula Takano, Ana Paula Tiemi, Caroline A. Lino, Cristina Fürstenau, Ivson Silva e Marina Fevereiro* do Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional, pela contribuição fundamental na técnica de western blotting e pela amizade.

À *Joelcimar Martins da Silva (Jô)*, agradeço pela amizade e pela sua disponibilidade e auxílios prestados ao longo destes anos.

Aos Colegas e Amigos da Pós-Graduação por todas as experiências vividas e compartilhadas durante todos esses anos.

Aos colegas do bloco didático da Anatomia *Carlos R. C. Pedro, Devair U. Alves, Edson D. da Silva, Everton L. P. Torres, Giovaldo S. C., José Adão Mendes, Milton P. da Silva*, muito obrigada pela prestatividade, aprendizado e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, *Celso Dias Pereira e Lucianna Vicente da Silva*, aos secretários *Cláudio R. C. Júnior, Cristiane V. Pinheiro, Luciana M. Silva, Patricia R. de Campos e Reginaldo Souza* e aos funcionários do Biotério, *Alessandro Rodrigo Martins, Fábio França Luiz, Renivaldo de Souza*.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia: *Kelly Patricia Ery Borges, Marta Maria da Silva Righetti, Sebastião Aparecido Boleta e Sônia Regina Yokomizo*, muito obrigada pela ajuda prestada nesses anos.

À querida *Rosana D. Prisco* pelas análises estatísticas, sugestões, e empenho na busca de resultados.

Ao Sr. *Roberto Cabado* do microscópio Confocal de varredura a Laser, muito obrigada pelo trabalho.

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 apoio e financiamento concedidos

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização dessa Tese de Doutorado.

Muito obrigada a todos!

“Quem nunca errou nunca experimentou nada novo”.

Albert Einstein

RESUMO

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.

No trato digestório a isquemia/reperfusão (I/R) acarreta alterações morfológicas nos neurônios entéricos e, estes em resposta à lesão liberam ATP no espaço extracelular, ativando o receptor P2X7. Estudos têm mostrado que lesões podem ser atenuadas pelo antagonista deste receptor, o *Brilliant Blue G* (BBG). Neste trabalho foi analisado os efeitos do BBG sobre os neurônios mioentéricos imunorreativos (ir) ao receptor P2X7 no íleo de ratos submetidos à I/R. A isquemia intestinal foi obtida pela obstrução do fluxo sanguíneo dos vasos ileais no período de 45 minutos, seguida pelos períodos de reperfusão de 0 hora (h), 24 h e 14 dias. Foi utilizado o BBG nos grupos I/R 24 h e I/R 14 dias nas dosagens de 50 e 100 mg/Kg. O grupo I/R 0 h é o grupo sem reperfusão. A densidade e a morfologia dos neurônios mioentéricos foram analisadas através da técnica de imunofluorescência. Também foi analisada a expressão proteica do receptor P2X7 através do western blotting, a marcação de neutrófilos pela histoquímica da mieloperoxidase (MPO), a integridade da parede intestinal pela técnica de histologia e a motilidade intestinal. Os resultados demonstraram que houve 100% de dupla marcação do receptor P2X7 com os neurônios mioentéricos. Houve uma diminuição na densidade (neurônios/cm²) dos neurônios P2X7-ir, NOS-ir, NF-ir, ChAT-ir e Hu-ir nos grupos I/R 0 h, 24 h e 14 dias. Nos grupos I/R onde foi injetado o antagonista BBG, houve uma recuperação da densidade neuronal. Houve diminuição na área do perfil das classes neuronais nos grupos I/R e recuperação do perfil neuronal nos grupos I/R BBG-50 e BBG-100. Houve um aumento na expressão do receptor P2X7 e no número de neutrófilos nas diferentes camadas do intestino delgado nos grupos isquêmicos. E a motilidade intestinal estava diminuída. Conclui-se que a I/R afetou morfológica e funcionalmente o intestino e com o uso do antagonista BBG os efeitos da isquemia foram diminuídos, demonstrando uma provável neuroproteção e participação do receptor P2X7 nas alterações dos neurônios entéricos na isquemia.

Palavras-chave: *Brilliant Blue G*. Isquemia intestinal. Motilidade. Neurônios entéricos. Receptores purinérgicos.

ABSTRACT

PALOMBIT, K. **Role of the *Brilliant Blue G* antagonist on the myenteric neurons immunoreactive for the P2X7 receptor of the rats ileum following the intestinal ischemia/reperfusion.** 2014. 128 p. Ph. D. thesis (Morphofunctional Sciences) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

In the digestive tract ischemia/reperfusion (I/R) causes morphological changes in enteric neurons, release ATP into the extracellular space in response to injury, activating the P2X7 receptor. Studies have shown that injury can be attenuated by *Brilliant Blue G* (BBG) antagonists of this receptor. In the present work, we analyzed the effects of the BBG antagonist on the P2X7 receptor and rats ileum enteric neurons subjected to I/R. Intestinal ischemia was obtained by ileal vessels obstruction for 45 minutes, followed by reperfusion periods of 0 hour (h), 24 h and 14 days. We used the BBG in I/R 24 h and I/R 14 days groups in dosages of 50 and 100 mg/kg. The I/R 0 h is the group without reperfusion. The neuronal density and the cell body profile were analyzed by immunofluorescence technique. Was also analyzed the protein expression of P2X7 receptor by western blotting, labeling of neutrophils by myeloperoxidase (MPO) reaction, the integrity of the intestinal wall by histology and the intestinal motility. Our results demonstrated that the double labeling P2X7 receptor in myenteric neurons were 100%. There was a decrease in density (neurons/cm²) P2X7-ir, NOS-ir, NF-ir, ChAT-ir and Hu-ir neurons in I/R 0 h, I/R 24 h and I/R 14 days groups. In I/R groups where the antagonist BBG was injected, the neuronal density was less affected. There was a decrease in the area of the cell body profile in neuronal classes in the I/R groups and recovery profile area of the I/R BBG-50 and I/R BBG-100 groups. There was an increase in the expression of P2X7 receptor and in the number of neutrophils in intestine layers in ischemic groups, and the intestinal motility was decreased. Concluded that I/R affected morphologically and functionally the intestine, and that the effects of I/R were decreased by use of the BBG antagonist, demonstrating a possible neuroprotection and participation of P2X7 receptor in enteric neurons in ischemia.

Keywords: Brilliant Blue G. Intestinal ischemia. Motility. Enteric neurons. Purinergic receptors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg - Micrograma
µM - Micromolar
5-HT - 5-Hidroxitriptamina
ACh - Acetilcolina
ADP - Adenosina difosfato
AMP - Adenosina monofosfato
AMS - Artéria mesentérica superior
ATP - Adenosina trifosfato
BBG - Brilliant Blue G
Ca²⁺ - Cálcio
CaCl₂ - Cloreto de cálcio
Calb - Calbindina
Calr - Calretinina
CC - Carbacol
cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar
ChAT - Acetilcolina transferase
CO₂ - Gás carbônico
CT - Controle
DII - Doença Intestinal Inflamatória
DMáx - Diâmetro máximo
DMín - Diâmetro mínimo
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DTT - Ditionitrito
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetracético
GABA - Ácido Gama Aminobutírico
GM - Glândulas da mucosa
h - Hora
H₂O - Estrutura molecular da água
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HE - Hematoxilina-Eosina
I/R - Isquemia com reperfusão

IL - Interleucina

IGLEs - Terminações nervosas laminares intra-ganglionares

IPANs - Neurônios aferentes intrínsecos primários

K⁺ - Potássio

KCl - Cloreto de potássio

Kg - Quilograma

LP - Lâmina própria

M - Molar

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

MgSO₄ - Sulfato de magnésio

ml - Mililitro

MC - Músculo circular

ML - Músculo longitudinal

mM - Milimolar

MM - Muscular da mucosa

MPO - Mieloperoxidase

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

ms - Milissegundo

MUC - Mucosa

Na⁺ - Sódio

NaCl - Cloreto de sódio

NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio

NaH₂PO₄ - Fosfato de sódio monobásico

NF - Neurofilamento

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

nm - Nanômetro

NPY - Neuropeptídeo Y

O₂ - Oxigênio

OH - Hidroxila

PBS - Tampão Salina Fosfato

PM - Plexo mioentérico

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonilo

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

PS - Plexo submucoso

Rpm - Rotação por minuto

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SNA - Sistema Nervoso Autônomo

SNC - Sistema Nervoso Central

SNE - Sistema Nervoso Entérico

SNP - Nitroprussiato de sódio

SOM - Somatostatina

TBST - Tampão salina Tris com Tween

TNF - Fator de Necrose Tumoral

UA - Unidade arbitrária

UDP - Uridina difosfato

UTP - Uridina trifosfato

V - Vilosidades

VIP - Peptídeo Intestinal Vasoativo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos anticorpos primários.....	44
Tabela 2 - Características dos anticorpos secundários.....	44
Tabela 3 - Peso dos animais (antes da cirurgia e após reperusão).....	51
Tabela 4 - Dupla marcação dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X7 e à NOS nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....	64
Tabela 5 - Dupla marcação dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X7 e ao NF nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....	65
Tabela 6 - Dupla marcação dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X7 e à ChAT nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....	66
Tabela 7 - Dupla marcação dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X7 e ao pan-neuronal anti-Hu nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....	67
Tabela 8 - Valores do DMáx e do DMín dos neurônios imunorreativos à NOS dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....	73
Tabela 9 - Valores do DMáx e do DMín dos neurônios imunorreativos à NF dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....	74
Tabela 10 - Valores do DMáx e do DMín dos neurônios imunorreativos à ChAT dos grupos controle, sham o h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....	76
Tabela 11 - Valores do DMáx e do DMín dos neurônios imunorreativos ao anti-Hu dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R 14 dias BBG-50 e I/R BBG-100 14 dias.....	77

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática do SNE do intestino delgado.....	23
Figura 2 - Representação esquemática dos 14 tipos de neurônios do SNE de cobaia.....	25
Figura 3 - Desenho esquemático da arquitetura geral das subunidades dos receptores P2X.....	31
Figura 4 - Obstrução do fluxo sanguíneo dos vasos ileais.....	41
Figura 5 - Dupla marcação de neurônios NOS-ir, NF-ir, ChAT-ir e anti-Hu-ir com o receptor P2X7 no plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos sham 0 h e I/R 0 h.....	53
Figura 6 - Dupla marcação de neurônios NOS-ir, NF-ir, ChAT-ir e anti-Hu-ir com o receptor P2X7 no plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h e I/R BBG-100 24 h.....	54
Figura 7 - Dupla marcação de neurônios NOS-ir, NF-ir, ChAT-ir e anti-Hu-ir com o receptor P2X7 no plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....	55
Figura 8 - Fotomicrografia da parede do íleo com neutrófilos marcados por histoquímica da MPO dos grupos controle, sham 0 h e I/R 0 h.....	57
Figura 9 - Fotomicrografia da parede do íleo com neutrófilos marcados por histoquímica da MPO dos grupos sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h e I/R BBG-100 24 h	58
Figura 10 - Fotomicrografia da parede do íleo com neutrófilos marcados por histoquímica da MPO dos grupos sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....	59
Figura 11 - Fotomicrografia da parede do íleo dos grupos sham 0 h e I/R 0 h	61
Figura 12 - Fotomicrografia da parede do íleo dos grupos sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h e I/R BBG-100 24 h.....	62
Figura 13 - Fotomicrografia da parede do íleo dos grupos sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....	63
Figura 14 - Histograma da densidade das células imunorreativas ao receptor P2X7 (A), à NOS (B) e ao NF (C) dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....	69
Figura 15 - Histograma da densidade dos neurônio imunorreativos à ChAT (A) e ao anti-Hu (B) dos grupos controle, sham 0h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R	

BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....71

Figura 16 - Área do perfil do corpo celular dos neurônios imunorreativos à NOS dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....72

Figura 17 - Área do perfil do corpo celular dos neurônios imunorreativos ao NF dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....74

Figura 18 - Área do perfil do corpo celular dos neurônios imunorreativos à ChAT dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....75

Figura 19 - Área do perfil do corpo celular dos neurônios imunorreativos ao anti-Hu dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....77

Figura 20 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) dos neurônios NOS-ir no íleo de ratos dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias, I/R BBG-100 14 dias.....79

Figura 21 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) dos neurônios NF-ir no íleo de ratos dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....81

Figura 22 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) dos neurônios ChAT-ir no íleo de ratos dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias, I/R BBG-100 14 dias.....83

Figura 23 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) dos neurônios anti-Hu-ir no íleo de ratos dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/RBBG-100 14 dias.....85

Figura 24 - Análise da expressão proteica do receptor P2X7 nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....86

Figura 25 - Número de neutrófilos marcados pela técnica histoquímica da mieloperoxidase nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R

BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias nas camadas ML+PM (A), MC (B) e PS+LP (C).....89

Figura 26 - Segmentos de registros mecanográficos demonstrando a atividade espontânea (A) e histograma da atividade espontânea (B) do íleo de ratos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....91

Figura 27 - Segmentos de registros mecanográficos que mostram os efeitos de relaxamento do SNP aplicado em uma concentração única (100 μ M) (A) e histograma dos efeitos do SNP na atividade espontânea (B) do íleo de ratos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....93

Figura 28 - Segmentos de registros mecanográficos que mostram os efeitos de relaxamento do ATP aplicado em uma concentração única (100 μ M) (A) e histograma dos efeitos do ATP na atividade espontânea (B) do íleo de ratos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....95

Figura 29 - Segmentos de registros mecanográficos que mostram os efeitos contráteis do CC aplicado nas concentrações de 0,1 μ M, 1 μ M e 10 μ M no íleo de ratos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias..... 97

Figura 30 - Efeitos do carbacol na atividade espontânea do íleo e na presença de antagonista nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.....98

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Sistema Nervoso Entérico.....	23
1.2 Receptores Purinérgicos.....	28
1.3 Isquemia Intestinal e Reperfusão.....	32
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo Geral.....	39
2.2 Objetivos Específicos.....	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 Animais.....	41
3.2 Indução da Isquemia/Reperfusão-Intestinal.....	41
3.3 Técnica de Imunohistoquímica.....	43
<u>3.3.1 Preparação do Material.....</u>	<u>43</u>
<u>3.3.2 Método de Dupla Marcação com Imunofluorescência.....</u>	<u>43</u>
<u>3.3.3 Análises Qualitativas.....</u>	<u>44</u>
<u>3.3.4 Análises Quantitativas.....</u>	<u>45</u>
<i>3.3.4.1 Análise do Código Químico.....</i>	<i>45</i>
<i>3.3.4.2 Análise da Densidade Neuronal.....</i>	<i>45</i>
<i>3.3.4.3 Análise Morfométrica.....</i>	<i>46</i>
3.4 Análise da Expressão Protéica do Receptor P2X7.....	46
3.5 Técnica de Histoquímica para Mieloperoxidase (MPO).....	47
3.6 Análise Histológica.....	48
3.7 Análise da Motilidade Intestinal.....	48
3.8 Análise Estatística.....	49
4 RESULTADOS.....	50
4.1 Efeitos da I/R no Íleo.....	51
4.2 Pesos dos Animais.....	51
4.3 Efeitos quantitativos da I/R sobre a Imunorreatividade do Receptor P2X7 à NOS, ao NF, à ChAT e ao anti-HuC/D no Plexo Mioentérico.....	52
4.4 Efeitos Qualitativos da I/R sobre a Distribuição de Neutrófilos.....	56
4.5 Efeitos Qualitativos Histológicos da I/R.....	60
4.6 Efeitos Quantitativos da I/R sobre as Duplas Marcações, Densidades e Morfometria dos Neurônios Mioentéricos.....	64

<u>4.6.1 Dupla Marcação do Receptor P2X₇ com Neurônios Imunorreativos à NOS, ao NF, à ChAT e ao anti-HuC/D.....</u>	64
<u>4.6.2 Efeitos da I/R sobre as Densidades Neuronais.....</u>	67
<u>4.6.3 Efeitos da I/R sobre a Área do Perfil Neuronal.....</u>	71
<u>4.6.4 Efeitos da I/R sobre a Distribuição dos Neurônios Mioentéricos Imunorreativos à NOS, NF, ChAT e anti-HuC/D de acordo com a Área do Perfil.....</u>	77
4.8 Efeitos da I/R sobre a Expressão Proteica do Receptor P2X₇.....	86
4.9 Efeitos Quantitativos da I/R sobre a Distribuição de Neutrófilos.....	87
4.10 Efeitos da I/R sobre a Motilidade Intestinal.....	90
<u>4.10.1 Atividade Espontânea do Íleo.....</u>	90
<u>4.10.2 Efeitos do ATP e SNP na Atividade Espontânea do Íleo.....</u>	92
<u>4.10.3 Efeitos do Carbacol na Atividade Espontânea do Íleo.....</u>	96
5 DISCUSSÃO.....	99
5.1 Considerações sobre a Isquemia Intestinal com Reperfusão.....	100
5.2 Considerações sobre o Código Químico e a Expressão do Receptor P2X₇.....	101
5.3 Considerações sobre a Densidade Neuronal.....	103
5.4 Considerações sobre o Perfil Neuronal.....	104
5.5 Considerações sobre a Distribuição dos Neutrófilos.....	106
5.6 Considerações sobre a Motilidade Intestinal.....	106
5.7 Considerações Finais.....	108
6 CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS.....	111

1.1 Sistema Nervoso Entérico

O sistema nervoso entérico (SNE) é um componente do sistema nervoso autônomo (SNA), porém não segue necessariamente os comandos que recebe do cérebro e nem da medula espinal, e nem necessariamente lhes envia de volta as informações recebidas (FURNESS, 2006; GERSHON, 2000). O SNE, portanto, é um local independente de integração e processamento neural, e por isso é também conhecido como o segundo cérebro (GERSHON, 2000). Este sistema possui essa autonomia porque seus gânglios contêm neurônios aferentes primários intrínsecos (IPANs), interneurônios e neurônios motores, que são os componentes neurais necessários para um circuito reflexo completo (BROOKES, 2001; FURNESS et al., 2003a).

O SNE está presente em todo trato digestório tubular: no esôfago, no estômago e nos intestinos delgado e grosso, e é formado por redes interconectadas ou plexos de neurônios, seus axônios e células gliais entéricas. O SNE tem múltiplas funções como determinação dos padrões de movimento do trato gastrintestinal, controle da secreção de ácido gástrico, regulação do movimento de fluido através do epitélio, mudanças do fluxo sanguíneo local e interações com os sistemas endócrino e imune do intestino (FURNESS, 2006, 2012). O SNE também contribui juntamente com as células gliais entéricas para a manutenção da integridade da barreira epitelial entre o lúmen do intestino e as células da parede intestinal (FURNESS, 2012; SAVIDGE et al., 2007; TOUMI et al., 2003).

Esse sistema possui dois plexos ganglionares, o plexo mioentérico e o plexo submucoso (Figura 1) (FURNEES, 2000, 2006).

Figura 1 - Representação esquemática do SNE do intestino delgado.

FONTE: Adaptado de Furness, 2012.

O plexo mioentérico, também conhecido como plexo de Auerbach, localiza-se entre as duas camadas de músculos que envolvem o intestino, a camada muscular longitudinal externa e a camada do músculo circular, presente por todo trato digestório, do esôfago ao reto. O plexo mioentérico apresenta três componentes: um plexo primário, um plexo secundário e um plexo terciário (AUERBACH, 1864¹ apud FURNESS, 2006; LI, 1940; SCHABADASCH, 1930a², b³ apud FURNESS, 2006; STÖHR, 1930⁴ apud FURNESS, 2006).

O plexo submucoso, também denominado plexo de Meissner, é proeminente nos intestinos delgado e grosso e recebe este nome devido à sua localização na camada submucosa. No plexo submucoso as malhas são menores que as do plexo mioentérico, as fibras interconectadas são mais finas e os gânglios são menores (GONIAEW, 1875⁵ apud FURNESS 2006; HENLE, 1871⁶ apud FURNESS, 2006).

Essencialmente, os plexos entéricos seguem um padrão ao longo do trato digestório, porém, diferenças quanto à densidade e ao tamanho dos neurônios, bem como a forma dos gânglios, podem ser encontradas no mesmo segmento do trato digestório dos animais de mesma espécie e com diferentes idades (MATINI; MAYER; PELLEGRINI, 1997; MCKEOWN; CHOW; YOUNG, 2001; QU et al., 2008), ou submetidos às condições experimentais, como a inflamação (BOYER et al., 2005; DE GIORGIO et al., 2004), desnutrição (CASTELUCCI et al., 2002b; GIROTTI et al., 2013; GOMES et al., 2006; GREGGIO et al., 2010; MISAWA et al., 2010), isquemia intestinal (PAULINO et al., 2011; PALOMBIT et al., 2013) e obesidade (MIZUNO et al., 2012).

Os neurônios entéricos têm sido classificados pelas suas morfologias, propriedades fisiológicas, marcações imunohistoquímicas e histoquímicas, as estruturas que eles inervam, os transmissores que utilizam e as conexões que recebem. Os neurônios entéricos podem ser agrupados em neurônios motores, interneurônios e IPANs, que são algumas vezes referidos como neurônios sensoriais intrínsecos (FURNESS, 2006).

Segundo Furness (2000, 2006) foram identificados dezessete tipos de neurônios entéricos, quatorze destes encontrados no intestino delgado de cobaias (Figura 2).

¹ AUERBACH, L. Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. **Arch. Pathol. Anat. Physiol.**, v. 30, p. 457-460, 1864.

² SCHABADASCH, A. Die Nerven des Magens der Katze. **Z. Zellforsch.**, v. 10, p. 254-319, 1930a.

³ SCHABADASCH, A. Intramurale Nervenplechte des Darmrohrs. **Z. Zellforsch.**, v. 10, p. 320-385, 1930b.

⁴ STÖHR, P. Mikroskopische Studien zur Innervation des Magen-Darmkanales. **Z. Zellforsch.**, v. 12, p. 66-154, 1930.

⁵ GONIAEW, K. Die nerven des nahrungsschlauches. **Arch. Mikrosk. Anat.**, v. 11, p. 479-496, 1875.

⁶ HENLE, J. **Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen**. Band III., Abt. 2. Nervenlehre. Vieweg und Sohn, Braunschweig. 1871.

Os neurônios motores são divididos em neurônios excitatórios e neurônios inibitórios da musculatura lisa do intestino, e neurônios secretomotores/vasodilatadores. Os dois primeiros encontram-se no plexo mioentérico e estão envolvidos no controle da motilidade, já os neurônios secretomotores/vasodilatadores são encontrados no plexo submucoso e são responsáveis pela inervação da mucosa e pela regulação da secreção, absorção e do fluxo sanguíneo (FURNESS, 2000, 2006).

Todas as regiões do intestino recebem uma inervação excitatória. Pelo uso efetivo e específico do antagonista do receptor muscarínico, muitas investigações mostraram que a transmissão excitatória tem um componente muscarínico sendo predominante na liberação das taquicininas. Os neurônios motores são imunorreativos para ambas as enzimas que sintetizam a Acetilcolina Transferase (ChAT) e as taquicininas (LIPPI et al., 1998). As substâncias muscarínicas antagonistas acabam inibindo a motilidade gastrointestinal (BORODY et al., 1985; GALLIGAN; FURNESS; COSTA, 1986).

Figura 2 - Representação esquemática dos 14 tipos de neurônios do SNE de cobaia.

Todos foram definidos por suas funções, morfologia do corpo celular, código químico e projeções. ML: Músculo Longitudinal; PM: Plexo Mioentérico; MC: Músculo Circular; PS: Plexo Submucoso; MM: Muscular da Mucosa; MUC: Mucosa.

FONTE: Adaptado de Furness, 2006.

O neurônio motor inibitório contém a enzima óxido nítrico sintase (NOS) e libera óxido nítrico (NO) com efeito relaxante. Embora existam evidências que o NO seja um transmissor desses neurônios (SANDERS; WARD, 1992; STARK; SZURSZEWSKI, 1992),

isto é igualmente claro que ele não é o único transmissor (FURNESS et al., 1995b; MAKHLOUF; GRIDER, 1993).

Dentre os interneurônios foi identificado apenas um tipo apresentando trajeto ascendente (com direção oral), e três tipos de neurônios com trajetos descendentes (com direção anal). Os interneurônios ascendentes são colinérgicos e formam uma rede ao longo do intestino, e estão relacionados com os reflexos propulsivos. Os três tipos de interneurônios descendentes têm os seguintes códigos químicos: ChAT, NOS e o Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP), que estão envolvidos na motilidade reflexa local, e os interneurônios imunorreativos à ChAT e à Somatostatina (SOM) estão envolvidos na condução dos complexos mioelétricos no intestino delgado e não são encontrados no colo. Os interneurônios imunorreativos à ChAT e à 5-Hidroxitriptamina (5-HT) estão envolvidos nos reflexos secretomotores e não diretamente na motilidade reflexa (FURNESS, 2000, 2006; POMPOLO; FURNESS, 1998).

O IPAN tem sido registrado por reflexos isolados no intestino, e após a secção do nervo extrínseco, ocorre sua degeneração (CREMA; FRIGO; LECCHINI, 1970; FURNESS et al., 1995a; LANGLEY; MAGNUS, 1905). Evidências de sua identidade somente foram obtidas no intestino delgado da cobaia, com morfologia de neurônio Dogiel Tipo II, e através de propriedades eletrofisiológicas o distinguiram dos interneurônios e dos neurônios motores (BERTRAND et al., 1997; KIRCHGESSNER; TAMIR; GERSHON, 1992; KUNZE; BORNSTEIN; FURNESS, 1995; KUNZE et al., 1998; KUNZE et al., 1999). A identificação dos IPANs no tecido entérico pela imunohistoquímica é feita com a calbindina (Calb) ou com o neurofilamento (NF) (FURNESS et al., 1998; QUINSON et al., 2001).

Os neurônios secretomotores do plexo submucoso e os neurônios vasomotores controlam diretamente o circuito reflexo local. Os dois tipos de neurônios secretomotores intestinais são os neurônios colinérgicos e os não-colinérgicos. Os neurônios não-colinérgicos parecem mediar a maioria das respostas reflexas locais, utilizando o VIP ou um peptídeo relacionado, como seu transmissor primário, enquanto que os neurônios colinérgicos utilizam a enzima ChAT (FURNESS, 2000).

A primeira e mais duradoura classificação dos neurônios entéricos pelas suas formas, foi feita pelo russo Aleksandr Stanislavovic Dogiel. Ele forneceu uma compreensível descrição da morfologia dos neurônios nos plexos mioentérico e submucoso, do intestino de

humanos, cobaias, coelhos, ratos, cães e gatos (DOGIEL, 1895b⁷ apud FURNESS, 2006; DOGIEL, 1899⁸ apud FURNESS 2006).

Os principais critérios de Dogiel para distinguir os diferentes tipos de neurônios foram os comprimentos e as formas dos dendritos. Além disso, ele mencionou o tamanho dos corpos celulares, sua localização dentro do gânglio e a posição do núcleo. Dogiel descreveu como Tipo I, as células achatadas, geralmente alongadas, semelhantes a uma estrela, quando vistos em preparados de membrana. As células têm de 4 a 20 dendritos, e um axônio. Uma característica marcante desses neurônios são seus dendritos lamelares que são achatados e, que na maioria dos casos se estendem a uma distância curta do corpo celular (DOGIEL, 1899; LAWRENTJE, 1929⁹ apud FURNESS, 2006).

As classes de neurônios que são consideradas com morfologia Dogiel Tipo I são os interneurônios ascendentes e descendentes e os neurônios motores inibitórios e excitatórios das musculaturas longitudinal e circular (BROOKES; COSTA, 1990; BROOKES; STEELE; COSTA, 1991; BROOKES et al., 1992, 1997; CLERC et al., 1998a, b; COSTA et al., 1992; POMPOLO; FURNESS, 1990; PORTBURY et al., 1996a, b; STEELE; BROOKES; COSTA, 1991; WATTCHOW; BROOKES; COSTA, 1995; YOUNG; FURNESS, 1995; YOUNG; FURNESS; POVEY, 1995).

Os neurônios mioentéricos com morfologia Dogiel Tipo II têm corpos celulares grandes e ovóides, frequentemente com superfícies lisas e um núcleo excêntrico. Sua principal característica é a presença de diversos processos celulares longos decorrentes diretamente do corpo celular nervoso (células multipolares) ou de um único processo inicial (conhecido como célula pseudo-unipolar) (DOGIEL, 1899). Esses neurônios dão origem a extensivas ramificações dentro do seu próprio gânglio mioentérico (BORNSTEIN et al., 1991). Todos os neurônios mioentéricos com morfologia Dogiel Tipo II têm projeções axonais para a mucosa (SONG; BROOKES; COSTA, 1994a).

Os IPANs são neurônios com morfologia Dogiel Tipo II, com propriedades eletrofisiológicas de neurônios AH, enquanto que os neurônios com morfologia Dogiel Tipo I

⁷ DOGIEL, A. S. Zur Frage über die Ganglion der Darmgefl echte bei den Säugetieren. **Anat. Anz.**, v. 10, p. 517-528, 1895b.

⁸ DOGIEL, A. S. Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. **Arch. Anat. Physiol. Leipzig Anat. Abt. Jg.**, v. 1899, p. 130-158, 1899.

⁹ LAWRENTJEW, B. J. Experimentelle-morphologische Studien über den feineren Bau des autonomen Nervensystems. II. Über den Aufbau der Ganglien der Speiseröhre nebst einigen Bemerkungen über das Vorkommen und die Verteilung zweier Arten von Nervenzellen in dem autonomen Nervensystem. **Z. Mikrosk. Anat. Forsch.**, v. 18, p. 233-262, 1929.

apresentam padrão eletrofisiológico de neurônios S (FURNESS, 2000, 2006; FURNESS; COSTA, 1987).

1.2 Receptores Purinérgicos

As diversas ações fisiológicas da adenosina trifosfato (ATP) foram reconhecidas relativamente cedo. Em 1929, Drury; Szent-Györgyi demonstraram as ações extracelulares potentes do ATP e da adenosina no coração e nos vasos sanguíneos coronários. Em 1948, Emmelin; Feldberg demonstraram que a injeção intravenosa de ATP em gatos, causava efeitos complexos que afetavam os mecanismos centrais e periféricos. A injeção de ATP no ventrículo lateral produzia fraqueza muscular, ataxia e sonolência. Em 1967, Galindo mostrou que a aplicação de ATP em várias regiões do cérebro, produzia mudanças eletrofisiológicas ou bioquímicas. Em 1959, Holton apresentou o primeiro palpite da função de transmissor para o ATP no sistema nervoso, demonstrando a liberação de ATP durante uma estimulação antidrômica dos nervos sensoriais que supriam a artéria da orelha de coelhos. Buchthal; Folkow (1948) reconheceram a função fisiológica do ATP nas junções neuromusculares, concluindo que a acetilcolina (ACh) que provocava contrações nas fibras musculares esqueléticas de anfíbios, foi potencializada pela exposição ao ATP. Em 1963, Berne propôs uma hipótese de que a adenosina era o mediador fisiológico da vasodilatação coronária associada com hipóxia do miocárdio.

Burnstock et al. (1963) propuseram a existência de nervos autonômicos que não eram adrenérgicos nem colinérgicos e que supriam o trato gastrintestinal. Nos anos subsequentes, foram feitos esforços para identificar o transmissor não adrenérgico e não colinérgico dos nervos que supriam o intestino e a bexiga urinária, e o ATP foi a substância que mais satisfizesse este critério (BURNSTOCK et al., 1963).

As purinas (Adenosina, Adenosina Difosfato - ADP e ATP) e as pirimidinas (Uridina Difosfato - UDP e Uridina Trifosfato - UTP) extracelulares são importantes moléculas sinalizadoras que medeiam diversos efeitos biológicos (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Os compostos purinérgicos são liberados maciçamente por células danificadas ou em degeneração, particularmente sob condições traumáticas ou isquêmicas (FRANKE; KRÜGEL; ILLES, 2006). Além disso, o ATP também pode ser liberado na forma vesicular, geralmente com outros neurotransmissores como a noradrenalina e a serotonina (BOARDER; HOURANI, 1999). Os compostos purinérgicos possuem efeitos sobre a função cardíaca, agregação plaquetária e tônus vascular (BURNSTOCK, 1991; COLLINS; HOURANI, 1993;

HUTTEMANN et al., 1984; OLSSON; PEARSON, 1990), e também podem atuar como fatores tróficos e reguladores endógenos de crescimento e diferenciação celular, tanto no desenvolvimento como na vida adulta (ABBRACCHIO et al., 1994; FRANKE; KRÜGEL; ILLES, 2006), na fertilização (FORESTA; ROSSATO; DI VIRGILIO, 1992), na embriogênese (KNUDSEN; ELMER, 1987) e na organogênese (SMUTS, 1981).

Estudos farmacológicos definiram uma primeira divisão dos receptores purinérgicos em P1 e P2, que são ativados pela adenosina e pelo ATP, respectivamente (BURNSTOCK, 1978). Os receptores P1 são subdivididos de acordo com evidências farmacológicas, bioquímicas e moleculares em quatro subtipos: A1, A2A, A2B e A3. E os receptores P2 são divididos em receptores P2X que são ligados a canais iônicos e os receptores P2Y que são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G (BURNSTOCK; KENNEDDY, 1985). Atualmente têm sido clonados, caracterizados farmacologicamente e aceitos como válidos membros da família dos receptores P2X: P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 e P2X7 (P2X1-7) (ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 1998; ABBRACCHIO et al., 2009; BURNSTOCK, 2007; COLLO et al., 1996).

Os receptores P2Y são compostos por sete domínios hidrofóbicos transmembrana, com as cadeias N-terminal (extracelular) e C-terminal (intracelular) curtas. Quatorze proteínas foram caracterizadas como sendo da família dos receptores P2Y e a maioria delas foi clonada a partir de bibliotecas do ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) humano (ABBRACCHIO et al., 2003; WILDMAN et al., 2002). No entanto, somente os subtipos P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14 são aceitos na literatura como P2Y funcionalmente expressos em mamíferos (MARTEAU et al., 2003; NICHOLAS, 2001). Os outros receptores que foram clonados possuem homologia com os receptores P2Y, mas não apresentam as características funcionais destes. Os falsos P2Y são: P2Y5, P2Y7, P2Y9 e P2Y10 (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

Os receptores P2X estão acoplados a canais iônicos de membrana plasmática e são ativados por ATP extracelular, que medeia rapidamente (dentro de 10 milissegundos) e seletivamente a permeabilidade para cátions, como sódio (Na^+), potássio (K^+) e cálcio (Ca^{2+}) (NORTH; SURPRENANT, 2000). Os receptores P2X são encontrados em células musculares lisas, neurônios, células gliais e apresentam um papel de mediador na neurotransmissão excitatória rápida no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (ABBRACCHIO et al., 2009; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

Os receptores P2X possuem duas regiões transmembranas, com os terminais N- e C-localizados intracelular, sendo que a maior porção da proteína é extracelular. A porção

extracelular contém o sítio de ligação para o ATP e os sítios para os antagonistas e moduladores (KHAKH et al., 2001). Os receptores P2X têm 379 a 595 aminoácidos, sendo o P2X6 o menor e o P2X7 o maior deles (ABBRACCHIO et al., 2009; DI VIRGILIO et al., 1998).

Uma 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).

No SNE, os resultados dos autores Castelucci et al. (2002a) demonstraram pela primeira vez, no gânglio entérico que o receptor P2X2 estava presente em neurônios imunorreativos à NOS e nos neurônios imunorreativos à Calb. Desta maneira, concluiu-se que a subunidade do receptor P2X2 se expressa em subtipos de neurônios entéricos, incluindo neurônios motores inibitórios, neurônios secretomotores não colinérgicos, IPANs e terminações aferentes vagais no estômago. Também, foi reportada a imunoreatividade do receptor P2X2 nas terminações nervosas intra-ganglionares laminares (IGLEs) no trato gastrointestinal de camundongos (CASTELUCCI et al., 2003).

As mudanças na expressão dos receptores purinérgicos P2X1-7 são frequentemente observados nos diferentes tipos celulares e tecidos, não somente como uma consequência da maturação neuronal e diferenciação, mas também das várias condições patológicas como após diferentes espécies de injúrias agudas no SNC, como isquemia, hipóxia, estresse mecânico, axoniotomia e inflamação. Os mecanismos purinérgicos podem estar envolvidos nas etiopatogênias de muitas condições neurodegenerativas, especialmente por causa da grande liberação extracelular de ATP, adenosina e outros neurotransmissores. A relação entre as mudanças na expressão do receptor P2 e a resposta específica dos diferentes tipos celulares para a injúria é extremamente complexa, e pode ser relativo para efeitos nocivos e/ou benéficos (BURNSTOCK et al., 2011; FRANKE; ILLES, 2006).

O receptor P2X7 é um membro original da família P2X e participa na regulação da permeabilidade celular, liberação das citocinas e na apoptose. É expresso em células lineares hematopoieticas, monócitos, macrófagos e na microglia. Estes dados concordam com o suposto papel deste receptor no reparo do cérebro após a inflamação, infarto, apoptose, hipóxia ou o insulto imune (FERRARI et al., 1999). Tem sido demonstrada a presença do receptor P2X7 em fibroblastos humanos (SOLINI; CHIOZZI; MORELLI, 1999a; SOLINI; CHIOZZI; FALZONI, 2000), no epitélio e na bexiga urinária humana (O'REILLY et al.,

2001), na uretra de humanos e de ratos (SLATER; BARDEN; MURPHY, 2000a; TASSELL et al., 2000), nos órgãos genitais masculinos de humanos e de ratos (LEE; BARDINI; BURNSTOCK, 2000), nas células do ducto e acinares da glândula parótida (LI et al., 2003).

A estrutura do receptor P2X7 é similar a dos outros receptores P2X, exceto pelo fato de ter a cadeia C-terminal intracelular mais longa (240 aminoácidos) que dos outros receptores (DI VIRGILIO et al., 1998; SURPRENANT et al., 1996) (Figura 3).

Figura 3 - Desenho esquemático da arquitetura geral das subunidades dos receptores P2X.

FONTE: Adaptado de Di Virgilio et al., 1998.

O receptor P2X7 inicia apoptose em vários tipos celulares que podem ser modificados durante a gravidez e no envelhecimento (COUTINHO-SILVA et al., 1999; SCHULZE-LOHOFF et al., 1998; SLATER; BARDEN; MURPHY, 2000a, b). Além disso, está envolvido nas interações neuroimunes e influencia na produção das citocinas (FERRARI et al., 2000; SOLLE et al., 2001). A ativação do receptor P2X7 conduz a mudanças rápidas nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} , liberação das citocinas pró-inflamatórias e interleucinas (ILs). Estudos sobre o receptor P2X7 sugerem também um papel específico em estados inflamatórios, neuropáticos, na sinalização nociceptiva, em estados crônicos da dor e seu potencial terapêutico (DONNELLY-ROBERTS et al., 2007).

No SNE tem sido reportada a presença do receptor P2X7 através de técnicas imunohistoquímicas e propriedades farmacológicas em neurônios que expressam funcionalmente este receptor, no entanto, não foi verificado quantitativamente em qual classe neuronal estava presente este receptor (HU et al., 2001).

O receptor P2X7 pode ter seus efeitos bloqueados através do uso de seus antagonistas. O suramin e o piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonato (PPADS), antagonistas não seletivos do receptor P2X7 bloqueiam o receptor com baixa afinidade, e tipicamente mostram antagonismo não-competitivo (JACOBSON et al., 2002). O *Brilliant Blue G* (BBG) é o antagonista mais seletivo e potente do receptor P2X7. Sua baixa toxicidade e a alta

seletividade fazem desse composto um candidato ideal para bloquear o efeito adverso da ativação deste receptor (JIANG; MACKENZIE; NORTH, 2000; REMY et al., 2008).

O BBG é um corante, também chamado de *Coomassie blue*, e é bem conhecido pelo seu uso em marcação de proteínas em gel de eletroforese. O BBG também tem sido reconhecido como um potente agente farmacológico, particularmente no tratamento de condições que envolvam a morte neuronal. Estudos recentes têm demonstrado que a administração *in vivo* de BBG protege contra a perda neuronal induzida pela amilóide em um modelo de doença de Alzheimer (RYU; MCLARNON, 2008) e atenua a apoptose neuronal e déficits motores em um modelo de doença de Huntington em camundongos (DÍAZ-HERNÁNDEZ et al., 2009). Um estudo da lesão da medula espinal mostrou que o BBG administrado via intravenosa melhorou a recuperação e reduziu a resposta inflamatória local em ratos (PENG et al., 2009). Contudo, o alvo molecular do BBG não está completamente entendido.

O BBG é um derivado estrutural do corante FD&C blue número 1 (também conhecido como Brilliant Blue FCF), um corante de alimentos amplamente utilizado, e não é considerado tóxico (BORZELLECA; DEPUKAT; HALLAGAN, 1990). No entanto, a possível toxicidade do Brilliant Blue FCF, ainda é controversa, e estudos recentes indicam que a aplicação desse corante em conjunto com outros corantes de alimentos, pode induzir a neurotoxicidade e inibir a neurogênese hipocampal (LAU et al., 2006; PARK et al., 2009).

1.3 Isquemia Intestinal e Reperusão

A isquemia é a carência do suprimento sanguíneo suficiente para manter as funções e as necessidades teciduais, geralmente é causada por uma obstrução mecânica, mas às vezes pela queda catastrófica da pressão arterial ou pela perda de sangue. A isquemia pode ser total ou parcial. Quando classificada como total, apresenta o fluxo arterial insuficiente para manter a vida celular e tecidual. Já quando é parcial, mantém a viabilidade celular, porém com o risco de evoluir para a morte celular, dependendo do tipo de tecido lesado e do tempo da isquemia (D´ALECY; ZELENOCK, 1990; GUAN et al., 2009).

A isquemia compromete não apenas o suprimento de oxigênio, mas também de substratos metabólicos, incluindo a glicose, que normalmente é fornecida pelo sangue circulante. Dessa forma, nos tecidos isquêmicos, a geração anaeróbica de energia é interrompida depois que os substratos glicolíticos são exauridos, ou a função glicolítica é

inibida pelo acúmulo de metabólitos que deveriam ter sido removidos pelo fluxo sanguíneo (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A isquemia intestinal, na sua forma crônica ou aguda, é um grande problema clínico, pois acomete principalmente idosos, e está associada com significativa morbidade e mortalidade (OLDENBURG et al., 2004). As principais condições para a isquemia intestinal estão relacionadas com a redução no fluxo arterial ou a obstrução no retorno venoso, que podem ocorrer na trombose mesentérica arterial ou venosa, tromboembolismo, aterosclerose, transplante, hipercoagulabilidade, arterite e compressão de vasos (HAGLUND; BERGQVIST, 1999; MASSBERG; MESSMER, 1998; O'GRADY; GHAMBIR; KOELMEYER, 2009) ou por um processo não oclusivo, como em situações de baixo fluxo mesentérico que pode ocorrer na insuficiência cardíaca, septicemia ou administração de alfa-adrenérgicos ou digitálicos (OLDENBURG et al., 2004). Outras causas citadas compreendem o choque de origem medular ou traumático, gastroenterites, hemoconcentração, pneumonia, placenta prévia e espasmo das artérias distais associado ao abuso de cocaína (MYERS; CLAGETT; VALENTINE, 1996). Além disso, uma variedade de doenças intestinais inflamatórias frequentemente pode levar a episódios de isquemia, como a Doença de Crohn e a isquemia aguda mesentérica (HAGLUND; BERGQVIST, 1999; THORNTON; SOLOMON, 2002). A isquemia de vasos intestinais também é bastante comum em pacientes hospitalizados, especialmente aqueles que estão em unidades de terapia intensiva (OLDENBURG et al., 2004).

Não por acaso, o fenômeno isquêmico agudo intestinal cursa com altas taxas de mortalidade, em torno de 70% dos casos (OTTINGER, 1978). Como se trata de um quadro abrupto, e principalmente nos casos de embolia, não há tempo para o desenvolvimento de uma rede de circulação colateral que seja suficiente para manter nem mesmo o metabolismo mínimo intestinal (HANSEN; OIGAARD, 1976).

Durante a fase de isquemia, ocorre lesão da mucosa intestinal, há aumento da permeabilidade microvascular, perda de fluido na luz intestinal, liberação de hidrolases lisossômicas, aumento de proteólise, liberação de fator de depressão do miocárdio na circulação e choque circulatório, criando um ciclo vicioso, no qual essas alterações causam depressão da função cardíaca e esta, por sua vez, provoca progressiva deterioração da perfusão intestinal (HORTON; WALKER, 1993; MYERS; HERNANDEZ, 1994).

Com a falta do fluxo sanguíneo, o tecido intestinal precisa utilizar as vias alternativas, anaeróbias para a reposição de ATP, para manter o metabolismo mínimo que mantém a função e a homeostase celular. Tais mecanismos são precários e geralmente eficientes por

apenas algumas horas, além de cobrar um preço alto ao tecido produzindo substâncias potencialmente nocivas (LAMMERS et al., 2003; SCHOENBERG; FREDHOLM; HAGLUND, 1985).

Essas alterações são agravadas ainda mais com a reperfusão, pois esta desencadeia o acúmulo de radicais livres, que atacam e lesam as membranas celulares, atraem neutrófilos e estimulam a liberação de mediadores inflamatórios sistêmicos (HORTON; WALKER, 1993; MYERS; HERNANDEZ, 1994). Dentre os mediadores inflamatórios liberados, temos o fator de necrose tumoral α (TNF- α), ILs 1, 6 e 10 e o NO. Esses mediadores estão envolvidos na indução da lesão local e, uma vez disseminados, podem induzir disfunções inflamatórias em órgãos distantes (CARRICO et al., 1986; HARWARD et al., 1993). Cavriani et al. (2004) demonstraram que a obstrução da artéria mesentérica superior (AMS) por 45 minutos em ratos, seguida pelos períodos de reperfusão de 30 minutos, 2 e 4 horas (h), causava lesão aguda no pulmão. Estes autores observaram um aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) e da permeabilidade microvascular no pulmão e um aumento dos níveis do TNF no soro.

Concentrações elevadas de TNF- α no soro são encontradas durante a inflamação sistêmica, e sua inibição protege contra as respostas inflamatórias distantes e locais provocadas pela isquemia intestinal e reperfusão (I/R) (KOKSOY et al., 2001). O TNF- α também parece mostrar um papel regulador sobre a IL-10 e IL-1 β liberadas após a I/R (SOUZA et al., 2005).

O NO, que também é liberado após a I/R, contribui na resposta inflamatória sistêmica, hipotensão e pode ser liberado na lesão pulmonar aguda (LIU; WARD; DUBICK, 2003; SQUADRITO et al., 1994; WANG et al., 2001). Negativamente o NO modula a liberação de TNF- α e IL-1 β induzida pela I/R (LIU et al., 2000; LIU; XU; HOCK, 2001).

As lesões isquêmicas resultam no aumento do volume das células endoteliais, no fechamento dos capilares e redução prolongada do fluxo sanguíneo intestinal (HAGLUND; BERGQVIST, 1999; TAKADA et al., 1998). O restabelecimento do fluxo sanguíneo é essencial para resgatar os tecidos isquêmicos e iniciar um fluxo de eventos bioquímicos e celulares que podem levar a uma perda do tecido (CHAN et al., 1999; MASSBERG; MESSMER, 1998; NODA et al., 1998).

Dependendo do tempo e da intensidade da isquemia, quando o oxigênio é reintroduzido aos tecidos, a lesão tecidual pode ser exacerbada (MCCORD, 1985). Trabalhos têm demonstrado evidências de que a lesão dos tecidos não estaria somente limitada à

isquemia, podendo se estender ou agravar com a reperfusão (MEYER; SILVA, 1999; PINHEIRO et al., 1999). Parks et al. (1982) observaram que três horas de isquemia seguidas por uma hora de reperfusão determinava maior lesão na mucosa intestinal do que quatro horas de exclusiva isquemia.

A I/R no intestino delgado provoca a ruptura da barreira da mucosa, translocação bacteriana e a ativação da resposta inflamatória. A translocação bacteriana é a passagem de bactérias viáveis da mucosa intestinal para nodos linfáticos e outros órgãos e tecidos. O processo de translocação envolve o contato inicial da bactéria com a parede intestinal, onde sozinha pode precipitar a produção de citocinas e uma resposta inflamatória subsequente. Uma vez que a bactéria penetra na mucosa, ela pode ser transportada para órgãos distantes pelo sistema circulatório. Um estudo usando uma bactéria marcada mostrou que a translocação em ratos foi mais evidente em 24 h após a reperfusão mesentérica, do que em 30 minutos, indicando que o tempo é um fator significativo para a translocação (JOÃO et al., 2004).

A isquemia arterial inicia-se com alterações em tecidos por bloqueio do suprimento de oxigênio com alteração no metabolismo energético aeróbico, estes fatos determinam a depleção de ATP intracelular e o aumento do ATP extracelular com distúrbio na homeostase celular. Durante o processo da isquemia, com suprimento inadequado de oxigênio, pode haver acúmulo de metabólitos que direta ou indiretamente podem mediar a lesão celular, estes eventos podem resultar em alterações progressivas celulares culminando com a necrose e/ou apoptose (CERQUEIRA; HUSSNI; YOSHIDA, 2005; GRACE, 1994).

Morfologicamente, necrose diferencia-se de apoptose, pois na necrose a célula aumenta o seu volume, há perda da integridade das membranas e extravasamento do conteúdo celular, o que pode causar inflamação no tecido adjacente. Enquanto que, na apoptose a célula diminui o seu perfil celular, seu núcleo condensa e há uma desintegração e formação de bolhas citoplasmáticas e “corpos apoptóticos”. Na apoptose são observados aspectos bioquímicos como a ativação de proteases (caspases) e a fragmentação oligonucleossomal do ácido desoxirribonucleico (DNA), na necrose estes eventos usualmente não estão presentes. Vários agentes podem induzir a necrose, no entanto, uma condição clássica de necrose é a isquemia que leva a uma depleção drástica de oxigênio, glicose e outros fatores tróficos e, evoca uma massiva morte de células endoteliais e/ou células não proliferativas, como por exemplo, neurônios (HUPPERTZ; FRANK; KAUFMANN, 1999; NIKOLETOPOULOU; PALIKARAS; TAVERNARAKIS, 2013; PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003).

A ativação de receptores purinérgicos como o P2X7 (antes chamado P2Z) pelo ATP exógeno pode ser outro estímulo para a morte celular. Em determinadas células, o ATP pode induzir a formação de poros, via receptor P2X7 na membrana plasmática, levando a um aumento de íons intracelular, com desencadeamento de necrose e/ou apoptose e consequentemente morte celular (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2009; PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003; VANHOUTTE; HUMPHREY; SPEDDING, 1996).

A função neural deste receptor está tendo uma considerável atenção, devido à presença do receptor P2X7 no sistema nervoso. 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, o receptor P2X7 parece ter potencial terapêutico em locais de distúrbios no sistema nervoso, como na I/R, na doença de Alzheimer, na lesão do cordão espinal e na dor neuropática (SPERLÁGH; KOFALVI; DEUCHARS, 2002; SPERLÁGH et al., 2006).

No SNC, os autores Jun et al. (2007) demonstraram que os neurônios dopaminérgicos expostos ao ATP podem ter os eventos de necrose, como o aumento do volume das células, sendo estes eventos mediados pelo receptor P2X7 e, que com o pré-tratamento do antagonista para o receptor P2X7, KN62, estes efeitos eram revertidos sobre os neurônios. Também, os autores Franke et al. (2006, 2004) têm sugerido que a I/R no cérebro aumenta a regulação do receptor P2X7 não somente na microglia, mas também nos astrócitos e neurônios.

Alguns trabalhos sobre os efeitos da I/R no SNE têm sido realizados. No trabalho de Lindeström; Ekblad (2004) foram analisadas mudanças estruturais nos neurônios entéricos do íleo de ratos submetidos à I/R. Nesse estudo foram observadas alterações nos números de neurônios acidófilos. Com relação aos neurônios dos plexos mioentérico e submucoso foi observado processo de morte celular, porém não foram estudadas as classes de neurônios afetadas e seus códigos químicos. Também os autores Piao et al. (1999) verificaram pela microscopia óptica e eletrônica, alterações nos neurônios mioentéricos de ratos com isquemia de 4 h, porém não foi determinada a classe neuronal afetada.

Resultados do laboratório demonstraram que a isquemia da AMS com 4 h de reperfusão, acarretou alterações morfológicas nos neurônios dos plexos mioentérico e submucoso que expressavam o receptor P2X2, a NOS e a Calb (PAULINO et al., 2011) e o mesmo ocorreu nos períodos de 24 h e 7 dias de reperfusão (BOBNA, 2011). Protocolo com isquemia somente de vasos ileais tem demonstrado alterações dos neurônios entéricos após os períodos de 6 h, 24 h, 72 h e 1 semana de reperfusão (PALOMBIT et al., 2013).

Milano et al. (2008) observaram que a I/R aumentava a expressão do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) dos receptores purinérgicos P2X7 e P2Y2 em diferentes órgãos, como nos rins e nos pulmões, no entanto, não foi verificada alteração com diferença significativa no intestino. Isto pode ter ocorrido, devido a técnica empregada pelos autores, onde eles utilizaram o intestino como um todo, incluindo o SNE, camadas musculares e vilosidades.

Os autores Rivera et al. (2009) utilizaram a isquemia de artérias ileais por 60 minutos, e demonstraram aumento da área dos perfis dos neurônios de cobaias imunorreativos à NOS após 24 e 72 h de reperfusão. Outro trabalho dos autores Rivera et al. (2012) evidenciaram que a I/R em camundongos *knockouts* para a NOS foi mais deletério quando comparado ao camundongo normal, implicando que o NO produzido pela NOS possa ter um efeito protetor.

A I/R é um fenômeno comum que afeta milhões de pessoas no mundo todo. Porém, é evidente que a fisiopatologia bem como o tratamento de uma lesão isquêmica são eventos complexos e multifatoriais, e é necessário um amplo estudo sobre o tema. Constatada a importância e a complexidade dessa condição clínica, verificamos a necessidade de estudar os efeitos protetivos do antagonista do receptor P2X7, o BBG, sobre a isquemia intestinal com diferentes períodos de reperfusão.

2.1 Objetivo Geral

Analisar o efeito do antagonista *Brilliant Blue G* sobre as diferentes classes neuronais imunorreativas ao receptor P2X7 no plexo mioentérico do íleo de ratos Wistar submetidos à isquemia intestinal com reperfusão.

2.2 Objetivos Específicos

Este trabalho visa analisar os efeitos da I/R nos neurônios do plexo mioentérico do íleo de ratos Wistar com o uso do antagonista do receptor P2X7, o BBG, sob os seguintes aspectos:

- a) Distribuição e expressão do receptor purinérgico P2X7;
- b) Dupla marcação dos neurônios imunorreativos ao receptor purinérgico P2X7 com a NOS, o NF, a ChAT e o anti-HuC/D;
- c) Densidade dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7, à NOS, ao NF, à ChAT e ao anti-HuC/D;
- d) Área do perfil, diâmetro máximo e diâmetro mínimo dos neurônios imunorreativos à NOS, ao NF, à ChAT e ao anti-HuC/D;
- e) Neutrófilos pela atividade da mieloperoxidase;
- f) Morfologia do íleo;
- g) Aspectos funcionais da motilidade intestinal.

3.1 Animais

Foram utilizados 132 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) Wistar, machos, adultos (aproximadamente 2 meses de idade) e peso entre 250 e 300 gramas (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 h com livre acesso a comida e água.

3.2 Indução da Isquemia/Reperusão-Intestinal

Os ratos foram pesados e logo em seguida anestesiados com uma mistura de xilazina (10 mg/Kg), cetamina (50 mg/Kg) e acepromazina (2 mg/Kg) por via subcutânea. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal numa prancha de isopor, 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 das artérias e veias ileais com cliques microcirúrgicos removíveis (Figura 4).

Figura 4 - Obstrução do fluxo sanguíneo dos vasos ileais.

Oclusão do fluxo sanguíneo das artérias e veias ileais de rato. (A - menor aumento e B - maior aumento). Setas cheias indicam o local da isquemia. Setas vazadas indicam a área que não sofreu isquemia.

A oclusão foi realizada pelo período de 45 minutos. Durante o período de manutenção da isquemia, nas regiões expostas do intestino foi colocado Tampão Fosfato Salina (PBS 0,15

M NaCl 0.01 M tampão fosfato de sódio, pH 7,2) aquecido (37 °C) 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 desejado de isquemia, os cliques vasculares foram removidos e a reperfusão foi restaurada, neste momento, a região do íleo retomou a sua coloração rósea normal. Em seguida a incisão mediana foi fechada com sutura contínua, em dois planos, com fio de *nylon* monofilamentar ou de algodão.

Os animais foram divididos em 11 grupos experimentais: o grupo controle (CT), onde não foi realizada nenhuma intervenção cirúrgica; os grupos falso operados (sham 0 h, 24 h e 14 dias), onde os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos dos animais que sofreram isquemia, porém não houve a oclusão das artérias e veias ileais; os grupos isquêmicos (I/R), onde houve intervenção cirúrgica com a oclusão dos vasos ileais com reperfusão de 0 h, 24 h e 14 dias; e os grupos I/R com aplicação do BBG-50 (24 h e 14 dias) e BBG-100 (24 h e 14 dias).

No grupo 0 h de reperfusão, os tecidos foram coletados logo após os 45 minutos de isquemia.

Nos grupos I/R 24 h foi injetado salina (0,9% de cloreto de sódio - NaCl por via subcutânea) e BBG (50 e 100 mg/kg; grupo I/R 50 e grupo I/R 100) na quantidade de 1 mL/Kg, 1 h após a isquemia.

Nos grupos I/R 14 dias foi injetado salina (via subcutânea) e BBG (50 ou 100 mg/kg; grupo I/R 50 e grupo I/R 100) na quantidade de 1 mL/Kg, 1 hora após a isquemia e uma vez por dia nos 5 dias seguintes a isquemia (PENG et al., 2009).

Para a preparação do antagonista do receptor P2X7, o BBG (Sigma) foi dissolvido em 0,9% de NaCl para injeção subcutânea.

No momento da coleta, os animais foram anestesiados e 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.

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° 126/2010. E renovação prorrogada até 25/10/2016.

3.3 Técnica de Imunohistoquímica

3.3.1 Preparação do Material

Os segmentos do íleo foram obtidos dos animais submetidos aos tratamentos descritos no item 3.2. Os segmentos foram limpos de seu conteúdo com a injeção de PBS na luz intestinal e logo após abertos ao longo da borda mesentérica e colocados em balsas de madeira (9 cm de comprimento e 2 cm de largura) com a mucosa voltada para baixo, e esticados por meio de alfinetes. Após, foram imersos no fixador com 4% de formaldeído em 0.1 M tampão fosfato de sódio, com pH 7,0 à 4 °C, durante uma noite. No dia seguinte, os tecidos foram retirados do fixador e clareados com 3 lavagens de 10 minutos cada, em dimetilsulfóxido (DMSO), 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 °C, para sua conservação.

3.3.2 Método de Dupla Marcação com Imunofluorescência

Após a fixação e o clareamento do tecido, com auxílio do Microscópio estereoscópico ZM800 Nikon, o íleo de cada animal foi seccionado em cerca de 1 cm² com uma lâmina de bisturi número 15, e utilizou-se para dissecação, 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.

O preparado de membrana foi cortado ao meio, ou seja, cada animal de cada grupo tinha 2 preparados de membrana (0,5 cm²). Foram utilizados 5 animais para cada grupo, ao final, foram analisados 10 preparados de membrana para cada um dos grupos: controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias para cada imunorreatividade.

Antes das preparações serem incubadas em anticorpos primários, elas foram imersas em 10% de solução de soro normal de cavalo em 1,5% de Triton-X (Sigma) em PBS, por 45 minutos, em temperatura ambiente. Após, foram incubadas em anticorpos primários descritos na Tabela 1 e permaneceram por 48 horas, à 4 °C. Passado o tempo de incubação, os preparados de membrana foram lavados em PBS por 3 vezes de 10 minutos cada.

As duplas marcações do plexo mioentérico foram obtidas, usando as combinações de anticorpos primários do receptor purinérgico P2X7 com a NOS (marcador de neurônios inibitórios), com o NF (marcador de neurônios sensoriais), com a ChAT (marcador de neurônios excitatórios colinérgicos) e com o pan-neuronal anti-HuC/D (marcador de todos os neurônios) (Tabela 1).

Tabela 1 - Características dos anticorpos primários.

Antígeno	Hospedeiro	Diluição	Referência
Receptor P2X7	Coelho	1:200	Chemicon
NOS	Carneiro	1:2000	EMSO
NF	Camundongo	1:500	Sigma
ChAT	Cabra	1:100	Chemicon
Anti-HuC/D	Camundongo	1:100	Molecular Probes

Após a incubação do anticorpo primário, os tecidos foram incubados em anticorpos secundários, por uma hora, à temperatura ambiente (Tabela 2). Ao final, os tecidos foram lavados 3 vezes de 10 minutos cada, em PBS e montados em lâmina com glicerol tamponado com 0,5 M tampão carbonato de cálcio (pH 8,6).

Tabela 2 - Características dos anticorpos secundários.

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

3.3.3 Análises Qualitativas

Os métodos das análises qualitativas dos neurônios imunorreativos ao receptor purinérgico P2X7, à NOS, ao NF, à ChAT e ao anti-Hu do plexo mioentérico foram realizados em microscópio de fluorescência Nikon 80i, equipado com filtros para discriminar entre as fluorescências 488 (verde) e 594 (vermelho) acoplado ao analisador de imagem. Este microscópio de fluorescência utiliza o filtro 10 para 488 (450-490 nm de filtro de excitação e 515-565 nm para emissão), e filtro 00 para 594 (530-585 nm de filtro de excitação e 615 nm

de filtro para emissão). As imagens foram capturadas e analisadas pelo programa NIS Elements (Nikon, versão 5).

As preparações também foram analisadas pelo microscópio Confocal de Varredura à Laser do Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento do ICB/USP, o LSM 510 da Zeiss, equipado com três lasers; Argônio 458, 488 e 514 nm; Hélio/Neônio 543 nm e Hélio/Neônio 633 nm. O sistema tem um laser krypton/argon para visualização diferencial de fluoróforo usando 488 nm de filtro de excitação e 522/535 nm de filtro de emissão para 488 e 568 nm de filtro de excitação e 605/632 nm de filtro de emissão para 594. As imagens estão em 512x512 pixels em uma espessura de secção óptica de 0,5 mm e foram processadas usando os programas de software LSM 5.0 (Zeiss) Corel Photo Paint e Corel Draw.

3.3.4 Análises Quantitativas

3.3.4.1 Análise do Código Químico

A análise do código químico foi realizada para verificar a quantidade de neurônios mioentéricos que expressam o receptor P2X7. As análises foram feitas em preparados de membrana através da dupla marcação do receptor purinérgico P2X7 com a NOS, o NF, a ChAT e o anti-Hu. Primeiro, os neurônios foram localizados pela presença do fluoróforo que marca um antígeno, então o filtro foi mudado para determinar se o neurônio era ou não marcado por um segundo antígeno, localizado por um segundo fluoróforo de diferente cor. Foram analisados 100 neurônios de cada preparado de membrana de cada dupla marcação, de cada animal dos grupos estudados. Os dados das duplas marcações são expressos com média $\pm$ erro padrão, n= número de preparações.

3.3.4.2 Análise da Densidade Neuronal

A análise da densidade neuronal foi realizada para obtermos o número de neurônios/cm² e verificar se a I/R e o tratamento com BBG alteram os valores dos neurônios do plexo mioentérico. A obtenção das densidades dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7, à NOS, ao NF, à ChAT e ao anti-Hu foi feita em aumento de 100X no microscópio de fluorescência Nikon 80i (área do campo microscópico 0,000379 cm²) acoplado com filtros para discriminar entre as fluorescências 488 e 594 (GIROTTI et al., 2013; PALOMBIT et al.,

2013). Foram feitas contagens do número de neurônios em 40 campos, em dois preparados de membrana de cada um dos 5 animais dos grupos estudados.

3.3.4.3 Análise Morfométrica

A análise morfométrica foi realizada para a obtenção da área do perfil do corpo celular, diâmetro máximo (DMáx) e diâmetro mínimo (DMín) dos neurônios mioentéricos e verificar se a I/R e o tratamento com o antagonista BBG alteram a morfologia neuronal. Foram fotografados 100 neurônios imunorreativos à NOS, ao NF, à ChAT e ao anti-Hu de cada animal de todos grupos estudados. As imagens foram obtidas pelo programa NIS Elements (Nikon) e a análise morfométrica foi feita no programa Image-Pro Plus 4.1.0.0 (GIROTTI et al., 2013; PALOMBIT et al., 2013).

3.4 Análise da Expressão Proteica do Receptor P2X7

A análise da expressão proteica do receptor purinérgico P2X7 foi feita através da técnica de western blotting. Foram coletadas as porções do íleo dos grupos (n=3/grupo) controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias. Após a coleta os intestinos foram dissecados (ver item 3.3.2) à fresco e logo em seguida congelados (-20 °C).

A proteína total do intestino foi obtida usando 1 g de tecido/10 mL de tampão de digestão (0,1 M KCl (SIGMA), 10 mM HEPES (SIGMA), 3 mM de MgCl₂ (SIGMA), 5 mM 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), 1 mM Leupeptina (SIGMA), 5 mM Aprotinina (SIGMA) e 1 mM Pepstatina (SIGMA)). As concentrações da proteína foram analisadas pelo método de Bradford. 150 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 presença 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 para o receptor purinérgico P2X7 diluído em TBST (1:300) durante uma noite à 4

°C. No dia seguinte a membrana foi lavada e foi adicionado o anticorpo secundário conjugado à peroxidase diluído em TBST (1:20.000) por 2 h à temperatura ambiente. A membrana foi lavada novamente em TBST e foi 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 foi utilizada como normalizador.

Este protocolo foi desenvolvido em colaboração com a Profa. Dra. Maria Luiza Barreto de Chaves.

3.5 Técnica de Histoquímica para Mieloperoxidase (MPO)

A técnica da MPO foi realizada para analisar a presença de neutrófilos nas diferentes camadas do intestino. Os segmentos do íleo distal de aproximadamente 1,5 cm dos grupos estudados (n=3/grupo) foram coletados, abertos ao longo da borda mesentérica e presos em balsas de madeira. Após, foram fixados em etanol 100% por 10 minutos, lavados em PBS (3x10 minutos), e armazenados em PBS-sacarose (PBS contendo 30% de sacarose) por uma noite à 4 °C. No dia seguinte, os tecidos foram transferidos para uma solução com 50% Optimum Cutting Temperature (OCT; Tissue Tek, Elkhart, Indiana, EUA) e PBS-sacarose. Em seguida, os tecidos foram imersos em OCT, congelados em nitrogênio líquido e armazenados à -80 °C. Os tecidos foram cortados em criostato (10 μ m de espessura), coletados em lâminas e deixados à temperatura ambiente por 1 h. Após, os tecidos foram corados em uma solução Hanker-Yates (p-fenilenodiamina mais pirocatecol; Polysciences, Warrington, na Pensilvânia, EUA) que consiste de 0,6 mg/mL do reagente Hanker-Yates e H₂O₂ 0,003% em PBS durante 10 minutos para detectar a presença da MPO nos neutrófilos (KALFF et al., 1998). Em seguida, os tecidos foram lavados em PBS (3x5 minutos), contracorados com verde de metila à 2% por 30 segundos, desidratados através da bateria de etanol, diafanizados em xilol e montados em meio de montagem permanente (DPX mounting medium) (BDH, Dorset, UK) (RIVERA et al., 2012).

Após, foram realizadas análises qualitativas e quantitativas da localização dos neutrófilos nas camadas do intestino. A contagem dos neutrófilos foi dividida em três partes: músculo longitudinal + plexo mioentérico, músculo circular e lâmina própria + plexo submucoso no íleo distal dos grupos estudados (RIVERA et al., 2012).

3.6 Análise Histológica

A análise histológica foi realizada para observarmos se a I/R e a aplicação do BBG alteram a integridade da parede intestinal. Foram coletados os segmentos do íleo distal de aproximadamente 1,5 cm dos grupos (n=3/grupo) estudados. Os tecidos foram lavados em PBS, abertos pela borda mesentérica, colocados em balsas de madeira com a mucosa voltada para cima e fixados em paraformaldeído a 4% por 24 h. Os tecidos passaram por uma série de concentrações crescentes de álcoois, após foram diafanizados em séries de xilóis e incluídos em parafina. Em seguida os tecidos foram cortados transversalmente em micrótomo, com uma espessura de 5 µm e corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE).

Os cortes histológicos foram utilizados para análises qualitativas da camada longitudinal, plexo mioentérico, camada circular, plexo submucoso, lâmina própria e vilosidades do íleo distal dos grupos estudados.

3.7 Análise da Motilidade Intestinal

Segmentos do íleo distal de aproximadamente 2 cm foram coletados, preparados e montados longitudinalmente no banho de órgãos contendo solução salina fisiológica de Krebs (NaCl, KCl, NaHCO₃, NaH₂PO₄, MgSO₄, D-glucose e CaCl₂). Os banhos foram oxigenados com carbogênio (95% O₂: 5% CO₂) e mantidos à 37 °C. Uma tensão de repouso de 1 g foi aplicada aos tecidos e respostas isométricas foram gravadas com um transdutor de força e registradas usando um programa Acknowledge 4 BIOPAC System, Inc (USA). Os tecidos foram equilibrados por 60 minutos antes da adição das drogas.

Os tecidos foram incubados individualmente com: o cloridrato de carbamilcolina (carbacol - CC; Sigma-Aldrich), um agonista colinérgico (concentrações: 0,1 µM, 1,0 µM e 10,0 µM, curva cumulativa), o nitroprussiato de sódio dihidratado (SNP; Sigma-Aldrich) um doador exógeno de NO (100 µM, concentração única) e a adenosina-5'-difosfato dissódico (ATP, Amresco), um agonista não seletivo do receptor P2X (100 µM, concentração única).

As análises quantitativas do SNP e do ATP foram feitas através da subtração do valor da atividade espontânea pelo valor da amplitude mínima na presença dos agonistas, e então foi calculada a porcentagem de relaxamento de cada grupo (%). No entanto, a análise do CC foi feita através da subtração do pico máximo de cada dosagem de CC pela atividade espontânea (g). Todos os registros de dados de tensão isométrica foram analisados usando o programa Acknowledge 4 BIOPAC System, Inc (USA).

3.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada comparando os grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias, verificando as variáveis das duplas marcações (%), densidades neuronais (cm^2), área do perfil neuronal (μm^2), número de neutrófilos (campo), expressão proteica do receptor P2X7 (UA) e a motilidade intestinal (g).

Os dados foram comparados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) de dois fatores, tempo e tratamento, seguido pelo Teste de Tukey. Os testes foram realizados com nível de significância $p < 0,05$.

4.1 Efeitos da I/R no Íleo

Durante o período de oclusão de 45 minutos, a região do intestino que foi privada do fluxo sanguíneo alterou sua coloração e tornou-se de cor vermelha escura. Uma vez que o fluxo sanguíneo foi restabelecido, o tecido retomou a sua coloração normal. Após a cirurgia os animais foram acompanhados diariamente e retornaram a atividade normal.

Nos animais que receberam as doses do antagonista, os órgãos da cavidade abdominal apareceram na coloração azul, e as fezes na coloração azul-esverdeada.

As regiões submetidas à isquemia demonstraram aparência normal quando foram utilizadas para dissecação para os métodos de imunohistoquímica, western blotting, MPO, histologia e motilidade intestinal.

4.2 Pesos dos Animais

Os ratos submetidos à I/R não demonstraram diferenças de peso corporal antes da cirurgia e após os períodos de reperfusão, quando comparados aos grupos controle e sham (Tabela 3).

Tabela 3 - Peso dos animais (antes da cirurgia e após reperfusão).

Grupos	<i>Controle</i>	<i>Sham</i>		<i>Isquêmico</i>	
		<i>Antes/Cirurgia</i>	<i>Pós/Cirurgia</i>	<i>Antes/Cirurgia</i>	<i>Pós/Cirurgia</i>
Controle	264,8±17,5	-	-	-	-
0 h	-	276,9±10,4	-	276,1±9,5	-
24 h salina	-	288,2 ±14,4	261,0±13,6	273,9±14,2	262,0±12,5
24 h BBG-50	-	-	-	268,8±16,0	259,7±10,1
24 h BBG-100	-	-	-	269,9±9,8	263,7±11,1
14 dias salina	-	262,7±37,7	302,4±18,5	250,5±14,3	311,1±3,6
14 dias BBG-50	-	-	-	248,3±4,9	284,7±0,0
14 dias BBG-100	-	-	-	256,5±9,7	274,0±0,0

Dados expressos em Média±desvio padrão

4.3 Efeitos Qualitativos da I/R sobre a Imunorreatividade do Receptor P2X7 à NOS, ao NF, à ChAT e ao anti-Hu no Plexo Mioentérico

De maneira geral, a imunomarcagem do receptor P2X7 foi observada nos neurônios do plexo mioentérico do íleo dos ratos dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias. Não foi observada nenhuma alteração aparente na expressão deste receptor.

A marcação da NOS foi evidenciada nos neurônios inibitórios do plexo mioentérico e não foi observada alteração da intensidade desses neurônios nos grupos estudados. Os neurônios NOS-ir apresentaram morfologia Dogiel Tipo I. Muitos neurônios NOS-ir dos grupos I/R 0 h e I/R salina 24 h estavam edemaciados. Nos grupos onde foi injetado o BBG também foram encontrados alguns neurônios edemaciados, mas em quantidade menor. Foi observada dupla marcação do receptor P2X7 com neurônios NOS-ir no plexo mioentérico dos grupos analisados (Figuras 5, 6 e 7).

Foi verificada a imunomarcagem para o NF no plexo mioentérico dos grupos controle, sham e isquêmicos. Os neurônios imunorreativos ao NF apresentaram morfologia Dogiel Tipo II e não foram observadas alterações quanto à morfologia dos neurônios nos grupos estudados. As análises qualitativas demonstraram que houve dupla marcação do receptor P2X7 com os neurônios NF-ir (Figuras 5, 6 e 7).

Os neurônios mioentéricos imunorreativos à ChAT eram numerosos e cercados por varicosidades imunorreativas. Foi observada uma diferença em relação à imunorreatividade desses neurônios, onde alguns neurônios estavam fortemente marcados e alguns fracamente em todos os grupos analisados. O padrão de distribuição dos neurônios ChAT-ir nos gânglios entéricos foi abundante. Além disso, foram encontrados neurônios edemaciados nos grupos isquêmicos. E foi observada dupla marcação de neurônios imunorreativos à ChAT com o receptor P2X7 em todos os grupos analisados (Figuras 5, 6 e 7).

Nos gânglios mioentéricos foram observados neurônios imunorreativos ao pan-neuronal anti-HuC/D, onde foi possível observar marcação no citoplasma e nos núcleos dos neurônios. Esta imunomarcagem demonstrou neurônios de diversos tamanhos. Houve dupla marcação dos neurônios anti-Hu-ir com o receptor purinérgico P2X7-ir (Figura 5, 6 e 7).

Figura 5 - Dupla marcação de neurônios NOS-ir, NF-ir, ChAT-ir e anti-Hu-ir com o receptor P2X7 no plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos sham 0 h e I/R 0 h.

Neurônios imunorreativos ao receptor P2X7 com a NOS (A-A'), com o NF (B-B'), com a ChAT (C-C') e com o anti-Hu (D-D') do íleo de ratos sham (A-D) e submetidos à isquemia sem reperusão (A'-D'). Setas simples indicam dupla marcação. (Barra de calibração: 20 μm).

Figura 6 - Dupla marcação de neurônios NOS-ir, NF-ir, ChAT-ir e anti-Hu-ir com o receptor P2X7 no plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h e I/R BBG-100 24 h.

Neurônios imunorreativos ao receptor P2X7 com a NOS (A-A'''), com o NF (B-B'''), com a ChAT (C-C''') e com o anti-HU (D-D''') do íleo de ratos sham (A-D) e submetidos à I/R de 24 horas com salina (A'-D'), BBG-50 (A''-D'') e BBG-100 (A'''-D'''). Setas simples indicam dupla marcação. (Barra de calibração: 20 μ m).

Figura 7 - Dupla marcação de neurônios NOS-ir, NF-ir, ChAT-ir e anti-Hu-ir com o receptor P2X7 no plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

Neurônios imunorreativos ao receptor P2X7 com a NOS (A-A'''), com o NF (B-B'''), com a ChAT (C-C''') e com o anti-Hu (D-D''') do íleo de ratos sham (A-D) e submetidos à I/R de 14 dias com salina (A'-D'), BBG-50 (A''-D'') e BBG-100 (A'''-D'''). Setas simples indicam dupla marcação. (Barra de calibração: 20 μ m).

4.4 Efeitos Qualitativos da I/R sobre a Distribuição de Neutrófilos

Os neutrófilos foram revelados pela reação de MPO nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

No grupo controle os neutrófilos foram encontrados principalmente nas vilosidades, lâmina própria e na submucosa, pouco vistos nas camadas musculares. Nos grupos sham 0 h, 24 h e 14 dias observamos um aumento no número de neutrófilos nas camadas submucosa e muscular circular (Figuras 8, 9 e 10).

Nos grupos isquêmicos, houve uma grande infiltração de neutrófilos em todas as camadas da porção do íleo submetido a I/R, incluindo músculo longitudinal, músculo circular, plexos entéricos e lâmina própria (Figuras 8, 9 e 10).

Nos grupos I/R tratados com o BBG, na camada submucosa foi observada uma diminuição dos neutrófilos, com similaridade aos grupos sham (Figuras 8, 9 e 10).

Figura 8 - Fotomicrografia da parede do íleo com neutrófilos marcados por histoquímica da MPO dos grupos controle, sham 0 h e I/R 0 h.

(LP) Lâmina Própria, (MC) Músculo Circular; (ML+PM) Músculo Longitudinal + Plexo Mioentérico; (GM) Gânglio Mioentérico. Setas simples indicam a marcação de neutrófilos na LP. Seta dupla indica marcação de neutrófilo no GM. A-B Barra: 100 µm; C-D Barra: 50 µm; E-F Barra: 20 µm.

Figura 9 - Fotomicrografia da parede do íleo com neutrófilos marcados por histoquímica da MPO dos grupos sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h e I/R BBG-100 24 h.

(LP) Lâmina Própria, (MC) Músculo Circular. Setas simples indicam a marcação de neutrófilos na LP. Setas duplas indicam marcação de neutrófilo nas camadas musculares. A-D Barra: 100 µm; E-H Barra: 50 µm; I-L Barra: 20 µm.

Figura 10 - Fotomicrografia da parede do íleo com neutrófilos marcados por histoquímica da MPO dos grupos sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

(LP) Lâmina Própria, (MC) Músculo Circular. Setas simples indicam a marcação de neutrófilos na LP. Setas duplas indicam marcação de neutrófilo nas camadas musculares. A-D Barra: 100 µm; E-H Barra: 50 µm; I-L Barra: 20 µm.

4.5 Efeitos Qualitativos Histológicos da I/R

A morfologia da parede intestinal foi analisada pelo método de HE. Os animais do grupo sham 0 h não apresentaram alterações morfológicas aparentes. A parede intestinal apresentou-se com a mucosa revestida por epitélio com a presença de vilosidades e com as células caliciformes. As criptas ou glândulas intestinais foram características em todos os grupos analisados (Figuras 11, 12 e 13).

No grupo I/R 0 h, o topo das vilosidades pareceu estar destruído, como consequência da isquemia, no entanto, nas vilosidades estavam presentes as células caliciformes. A região das glândulas intestinais pareceu estar edemaciada quando comparada com o grupo sham, sendo restaurada nos grupos I/R BBG-50 e BBG-100 de 14 dias (Figuras 11, 12 e 13).

A musculatura circular pareceu estar mais espessa no grupo I/R 0 h. Além disso, o plexo mioentérico pareceu estar com a presença de mais vacúolos no grupo I/R 0 h quando comparado aos grupos I/R salina 24 h e 14 dias. Não foram observados eosinófilos ao redor do plexo mioentérico em todos os grupos analisados (Figuras 11, 12 e 13).

A aparência do íleo nos grupos I/R BBG-50 e BBG-100 de 24 h e 14 dias pareceu similar aos grupos controle e sham (Figuras 11, 12 e 13).

Figura 11 - Fotomicrografia da parede do íleo dos grupos sham 0 h e I/R 0 h.

Aspecto geral da parede intestinal (A-A'); Camadas da parede intestinal (B-C'); Detalhe do plexo mioentérico (D-D'); (V) Vilosidades, (GM) Gânglio Mioentérico, (MC) Músculo Circular, (ML) Músculo Longitudinal; Setas indicam neurônios entéricos. H.E. A-A' Barra: 100 µm; B-B' Barra: 50 µm; C-C' Barra: 20 µm; D-D' Barra: 10 µm.

Figura 12 - Fotomicrografia da parede do íleo dos grupos sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h e I/R BBG-100 24 h.

Aspecto geral da parede intestinal (A, B, C, D); Camadas da parede intestinal (A', B', C', D'); (V) Vilosidades, (GM) Gânglio Mioentérico, (MC) Músculo Circular, (ML) Músculo Longitudinal. H.E. ABCD Barra: 100 µm; A'B'C'D' Barra: 50 µm; A''B''C''D'' Barra: 20 µm.

Figura 13 - Fotomicrografia da parede do íleo dos grupos sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

Aspecto geral da parede intestinal (A, B, C, D); Camadas da parede intestinal (A', B', C', D'); (V) Vilosidades, (GM) Gânglio Mioentérico, (MC) Músculo Circular, (ML) Músculo Longitudinal. H.E. ABCD Barra: 100 µm; A'B'C'D' Barra: 50 µm; A''B''C''D'' Barra: 20 µm.

4.6 Efeitos Quantitativos da I/R sobre as Duplas Marcações, Densidades e Morfometria dos Neurônios Mioentéricos

4.6.1 Dupla Marcação do Receptor P2X7 com Neurônios Imunorreativos à NOS, ao NF, à ChAT e ao anti-Hu

Foi realizado o estudo de dupla marcação dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7 com a NOS, o NF, a ChAT e com o anti-Hu. Os resultados são demonstrados nas tabelas 4, 5, 6 e 7.

A marcação dos neurônios NOS-ir demonstrou em todos os grupos estudados dupla marcação de 100% com os neurônios que expressavam o receptor P2X7 (Tabela 4).

No grupo controle, ao analisar o receptor P2X7 nos neurônios, observou-se que a dupla marcação com a NOS foi de $24,5 \pm 0,6\%$. Nos grupos sham com 0 h, 24 h e 14 dias as duplas marcações foram de $20,5 \pm 1,3\%$, $25,0 \pm 1,0\%$ e $26,5 \pm 1,6\%$, respectivamente (Tabela 4).

Nos grupos I/R 0 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h e I/R BBG-100 24 h, as duplas marcações do receptor P2X7 com neurônios NOS-ir foram de $26,5 \pm 1,4\%$, $22,5 \pm 1,4\%$, $24,5 \pm 1,1\%$ e $24,5 \pm 1,0\%$, respectivamente. E nos grupos I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias os valores foram de $27,5 \pm 3,5\%$, $23,0 \pm 1,5\%$ e $22,5 \pm 1,7\%$, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 - Dupla marcação dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X7 e à NOS nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

<i>Grupos</i>	<i>NOS/P2X7(%)</i>	<i>P2X7/NOS(%)</i>
Controle	100	$24,5 \pm 0,6$
Sham 0 h	100	$20,5 \pm 1,3$
I/R 0 h	100	$26,5 \pm 1,4$
Sham 24 h	100	$25,0 \pm 1,0$
I/R salina 24 h	100	$22,5 \pm 1,4$
I/R BBG-50 24 h	100	$24,5 \pm 1,1$
I/R BBG-100 24 h	100	$24,5 \pm 1,0$
Sham 14 dias	100	$26,5 \pm 1,6$
I/R salina 14 dias	100	$27,5 \pm 3,5$
I/R BBG-50 14 dias	100	$23,0 \pm 1,5$
I/R BBG-100 14 dias	100	$22,5 \pm 1,7$

Os dados são de n=5 e expressos em média $\pm$ erro padrão.

As duplas marcações dos neurônios NF-ir com o receptor P2X7 nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14

dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias demonstraram dupla marcação em 100% (Tabela 5).

No grupo controle, ao analisar o receptor P2X7 nos neurônios, observou-se que a dupla marcação com o NF foi de $31,5 \pm 0,8\%$. Nos grupos sham com 0 h, 24 h e 14 dias, as duplas marcações foram de $32,0 \pm 1,2\%$, $31,7 \pm 1,9\%$ e $33,0 \pm 1,6\%$, respectivamente (Tabela 5).

Nos grupos I/R 0 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h e I/R BBG-100 24 h, as duplas marcações do receptor P2X7 com neurônios NF-ir foram de $34,7 \pm 1,5\%$, $33,0 \pm 2,4\%$, $29,2 \pm 0,8\%$ e $32,7 \pm 1,8\%$, respectivamente. E nos grupos I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias os valores foram de $28,7 \pm 1,0\%$, $31,7 \pm 1,7\%$ e $29,2 \pm 1,0\%$, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Dupla marcação dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X7 e ao NF nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

<i>Grupos</i>	<i>NF-200/P2X7(%)</i>	<i>P2X7/NF-200(%)</i>
Controle	100	$31,5 \pm 0,8$
Sham 0 h	100	$32,0 \pm 1,2$
I/R 0 h	100	$34,7 \pm 1,5$
Sham 24 h	100	$31,7 \pm 1,9$
I/R salina 24 h	100	$33,0 \pm 2,4$
I/R BBG-50 24 h	100	$29,2 \pm 0,8$
I/R BBG-100 24 h	100	$32,7 \pm 1,8$
Sham 14 dias	100	$33,0 \pm 1,6$
I/R salina 14 dias	100	$28,7 \pm 1,0$
I/R BBG-50 14 dias	100	$31,7 \pm 1,7$
I/R BBG-100 14 dias	100	$29,2 \pm 1,0$

Os dados são de n=5 e expressos em média $\pm$ erro padrão.

Os neurônios ChAT-ir com o receptor P2X7 demonstraram dupla marcação em 100% em todos os grupos estudados (Tabela 6).

No grupo controle, ao analisar o receptor P2X7 nos neurônios, observou-se que a dupla marcação com a ChAT foi de $42,6 \pm 2,3\%$. Nos grupos sham com 0 h, 24 h e 14 dias, as duplas marcações foram de $42,7 \pm 1,0\%$, $45,0 \pm 2,0\%$ e $41,5 \pm 1,3\%$, respectivamente (Tabela 6).

Nos grupos I/R 0 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h e I/R BBG-100 24 h, as duplas marcações do receptor P2X7 com neurônios ChAT-ir foram de $44,5 \pm 0,7\%$, $43,5 \pm 1,5\%$, $44,0 \pm 0,6\%$ e $45,5 \pm 1,6\%$, respectivamente. E nos grupos I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14

dias e I/R BBG-100 14 dias os valores foram de $42,0 \pm 0,5\%$, $41,5 \pm 1,3\%$ e $43,5 \pm 0,9\%$, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Dupla marcação dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X7 e à ChAT nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

<i>Grupos</i>	<i>ChAT/P2X7(%)</i>	<i>P2X7/ChAT(%)</i>
Controle	100	$42,6 \pm 2,3$
Sham 0 h	100	$42,7 \pm 1,0$
I/R 0 h	100	$44,5 \pm 0,7$
Sham 24 h	100	$45,0 \pm 2,0$
I/R salina 24 h	100	$43,5 \pm 1,5$
I/R BBG-50 24 h	100	$44,0 \pm 0,6$
I/R BBG-100 24 h	100	$45,5 \pm 1,6$
Sham 14 dias	100	$41,5 \pm 1,3$
I/R salina 14 dias	100	$42,0 \pm 0,5$
I/R BBG-50 14 dias	100	$41,5 \pm 1,3$
I/R BBG-100 14 dias	100	$43,5 \pm 0,9$

Os dados são de $n=5$ e expressos em média $\pm$ erro padrão.

Houve dupla marcação de 100% dos neurônios imunorreativos ao pan-neuronal anti-HuC/D com o receptor P2X7 nos grupos estudados (Tabela 7).

Por outro lado, ao analisar o receptor P2X7 nos neurônios, observou-se que nos animais do grupo controle a dupla marcação foi de $82,0 \pm 2,1\%$. Nos grupos sham com 0 h, 24 h e 14 dias, as duplas marcações foram de $82,0 \pm 1,3\%$, $85,5 \pm 1,5\%$ e $80,7 \pm 0,8\%$, respectivamente (Tabela 7).

Nos grupos I/R 0 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h e I/R BBG-100 24 h, as duplas marcações do receptor P2X7 com neurônios anti-Hu-ir foram de $81,5 \pm 1,6\%$, $83,5 \pm 1,8\%$, $83,0 \pm 2,4\%$ e $83,0 \pm 1,6\%$, respectivamente. E nos grupos I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias os valores foram de $81,0 \pm 0,6\%$, $80,0 \pm 2,5\%$ e $81,5 \pm 0,8\%$, respectivamente (Tabela 7).

Ao analisar a Tabela 7, observa-se que houve células somente imunorreativas ao receptor P2X7 que não eram imunorreativas ao pan-neuronal anti-HuC/D, portanto não eram neurônios. Nos grupos estudados esta porcentagem foi ao redor de $17,9 \pm 1,6\%$, e não houve diferença entre os grupos.

Tabela 7 - Dupla marcação dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X7 e ao pan-neuronal anti-Hu nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

<i>Grupos</i>	<i>Hu/P2X7(%)</i>	<i>Hu(%)</i>	<i>P2X7/Hu(%)</i>	<i>P2X7(%)</i>
Controle	100	0	82,0±2,1	18,0±2,1
Sham 0 h	100	0	82,0±1,3	18,0±1,3
I/R 0 h	100	0	81,5±1,6	19,5±1,6
Sham 24 h	100	0	85,5±1,5	14,6±1,5
I/R salina 24 h	100	0	83,5±1,8	16,5±1,8
I/R BBG-50 24 h	100	0	83,0±2,4	17,0±2,4
I/R BBG100 24 h	100	0	83,0±1,6	17,0±1,6
Sham 14 dias	100	0	80,7±0,8	19,3±0,8
I/R salina 14 dias	100	0	81,0±0,6	19,0±0,6
I/R BBG-50 14 dias	100	0	80,0±2,5	20,0±2,5
I/R BBG-100 14 dias	100	0	81,5±0,8	18,5±0,8

Os dados são de n=5 e expressos em média ± erro padrão.

4.6.2 Efeitos da I/R sobre as Densidades Neuronais

A densidade neuronal (neurônios/cm²) foi obtida a partir da contagem dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7, à NOS, ao NF, à ChAT e ao anti-Hu em 40 campos com o aumento de 100X.

As células imunorreativas ao receptor P2X7 dos grupos sham 0 h, 24 h e 14 dias não apresentaram diferenças significantes ($p>0,05$) quando comparadas ao grupo controle (Figura 14A).

As células imunorreativas ao receptor P2X7 do grupo I/R 0 h não apresentaram diferenças significantes ($p>0,05$) quando comparadas com o grupo sham 0 h. Os grupos I/R salina, BBG-50 e BBG-100 24 h apresentaram uma diminuição significativa ($p<0,001$) em torno de 28%, 17% e 23%, respectivamente, quando comparados ao grupo sham 24 h. O grupo I/R salina 14 dias apresentou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 22% na densidade das células imunorreativas ao receptor P2X7, quando comparado com o grupo sham de 14 dias. E quando comparado com os grupos I/R BBG-50 e I/R BBG-100 14 dias apresentou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 15% e 21%, respectivamente. Os grupos I/R BBG-50 e BBG-100 14 dias não apresentaram diferenças significantes quando comparados com o grupo sham (Figura 14A).

Os neurônios imunorreativos à NOS dos grupos sham 0 h, 24 h e 14 dias não apresentaram diferenças significantes ($p>0,05$) quando comparados ao grupo controle. O grupo I/R 0 h apresentou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 42,5% quando comparado com o grupo sham 0 h. O grupo I/R salina 24 h apresentou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 36% e 23% em relação aos grupos sham e I/R BBG-50 24 h, respectivamente. Os grupos I/R BBG-50 e I/R BBG-100 apresentaram uma diminuição significativa ($p<0,05$) de 17% e 31%, respectivamente, quando comparados com o grupo sham (Figura 14B).

Os neurônios NOS-ir no grupo I/R salina 14 dias apresentaram uma diminuição significativa ($p<0,001$) da densidade de 45% e 20% quando comparados com os grupos sham e I/R BBG-50 14 dias, respectivamente. Nos grupos I/R BBG-50 e BBG-100 houve uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 33%, quando comparados ao grupo sham de 14 dias (Figura 14B).

Em relação aos neurônios NF-ir, os grupos sham 0, 24 h e 14 dias não apresentaram diferenças significantes ($p>0,05$) quando comparados com o grupo controle. O grupo I/R 0 h apresentou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 26% na densidade quando comparado aos animais do grupo sham 0 h. O grupo I/R salina 24 h apresentou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 40% e 23% quando comparado aos grupos sham e I/R BBG-50 24 h, respectivamente. Os grupos I/R BBG-50 e I/R BBG-100 24 h apresentaram uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 21% e 24%, respectivamente, quando comparados com o grupo sham 24 h. O grupo I/R salina 14 dias apresentou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 34,5% e 24% na densidade dos neurônios NF-ir quando comparado com os grupos sham e I/R BBG-50 14 dias, respectivamente. O grupo I/R BBG-50 14 dias não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo sham, enquanto que o grupo I/R BBG-100 apresentou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 29% (Figura 14C).

Figura 14 - Histograma da densidade das células imunorreativas ao receptor P2X7 (A), à NOS (B) e ao NF (C) dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

Os dados são de n=5 e expressos em média $\pm$ erro padrão. ($p < 0,001$) (* comparado com o grupo sham; # comparado com o grupo I/R BBG-50; π comparado com o grupo I/R BBG-100).

Os neurônios ChAT-ir dos grupos sham 0 h, 24 h e 14 dias não apresentaram diferenças significantes ($p > 0,05$) quando comparados com o grupo controle. O grupo I/R 0 h apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,001$) de 29% na densidade quando comparado

aos animais do grupo sham 0 h. O grupo I/R salina 24 h apresentou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 18% quando comparado ao grupo sham de 24 h. Os grupos I/R BBG-50 e BBG-100 24 h apresentaram uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 13% e 19,5%, respectivamente, quando comparados ao grupo sham 24 h. Nos grupos de 14 dias, o grupo I/R salina apresentou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 38% na densidade dos neurônios ChAT-ir quando comparado com os grupos sham e I/R BBG-50, e quando comparado com o grupo I/R BBG-100 apresentou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 26%. O grupo I/R BBG-50 14 dias não apresentou diferença ao ser comparado com o grupo sham, enquanto que o grupo I/R BBG-100 14 dias apresentou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 17% (Figura 15A).

Em relação aos neurônios anti-Hu-ir, os grupos sham 0 h, 24 h e 14 dias não apresentaram diferenças significantes ($p>0,05$) quando comparados com o grupo controle. O grupo I/R 0 h apresentou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 43% na densidade quando comparado aos animais do grupo sham 0 h. O grupo I/R salina 24 h apresentou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 41,5% quando comparado ao grupo sham 24 h. Os grupos I/R BBG-50 e BBG-100 24 h apresentaram uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 41% e 39%, respectivamente. O grupo I/R salina 14 dias apresentou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 40,5% na densidade dos neurônios anti-Hu-ir quando comparado com o grupo sham 14 dias. Os grupos I/R BBG-50 e I/R BBG-100 14 dias apresentaram uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 36% e 27,5%, respectivamente (Figura 15B).

Figura 15 - Histograma da densidade dos neurônios imunorreativos à ChAT (A) e ao anti-Hu (B) dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

Os dados são de n=5 e expressos em média $\pm$ erro padrão. ($p < 0,001$) (* comparado com o grupo sham; # comparado com o grupo I/R BBG-50; π comparado com o grupo I/R BBG-100).

4.6.3 Efeitos da I/R sobre a Área do Perfil Neuronal

Foram avaliados a área do perfil do corpo celular, o DMáx e o DMín dos neurônios imunorreativos à NOS, ao NF, à ChAT e ao anti-Hu.

Houve uma diminuição significativa de 11% na área do perfil dos neurônios NOS-ir do grupo sham 0 h quando comparado com o grupo controle. E uma diminuição significativa de 7% no DMáx e DMín (Figura 16, Tabela 8).

O grupo I/R 0 h não apresentou diferença na área do perfil, DMáx e DMín quando comparado com o grupo sham 0 h (Figura 16, Tabela 8).

A análise comparativa dos neurônios imunorreativos à NOS no grupo I/R salina 24 h apresentou um aumento de 25% na área do perfil e 10% no DMín quando comparado com o grupo sham. O DMáx não apresentou diferença entre os grupos (Figura 16, Tabela 8).

Em relação aos grupos I/R BBG-50 e BBG-100 24 h, os neurônios NOS-ir não apresentaram diferenças nos valores da área do perfil neuronal, DMáx e DMín, quando comparados com o grupo sham 24 h (Figura 16, Tabela 8).

A análise comparativa da área do perfil dos neurônios NOS-ir nos grupos I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 14 dias não apresentou diferenças significantes quando comparados com o grupo sham 14 dias. Não houve diferença no DMáx e DMín nesses mesmos grupos (Figura 16, Tabela 8).

Figura 16 - Área do perfil do corpo celular dos neurônios imunorreativos à NOS dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

Os dados são de n=5 e expressos em média $\pm$ erro padrão. ($p < 0,001$) (α comparado com o grupo controle; * comparado com o grupo sham; # comparado com o grupo I/R BBG-50; π comparado com o grupo I/R BBG-100).

Tabela 8 - Valores do DMáx e do DMín dos neurônios imunorreativos à NOS dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

<i>Grupos</i>	<i>DMáx (μm)</i>	<i>DMín (μm)</i>
Controle	41,8±0,3	17,1±0,2
Sham 0 h	39,9±0,2 α	15,9±0,1α
I/R 0 h	39,1±0,7 α	16,1±0,2 α
Sham 24 h	43,2±0,6	16,2±0,3
I/R salina 24 h	45,4±0,4	17,8±0,1*
I/R BBG-50 24 h	39,4±0,6	16,9±0,1
I/R BBG-100 24 h	43,9±0,4	16,5±0,3
Sham 14 dias	38,8±0,6	16,4±0,4
I/R salina 14 dias	41,8±0,9*	16,2±0,4
I/R BBG-50 14 dias	40,9±0,2	15,2±0,3
I/R BBG-100 14 dias	41,2±0,9	15,6±0,1

Os dados são de n=5 e expressos em média ± erro padrão. ($p < 0,001$) (α comparado com o grupo controle; * comparado com o grupo sham).

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores da área do perfil, DMáx e DMín dos neurônios NF-ir, entre o grupo controle e os grupos sham (Figura 17, Tabela 9).

O grupo I/R 0 h apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,001$) de 21% na área do perfil quando comparado com o grupo sham 0 h. Os valores de DMáx e DMín apresentaram diminuição significativa ($p < 0,001$) de 4% e 19,5%, respectivamente, quando comparados com o grupo sham (Figura 17, Tabela 9).

O grupo I/R salina 24 h apresentou um aumento significativo ($p < 0,001$) de 13% na área do perfil neuronal quando comparado com o grupo sham de 24 h. e, os grupos I/R BBG-50 e BBG-100 não apresentaram diferenças (Figura 17, Tabela 9).

Os grupos I/R salina 14 dias e BBG-100 não apresentaram diferenças significantes na área do perfil neuronal, DMáx e DMín quando comparados com o grupo sham de 14 dias. O grupo I/R BBG-50 apresentou uma diminuição significativa na área do perfil neuronal ($p < 0,001$) de 12% e 14%, quando comparado com os grupos sham e I/R BBG-100, respectivamente (Figura 17, Tabela 9).

Figura 17 - Área do perfil do corpo celular dos neurônios imunorreativos ao NF dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

Os dados são de n=5 e expressos em média $\pm$ erro padrão. ($p < 0,001$) (* comparado com o grupo sham; # comparado com o grupo I/R BBG-50; π comparado com o grupo I/R BBG-100).

Tabela 9 - Valores do DMáx e do DMín dos neurônios imunorreativos ao NF dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

Grupos	DMáx (μm)	DMín (μm)
Controle	39,0 $\pm$ 1,0	19,6 $\pm$ 0,5
Sham 0 h	35,6 $\pm$ 0,2	21,4 $\pm$ 0,3
I/R 0 h	35,1 $\pm$ 1,5 *	17,2 $\pm$ 0,6 *
Sham 24 h	37,1 $\pm$ 1,3	19,4 $\pm$ 0,7
I/R salina 24 h	42,8 $\pm$ 2,0 * # π	19,3 $\pm$ 0,9
I/R BBG-50 24 h	34,8 $\pm$ 0,7	19,6 $\pm$ 0,2
I/R BBG-100 24 h	35,9 $\pm$ 0,5	19,4 $\pm$ 0,4
Sham 14 dias	36,1 $\pm$ 0,9	21,6 $\pm$ 0,4
I/R salina 14 dias	37,3 $\pm$ 0,3	19,4 $\pm$ 0,5
I/R BBG-50 14 dias	35,4 $\pm$ 0,4	19,3 $\pm$ 0,7
I/R BBG-100 14 dias	37,1 $\pm$ 1,2	21,3 $\pm$ 0,6

Os dados são de n=5 e expressos em média $\pm$ erro padrão. ($p < 0,001$) (* comparado com o grupo sham; # comparado com o grupo I/R BBG-50; π comparado com o grupo I/R BBG-100).

Houve um aumento significativo de 8% na área do perfil e de 10 % no DMín dos neurônios ChAT-ir do grupo sham 0 h quando comparado com o grupo controle. Enquanto que no DMáx não houve diferença significativa (Figura 18, Tabela 10).

O grupo I/R 0 h não apresentou diferença na área do perfil, DMáx e DMín quando comparado com o grupo sham 0 h (Figura 18, Tabela 10).

A análise comparativa dos neurônios imunorreativos à ChAT nos grupos I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 24 h apresentaram um aumento na área do perfil de 21%, 17% e 14%, respectivamente, quando comparados com o grupo sham 24 h. E um aumento no DMín de 16%, 15% e 11%, respectivamente. O DMáx não apresentou diferença entre os grupos estudados (Figura 18, Tabela 10).

Os grupos I/R salina 14 dias apresentou um aumento da área do perfil de 8% quando comparado com o grupo sham de 14 dias. Os grupos I/R BBG-50 e I/R BBG-100 14 dias, não apresentaram diferenças quando comparados com o grupo sham. Os valores de DMáx apresentaram um aumento significativo de 9%, 15% e 11% nos grupos I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 14 dias, respectivamente, quando comparados com o grupo sham. O DMín dos mesmos grupos, não apresentou diferença (Figura 18, Tabela 10).

Figura 18 - Área do perfil do corpo celular dos neurônios imunorreativos à ChAT dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R 14 dias BBG-50 e I/R BBG-100 14 dias.

Os dados são de n=5 e expressos em média $\pm$ erro padrão. ($p < 0,001$) (α comparado com o grupo controle; * comparado com o grupo sham).

Tabela 10 - Valores do DMáx e do DMín dos neurônios imunorreativos à ChAT dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

<i>Grupos</i>	<i>DMáx (μm)</i>	<i>DMín (μm)</i>
Controle	28,3±0,1	15,1±0,1
Sham 0 h	27,4±0,4	16,6±0,2 α
I/R 0 h	29,5±0,2	16,2±0,3 α
Sham 24 h	29,1±0,4	14,5±0,2
I/R salina 24 h	29,4±0,5	16,7±0,1 *
I/R BBG-50 24 h	28,6±0,3	16,7±0,1 *
I/R BBG-100 24 h	29,0±0,2	16,0±0,2 *
Sham 14 dias	28,5±0,6	16,6±0,1
I/R salina 14 dias	31,2±0,3 *	16,4±0,1
I/R BBG-50 14 dias	32,8±0,5 *	15,6±0,2
I/R BBG-100 14 dias	31,5±0,6 *	15,5±0,3

Os dados são de n=5 e expressos em média ± erro padrão. ($p < 0,001$) (α comparado com o grupo controle; * comparado com o grupo sham).

Não houve diferença nos valores da área do perfil, DMáx e DMín dos neurônios anti-Hu-ir, entre o grupo controle e os grupos sham (Figura 19, Tabela 11).

O grupo I/R 0 h não apresentou diferença na área do perfil, DMáx e DMín quando comparado com o grupo sham 0 h (Figura 19, Tabela 11).

A análise comparativa dos neurônios imunorreativos ao anti-Hu nos grupos I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 24 h apresentou um aumento de 9%, 12% e 17%, respectivamente, quando comparados com o grupo sham. O DMáx apresentou aumento de 10% apenas no grupo I/R BBG-100 quando comparado com o grupo sham. O DMín não apresentou diferenças entre os grupos estudados (Figura 19, Tabela 11).

Os grupos I/R salina e I/R BBG-50 14 dias não apresentaram diferenças da área do perfil, DMáx e DMín, quando comparados com o grupo sham de 14 dias. O grupo I/R BBG-100 14 dias apresentou um aumento de 18% na área do perfil e de 13% no DMáx, quando comparado com o grupo sham. O DMín desse mesmo grupo não apresentou diferença (Figura 19 Tabela 11).

Figura 19 - Área do perfil do corpo celular dos neurônios imunorreativos ao anti-Hu dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

Os dados são de n=5 e expressos em média $\pm$ erro padrão. ($p < 0,001$) (* comparado com o grupo sham).

Tabela 11 - Valores do DMáx e do DMín dos neurônios imunorreativos ao anti-Hu dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R 14 dias BBG-50 e I/R BBG-100 14 dias.

Grupos	DMáx (μm)	DMín (μm)
Controle	27,2 $\pm$ 0,5	14,6 $\pm$ 0,3
Sham 0 h	27,0 $\pm$ 0,6	14,3 $\pm$ 0,3
I/R 0 h	27,6 $\pm$ 0,4	14,1 $\pm$ 0,1
Sham 24 h	27,1 $\pm$ 0,6	14,4 $\pm$ 0,3
I/R salina 24 h	27,7 $\pm$ 0,2	15,5 $\pm$ 0,3
I/R BBG-50 24 h	27,9 $\pm$ 0,8	15,7 $\pm$ 0,6
I/R BBG-100 24 h	29,7 $\pm$ 0,8 *	15,5 $\pm$ 0,3
Sham 14 dias	27,8 $\pm$ 0,5	14,6 $\pm$ 0,4
I/R salina 14 dias	28,4 $\pm$ 0,7	14,7 $\pm$ 0,4
I/R BBG-50 14 dias	28,9 $\pm$ 0,6	14,7 $\pm$ 0,3
I/R BBG-100 14 dias	31,3 $\pm$ 0,5 *	15,5 $\pm$ 0,2

Os dados são de n=5 e expressos em média $\pm$ erro padrão. ($p < 0,001$) (* comparado com o grupo sham).

4.6.4 Efeitos da I/R sobre a Distribuição dos Neurônios Mioentéricos Imunorreativos à NOS, NF, ChAT e anti-Hu de acordo com a Área do Perfil

Na análise dos neurônios NOS-ir nos grupos controle, sham 0 h e I/R 0 h a área do perfil variou de 100 a 1100 μm^2 . No grupo controle 74% dos neurônios estavam entre 400 e 700 μm^2 enquanto que nos grupos sham e I/R 0 h a maioria dos neurônios (74% e 64%, respectivamente) estavam entre 300 e 600 μm^2 , mostrando que houve diminuição da área do

perfil do corpo celular dos neurônios imunorreativos à NOS nesses grupos, quando comparados com o grupo controle (Figura 20).

Nos grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 24 h, a área do perfil dos neurônios variou de 100 a 1400 μm^2 . No grupo sham 84% dos neurônios estavam entre 300 e 700 μm^2 enquanto que no grupo I/R salina 90% dos neurônios estavam entre 400 e 900 μm^2 , indicando um aumento da área do perfil neuronal no grupo I/R salina 24 h. Nos grupos I/R BBG-50 e BBG-100 24 h 82% dos neurônios estavam entre 300 e 700 μm^2 , mostrando que não houve diferença na área do perfil dos neurônios NOS-ir quando comparados com o grupo sham 24 h (Figura 20).

Nos grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 14 dias, a área do perfil dos neurônios variou de 200 a 1600 μm^2 . Aproximadamente 80% dos neurônios dos quatro grupos estavam entre 300 e 700 μm^2 , mostrando que os grupos são idênticos (Figuras 20).

Figura 20 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) dos neurônios NOS-ir no íleo de ratos dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias, I/R BBG-100 14 dias.

Na análise dos neurônios NF-ir nos grupos controle, sham 0 h e I/R 0 h a área do perfil variou de 200 a 1100 μm^2 . Nos grupos controle e sham a maioria dos neurônios (67% e 75%) estava entre 400 e 700 μm^2 enquanto que no grupo I/R 79% dos neurônios estavam entre 300 e 600 μm^2 , mostrando que houve diminuição da área do perfil do corpo celular dos neurônios imunorreativos ao NF (Figura 21).

Nos grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 24 h a área do perfil dos neurônios variou de 100 a 1400 μm^2 . No grupo sham 75% dos neurônios estavam entre 400 e 700 μm^2 enquanto que no grupo I/R 83% dos neurônios estavam entre 400 e 800 μm^2 , indicando um aumento da área do perfil neuronal no grupo I/R salina 24 h. Nos grupos I/R BBG-50 e BBG-100 24 h 80% dos neurônios estavam entre 400 e 700 μm^2 , mostrando que não houve diferença na área do perfil dos neurônios NF-ir quando comparados com o grupo sham 24 h (Figura 21).

Nos grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 14 dias a área do perfil dos neurônios variou de 200 a 1200 μm^2 . Aproximadamente 70% dos neurônios desses grupos estavam entre 400 e 700 μm^2 , mostrando que os grupos são idênticos (Figura 21).

Figura 21 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) dos neurônios NF-ir no íleo de ratos dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

Na análise dos neurônios ChAT-ir nos grupos controle, sham 0 h e I/R 0 h a área do perfil variou de 100 a 1000 μm^2 . No grupo controle 80% dos neurônios estavam entre 200 e 400 μm^2 enquanto que nos grupos sham e I/R 0 h 80% dos neurônios estavam entre 300 e 500 μm^2 , mostrando que houve aumento da área do perfil do corpo celular dos neurônios imunorreativos à ChAT nos grupos sham e I/R, quando comparados com o grupo controle (Figura 22).

Nos grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 24 h a área do perfil dos neurônios variou de 100 a 1200 μm^2 . No grupo sham 82% dos neurônios estavam entre 200 e 400 μm^2 enquanto que nos grupos I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 80% dos neurônios estavam entre 200 e 500 μm^2 , mostrando que houve um aumento na área do perfil dos neurônios ChAT-ir quando comparados com o grupo sham 24 h (Figura 22).

Nos grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 14 dias a área do perfil dos neurônios variou de 100 a 1000 μm^2 . No grupo sham 82% dos neurônios estavam entre 200 e 500 μm^2 enquanto que no grupo I/R salina 90% dos neurônios estavam entre 200 e 600 μm^2 , indicando um aumento da área do perfil neuronal. Nos grupos I/R BBG-50 e BBG-100 24 h a maioria dos neurônios (90% e 80%, respectivamente) estavam entre 200 e 500 μm^2 , mostrando que não houve diferença na área do perfil dos neurônios ChAT-ir quando comparados com o grupo sham 24 h (Figura 22).

Figura 22 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) dos neurônios ChAT-ir no íleo de ratos dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias, I/R BBG-100 14 dias.

Na análise dos neurônios anti-Hu-ir nos grupos controle, sham 0 h e I/R 0 h a área do perfil variou de 100 a 1000 μm^2 . 90% dos neurônios estavam entre 100 e 500 μm^2 , mostrando que não houve alteração na área do perfil do corpo celular dos neurônios imunorreativos ao anti-Hu (Figura 23).

Nos grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 24 h a área do perfil dos neurônios variou de 100 a 900 μm^2 . No grupo sham 74% dos neurônios estavam entre 100 e 400 μm^2 enquanto que nos grupos I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 78% dos neurônios estavam entre 200 e 500 μm^2 , mostrando que houve um aumento na área do perfil dos neurônios anti-Hu-ir quando comparados com o grupo sham 24 h (Figura 23).

Nos grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 de 14 dias a área do perfil dos neurônios variou de 100 a 900 μm^2 . 70% dos neurônios estavam entre 200 e 500 μm^2 , mostrando que não houve alterações na área do perfil dos neurônios anti-Hu-ir nos grupos de 14 dias (Figura 23).

Figura 23 - Distribuição de frequência das áreas (μm^2) dos neurônios anti-Hu-ir no íleo de ratos dos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

4.8 Efeitos da I/R sobre a Expressão Proteica do Receptor P2X7

A expressão proteica do receptor P2X7 foi avaliada por western blotting nos extratos do plexo mioentérico juntamente com o músculo longitudinal de ratos sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias (n=3/grupo). A β -actina foi utilizada como normalizador. A expressão proteica do receptor P2X7 foi quantificada através da análise densitométrica e os valores são expressos em UA.

O grupo I/R 0 h não apresentou diferenças estatísticas significantes ao ser comparado com o grupo sham 0 h (Figura 24).

Os animais dos grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 24 h não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si. Porém foi observada uma tendência de aumento de 29% da expressão do receptor no grupo I/R salina 24 h quando comparado ao grupo sham, e da mesma forma foi observada uma tendência de diminuição de 26%, 43% e 35% no grupo I/R BBG-50 quando comparado com os grupos sham, I/R salina e I/R BBG-100 24 h, respectivamente (Figura 24).

Os animais dos grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 de 14 dias não apresentaram diferenças significantes quando comparados entre si (Figura 24).

Figura 24 - Análise da expressão proteica do receptor P2X7 nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

Os dados são de n=3 e expressos em média $\pm$ erro padrão.

4.9 Efeitos Quantitativos da I/R sobre a Distribuição de Neutrófilos

Os neutrófilos foram demonstrados pela reação de MPO e foram contados em três compartimentos: músculo longitudinal + plexo mioentérico (ML+PM), músculo circular (MC) e plexo submucoso + lâmina própria (PS+LP). Os neutrófilos não foram contados nas vilosidades devido à perda destas nos grupos isquêmicos.

Na camada do ML+PM os grupos sham e I/R 0 h apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) de aproximadamente 270% e 470%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle. O grupo I/R 0 h apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) de aproximadamente 43% quando comparado com o grupo sham 0 h (Figura 25A).

Os grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 24 h apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) de 200%, 770%, 670% e 1100%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. Os grupos I/R salina e I/R BBG-50 24 h apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) de 190% e 160%, respectivamente, em relação ao grupo sham. O grupo I/R BBG-100 apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) de 310% e 42% quando comparado aos grupos sham e I/R salina, respectivamente (Figura 25A).

Com 14 dias, os grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) de 200%, 800%, 600% e 700%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. Os grupos I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 14 dias apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) de 200%, 130% e 170%, respectivamente, em relação ao grupo sham (Figura 25A).

Na camada do MC os grupos sham e I/R 0 h apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) de aproximadamente 270% ao serem comparados ao grupo controle. O grupo I/R 0 h não apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo sham 0 h (Figura 25B).

Os grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 de 24 h apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) de 200%, 320%, 160% e 60%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. O grupo I/R salina apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) de 40%, 60% e 160% quando comparado com os grupos sham, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 24 h, respectivamente. O grupo I/R BBG-100 apresentou uma diminuição significativa ($p<0,05$) de 47% e 62% quando comparado aos grupos sham e I/R salina (Figura 25B).

Com 14 dias, os grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) de 220%, 400%, 220% e 260%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. O grupo I/R salina 14 dias apresentou um aumento significativo

($p<0,05$) de 56% em relação ao grupo sham. Os grupos I/R BBG-50 e BBG-100 não apresentaram diferenças quando comparados ao mesmo grupo (Figura 25B).

Na camada do PS+LP os grupos sham e I/R 0 h apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) de aproximadamente 49% e 100%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. O grupo I/R 0 h apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) de 37% quando comparado ao grupo sham 0 h (Figura 25C).

Os grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 de 24 h apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) de 57%, 100%, 45% e 50%, respectivamente, quando comparados com o grupo controle. O grupo I/R salina apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) de 28%, 40% e 34% ao ser comparado aos grupos sham, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 24 h, respectivamente. Os grupos I/R BBG-50 e BBG-100 não apresentaram diferenças significantes quando comparados com o grupo sham (Figura 25C).

Com 14 dias, os grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 apresentaram um aumento significativo ($p<0,05$) de 50%, 100%, 71% e 78%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. O grupo I/R salina 14 dias apresentou um aumento significativo ($p<0,05$) de 38%, 20% e 15% em relação ao grupo sham. Os grupos I/R BBG-50 e BBG-100 não apresentaram diferenças quando comparados ao mesmo grupo (Figura 25C).

Figura 25 - Número de neutrófilos marcados pela técnica histoquímica da MPO nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias nas camadas ML+PM (A), MC (B) e PS+LP (C).

Os dados são de $n=3$ e expressos em média $\pm$ erro padrão. ($p < 0,05$) (α comparado com o grupo controle; * comparado com o grupo sham; # comparado com o grupo I/R BBG-50; π comparado com o grupo I/R BBG-100; Ω comparado com o grupo I/R salina) ML+PM: músculo longitudinal + plexo mioentérico; MC: músculo circular; PS+LP: plexo submucoso + lâmina própria.

4.10 Efeitos da I/R sobre a Motilidade Intestinal

4.10.1 Atividade Espontânea no Íleo

Após a fase de equilíbrio dos tecidos, foi realizada a medida da atividade espontânea do íleo em todos animais dos diferentes grupos estudados ($n=3/\text{grupo}$). Para quantificar a atividade espontânea da região do íleo foi determinado o índice de motilidade (frequência de contrações X média da amplitude de contração).

O índice de motilidade variou entre 1,0 e 1,3 g entre os grupos (Figura 26A).

O grupos sham e I/R 0 h não apresentaram diferenças significantes na atividade espontânea quando comparados entre si e com o grupos controle (Figura 26B).

Nos grupos de 24 h, o grupo sham demonstrou uma tendência a diminuição de aproximadamente 15% quando comparado aos grupos controle e sham 0 h. O grupo I/R salina 24 h apresentou uma tendência à diminuição de 16% quando comparado ao grupo controle. O grupo I/R salina 24 h ao ser comparado aos grupos I/R 0 h e I/R salina 14 dias, apresentou uma diminuição significativa ($p<0,05$) de 23% e 16%, respectivamente. O grupo I/R salina 24 h ao ser comparado com os grupos I/R BBG-50 e BBG-100 24 h, apresentou uma diminuição significativa ($p<0,05$) de 17% (Figura 26B).

O grupo I/R salina 24 h ao ser comparado aos grupos I/R BBG-50 e BBG-100 14 dias, apresentou uma diminuição significativa ($p<0,05$) de aproximadamente 14% (Figura 26B).

Não houve diferença significativa entre os grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 14 dias quando comparados ao grupo controle e entre si (Figura 26B).

Figura 26 - Segmentos de registros mecanográficos demonstrando a atividade espontânea (A) e histograma da atividade espontânea (B) do íleo de ratos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 dias, I/R salina 24 dias, I/R BBG-50 24 dias, I/R BBG-100 24 dias, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 dias e I/R BBG-100 14 dias.

Os dados são de $n=3$ e expressos em média $\pm$ erro padrão. $p<0,05$ (* comparado com os grupos I/R 0 h e I/R salina 14 dias; # comparado com os grupos I/R BBG-50 e 100 24 h; π comparado com os grupos I/R BBG-50 e 100 14 dias).

4.10.2 Efeitos do ATP e SNP na Atividade Espontânea do Íleo

O SNP foi aplicado em dose única de 100 μ M, e induziu relaxamento do íleo que ocorreu imediatamente após a aplicação da droga, como visto na figura representativa 27A.

No grupo controle, a aplicação do SNP causou uma redução de 47% da atividade espontânea do íleo. No grupos sham e I/R 0 h, observou-se que houve um relaxamento de 52% e 46%, respectivamente, porém não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 27B).

No período de 24 h, o SNP causou uma diminuição da atividade espontânea nos grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 de 67%, 58%, 47% e 55%, respectivamente, com diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos controle e sham e entre os grupos sham e I/R BBG-50. O grupo I/R BBG-50 24 h apresentou um menor relaxamento ao ser comparado com o grupo I/R salina 24 h (Figura 27B).

No período de 14 dias, os grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 apresentaram relaxamento do íleo com os valores de 58%, 47%, 41% e 44%, respectivamente, no entanto, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 27B).

Figura 27 - Segmentos de registros mecanográficos que mostram os efeitos de relaxamento do SNP aplicado em uma concentração única (100 μ M) (A) e histograma dos efeitos do SNP na atividade espontânea (B) no íleo de ratos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 dias, I/R salina 24 dias, I/R BBG-50 24 dias, I/R BBG-100 24 dias, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 dias e I/R BBG-100 14 dias.

Os dados são de n=3 e expressos em média $\pm$ erro padrão. $p < 0,05$ (α comparado com o grupo controle; # comparado com o grupo I/R BBG-50 24 h).

O ATP foi adicionado na concentração de 100 μ M em uma dose única, e induziu relaxamento do íleo logo após a sua aplicação, como observado na figura 28A.

No grupo controle, o ATP causou uma redução de 20% da atividade espontânea do íleo. Nos grupos sham e I/R 0 h, observou-se que houve um relaxamento de 13% e 19%, respectivamente, no entanto não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 28B).

No período de 24 h, o ATP causou uma diminuição da atividade espontânea em 17%, 18%, 12% e 20% nos grupos sham, I/R salina, I/R BBG-50 e I/R BBG-100 24 h, respectivamente, sem diferença significativa (Figura 28B).

Nos grupos sham, I/R salina e I/R BBG-50 14 dias houve um relaxamento do íleo de aproximadamente 15%, e no grupo I/R BBG-100 14 dias esse relaxamento foi de 11%, mas não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 28B).

Figura 28 - Segmentos de registros mecanográficos que mostram os efeitos de relaxamento do ATP aplicado em uma concentração única (100 μ M) (A) e histograma dos efeitos do ATP na atividade espontânea (B) no íleo de ratos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 dias, I/R salina 24 dias, I/R BBG-50 24 dias, I/R BBG-100 24 dias, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 dias e I/R BBG-100 14 dias.

Os dados são de n=3 e expressos em média $\pm$ erro padrão.

4.10.3 Efeitos do Carbacol na Atividade Espontânea do Íleo

A contratilidade do músculo liso do íleo foi examinada em resposta a estimulação colinérgica pela administração de CC ao banho. Foi realizada uma curva cumulativa nas concentrações de 0,1 μM (10^{-7}M), 1 μM (10^{-6}M) e 10 μM (10^{-5}M).

Houve a formação de uma curva crescente quando as diferentes concentrações de CC foram adicionadas ao banho (Figura 29).

No grupo controle o pico máximo de contração foi de $3,1 \pm 1,0$ g. No grupo sham 0 h o pico máximo de contração foi de $3,4 \pm 1,7$ g e no grupo I/R 0 h foi de $1,8 \pm 0,9$ g (10 μM), demonstrando uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de 42% e 47% da contração do íleo isquêmico quando comparado com os grupos controle e sham 0 h, respectivamente (Figura 30A).

No grupo sham 24 h o pico máximo de contração foi de $3,9 \pm 1,4$ g e no grupo I/R salina 24 h foi de $2,8 \pm 0,6$ g (10 μM), demonstrando uma redução significativa ($p < 0,05$) de 28% na presença do CC nos animais que sofreram isquemia (Figura 30B).

Nos grupos I/R BBG-50 e BBG-100 24 h os picos máximos de contração foram de $1,5 \pm 0,5$ g e $2,7 \pm 0,5$ g (10 μM) com diminuição significativa de 61,5% e 30,8%, respectivamente, quando comparados ao grupo sham 24 h (Figura 30B).

No grupo sham 14 dias, o pico máximo de contração foi de $1,9 \pm 0,4$ g, enquanto que no grupo I/R salina 14 dias foi de $3,5 \pm 0,3$ g (10 μM), demonstrando um aumento significativo ($p < 0,05$) de 46% na resposta ao CC nos animais que sofreram isquemia (Figura 30C).

Nos grupos I/R BBG-50 e BBG-100 os picos máximos de contração foram de $4,0 \pm 0,6$ g e $3,4 \pm 0,7$ g (10 μM) com aumento significativo ($p < 0,05$) de 52% e 44%, respectivamente, quando comparados com o grupo sham de 14 dias (Figura 30C).

O grupo I/R salina 14 dias, não apresentou diferenças significantes quando comparado com os grupos I/R BBG-50 e I/R BBG-100 14 dias (Figura 30C).

Figura 29 - Segmentos de registros mecanográficos que mostram os efeitos contráteis do CC aplicado nas concentrações de 0,1 μM , 1 μM e 10 μM no íleo de ratos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 dias, I/R salina 24 dias, I/R BBG-50 24 dias, I/R BBG-100 24 dias, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 dias e I/R BBG-100 14 dias.

Figura 30 - Efeitos do carbacol na atividade espontânea do fêo nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 h, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.

Os dados são de $n=3$ e expressos em média $\pm$ erro padrão. $p<0,05$ (α comparado com o grupo controle; * comparado com o grupo sham).

5.1 Considerações sobre a Isquemia Intestinal com Reperfusão

A I/R é um evento que ocorre em numerosos órgãos como resultado de vários insultos, como trauma, choque, cirurgia de rotina e transplante de órgãos. O intestino é um dos órgãos mais sensíveis à I/R sendo as causas mais comuns: trombose mesentérica venosa ou arterial, embolismo ou obstrução (GUAN et al., 2009; HAGLUNG; BERGQVIST, 1999; OLDENBURG et al., 2004).

A isquemia pode ameaçar a viabilidade do trato gastrintestinal com consequências catastróficas, incluindo a necrose intestinal e a gangrena, e atingir órgãos à distância como os pulmões (CAVRIANI et al., 2004).

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). A isquemia mesentérica e o infarto intestinal ocorrem predominantemente na população idosa com doenças cardiovasculares e outras disfunções sistêmicas (ROMANO et al., 2007; TENDLER, 2003). A isquemia intestinal ocorre principalmente entre a décima sexta e a décima sétima década de vida. A idade de início depende do gênero do paciente e da etiologia da isquemia (CLAVIEN et al., 1988).

Roedores são comumente utilizados como modelos de pesquisa para I/R e têm fornecido uma ampla base de conhecimento em relação à sua fisiologia e patogênese (SLONE; FLEMING, 2014). Nós utilizamos o rato, pois este apresenta facilidade de trabalho, adequabilidade ao protocolo e disponibilidade. A constituição anatômica visceral do rato é similar à do homem. É um animal resistente à anestesia subcutânea, apresenta porte pequeno, de fácil manuseio cirúrgico para abordagem das artérias e, ainda, baixo custo.

A duração da isquemia influencia a gravidade da lesão e da mortalidade. Em nosso protocolo, a isquemia foi induzida no período de 45 minutos, e todos os animais sobreviveram ao período máximo de reperfusão utilizado neste trabalho (14 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. A literatura apresenta ser satisfatória à isquemia quando o tecido apresenta esta coloração (PALOMBIT et al., 2013; RIVERA et al., 2009; 2012).

Como já descrito, a I/R ocasiona alterações celulares e teciduais, porém há estudos que demonstram que a manipulação cirúrgica pode causar alterações no trato digestório. Em nosso trabalho observamos alterações no número de neutrófilos e na motilidade intestinal dos grupos sham. Simmy et al. (2001) observaram que ratos Wistar submetidos a cirurgia abdominal com manipulação intestinal, apresentavam alterações no epitélio intestinal com

diminuição da viabilidade celular e o rendimento nas células da cripta, com alterações na fisiologia gastrintestinal.

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

Utilizando diferentes métodos imunohistoquímicos e farmacológicos, foram identificados no SNE diferentes tipos de neurônios, que se subdividem em neurônios motores e sensoriais (FURNESS, 2006; FURNESS et al., 2012, 2000).

O presente trabalho utilizou marcadores neuronais, segundo os autores Castelucci et al. (2002a); Furness (2000, 2006) e Poole et al. (2002), para a marcação de neurônios motores inibitórios, utilizou-se a NOS; para IPANs o NF; para neurônios motores excitatórios a ChAT, e como pan-neuronal foi utilizado o marcador anti-Hu.

Na análise qualitativa não observamos diferenças na intensidade dos neurônios imunorreativos à NOS, ao NF, à ChAT e ao anti-Hu entre os grupos estudados.

A presença dos receptores P2X nos neurônios entéricos tem sido descrita através de métodos imunohistoquímicos (VULCHANOVA et al., 1996). Foi evidenciado 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).

Com relação ao receptor P2X7, o presente estudo confirmou a presença da imunoreatividade deste receptor purinérgico nos neurônios do plexo mioentérico do íleo de ratos dos grupos analisados, concordando com uma publicação que demonstrou o padrão de distribuição deste receptor no intestino de cobaias (HU et al., 2001).

Resultados do laboratório têm demonstrado alterações dos receptores purinérgicos. No modelo de isquemia da AMS com 4 h (PAULINO et al., 2011) e com 24 h de reperfusão (BOBNA, 2011) foi demonstrado uma diminuição da expressão do receptor P2X2. E na isquemia realizada nos vasos ileais foi demonstrado alterações no receptor P2X7 (PALOMBIT et al., 2013).

É possível que cada receptor tenha uma função diferenciada nos neurônios, pois experimentos demonstraram que os receptores purinérgicos têm um papel fisiológico na transmissão no SNE (BIAN et al., 2000; SPENCER et al., 2000). Também, os autores Coutinho-Silva et al. (1999) e Slater et al. (2000a, b) descreveram que o receptor P2X7 inicia apoptose em vários tipos celulares. O receptor P2X7 é o único membro da família P2X, que forma um poro na membrana celular em resposta a um estímulo, e pode regular a

permeabilidade celular, liberação de citocinas e desencadear a apoptose (SURPRENANT et al., 1996).

As purinas e as pirimidinas são liberadas ativamente ou passivamente de células em condições normais ou lesadas. Em determinadas condições, o ATP pode alcançar altas concentrações no espaço extracelular. No estresse isquêmico, o ATP exerce efeito excitotóxico mediado pelos receptores P2 em vários tipos celulares (FRANKE et al., 2006).

Com relação ao estudo das duplas marcações, nossos resultados demonstraram que o receptor P2X7 está presente em 100% dos neurônios mioentéricos nos grupos controle, sham e submetidos à isquemia intestinal com diferentes períodos de reperfusão e com a aplicação de salina e do antagonista BBG, e não houve diferença significativa entre eles. Os autores Hu et al. (2001) observaram a presença do receptor P2X7 nos neurônios entéricos onde analisaram qualitativamente a dupla marcação dos neurônios NOS-ir e Calb-ir com este receptor em cobaias.

Trabalhos do laboratório têm demonstrado alterações quantitativas nas duplas marcações do receptor P2X2 no íleo de animais desnutridos e renutridos (MISAWA et al., 2010) e dos receptores P2X2 e P2X7 no colo distal de animais desnutridos e renutridos (GIROTTI et al., 2013) e em outros protocolos de isquemia (BOBNA, 2011; PAULINO et al., 2011).

O marcador pan-neuronal anti-HuC/D é usado para analisar a população total de neurônios do SNE de diferentes espécies, como por exemplo, em ratos (PHILLIPS et al., 2004a) e humanos (GANNS et al., 2006). A proteína Hu pertence à família de proteínas ligantes de RNA-ELAV (*embryonic lethal abnormal visual*), e em nosso trabalho marcou o corpo celular e o núcleo dos neurônios entéricos. Resultados semelhantes foram descritos no SNE de equinos (FREYTAG, 2008) e de camundongos (QU et al., 2008).

Comparações entre diferentes marcadores pan-neuronais no SNE, como anti-Hu, PGP 9.5, Azul de Cuprolínico, traçador retrógrado Fluoro-Golg, mostraram o anti-Hu e Azul de Cuprolínico como marcadores neuronais mais confiáveis para a quantificação da população neuronal total (PHILLIPS et al., 2004a).

Um dado interessante do nosso estudo foi a dupla marcação do anti-Hu com o receptor P2X7, onde foi observado que 100% dos neurônios do plexo mioentérico eram imunorreativos ao receptor, porém na análise inversa, observou-se que 15% das células imunorreativas ao receptor P2X7 não eram neurônios. Essa pequena porcentagem pode ser outro tipo celular, como por exemplo célula glial entérica. Um trabalho do laboratório, de dupla marcação do receptor P2X2 com o pan-neuronal anti-Hu, demonstrou que

aproximadamente 6% das células imunorreativas ao P2X2 não são neurônios e a dupla marcação deste receptor com a proteína S-100 (marcador de célula glial entérica) demonstrou que aproximadamente 5% das células gliais são imunorreativas ao receptor (MENDES, 2013).

A presença de receptores purinérgicos em células gliais no SNA tem sido relatada anteriormente. O ATP afeta as células de Schwann no nervo vago isolado de ratos (IRNICH et al., 2001). Os receptores P2X7 funcionais estão presentes em culturas de células de Schwann de camundongos (COLOMAR; AMEDEE, 2001). Tem sido demonstrada a presença do receptor P2X7 em células gliais entéricas, e estudos demonstraram que cada célula glial imunorreativa ao S-100 era identificada individualmente com o receptor P2X7 (VANDERWINDEN et al., 2003).

O antagonista do receptor P2X7 utilizado nesse trabalho é derivado de um corante alimentar e não tem toxicidade conhecida, exceto para a potenciação da acidose metabólica em pacientes sépticos (PENG et al., 2009). Nossos dados demonstram que a injeção subcutânea de BBG, reduziu os efeitos da I/R sobre a densidade e área do perfil dos neurônios mioentéricos, sobre os neutrófilos nas diferentes camadas do intestino e também sobre a motilidade intestinal. Em alguns casos, a dose de 50 mg/Kg pareceu ser mais eficiente que a de 100 mg/Kg. Peng et al., (2009) demonstraram que a injeção intravenosa de BBG diminuiu significativamente as lesões da medula espinal, sem toxicidade evidente. Em adição, os autores Chu et al. (2012) ao utilizar o BBG na isquemia cerebral demonstraram redução da morte neuronal no hipocampo e da ativação de astrócitos e microglia.

5.3 Considerações sobre a Densidade Neuronal

Mudanças na densidade dos neurônios entéricos têm sido investigadas em protocolos como a desnutrição/renutrição (BRANDÃO et al., 2003; CASTELUCCI et al., 2002b; GIROTTI et al., 2013; GOMES et al., 2006; MISAWA et al., 2010; SANT'ANA et al., 1997). Em animais *ob/ob* foi verificada diminuição na densidade dos neurônios NOS-ir e ChAT-ir (MIZUNO et al., 2012) e em protocolos de I/R foram vistas alterações no número de neurônios no plexo mioentérico (BOBNA, 2011; PALOMBIT et al., 2013; PAULINO et al., 2011).

A secreção e a motilidade intestinal são amplamente dependentes da atividade dos neurônios entéricos e a perda desses neurônios pode resultar em uma disfunção intestinal. Yano et al. (1997) mostraram que o peristaltismo foi anulado após a isquemia. Também tem

sido sugerido que a doença intestinal inflamatória (DII), em episódios que ocorram I/R, está associada com alterações na motilidade gastrointestinal (THORNTON; SOLOMON, 2002).

Estudos de isquemia da AMS com reperfusão (LINDESTROM; EKBLAD, 2004) demonstraram diminuição no número total de neurônios entéricos, porém estes autores não identificaram as classes de neurônios afetadas e seus códigos químicos. Rivera et al. (2009) realizaram isquemia de 60 minutos de artérias ileais em cobaias e observaram diminuição dos neurônios NOS-ir.

Nossos dados mostraram que o número de neurônios/cm² imunorreativos ao receptor P2X7, NOS, NF, ChAT e anti-Hu no plexo mioentérico do íleo de ratos, estava diminuído nos grupos isquêmicos, e com o uso do antagonista BBG a densidade das células imunorreativas ao receptor P2X7 do grupo de 14 dias foi restabelecida, bem como dos neurônios NF-ir e ChAT-ir, no entanto houve diferenças entre as classes neuronais. Os autores Peng et al. (2009) também verificaram o restabelecimento dos neurônios da medula espinal após lesão mecânica com o uso do BBG. Estes resultados corroboram com a participação do receptor P2X7 na morte neuronal.

5.4 Considerações sobre o Perfil Neuronal

O gânglio mioentérico de pequenos animais de laboratório, como camundongos, ratos e cobaias, são alongados e tem características geométricas homólogas (GABELLA, 1971; 1987). De acordo com estudos anteriores de Pearson (1994), o longo eixo do gânglio mioentérico está orientado em paralelo com a camada muscular circular. Essa orientação é documentada em vários trabalhos feitos com pequenos e grandes animais e parece ser uma característica do plexo mioentérico (GABELLA, 1987; SANTER; BAKER, 1988).

A avaliação morfométrica dos neurônios mioentéricos tem sido vastamente estudada em diferentes protocolos experimentais. Como exemplo, nos neurônios mioentéricos de ratos submetidos à dieta de cafeteria, foi demonstrado que a área do perfil neuronal não sofreu modificações (SCOARIS et al., 2010). Estes autores explicam que fatores envolvidos na variação da área do corpo celular ocorrem no estresse oxidativo em ratos diabéticos, isto pode estar relacionado à formação de espécies reativas de oxigênio. Em protocolos de desnutrição e renutrição, os neurônios mioentéricos imunorreativos ao NADH-diaforase do intestino grosso de ratos sofreram redução em 15% da área (CASTELUCCI et al., 2002b). Um trabalho relacionado a diferentes idades em ratos indicou a predominância de neurônios com perfis

celulares pequenos em animais jovens e de neurônios com a área do perfil maior em animais idosos (MARESE et al., 2007).

A diminuição na área do perfil das diferentes classes neuronais nos plexos mioentérico e submucoso foi encontrada em protocolos de desnutrição (MISAWA et al., 2010; GIROTTI et al., 2013) e de I/R (PALOMBIT et al., 2013; PAULINO et al., 2011). A obesidade promoveu aumento nos neurônios imunorreativos à ChAT e à Calr em camundongos obesos fêmeas (MIZUNO et al., 2012).

Yano et al. (1997) mostraram uma diminuição no tamanho dos neurônios mioentéricos do jejuno após 2-6 horas de isquemia seguida por 2 dias de reperfusão, mas não mostraram nenhuma mudança no número de neurônios. Piao et al. (1999) observaram que após 4 horas de isquemia muitos neurônios mioentéricos do intestino delgado de ratos se degeneravam dentro de 4 semanas e sugeriram que a isquemia intestinal causava a morte neuronal tardia.

Os autores Lindeström e Ekblad (2004) encontraram neurônios com o perfil celular diminuído no gânglio mioentérico em segmentos submetidos à isquemia de 60 minutos com reperfusão de 24 e 72 h. Já com uma semana após a I/R, a maioria dos neurônios no gânglio mioentérico apareceu em tamanho normal, embora alguns estivessem com o perfil neuronal aumentado.

Os resultados de Rodriguez et al., (2006) indicaram que a isquemia *in situ* seguida pela superfusão *in vitro* alterava a resposta da estimulação química e elétrica e causava mudança estrutural no SNE. Rivera et al. (2009) demonstraram aumento somente na classe neuronal NOS-ir nas primeiras 24 h de reperfusão.

Brehmer et al. (2000) demonstraram um aumento no tamanho dos neurônios nitrérgicos do plexo mioentérico na obstrução parcial do íleo de porcos jovens, mostrando que essas mudanças na área do perfil neuronal podem ser provocadas por estresse mecânico.

No trabalho de Paulino et al. (2011) houve uma diminuição da área do perfil dos neurônios NOS-ir. A diferença destes resultados com o do presente trabalho pode ser pelo fato de que o protocolo utilizado por Paulino et al. (2011) foi o da oclusão da AMS por 40 minutos com reperfusão de 4 h, podendo ser este mais agressivo ao SNE do que o da obstrução de vasos ileais.

O presente estudo identificou um número de alterações morfológicas nos neurônios entéricos seguido pela I/R. Após medirmos a área do perfil, observamos nos grupos isquêmicos um aumento desta nos neurônios NOS-ir, ChAT-ir e anti-Hu-ir, e uma diminuição nos neurônios NF-ir nos grupos I/R 0 h e 14 dias. A recuperação da área do perfil desses neurônios foi vista novamente nos animais que foram tratados com o antagonista BBG.

5.5 Considerações sobre a Distribuição dos Neutrófilos

Os neutrófilos possuem atividade fagocitária e são os principais elementos celulares em muitas formas de inflamação. Kalff et al. (1998) demonstraram que a manipulação do intestino resulta no extravasamento de leucócitos na camada muscular intestinal, que foi associada com uma diminuição acentuada na atividade do músculo circular. Tem sido demonstrado que durante a reperfusão intestinal, os neutrófilos invadem rapidamente a musculatura externa e secretam moléculas incluindo a MPO (HIERHOLZER et al., 1999; MASSBERG; MESSMER, 1998). Estes achados têm sido verificados na musculatura do íleo que sofreram I/R (RIVERA et al., 2011, 2012).

No presente trabalho, os neutrófilos foram revelados pela reação de MPO e posteriormente contados em três compartimentos: primeiramente na camada ML + PM, seguido pela camada MC, e por fim o PS + LP. A presença dos neutrófilos foi observada nestes compartimentos em todos os grupos estudados, porém em maior quantidade nos grupo I/R, e nos grupos tratados com o BBG eles estavam reduzidos.

Nos animais do grupo controle, poucos neutrófilos foram encontrados nas camadas do intestino. Nos grupos sham, isquêmicos e com aplicação de BBG os neutrófilos eram numerosos, principalmente na lâmina própria. Resultados semelhantes foram encontrados por Rivera et al. (2012), que analisaram a presença de neutrófilos no íleo de camundongos submetidos à isquemia com 3 e 24 h de reperfusão.

Mesmo o número de neutrófilos sendo elevado nos grupos onde foi aplicado o BBG, esse número era inferior ao dos grupos I/R, sugerindo que o BBG não atua apenas protegendo os neurônios entéricos, mas também reduz os efeitos da isquemia na parede intestinal. No estudo de Peng et al. (2009) também foi demonstrado que o tratamento com BBG diminuiu a infiltração de neutrófilos após uma lesão da medula espinal.

5.6 Considerações sobre a Motilidade Intestinal

Tem sido relatado que a I/R pode causar alterações na motilidade intestinal. Alguns trabalhos têm demonstrado o atraso no trânsito gastrointestinal e as respostas à estímulos farmacológicos e elétricos em protocolos de isquemia (BALLABENI et al., 2002; HASSOUN et al., 2001; SHIMOJIMA et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2001).

Em nosso trabalho, as mudanças na atividade motora intestinal foram evidenciadas em um modelo de isquemia intestinal com diferentes períodos de reperfusão. No grupo I/R salina

24 h foi observado diminuição da atividade espontânea intestinal e recuperação nos grupos I/R com o uso do BBG. Relatos da diminuição na contratilidade intestinal têm sido reportados nos protocolos de isquemia (RIVERA et al., 2012; TAHA et al., 2010; TAKAHASHI et al., 2001).

Tem sido demonstrado que durante a I/R há o aumento da produção da NOS (BROWN et al., 1997). Tem sido postulado que o NO está envolvido no relaxamento da musculatura intestinal com regulação das contrações via não adrenérgica e não colinérgica dos neurônios (CAPLAN et al., 1994). Além disso, a I/R induziria a produção de NO e mudanças nos níveis basais dessa substância poderiam alterar a motilidade intestinal (CAPLAN et al., 1994).

Para analisar o efeito do NO na atividade espontânea, foi utilizada uma dose única do SNP, considerado um doador exógeno de NO. Trabalhos têm demonstrado o aumento do relaxamento com a aplicação do SNP (RAGY; ELBASSUOMI, 2012; TAKAHASHI et al., 2001; TAKIZAWA et al., 2013). Os nossos resultados demonstraram um aumento do relaxamento no grupo I/R salina 24 h, que pode ser explicado da seguinte maneira: como na I/R há liberação de NO, com a administração do SNP ao banho de órgãos, pode haver um aumento na quantidade de NO no meio circulante, que aumentaria o relaxamento do intestino. Com o uso do BBG houve diminuição do relaxamento do intestino no grupo I/R 24 h. Outros trabalhos têm demonstrado uma diminuição no relaxamento dos segmentos do íleo de ratos submetidos à isquemia da AMS com reperfusão de 24 h, porém esses autores utilizaram a indometacina para induzir o relaxamento do intestino (BALLABENI et al., 2002).

Estudos têm demonstrado o envolvimento do ATP no relaxamento da atividade motora espontânea do duodeno de ratos (GLASGOW; MATTAR; KRANTIS, 1998). Além disso, tem sido demonstrada a presença do receptor P2X2 nos neurônios inibitórios (CASTELUCCI et al., 2002a). Os resultados do presente trabalho demonstraram a presença de 100% do receptor P2X7 nos neurônios entéricos NOS-ir, sendo assim, estudamos o efeito do ATP no íleo dos grupos I/R. Os resultados demonstraram relaxamento da atividade espontânea nos grupos controle e I/R, e nos grupos tratados com o BBG houve menor relaxamento.

Tem sido utilizado para estudo da contratilidade intestinal agonistas dos receptores muscarínicos colinérgicos, como o carbacol, e tem sido observada a diminuição da atividade espontânea em protocolos como o envelhecimento (TRAN et al., 2014). Também nos trabalhos de I/R têm sido verificado a diminuição da amplitude da contração ao CC no íleo de camundongos (RIVERA et al., 2012). Os nossos resultados concordam com a literatura no

qual verificamos nos grupos I/R 0 h e 24 h que os picos máximos de contração atingidos foram menores do que os dos grupos sham. Nos grupos I/R BBG-100 24 h e 14 dias houve retorno da contratilidade aos níveis normais em resposta ao CC. Dados similares foram reportados sobre a redução da resposta à acetilcolina em um modelo de I/R 24 h (BALLABENI et al., 2002).

5.7 Considerações Finais

O presente estudo demonstrou que a I/R está associada com a perda significativa de diferentes subpopulações de neurônios do plexo mioentérico acompanhada por diversas alterações morfológicas nos neurônios e na parede intestinal. Nos eventos de isquemia a quantidade de ATP circulante está aumentada e o papel do receptor P2X7 é muito importante no processo de apoptose e perda neuronal. Com o uso do antagonista BBG seletivo para o receptor P2X7, os efeitos da isquemia sobre os neurônios foram restaurados ou diminuídos, demonstrando desta forma a provável participação deste receptor nas alterações dos neurônios na isquemia.

Os efeitos da isquemia sobre o SNE podem causar disfunções gastrintestinais, como problemas na motilidade intestinal. E o uso do antagonista do receptor P2X7 leva a uma recuperação dos danos causados pelo evento isquêmico, como demonstrado no presente trabalho.

Com base nos objetivos estabelecidos, na metodologia empregada e nos resultados obtidos, conclui-se que no íleo de ratos submetidos à I/R:

1. Foi confirmada a presença do receptor P2X7 nos neurônios inibitórios, excitatórios e sensoriais do plexo mioentérico nos grupos controle, sham 0 h, I/R 0 h, sham 24 dias, I/R salina 24 h, I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, sham 14 dias, I/R salina 14 dias, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.
2. Não houve alteração do código químico nos grupos estudados.
3. Houve diminuição na densidade dos neurônios P2X7-ir, NOS-ir, NF-ir, ChAT-ir e anti-Hu-ir nos grupos isquêmicos com diferentes períodos de reperfusão e recuperação da densidade nos grupos com aplicação do BBG.
4. Houve alterações na área do perfil dos neurônios NOS-ir, ChAT-ir e NF-ir nos grupos isquêmicos, e recuperação nos grupos I/R BBG-50 24 h, I/R BBG-100 24 h, I/R BBG-50 14 dias e I/R BBG-100 14 dias.
5. Houve aumento da expressão do receptor P2X7 no grupo I/R salina 24 h.
6. Foram observadas alterações histológicas na parede intestinal no grupo I/R 0 h.
7. Houve aumento no número de neutrófilos nas diferentes camadas do intestino nos grupos submetidos à isquemia e diminuição nos grupos I/R BBG-50 e BBG-100.
8. Houve diminuição da atividade espontânea intestinal no grupo I/R 24 h e recuperação nos grupos I/R BBG-50 e BBG-100. Houve um maior relaxamento intestinal no grupo I/R salina 24 h e recuperação no grupo I/R BBG. E houve diminuição na contratilidade em resposta ao CC nos grupos I/R.
9. O antagonista BBG pareceu ser eficiente na proteção das diferentes classes neuronais, o que confirma a participação do receptor P2X7 na morte neuronal no modelo de isquemia e reperfusão intestinal e na recuperação da motilidade intestinal.

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. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24, n. 2, p. 52-55, 2003.
- ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signaling; pathophysiological roles. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 78, p. 113-145, 1998.
- ABBRACCHIO, M. P.; SAFFREY, M. J.; HÖPKER, V.; BURNSTOCK, G. Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum. **Neuroscience**, v. 59, n. 1, p. 67-76, 1994.
- ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 4th Edition. **Br. J. Pharmacol.**, v. 158, p. S1-S239, 2009.
- AUERBACH, L. Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. **Arch. Pathol. Anat. Physiol.**, v. 30, p. 457-460, 1864.
- 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.
- BERNE, R. M. Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. **Am. J. Physiol.**, v. 204, p. 317-322, 1963.
- BERTRAND, P. P.; KUNZE, W. A. A.; BORNSTEIN, J. C.; FURNESS, J. B.; SMITH, M. L. Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. G422-G435, 1997.
- BIAN, X.; BERTRAND, P. P.; BORNSTEIN, J. C. Descending inhibitory reflexes involve P2X receptor-mediated transmission from interneurons to motor neurons in guinea-pig ileum. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 528, p. 551-560, 2000.
- BOARDER, M. R.; HOURANI, S. M. O. The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 19, p. 99-107, 1999.
- BOBNA, A. R. M. **Efeitos da isquemia/reperfusão-intestinal sobre o receptor P2X₂ e neurônios entéricos do íleo de ratos**. 2011. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Orientador: Profa. Dra. Patricia Castelucci.

*De acordo com:

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

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

BORODY, T. J.; QUIGLEY, E. M.; PHILLIPS, S. F.; WIENBECK, M.; TUCKER, R. L.; HADDAD, A.; ZINSMEISTER, A. R. Effects of morphine and atropine on motility and transit in the human ileum. **Gastroenterology**, v. 89, n. 3, p. 562-570, 1985.

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.

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

BRANDÃO, M. C. S.; DE ANGELIS, R. C.; DE SOUZA, R. R.; LIBERTI, E. A. Effects of pre-and postnatal protein deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric study in weaning rats. **Nutr. Res.**, v. 23, p. 215-223, 2003.

BREHMER, A.; GÖBEL, D.; FRIESER, M.; GRAF, M.; RADESPIEL-TRÖGER, M.; NEUHUBER, W. Experimental hypertrophy of myenteric neurones in the pig: a morphometric study. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 12, n. 2, p. 155-62, 2000.

BROOKES, S. J. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat. Rec.*, v. 262, p. 58-70, 2001.

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

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

BROOKES, S. J.; STEELE, P. A.; COSTA, M. Calretinin immunoreactivity in cholinergic motor neurones, interneurons and vasomotor neurones in the guinea-pig small intestine. **Cell Tissue Res.**, v. 263, p. 471-481, 1991.

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

BROWN, J. F.; TEPPERMAN, B. L. Role of nitric oxide in hypoxia-induced colonic dysfunction in the neonatal rat. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. 760-769, 1997.

BUCHTHAL, F.; FOLKOW, B. Interaction between acetylcholine and adenosine triphosphate in normal, curarised and denervated muscle. **Acta Physiol. Scand.**, v. 15, p. 150-160, 1948.

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

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

BURNSTOCK, G. Distribution and role of purinoreceptor subtypes. **Nucleos. Nucleotid.**, v. 10, p. 917-930, 1991.

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

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

BURNSTOCK, G.; CAMPBELL, G.; BENNETT, M.; HOLMAN, M. E. Inhibition of the smooth muscle of the taenia coli. **Nature**, v. 200, p. 581-582, 1963.

CAPLAN, M. S.; HEDLUND, E.; HILL, N.; MACKENDRICK, W. The role of endogenous nitric oxide and platelet-activating factor in hypoxia-induced intestinal injury in rats. **Gastroenterol.**, v. 106, p. 346-352, 1994.

CARRICO, C. J.; MEAKINS, J. L.; MARSHALL, J. C.; FRY, D.; MAIER, R.V. Multiple-organ failure syndrome. **Arch. Surg.**, v. 121, p. 196-208, 1986.

CASTELUCCI, P.; ROBBINS, H. L.; FURNESS, J. B. P2X2 purine receptor immunoreactivity of intraganglionic laminar endings in the mouse gastrointestinal. **Cell Tissue Res.**, v. 312, n. 2, p. 167-174, 2003.

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

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

CAVRIANI, G.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; TREZENA, A. G.; DA SILVA, Z. L.; DOMINGOS, H. V.; DE ARRUDA, M. J.; JANCAR, S.; TAVARES DE LIMA, W. Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 494, n. 2-3, p. 241-249, 2004.

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.

CHAN, K. L.; ZHANG, X. H.; FUNG, P. C.; GUO W. H.; TAM, P. K. H. Role of nitric oxide in intestinal ischemia-reperfusion injury studied using electron paramagnetic resonance. **Br. J. Surg.**, v. 86, p. 1427-1432, 1999.

CHU, K.; YIN, B.; WANG, J.; PENG, G.; LIANG, H.; XU, Z.; DU, Y.; FANG, M.; XIA, Q.; LUO, B. Inhibition of P2X7 receptor ameliorates transient global cerebral ischemia/reperfusion injury via modulating inflammatory responses in the rat hippocampus. **J. Neuroinflammation.**, v. 18, p. 69, 2012.

CLAVIEN, P. A.; DURIG, M.; HARDER, F. Venous mesenteric infarction: a particular entity. **Br. J. Surg.**, v. 75, p. 252-258, 1988.

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

CLERC, N.; FURNESS, J. B.; LI, Z. S.; BORNSTEIN, J. C.; KUNZE, W. A. A. Morphological and immunohistochemical identification of neurons and their targets in the guinea-pig duodenum. **Neuroscience**, v. 86, p. 679-694, 1998b.

COLLINS, M. G.; HOURANI, S. M. O. Adenosine receptor subtypes. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 14, p. 360-366, 1993.

COLLO, G.; NORTH, R. A.; KAWASHIMA, E.; MERLO-PICH, E.; NEIDHART, S.; BUELL, G. Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 2495-2507, 1996.

COLOMAR, A.; AMEDEE, T. ATP stimulation of P2X(7) receptors activates three different ionic conductances on cultured mouse Schwann cells. **Eur. J. Neurosci.**, v. 14, p. 927-936, 2001.

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

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.

CREMA, A.; FRIGO, G. M.; LECCHINI, S. A pharmacological analysis of the peristaltic reflex in the isolated colon of the guineapig or cat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 39, p. 334-345, 1970.

D'ALECY, L. G.; ZELENOCK, G. B. Pathophysiology of ischemia and hypoxia. In: ZELENOCK, G. B.; D'ALECY, L. G.; SHLAFFER, M.; FANTONE, III J. C.; STANLEY, J. C. **Clinical ischemic syndromes: mechanisms and consequences of tissue injury**. St Louis: the CV Mosby Company, 1990. p. 147-158.

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

DI VIRGILIO, F.; CHIOZZI, P.; FALZONI, S.; FERRARI, D.; SANZ, J. M.; VENKETARAMAN, V.; BARICORDI, O. R. Cytolytic P2X purinoceptors. **Cell Death Differ.**, v. 5, n. 3, p. 191-199, 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.

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

DOGIEL, A. S. Zur Frage über die Ganglion der Darmgeflechte bei den Säugetieren. **Anat. Anz.**, v. 10, p. 517-528, 1895b.

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. 409-15, 2007.

DRURY, A. N.; SZENT-GYÖRGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. **J. Physiol.**, v. 68, p. 213-237, 1929.

EMMELIN, N.; FELDBERG, W. Systemic effects of adenosine triphosphate. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v. 3, p. 273-284, 1948.

FERRARI, D.; LA SALA, A.; CHIOZZI, P.; MORELLI, A.; FALZONI, S.; GIROLOMONI, G.; IDZKO, M.; DICHMANN, S.; NORGAEUER, J.; DI VIRGILIO, F. The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. **FASEB J.**, v. 14, n. 15, p. 2466-2476, 2000.

FERRARI, D.; LOS, M.; BAUER, M. K.; VANDENABEELE, P.; WESSELBORG, S.; SCHULZE-OSTHOFF, K. P2Z purinoceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. **FEBS Lett.**, v. 447, p. 71-75, 1999.

FORESTA, C.; ROSSATO, M.; DI VIRGILIO, F. Extracellular ATP is a trigger for the acrossome reaction in human spermatozoa. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 19443-19447, 1992.

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

FRANKE, H.; KRÜGEL, U.; ILLES, P. P2 receptors and neuronal injury. **Euro. Jour. Physiol.**, v. 452, p. 622-644, 2006.

FRANKE, H.; GÜNTHER, A.; GROSHE, J.; SCHIDT, R.; ROSSNER, S.; REINHART, R., FABER-ZUSCHRATTER, H.; SCHNEIDER, D.; ILLES, P. P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats. **J. Neuropathol. Exper. Neurol.**, v. 63, n. 7, p. 686-699, 2004.

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.

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

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

FURNESS, J. B.; ALEX, G.; CLARK, M. J.; LAL, V. V. Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine. **Anat. Rec.**, v. 272A, p. 475-483, 2003a.

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

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

FURNESS, J. B.; KUNZE, W. A.; BERTRAND, P. P.; CLERC, N.; BORNSTEIN, J. C. Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. **Prog. Neurobiol.**, v. 54, p. 1-18, 1998.

FURNESS, J. B.; JOHNSON, P. J.; POMPOLO, S.; BORNSTEIN, J. C. Evidence that enteric motility reflexes can be initiated through entirely intrinsic mechanisms in the guinea-pig small intestine. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 7, p. 89-96, 1995a.

FURNESS, J. B.; YOUNG, H. M.; POMPOLO, S.; BORNSTEIN, J. C.; KUNZE, W. A. A.; MC CONALOUGH, K. Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. **Gastroenterology**, v. 108, p. 554-563, 1995b.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. **The enteric nervous system**. England: Churchill Livingstone, 1987.

GABELLA, G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. **Neuroscience**, v. 22, p. 737-752, 1987.

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

GALINDO, A.; KRNJEVIC', K.; SCHWARTZ, S. Micro-iontophoretic studies on neurones in the cuneate nucleus. **J. Physiol.**, v. 192, p. 359-377, 1967.

GALLIGAN, J. J.; FURNESS, J. B.; COSTA, M. Effects of cholinergic blockade and sympatetic denervation on gastrointestinal myoelectric activity in guinea-pig. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 238, p. 1114-1125, 1986.

GERSHON, M. D. **The second brain**. New York: HarperCollins Publishers Inc, 1998.

GANNIS, 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.

GIROTTI, P.; MISAWA, R.; PALOMBIT, K.; MENDES, C. E.; BITTENCOURT, J. C.; CASTELUCCI, P. Differential effects of undernourishment on subpopulations of rat enteric neurons. **Cell Tissue Res.**, v. 353, p. 367-380, 2013.

GLASGOW, I.; MATTAR, K.; KRANTIS, A. Rat gastroduodenal motility in vivo: involvement of NO and ATP in spontaneous motor activity. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. 889-96, 1998.

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

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

GRACE, P. A. Ischemia-reperfusion injury. **Br. J. Surg.**, v. 81, p. 637-647, 1994.

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. Gastroenterology**, v. 16, n. 5, p. 563-570, 2010.

GUAN, Y.; WORRELL, R. T.; PRITTS, T. A.; MONTROSE, M. H. Intestinal ischemia-reperfusion injury: reversible and irreversible damage imaged in vivo. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 297, p. 187-196, 2009.

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

HANSEN, B. H. J.; OIGAARD, A. Embolization to the superior mesenteric artery. Arteriography and embolectomy in four cases. **Acta Chir. Scand.**, v. 142, p. 451, 1976.

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.

HASSOUN, H. T.; WEISBRODT, N. W.; MERCER, D. W.; KOZAR., R. A.; MOODY, F. G.; MOORE, F. A. Inducible nitric oxide synthase mediates gut ischemia/reperfusion-induced ileus only after severe insults. **J. Surg. Res.**, v. 97, p. 150-154, 2001.

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

HIERHOLZER, C.; KALFF, J. C.; AUDOLFSSON, G.; BILLIAR, T. R.; TWEARDY, D. J.; BAUER, A. J. Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia/reperfusion injury. **Transplant.**, v. 68, p. 1244-1254, 1999.

HOLTON, P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. **J. Physiol.**, v. 145, p. 494-504, 1959.

HORTON, J. W.; WALKER, P. B. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. **J. Appl. Physiol.**, v. 74, p. 1515-20, 1993.

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.

HUMPHREYS, B. D.; VIRGINIO, C.; SURPRENANT, A.; RICE, J.; DUBYAK, G. R. Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. **Mol. Pharmacol.**, v. 54, p. 22-32, 1998.

HUPPERTZ, B.; FRANK, H-G.; KAUFMANN, P. The apoptosis cascade - morphological and immunohistochemical methods for it visualization. **Anat. Embriol.**, v. 200, p. 1-18, 1999.

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

IRNICH, D.; BURGSTAHLER, R.; BOSTOCK, H.; GRAFE, P. ATP affects both axons and Schwann cells of unmyelinated C fibres. **Pain**, v. 92, p. 343-350, 2001.

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.

JOÃO, A. S.; ALENCAR, S. S. S.; MEDEIROS, A. C.; DINIZ, S. O. F.; CARDOSO, V. N.; BRANDT, C. T. Translocation of 99mTc labelled bacteria after intestinal ischemia and reperfusion. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, 2004.

JUN, J-H.; KIM, J.; JUNG, S-Y.; SONG, R.; NOH, J-H.; PARK, Y-S.; RYO, S-H.; KIM, J-H.; KONG, J-M.; KIM K-T. Extracellular ATP mediates necrotic cell swelling in SN4741 dopaminergic neurons through P2X7 receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 52, p. 37350-37358, 2007.

KALFF, J. C.; SCHRAUT, W. H.; SIMMONS, R. L.; BAUER A. J. Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. **Ann. Surg.**, v. 228, p. 652-663, 1998.

KHAKH, B. S.; BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C.; KING, B. F.; NORTH, R. A.; SÉGUÉLA, P.; VOIGT, M.; HUMPHREY, P. P. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, p. 107-118, 2001.

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

KNUDSEN, T. B.; ELMER, W. A. Evidence for negative control of growth by adenosine in the mammalian embryo: induction of HmX/+ mutant limb outgrowth by adenosine deaminase. **Differentiation**, v. 33, p. 270-279, 1987.

KOKSOY, C.; KUZU, M. A.; KUZU, I.; ERGUN, H.; GURHAN, I. Role of tumour necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischaemia-reperfusion. **Br. J. Surg.**, v. 88, p. 464-468, 2001.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Adaptação, dano e morte celular. In: **Robbins & Cotran, Bases Patológicas das Doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 13.

KUNZE, W. A. A.; BORNSTEIN, J. C.; FURNESS, J. B. Identification of sensory nerve cells in a peripheral organ the intestine of a mammal. **Neuroscience**, v. 66, p. 1-4, 1995.

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

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

LAMMERS, K. M.; INNOCENTI, G.; VENTURI, A.; RIZZELLO, F.; HELWIG, U.; BIANCHI, G. P.; PEDRINI, L.; DI NINO, G.; GIONCHETTI, P.; CAMPIERI, M. The effect of transient intestinal ischemia on inflammatory parameters. **Int. J. Colorectal Dis.**, v. 18, n. 1, p. 78-85, 2003.

LANGLEY, J. N.; MAGNUS, R. Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 33, p. 34-51, 1905.

LAU, K.; MCLEAN, W. G.; WILLIAMS, D. P.; HOWARD, C. V. Synergistic interactions between commonly used food additives in a developmental neurotoxicity test. **Toxicol. Sci.**, v. 90, p. 178-187, 2006.

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

- LEE, H. Y.; BARDINI, M.; BURNSTOCK G. P2X receptor immunoreactivity in the male genital organs of the rat. **Cell Tissue Res.**, v. 300, p. 321-330, 2000.
- LI, P. L. The intramural nervous system of the small intestine with special reference to the innervation of the inner subdivision of its circular muscle. **J. Anat.**, v. 74, p. 348-359, 1940.
- LI, Q.; LUO X.; ZENG, W.; MUALLEN S. Cell-specific behavior of P2X7 receptors in mouse parotid acinar and duct cells. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 47554-47561, 2003.
- LINDESTROM, L.; EKBLAD, E. Structural and neuronal changes in rat ileum after ischemia with reperfusion. **Dig. Dis. Sci.**, v. 49, p. 1212-1222, 2004.
- LIPPI, A.; SANTICIOLI, P.; CRISCUOLI, M.; MAGGI, C. A. Depolarization evoked co-release of tachykinins from enteric nerves in the guinea-pig proximal colon. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 357, p. 245-251, 1998.
- LIU, P.; XU, B.; SPOKAS, E.; LAI, P. S.; WONG, P. Y. Role of endogenous nitric oxide in TNF-alpha and IL-1beta generation in hepatic ischemia-reperfusion. **Shock**, v. 13, p. 217-223, 2000.
- LIU, P.; XU, B.; HOCK, C. E. Inhibition of nitric oxide synthesis by L-name exacerbates acute lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion. **Shock**, v. 16, p. 211-217, 2001.
- LIU, L. M.; WARD, J. A.; DUBICK, M. A. Hemorrhage-induced vascular hyporeactivity to norepinephrine in select vasculatures of rats and the roles of nitric oxide and endothelin. **Shock**, v. 19, p. 208-214, 2003.
- MAKHLOUF, G. M.; GRIDER, J. R. Nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitters of the gut. **News Physiol. Sci.**, v. 8, p. 196-199, 1993.
- MARESE, A. C.; DE FREITAS, P.; NATALI, M. R. Alterations of the number and the profile of myenteric neurons of Wistar rats promoted by age. **Auton Neurosci.** v. 137, n. 1-2, p. 10-8, 2007.
- MARTEAU, F.; LE POUL, E.; COMMUNI, D.; 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.
- MARTINEZ, J. P.; HOGAN, G. J. Mesenteric ischemia. **Emerg. Med. Clin. North Am.**, v. 22, p. 909-28, 2004.
- MASSBERG, S.; MESSMER, K. The nature of ischemia/reperfusion injury. **Transplant. Proc.**, v. 30, p. 4217-4223, 1998.
- MATINI, P.; MAYER, B.; PELLEGRINI, M. S. F. Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life. **Cell Tissue Res.**, v. 288, p. 11-23, 1997.
- MCCORD, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **N. Engl. J. Med.**, v. 312, p. 159-63, 1985.

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

MENDES, C. E. **Estudo das células gliais entéricas imunorreativas aos receptores P2X2 e P2X7 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. Orientador: Profa. Dra. Patricia Castelucci.

MEYER, T. N; SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 45, n. 2, p. 181-8, 1999.

MILANO, P. M.; DOULETT, C. D.; RIESENMAN, P. J.; ROBINSON, W. P.; BEIDLER, S. K.; ZARZAUR, B. L.; RICH, P. B. Intestinal ischemia-reperfusion injury alters purinergic receptor expression in clinically relevant extraintestinal organs. **J. Surgical Res.**, v. 145, n. 2, p. 272-278, 2008.

MISAWA, R.; GIROTTI, P. A.; MIZUNO, M. S.; LIBERTI, E. A.; FURNESS, J. B CASTELUCCI, P. Effects of protein deprivation and re-feeding on the P2X2-receptor- ileum enteric neurons. **World J. Gastroenterol.** V. 16 p, 3651-63, 2010.

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

MYERS, S. I.; HERNANDEZ, R. Leukotrien C4 regulation of splanchnic blood flow during ischemia. **Am. J. Surg.**, v. 167, p. 566-569, 1994.

MYERS, S. I.; CLAGETT. G. P.; VALENTINE, R. J. Chronic intestinal ischemia caused by intravenous cocaine use: report of two cases and review of the literature. **J. Vasc. Surg.**, v. 23, p. 724, 1996.

NICHOLAS, R. A. Identification of the P2Y(12) receptor: a novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides. **Mol. Pharmacol.**, v. 60, n. 3, p. 416-420, 2001.

NIKOLETOPOULOU, V.; PALIKARAS, M. M. K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **BBA Mol. Cel. Res.**, 2013. In press.

NODA, T.; IWAKARI, R.; FUJIMOTO, K.; MATSOU, S.; AW, T. Y. Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. G270-G276, 1998.

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

O'GRADY, G.; GHAMBIR, S.; KOELMEYER, T. D. Death by midgut infarction: clinical lessons form 88 post-mortems in Auckland, New Zealand. **ANZ J. Surg.**, v. 79, p. 38-41, 2009.

O'REILLY, B. A.; KOSAKA, A. H.; CHANG, T. K.; FORD, A. P.; POPERT, R.; RYMER, J. M.; MCMAHON, S. B. A quantitative analysis of purinoceptor expression in human fetal and adult bladders. **J. Urol.**, v. 165, p. 1730-1734, 2001.

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

OLSSON, R. A.; PEARSON, J. D. Cardiovascular purinoreceptors. **Physiol. Rev.**, v. 70, p. 761-845, 1990.

OTTINGER, L. W. The surgical management of acute occlusion of the superior mesenteric artery. **Ann. Surg.**, v. 188, p. 721, 1978.

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

PARK, M.; PARK, H. R.; KIM, S. J.; KIM, M. S.; KONG, K. H.; KIM, H. S.; GONG, E. J.; KIM, M. E.; KIM, H. S.; LEE, B. M.; et al. Risk assessment for the combinational effects of food color additives: neural progenitor cells and hippocampal neurogenesis. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 72, p. 1412-1423, 2009.

PARKS, D. A.; BULKLEY, G. B.; GRANGER, D. N.; HAMILTON, S. R.; MCCORD, J. M. Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. **Gastroenterology**, v. 82, p. 9-15, 1982.

PAULINO, A. S.; PALOMBIT, K.; CAVRIANI, G.; TAVARES-DE-LIMA, W.; MIZUNO, M. S.; MAROSTI, A. R.; DA SILVA, M. V.; GIROTTI, P. A.; LIBERTI, E. A.; 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.

PEARSON, G. T. Structural organization and neuropeptide distributions in the equine enteric nervous system: an immunohistochemical study using whole-mount preparations from the small intestine. **Cell Tissue Res.**, v. 276, p. 523-534, 1994.

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.

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. **J. Neurosci. Meth.**, v. 133, p. 99-107, 2004a.

PIAO, D. X.; JIANG, H. C.; KOSAKA, M.; SHIBATA, T.; OHTSUKA, A.; MURAKAMI, T. Cytoplasmic delayed neuronal death in the myenteric plexus of the rat small intestine after ischemia. **Arc. Histol. Cytol.**, v. 62, n. 4, p. 383-393, 1999.

PINHEIRO, B. V.; HOLANDA, M. A.; ARAÚJO, F. G.; ROMALDINI, H. Lesão pulmonar de reperfusão. **J. Pneumol.**, v. 25, n. 2, p. 124-136, 1999.

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

POMPOLO, S.; FURNESS, J. B. Ultrastructure and synaptology of neurons immunoreactive for gamma-aminobutyric acid in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. **J. Neurocytol.**, v. 19, n. 4, p. 539-549, 1990.

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.

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

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.

QUINSON, N.; ROBBINS, H. L.; CLARK, M. J.; FURNESS, J. B. Calbindin immunoreactivity of enteric neurons in the guinea-pig ileum. **Cell Tissue Res.**, v. 305, n. 1, p. 3-9, 2001.

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, p. 521-528, 2012.

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

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

RIBEIRO, M. E.; YOSHIDA, W. B. Reperfusion injury after intestinal ischemia: pathophysiology and experimental models. **J. Vasc. Br.**, v. 4, 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 Tis. Res.**, 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 Tis. 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.

RODRIGUEZ, R.; VENTURA-MARTINEZ, R.; SANTIAGO-MEJIA, J.; AVILA-COSTA, M. R.; FORTOUL, T. I. Altered responsiveness of the guinea-pig isolated ileum to smooth muscle stimulants and to electrical stimulation after in situ ischemia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 147, n. 4, p. 371-378, 2006.

ROMANO, S.; ROMANO, L.; GRASSI, R. Multidetector row computed tomography findings from ischemia to infarction of the large bowel. **Eur. J. Radiol.**, v. 61, p. 433-434, 2007.

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

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

SANT'ANA, M.; MIRANDA, N. M. H.; DE SOUZA, R. R.; MOLINARI, S. L. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon of rats subjected to proteic desnutrition. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 55, n. 4, p. 687-695, 1997.

SANTER, R. M.; BAKER, D. M. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 25, p. 59-67, 1988.

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

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

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

SCHOENBERG, M. H.; FREDHOLM, B. B.; HAGLUND, U. Studies on the oxygen radical mechanism involved in the small intestinal reperfusion damage. **Acta Physiol. Scand.**, v. 124, p. 581-589, 1985.

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/P2X7 receptors. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. F962-F971, 1998.

SCOARIS, C. R.; RIZO, G. V.; ROLDI, L. P.; DE MORAES, S. M.; DE PROENÇA, A. R.; PERALTA, R. M.; NATALI, M. R. Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. **Nutrition**, v. 26, n. 3, p. 312-320, 2010.

SHIMOJIMA, N.; NAKAKI, T.; YASUhide, M.; KEN, H.; HIROSHI, O.; MASATOSHI, H.; MASAKI, K. Interstitial Cells of Cajal in Dysmotility in Intestinal Ischemia and Reperfusion Injury in Rats. **J. Surg. Res.**, v. 135, p. 255-261, 2006.

SIMMY, T.; ANUP, R.; PRABHU, R.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Effect of surgical manipulation of the rat intestine on enterocyte populations. *Surg.*, v. 130, p. 479-88, 2001.

SLATER, N. M.; BARDEN, J. A.; MURPH, C. R. Distributional changes of purinergic receptor subtypes P2X1-7 in uterine epithelial cells during early pregnancy. **Histochemi. J.**, v. 32, p. 365-72, 2000a.

SLATER, M.; BARDEN, J. A.; MURPHY, C. R. The purinergic calcium channels P2X1,2,5,7 are down-regulated while P2X3,4,6 are up-regulated during apoptosis in the ageing rat prostate. **Histochem. J.**, v. 32, n. 9, p. 571-580, 2000b.

SLONE, E. A.; POPE, M. R.; ROTH, M.; WELTI, R. FLEMING, S. D. TLR9 is dispensable for intestinal ischemia/reperfusion-induced tissue damage. **Am. J. Clin. Exp. Immunol.**, v. 1, p. 124-135, 2012.

SMUTS, M. S. Rapid nasal pit formation in mouse embryos stimulated by ATP-containing medium. **J. Exp. Zool.**, v. 216, p. 409-414, 1981.

SOLINI, A.; CHIOZZI, P.; MORELLI, A. Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X7 receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release. **J. Cell Sci.**, v. 112, p. 297-305, 1999a.

SOLINI, A.; CHIOZZI, P.; FALZONI S. High glucose modulates P2X7 receptor-mediated function in human primary fibroblasts. **Diabetologia**, v. 43, p. 1248-1256, 2000.

SOLLE, M.; LABASI, J.; PERREGAUX, D. G.; STAM, E.; PETRUSHOVA, N.; KOLLER, B. H.; GRIFFITHS, R. J.; GABEL, C. A. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 1, p. 125-132, 2001.

SONG, Z. M.; BROOKES, S. J.; COSTA, M. All calbindin-immunoreactive myenteric neurons project to the mucosa of the guinea-pig small intestine. **Neurosci. Lett.**, v. 180, p. 219-222, 1994a.

SOUZA, D. G.; GUABIRABA, R.; PINHO, V.; BRISTOW, A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M. IL-1Y driven endogenous IL-10 production protects against the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. **J. Immunol.**, v. 170, p. 4759-4766, 2005.

SPENCER, N. J.; WALSH, M.; SMITH, T. K. Purinergic and cholinergic neuro-neuronal transmission underlying reflexes activated by mucosal stimulation in the isolated guinea-pig ileum. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 522, p. 321-331, 2000.

SPERLÁGH, B.; VIZI, E. S.; WIRKNER, K.; ILLES, P. P2X7 receptors in the nervous system. **Prog. Neurobiology**, v. 78, p. 327-346, 2006.

SPERLÁGH, B.; KOFALVI, A.; DEUCHARS, J. Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. **J. Neurochem.**, v. 81, p. 1196-1211, 2002.

SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; CANALE, P.; IOCULANO, M.; CAMPO, G. M.; AMMENDOLIA, L.; FERLITO, M.; ZINGARELLI, B.; SQUADRITO, G.; SAITTA, A.; et al. Participation of tumor necrosis factor and nitric oxide in the mediation of vascular dysfunction in splanchnic artery occlusion shock. **Br. J. Pharmacol.**, v. 113, p. 1153-1158, 1994.

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

STEELE, P. A.; BROOKES, S. J.; COSTA, M. Immunohistochemical identification of cholinergic neurons in the myenteric plexus of guinea-pig small intestine. **Neuroscience**, v. 45, p. 227-239, 1991.

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

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

TAHA, M. O.; MIRANDA-FERREIRA, R.; PAEZ, R. P.; SIMÕES, R. S.; BOIN, H. C.; MARTINS, I. A.; VERSAGE, P. F.; SILVA, H. F.; PENZO, L. D.; FAGUNDES, A. L.; OLIVEIRA, I.; CARICATI-NETO, A.; MONTEIRO, H. P. Role of L-arginine, a substrate of nitric oxide biosynthesis, on intestinal ischemia-reperfusion in rabbits. **Transplant. Proc.**, v. 42, p. 448-450, 2010.

TAKADA, K.; YAMASHITA, K.; SAKURAI-YAMASHITA, Y.; SHIGEMATSU, K.; HAMADA, Y.; HIOKI, K.; TANIYAMA, K. Participation of nitric oxide in the mucosal injury of rat intestine induced by ischemia-reperfusion. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 287, n. 1, p. 403-407, 1998.

TAKAHASHI, A.; TOMOMASA, T.; KANEKO, H.; WATANABE, T.; TABATA, M.; MORIKAWA, H.; TSUCHIDA, Y.; KUWANO, H. Intestinal motility in an in vivo rat model of intestinal ischemia-reperfusion with special reference to the effects of nitric oxide on the motility changes. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 33, p. 283-288, 2001.

TAKIZAWA, Y.; KISHIMOTO, H.; KITAZATO, T.; ISHIZAKA, H.; KAMIYA, N.; ITO, Y.; TOMITA, M.; HAYASHI, M. Characteristics of reversible absorption-enhancing effect of sodium nitroprusside in rat small intestine. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 49, p. 664-670, 2013.

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

TENDLER, D. A. Acute intestinal ischemia and infarction. **Semin. Gastrointest. Dis.**, v. 14, p. 66-76, 2003.

THORNTON, M.; SOLOMON, M. J. Crohn's disease: in defense of microvascular aetiology. **Int. J. Colorectal Dis.**, v. 17, p. 287-297, 2002.

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

TRAN, L.; GREENWOOD-VAN MEERVELD, B. In a non-human primate model, aging disrupts the neural control of intestinal smooth muscle contractility in a region-specific manner. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 26, p. 410-418, 2014.

VANDERWINDEN, J. M.; TIMMERMANS, J. P.; SCHIFFMANN, S. N. Glial cells, but not interstitial cells, express P2X7, an ionotropic purinergic receptor, in rat gastrointestinal musculature. **Cell Tissue Res.**, v. 312, n. 2, p. 149-154, 2003.

VANHOUTTE, P. M.; HUMPHREY, P. P. A.; SPEDDING, M. X. International Union of Pharmacology recommendation for nomenclature of new receptor subtypes. **Pharmacol. Rev.**, v. 48, p. 1-2, 1996.

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.

VULCHANOVA, L.; ARVIDSSON, U.; RIEDHL, M.; WANG, J.; BUELL, G.; SUPRENTANT, 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, Y.; XU, H.; MIZOGUCHI, K.; OE, M.; MAETA, H. Intestinal ischemia induces late preconditioning against myocardial infarction: a role for inducible nitric oxide synthase. **Cardiovasc. Res.**, v. 49, p. 391-398, 2001.

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

WILDMAN, S. S.; BROWN, S. G.; RAHMAN, M.; NOEL, C. A.; CHURCHILL, L.; BURNSTOCK, G.; UNWIN, R. J.; KING, B. F. Sensitization by extracellularCa(2+) of rat P2X(5) receptor and its pharmacological properties compared with rat P2X(1). **Mol. Pharmacol.**, v. 62, p. 957-966, 2002.

YANO, K.; HOSOKAWA, K.; HATA, Y. Quantitative morphology of Auerbach's plexus in rat intestinal wall undergoing ischemia. **J. Reconstr. Microsurg.**, v. 13, n.4, p. 297-301, 1997.

YOUNG, H. M.; FURNESS, J. B. An ultrastructural examination of the targets of serotonin-immunoreactive descending interneurons in the guinea-pig small intestine. **J. Comp. Neurol.**, v. 356, p. 101-114, 1995.

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