Marcos Vinicius da Silva

**EFEITO DA COLITE ULCERATIVA
EXPERIMENTAL SOBRE O RECEPTOR
P2X₇ NO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE
RATOS WISTAR**

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

**São Paulo
2011**

Marcos Vinicius da Silva

**EFEITO DA COLITE ULCERATIVA
EXPERIMENTAL SOBRE O RECEPTOR
P2X₇ NO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO DE
RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Castelucci

Versão Original

**São Paulo
2011**

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

da Silva, Marcos Vinicius

Efeito da colite ulcerativa experimental sobre o receptor P2X₇ no sistema nervoso entérico de ratos Wistar / Marcos Vinicius da Silva. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Patricia Castelucci.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Sistema nervoso entérico.

Versão do título para o inglês: Effect of experimental ulcerative colitis on the P2X₇ receptor in the Wistar rats enteric nervous system.

Descritores: 1. Plexo mioentérico 2. Sistema nervoso entérico 3. Colite ulcerativa 4. Doença do sistema digestório 5. Colite 6. Doenças do colo I. Castelucci, Patricia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0170/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marcos Vinicius da Silva.

Título da Dissertação: Efeito da colite ulcerativa experimental sobre o receptor P2X₇ no sistema nervoso entérico de ratos Wistar.

Orientador(a): Patricia Castelucci.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Presidente: Nome completo:
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 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **121** nas fls. **75** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Patrícia Castelucci**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo dos receptores P2x2,3,7 e das classes neuronais do sistema nervoso entérico do intestino grosso de ratos submetidos a colite ulcerativa experimental** do qual participou(aram) o(s) alunos **Marcos Vinicius da Silva, Aline Rosa Marosti Bobna**, 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 EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)** em **25.08.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 26 de agosto de 2009.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEa - ICB/USP

*A Deus e meus queridos pais,
Tia mãe, irmãos e familiares
que me apoiaram e me deram
força quando precisei.*

Agradecimentos

...MESTRE NÃO É AQUELE QUE APRENDEU A ENSINAR, MAS SIM AQUELE QUE ENSINA A APRENDER. Quando um aprendiz erra, seu mestre também errou, e precisa descobrir onde cometeu o erro, que aquele que aprende é reflexo de seu mestre, se houve comportamento indevido do aprendiz, não lhe foi ensinado à aprender, e sim repetiu o comportamento de quem lhe está a ensinar, é preciso ter atos de nobreza diante daqueles que escolhemos ensinar.

Senhora do Haiti de 108 anos.

Mestre.... 1. Homem que ensina, professor; 2. Aquele que é perito ou versado numa ciência ou arte... 3. Homem superior e de muito saber; 4. Aquele que se avanta em qualquer coisa, mentor, confessor; 5. Aquele que tem o mestrado...

Dicionário Aurélio

Reflexões como estas, me remete devagar sobre tudo que o ser Mestre representa. Será que estou preparado para essa honra, que é ser Mestre? Para mim, ser mestre ***é ser incansável em aprender seja em conhecimento científico ou na vida***. Mas até o momento da minha vida, tive o grande privilégio de conviver com mestres que me ensinaram muito, e espero fazer o mesmo no futuro.

Primeiramente, agradeço a Deus, o mentor dos mentores, que me ilumina, me dá paciência, força e o conforto quando preciso e precisei, obrigado por estar tão presente.

Agradeço a meus Mestres familiares que me ensinaram os primeiros passos passados, cautelaram passos presentes e souberam me conter nos saltos para o futuro. A eles agradeço principalmente Minha Mãe, Adeildes Barbosa da Silva, Minha Tia-mãe, Maria Augusta Feitosa, meu Pai Luiz Augusto da Silva e meus irmãos Fabiano Barbosa da Silva e Fabricio Luiz Barbosa da Silva.

Agradeço a meus mestres pelas grandes tardes de Domingo, aconchego domiciliar e ensinamentos de vida em São Paulo: Tia Sônia, Renilson Feitosa, Roseli, Sandra Merli Feitosa, Amilton Merli, Andréia Feitosa, Laerte, Ricardo, Ingridi.

Pelas grandes pequenas primas Lorena, Luiza, Izadora e meu primo Ítalo, obrigado por relembrar um pouco da minha infância.

Pela grande mestra e amiga que mesmo distante manteve a amizade desde a faculdade a você agradeço Amanda Loreta Silva Rosa.

Aos meus mestres da faculdade e colegas que me proporcionaram uma ótima graduação me reverencio diante de vocês com saudades

Pelos meus mestres vizinhos e amigos de Aracaju que sempre perguntam por mim e me recebem tão bem quando retorno. Agradeço o apreço e o respeito dado a mim.

Aos meus mestres de Pesquisa.

Primeiramente a minha mentora e orientadora Professora Doutora Patrícia Castelucci que soube me ensinar, com paciência, a pesquisa aplicada e fez transmitir sua paixão por pesquisa e anatomia e me contagiar pela imensidão da ciência. Agradeço, por ler um simples e-mail e me dar oportunidade, acreditar na minha capacidade, e fazer realizar um sonho que ainda tem vários passos a alcançar.

Em especial a dois mestres que me iniciaram na vida científica Professor Dr. Francisco Prado Reis e Professor Dr. José Aderval Aragão. Além de me transmitirem sua paixão por Anatomia, souberam com suas experiências acadêmicas me ajudar traçar meu caminho inicial de vivência acadêmica.

A banca de qualificação que me deu excelentes sugestões e fez enriquecer o projeto: Profa. Dra. Laura Beatriz Mesiano Maifrino, Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti e Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza.

Ao Prof. Dr. John Barton Furness (Department of Anatomy and Cell Biology University of Melbourne Australia). E ao Prof. Dr. Geoffrey Burnstock (University Col Rowland Hill Street London) obrigado pelas sugestões.

Agradeço a Universidade de São Paulo e a coordenação da pós-graduação pela oportunidade de pertencer a essa grande equipe do Instituto de Ciências Biomédicas III.

As minhas colegas de laboratório que souberam ser pacientes e mestres em me ensinar o muito em vida, cultura e experiências vividas por elas. Em especial e primeiramente a minha irmã de vida científica Aline Rosa Marosti Bobna e seu esposo André Bobna, agradeço sua paciência, companhia e grande coração. As minhas honrosas, grandes amigas e não menos importantes colegas Kelly Palombit, Márcia Mizuno, Cristina Eusébio, Jaqueline Jurjuk, Renata Gerez, Juliane, Ligia e Luciane. Obrigado pelo auxílio e correções na tese e por saber que posso contar com vocês nos bons e maus momentos.

A Profa. Dra. Silvia Lacchini com sua paciência e amizade ensinou grandes universos. A seus orientandos e grandes amigos de laboratórios Cíntia Taniguthi, Kátia Viegas, Thaís Cristina, Juliane, Alvaro, Nara, Camila, Tati. Ensinaram-me ser amigo nos bons e maus momentos, grandes abraços e boas palavras.

A grande conhecedora de estatística Rosana, obrigado pela ajuda, por ser uma boa ouvinte e ser uma grande amiga.

Mestres do departamento que proporcionaram grandes momentos e ensinamentos:

Professores:

Em especial ao Prof. Dr. Jackson C. Bittencourt por ceder seu laboratório para cortes e montagens de lâminas

Prof. Dr. Edson A. Liberti (Anatomossauro)

Profa. Dra. Silvia Boldrini (in memória)

Profa. Dra. Maria Luiza M. B. de Chaves

Prof. Dr. Newton S. Canteras

Profa. Dra. Cecília Helena A. G. Ferreira

Profa. Dra. Maria Inês Nogueira

Aos meus grandes amigos do departamento

Minha grande amiga e paciente Giselle, Cleyton Sobrinho, Leila, Cristina, Cristiane, Marília, Bruno, Miguel, Ana Paula Takano, Félix, Vanessa, Priscila, Daniela, Kelly, Fernando, Hélder, Regina, João Paulo, Valquíria, Thiago, Adriano, Carlos, Mônica, Pedro, Wilma, Silvia Honda, Daiane.

Aos mestres técnicas e anjos que me ajudaram com grande bondade e paciência a desenvolver minhas lâminas de histologia e corte em criostato: Martinha e Joelcimar.

Aos grandes colegas técnicos do Biotério, Renivaldo e Rodrigo, e meus grandes amigos Ricardo e Fábio.

Aos grandes colegas técnicos de anatomia: Adão, Tim e Edinho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio e financiamentos concedidos.

Agradeço a todos pela amizade e ensinamentos que puderam me proporcionar durante esse período de minha vida. Espero ser tão mestre quanto vocês foram para mim e que possa também ensinar boas experiências a outros em meu convívio futuro.

Muito Obrigado!!!

A Todos

*Quando uma criatura humana
desperta para um grande sonho
e sobre ele lança toda a força de
sua alma, todo o universo
conspira a seu favor.*

Johann Goethe

RESUMO

DA SILVA, M.V. **Estudo do efeito da colite ulcerativa experimental sobre o receptor P2X₇ no SNE de ratos Wistar.** 2011 135 P (Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

No trato digestório a Colite Ulcerativa e a doença de Crohn apresentam a necrose intestinal como processos fisiopatológicos. Este projeto teve como objetivo estudar o receptor P2X₇ e o código químico do colo distal no SNE de ratos submetidos à colite ulcerativa experimental. O código químico, área e densidade neuronal foram analisados nos neurônios entéricos imunorreativos para óxido nítrico sintase (NOS), colina acetil transferase (ChAT), Calb, Calr e células gliais (S100) com o receptor P2X₇. Foi analisado no colo distal de ratos: a) a colite ulcerativa com administração de TNBS (2, 4, 6 ácido trinitrobenzeno sulfônico) (Grupo Colite) b) ratos Sham injetados com PBS, e c) os animais sem a intervenção (grupo controle). Os tecidos foram preparados para métodos imunohistoquímicos de dupla marcação do receptor P2X₇ com NOS, ChAT, Calb, Calr, HuC/D e S100. Houve colocalização no SNE do receptor P2X₇-ir (imunorreativos) com os neurônios NOS-ir, ChAT-ir, Calb-ir, Calr-ir, HuC/D-ir, e células S100-ir nos grupos controle, PBS e Colite. No grupo colite os neurônios apresentaram características deformadas, principalmente nos neurônios NOS-ir, no plexo mioentérico. No plexo mioentérico houve diminuição na colocalização do receptor P2X₇ com os neurônios NOS-ir em 4,7%, ChAT-ir em 9,7%, Calb-ir em 10%, Calr-ir de 3,4%, HuC/D-ir em 6,8%, e S100 em 9,5%. No plexo submucoso do grupo colite houve aumento dos neurônios Calb-ir de 6%, e dos neurônios Calr aumento de 13,5%, HuC/D-ir houve redução de 18,5%. Foi visto também nesse estudo alterações morfológicas, como aumento de neutrófilos, desintegração do epitélio intestinal e células caliciformes e diminuição de colágeno. A densidade neuronal no plexo mioentérico mostrou diminuição de 42,3%, 34,9%, 22,9%, 60,6%, 14,7% e 29,2% dos neurônios NOS-ir, ChAT-ir, Calb-ir, Calr-ir, HuC/D-ir e células S100-ir, respectivamente. No plexo submucoso houve diminuição de 34,7%, 11,7%, 33,4% e 44,2% nos neurônios Calb-ir, Calr-ir, HuC/D-ir e células S100-ir, respectivamente, no grupo colite. A área de perfil foi reduzida em 6,8% e 21% nos neurônios NOS-ir e ChAT-ir, respectivamente, tendo aumentado 20% dos neurônios Calb-ir. No plexo submucoso houve diminuição nas áreas, diâmetros máximo e mínimo nos neurônios Calb-ir, não houve alteração desse parâmetros nos neurônios Calr-ir. Este estudo demonstrou que a colite afetou os neurônios do SNE, com seus respectivos códigos químicos que podem causar alterações da morfologia e motilidade intestinal.

Palavras-chave: Colite, TNBS, Plexo mioentérico, Plexo submucoso, Receptor purinérgico.

ABSTRACT

DA SILVA, M. V. **Effect of experimental ulcerative colitis on the P2X₇ receptor in the enteric nervous system of rats.** 2011 135 P (Master Thesis) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The digestive tract the ulcerative colitis and Crohn's disease presents as process intestinal necrosis pathophysiological. This project aimed to study receptor P2X₇ and chemical code of the distal colon in enteric nervous system of rat undergoing experimental Ulcerative Colitis. The chemical code, area and neuronal density were analyzed in the enteric neurons immunoreactive for nitric oxide synthase (NOS), choline acetyl transferase (ChAT), Calbindin, calretinin and glial cells (S100) with P2X₇ receptor. The analyzed was done in the distal colon of rats: a) Ulcerative Colitis with TNBS administration (2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid) (colitis group) b) sham rats injected with PBS and c) animals with no intervention (control group). Tissues were prepared for immunohistochemical double staining methods P2X₇ receptor, ChAT, Calbindin, Calretinin, anti-HuC/D and S100. Colocalization the enteric nervous system of the P2X₇ receptor-ir (immunoreactive)-ir, with NOS-ir neurons, ChAT-ir, Calbindin-ir, Calretinin-ir, HuC/D-ir and S100-ir cells in the control, PBS and Colitis groups. The colitis group neurons showed deformed the NOS-IR neurons in the myenteric plexus. The decrease the colocalization of P2X₇ receptor neurons NOS-ir (4.7%), ChAT-ir (9.7%), Calbindin-ir (10%), Calretinin-ir (3.4%), HuC/D-ir neurons (6.8%) and S100 (9.5%) in the myenteric plexus. In the submucosal plexus the Calbindin-ir neurons increased by 6%, Calretinin-ir neurons increase of 13.5% and anti-HuC/D-ir 18.5% reduction in the Colitis group. There were morphological changes such as increased neutrophils, disintegration of the intestinal epithelium and goblet cells and decreased of collagen. The neuronal density decreased in the myenteric plexus of 42.28%, 34.9%, 22.87%, 60.57%, 14.69% and 29.2% NOS-ir, ChAT-ir, Calbindin-ir, calretinin-ir, HuC/D-ir neurons and S100-ir cells. In the submucosal plexus were decreased by 34.74%, 11.68%, 33.44% and 44.20% Calbindin-ir, Calretinin-ir, HuC/D-ir neurons and glial cells S100-ir, respectively, in the Colitis group. The profile area were reduced by 6.8% and 21% NOS-ir and ChAT-ir neurons, respectively, there was increase 20% of Calbindin-ir neurons. There was decrease in the submucosal plexus profile area, maximum and minimum diameters in the Calbindin-ir neurons, no change in the parameters by Calretinin-ir neurons. This study demonstrated that colitis affect the enteric nervous system neurons with their respective chemical codes that can cause changes in morphology and motility.

Key words: Colitis, TNBS, Myenteric Plexus, Submucosal Plexus, and Purinergic Receptor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração do íleo com suas camadas	29
Figura 2 - Tipos de neurônios entéricos.....	30
Figura 3 - Porção do colo distal após 24 h da aplicação de TNBS (A-B). (A) colo distal inflamado e com hiperemia (seta). (B) Intestino grosso aberto (colos proximal e distal) com a região do colo distal hiperemiada (seta).....	47
Figura 4 - Pontuação da lesão de colite após 24 horas.....	48
Figura 5 - Neurônios imunorreativos à NOS e ao receptor P2X ₇ (A - C'') no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas preenchidas demonstram neurônios NOS-ir colocalizados com o receptor P2X ₇ (Barra:10µm).....	50
Figura 6 - Neurônios imunorreativos à ChAT e ao receptor P2X ₇ (A - C'') no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas preenchidas demonstram neurônios ChAT-ir colocalizados com o receptor P2X ₇ (Barra: 10µm).....	51
Figura 7 - Neurônios imunorreativos à Calb e ao receptor P2X ₇ (A - C'') no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas preenchidas demonstram neurônios Calb-ir colocalizados com o receptor P2X ₇ (Barra:10µm).....	52
Figura 8 - Neurônios imunorreativos à Calr e ao receptor P2X ₇ (A - C'') no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas preenchidas demonstram neurônios Calr-ir colocalizados com o receptor P2X ₇ (Barra: 10µm).	53

Figura 9 - Neurônios do plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A-A''), PBS (B-B'') e Colite (C-C''). Evidencia neurônios imunorreativos ao anti-HuC/D (A, B, C) colocalizados com o receptor P2X₇ (A'', B'', C''). Setas simples demonstram neurônios colocalizados. Setas vazadas indicam células não colocalizadas com anti - HuC/D (Barra 10µm).54

Figura 10 - Neurônios imunorreativos à HuC/D e a NOS (A - C'') no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas preenchidas demonstram neurônios imunorreativos ao HuC/D e colocalizados com a NOS. Setas vazadas demonstram neurônios imunorreativos somente ao HuC/D (Barra 10µm)..55

Figura 11 - Neurônios imunorreativos ao HuC/D e a ChAT (A - C'') no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas demonstram neurônios imunorreativos ao HuC/D e colocalizados com a ChAT (Barra: 10µm).56

Figura 12 - Células gliais entéricas imunorreativas à S100 e ao receptor P2X₇ (A - C'') no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas preenchidas demonstram células marcadas com S100-ir colocalizadas com o receptor P2X₇ (Barra: 10µm).57

Figura 13 - Neurônios imunorreativos à Calb e ao receptor P2X₇ (A - C'') no plexo submucoso do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas demonstram neurônios Calb-ir colocalizados com o receptor P2X₇ (Barra:10µm).59

Figura 14 - Vasos imunorreativos somente ao receptor P2X₇ (A' - C'') do plexo submucoso do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas vazadas demonstram paredes dos vasos marcadas com o receptor P2X₇. * demonstra a luz do vaso (Barra: 20µm).60

Figura 15 - Neurônios imunorreativos à Calr e ao receptor P2X₇ (A - C'') no plexo submucoso do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C,

C''). Setas demonstram neurônios Calr-ir colocalizados com o receptor P2X₇ (Barra 10µm).61

Figura 16 - Vasos imunorreativos à Calr e ao receptor P2X₇ (A - C'') no plexo submucoso do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas vazadas demonstram terminações nervosas e vasos marcados com Calr-ir colocalizados com o receptor P2X₇. * demonstra luz do vaso (Barra: 20µm).....62

Figura 17 - Neurônios imunorreativos ao HuC/D e ao receptor P2X₇ (A - C'') no plexo submucoso do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas demonstram neurônios imunorreativos ao HuC/D colocalizados com o receptor P2X₇. Setas vazadas são células que expressam somente ao receptor P2X₇. * demonstra espaços vazios no gânglio (Barra 10µm).63

Figura 18 - Células gliais entéricas imunorreativas a S100 e ao receptor P2X₇ (A - C'') do plexo submucoso do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas demonstram células imunorreativas ao S100 colocalizadas com o receptor P2X₇. *indicam espaços onde localizam neurônios (Barra 10µm).....64

Figura 19 - Fotomicrografia com neutrófilos revelados por histoquímica de mieloperoxidase do colo distal de ratos os grupos controle (A, D, G, J), PBS (B, E, H, L) e Colite (C, F, I, M). LP lâmina própria; GM glândula da mucosa; PM plexo Mioentérico. Setas simples neutrófilos marcados em marrom. Barras (A-C) 100µm, (D-F) 50µm, (G-I) 20µm e (J-M) 10µm.66

Figura 20 - Fotomicrografia demonstrando secções coradas com hematoxilina e eosina, do colo distal, de ratos dos grupos controle (A, D, G, J), PBS (B, E, H, L) e Colite (C, F, I, M). CM camada circular; LP lâmina própria; GM glândula da mucosa; PM plexo Mioentérico. Barras (A-C) 100µm, (D-F) 50µm, (G-I) 20µm e (J-M) 10µm.....68

Figura 21 - Cortes histológicos, do colo distal, de ratos corados com picrosirius nos grupos controle (A-B'), PBS (C- D') e Colite (E- F'). LP lâmina própria; Luz polarizada (A-E'e'B'-F'), setas simples gânglio mioentérico, fibras colágenas: finas (verdes), espessas

(vermelhas) e finas e espessas (amarelas). Barras (A-E, A'-E') 100µm, (B-F, B'-F') 20µm.....70

Figura 22 - Cortes histológicos, do colo distal de ratos, corados com picrosirius nos grupos controle (A, A'), PBS (B, B') e Colite (C, C') . LP lâmina própria; Luz polarizada (A' - C'), setas vazadas gânglio mioentérico, fibras colágenas: finas (verdes), espessas (vermelhas) e finas e espessas (amarelas) (Barra: 10µm).71

Figura 23 - Fotomicrografia demonstrando secções coradas com ácido periódico de Shiff (PAS) do colo distal de ratos dos grupos controle (A, D, G), PBS (B, E, H) e Colite (C, F, I). LP lâmina própria. Setas simples células caliciformes. Barras (D-F) 50µm, (G-I) 20µm e (J-M) 10µm.73

Figura 24- Densidade (neurônios/cm²) dos neurônios imunorreativos ao P2X₇ nos grupos Controle, PBS e Colite,* $p < 0,05$ Colite comparado ao Controle, # $p < 0,05$ Colite comparado ao PBS.....81

Figura 25 - Densidade (neurônios/cm²) dos imunorreativos à NOS nos grupos Controle, PBS e Colite (*Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e π PBS comparado ao Controle; *, #, $\pi p < 0,05$).....82

Figura 26 - Densidade (neurônios/cm²) dos neurônios imunorreativos à ChAT nos grupos Controle, PBS e Colite (* Colite comparado ao Controle, π PBS comparado ao Controle; *, $\pi p < 0,05$).....8

Figura 27 - Densidade (neurônios/cm²) dos neurônios imunorreativos à Calb nos grupos Controle, PBS e Colite (*Colite comparado ao Controle, #Colite comparado ao PBS; *, # $p < 0,05$).....83

Figura 28 - Densidade (neurônios/cm²) dos neurônios imunorreativos à Calr no grupo Controle, PBS e Colite, *Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e π PBS comparado ao Controle; *, #, $\pi p < 0,05$).....84

Figura 29 - Densidade (neurônios/cm ²) dos neurônios imunorreativos ao Pan-Neuronal (HuC/D) no grupo Controle, PBS e Colite, *Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e π PBS comparado ao Controle; *, #, π $p < 0,05$).....	84
Figura 30 - Densidade de células gliais entéricas (células/cm ²) imunorreativas ao S100 no grupo Controle, PBS e Colite, *Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e π PBS comparado ao Controle; *, #, π $p < 0,05$).....	85
Figura 31 - Densidade (neurônios/cm ²) dos neurônios imunorreativos ao P2X ₇ nos grupos Controle, PBS e Colite,* $p < 0,05$ Colite comparado ao Controle, # $p < 0,05$ Colite comparado ao PBS.....	86
Figura 32 - Densidade (neurônios/cm ²) dos neurônios imunorreativos à Calb nos grupos Controle, PBS e Colite (*Colite comparado ao Controle, #Colite comparado ao PBS; *, # $p < 0,05$).....	87
Figura 33 - Densidade (neurônios/cm ²) dos neurônios imunorreativos à Calr no grupo Controle, PBS e Colite (*Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e π PBS comparado ao Controle; *, #, $p < 0,05$).....	88
Figura 34 - Densidade (neurônios/cm ²) dos neurônios imunorreativos ao Pan-Neuronal (HuC/D) no grupo Controle, PBS e Colite (*Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e π PBS comparado ao Controle; *, #, π $p < 0,05$).....	91
Figura 35- Densidade de células gliais entéricas (células/cm ²) imunorreativas ao S100 no grupo Controle, PBS e Colite (*Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e π PBS comparado ao Controle; *, #, π $p < 0,05$).....	92
Figura 36 - Área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à NOS nos grupos Controle, PBS e Colite (* diferença significativa do Colite em relação ao Controle e PBS, * $p < 0,05$).....	92
Figura 37 - Área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à ChAT nos grupos Controle, PBS e Colite. * diferença significativa do Colite em relação ao Controle e PBS (* $p < 0,05$).....	93

Figura 38 - Área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calb nos grupos Controle, PBS e Colite (# Indica diferença significativa do PBS em relação ao Controle; * diferença significativa do Colite em relação ao PBS, *, # $p<0,05$).....94

Figura 39 - Área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calr nos grupos Controle, PBS e Colite (* diferença significativa do PBS em relação ao colite, * $p<0,05$).....95

Figura 40 - Área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calb, do plexo submucoso, nos grupos Controle, PBS e Colite (* diferença significativa do PBS em relação ao colite, * $p<0,05$).....97

Figura 41 - Área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calr, do plexo submucoso, nos grupos Controle, PBS e Colite (* diferença significativa do PBS em relação ao colite, * $p<0,05$).....98

Figura 42 - Distribuição da área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à NOS nos grupos controle, PBS e Colite (* diferença significativa do Colite em relação ao Controle, * $p<0,05$).....101

Figura 43 - Distribuição da área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à ChAT nos grupos controle, PBS e Colite (* diferença significativa do Colite em relação ao Controle, * $p<0,05$).....102

Figura 44 - Distribuição da área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calb nos grupos Controle, PBS e Colite (* diferença significativa do Colite em relação ao Controle, * $p<0,05$).....103

Figura 45 - Distribuição da Área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calr nos grupos Controle, PBS e Colite (* diferença significativa do Colite em relação ao Controle, * $p<0,05$).....104

Figura 46 - Distribuição da área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calb do plexo submucoso nos grupos controle, PBS e Colite (* diferença significativa do Colite em relação ao Controle, * $p < 0,05$).....106

Figura 47 - Distribuição da área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calr do plexo submucoso nos grupos Controle, PBS e Colite (* diferença significativa do Colite em relação ao Controle, * $p < 0,05$).....107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos anticorpos primários.....	41
Tabela 2 - Anticorpos secundários usados.....	42
Tabela 3. Grau de lesão no colo distal com colite ulcerativa.....	42
Tabela 4 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X ₇ e ao óxido nítrico sintase (NOS) no colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e colite de 24 horas.....	74
Tabela 5 – Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X ₇ e a acetil colina transferase (ChAT) no Colo distal de animais dos grupos PBS e colite.....	75
Tabela 6 – Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X ₇ e a Calb (CALB) no Colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e colite.....	75
Tabela 7 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X ₇ e à Calr no colo distal de animais dos grupos controle, PBS e Colite.....	76
Tabela 8 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X ₇ e ao pan neuronal anti-HuC/D no colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e Colite.....	76
Tabela 9 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao anti-HuC/D e à NOS no colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e Colite.....	77
Tabela 10 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao anti-HuC/D e à ChAT no colo distal de animais dos grupos PBS e Colite.....	77
Tabela 11 - Colocalização das células gliais mioentéricas imunorreativas ao S100 e ao P2X ₇ no colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e Colite.....	78
Tabela 12 - Colocalização dos neurônios submucosos imunorreativos ao receptor P2X ₇ e à Calb no colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e Colite.....	78
Tabela 13 - Colocalização dos neurônios submucosos imunorreativos ao receptor P2X ₇ e à Calr no colo distal de animais dos grupos controle, PBS e Colite.....	79
Tabela 14 - Colocalização dos neurônios submucosos imunorreativos ao receptor P2X ₇ e ao pan neuronal anti-HuC/D no colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e Colite.....	80
Tabela 15 - Colocalização das células gliais submucosas imunorreativas ao S100 e ao P2X ₇ no colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e Colite.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - 5-Hidroxitriptamina

ACh - Acetilcolina

ATP - Adenosina trifosfato

BBG - Brilliant Blue G

Ca²⁺ - Cálcio

Calb - Calb

Calb-ir - Neurônios imunorreativos à Calb

Calr - Calr

Calr-ir - Neurônios imunorreativos à Calr

ChAT - Acetilcolina transferase

ChAT-ir - Neurônios imunorreativos à acetilcolina transferase

CO₂ - Gás carbônico

DC- Doença de Crohn

DII - Doença Intestinal Inflamatória

DMáx - Diâmetro Máximo

DMín - Diâmetro mínimo

DNBS - 2,4 Dinitrobenzeno Sulfônico

GDNF - Fator Neurotrófico Derivado da Glia

GFAP - Proteína Fibrilar Ácida Glial

H₂O - Estrutura molecular da água

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HE - Hematoxilina e Eosina

IFN γ - Interferon γ

IL-6 - Interleucina 6

IPANs - Neurônios aferentes intrínsecos primários

I/R-i - Isquemia intestinal e Reperfusão

K⁺ - Potássio

Na⁺ - Sódio

NaCl - Cloreto de sódio

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

NOSn-ir - Neurônios imunorreativos à óxido nítrico sintase neuronal

NPY - Neuropeptídeo Y

MPO - Mieloperoxidase

O₂ - Oxigênio

P2X₂-ir - Neurônios imunorreativos ao receptor P2X₂ (ionotrópicos)

P2X₇-ir - Neurônios imunorreativos ao receptor P2X₇ (ionotrópicos)

P2Y-ir - Neurônios imunorreativos ao receptor P2Y (metabotrópicos)

PAS - Ácido Periódico de Schiff

PBS - Tampão Salina Fosfato

SNA - Sistema Nervoso Autônomo

SNC - Sistema Nervoso Central

SNE - Sistema Nervoso Entérico

SNP - Sistema Nervoso Periférico

TNBS- Trinitrobenzeno sulfônico

TNF α - Fator de Necrose Tumoral α

VIP - Peptídeo Intestinal Vasoativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
Doenças Inflamatórias Intestinais: Colite Ulcerativa e Doença de Crohn.....	27
1.2 Considerações sobre o SNE.....	28
1.3 Considerações sobre as células Gliais Entéricas.....	32
1.4 Considerações sobre os Receptores Purinérgicos P2X no SNE.....	33
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo Geral	38
2.2 Objetivos Específicos.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Indução da Colite Ulcerativa.....	40
3.2 Preparação do Material para Imunohistoquímica.....	40
3.3 Método de Dupla Marcação para Imunofluorescência Indireta do Receptor P2X₇ com a NOS, a ChAT, a Calb, a Calr, anti-HuC/D e S100.....	41
3.4 Análises Qualitativas	42
3.4.1 Avaliação da Colite Ulcerativa	42
3.4.2 Análise da Imunofluorescência Indireta nos Neurônios Entéricos.....	43
3.5 Análises Quantitativas.....	43
3.5.1 Análise do Código Químico dos Neurônios Entéricos.....	43
3.5.2 Análise da Densidade Neuronal, da Área do Perfil Neuronal, DMáx e DMín.....	44
3.6 Técnica de Histoquímica para MPO.....	44
3.7 Método para Análise Histológica.....	45
3.8 Análise Estatística.....	45
4 RESULTADOS	46
4.1 Análises Qualitativas.....	47
4.1.1 Análise Qualitativa no Plexo Mioentérico.....	48
4.1.2 Análise Qualitativa no plexo Submucoso.....	58
4.2 Análise da Distribuição de Neutrófilos na Colite Ulcerativa.....	65
4.3 Análise Qualitativa Histológica na Colite Ulcerativa.....	67
4.4 Análise Qualitativa da Distribuição do Colágeno na Colite Ulcerativa.....	69
4.5 Análise Qualitativa das Células Caliciformes na Colite Ulcerativa.....	72
4.6-Análise Quantitativa dos Plexo Mioentérico e Plexo Submucoso.....	74

4.6.1 Colocalização no Plexo Mioentérico.....	74
4.6.2 Colocalização no Plexo Submucoso.....	78
4.7 Densidade Neuronal do Plexo Mioentérico.....	80
4.8 Densidade Neuronal do Plexo Submucoso.....	85
4.9 Áreas dos Perfis dos Neurônios Mioentéricos	90
4.10 Perfil Neuronal do Plexo Submucoso.....	96
4.11 Distribuição de Frequências dos Neurônios Mioentéricos	99
4.12 Distribuição de Frequências dos Neurônios Submucosos quanto à Área do Perfil.....	105
5 DISCUSSÃO.....	108
5.1 Considerações sobre o Modelo de Colite Experimental.....	109
5.2 Considerações sobre o Código Químico e a Expressão do Receptor P2X ₇	110
5.3 Alterações Morfológicas na Colite.....	114
5.4 Na análise Quantitativa dos Plexos Entéricos	116
5.5 Considerações sobre a Densidade Neuronal nos Plexos entéricos	117
6 CONCLUSÕES	119
REFERÊNCIAS	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Inflamatórias Intestinais: Colite Ulcerativa e Doença de Crohn

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são doenças crônicas que afetam o trato digestório, dentre essas doenças temos: a colite ulcerativa e a doença de Crohn (DC) (KAWADA et al., 2007). De etiologias desconhecidas, caracterizam-se por uma complexa interação de fatores genéticos, imunológicos e ambientais (FIOCCHI, 1997; POLI et al., 2001).

A incidência das DII ocorre entre os 20 e 40 anos ou entre os idosos (JEWELL, 1998). A América Latina tem baixa prevalência da doença quando comparada aos Estados Unidos, Reino Unido e Austrália (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2002). O Brasil é considerado um país de baixa prevalência da DII, entretanto, em um estudo baseado em dados de internações hospitalares realizado no estado de São Paulo (2009), apontou que a população mais afetada com a doença era da raça branca do sexo feminino e que houve um aumento de casos de 1,75 a 11,3 casos por 100.000 pessoas entre os anos de 1986 e 2005, sendo a Colite Ulcerativa das DII que mais aumentou nos últimos cinco anos (2001-2005). Dos casos registrados, houve predominância de pessoas da raça branca, entre 20 e 40 anos, com aumento da incidência em indivíduos a partir dos 55 anos de idade (VICTORIA et al., 2009). A distribuição das DII é semelhante nos sexos feminino e masculino, exceto na Doença de Crohn, o qual a prevalência ocorre na população feminina. Populações de áreas urbanas, de classes econômicas mais altas, fumantes e parentes de primeiro grau de indivíduos portadores da DII são os mais acometidos por essas doenças (OMS, 2002).

Pelos modelos experimentais de inflamação intestinal tem sido possível constatar alterações na diminuição dos neurônios dos gânglios entéricos, anormalidades nas funções contrátil e secretora do colo distal associados com diarreia (COLLINS, 1996; GALEAZZI et al., 2000; JACOBSON et al., 1995; POLI et al., 2001; SNAPE et al., 1991; STEIN et al., 1998). A literatura tem demonstrado que o sistema nervoso entérico (SNE) é muito afetado na DII, com necrose, apoptose e degeneração dos gânglios entéricos (GEBOES; COLLINS, 1998; LOMAX et al., 2005). Também foram observadas alterações nos neurotransmissores e neuropeptídeos dos neurônios entéricos com a DII (BOYER et al., 2005; SHARKEY; KROESE, 2001).

Para a indução de colite experimental em animais têm sido utilizadas substâncias ácidas como: o 2, 4-ácido dinitrobenzeno sulfônico (DNBS) e 2, 4, 6 ácido Trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Com o uso destas substâncias pode-se promover uma colite semelhante

à de humanos (BOYER et al., 2005; JACOBSON et al., 1997; LINDEN et al., 2005; POLI et al., 2001; SANOVIC et al., 1999).

A injeção do TNBS reproduz em animais uma inflamação persistente do colo distal semelhante à de humanos, o que possibilita monitorar a progressão da doença por várias semanas (JURJUS et al., 2004; KAWADA et al., 2007; MORRIS et al., 1989). A partir disso, em um estudo utilizando o TNBS como substância indutora de ileíte mostrou que os danos imediatos na mucosa são revertidos rapidamente (<1 dia), apresentando um aumento no número de células imunitárias (PONTELL et al., 2009). Nesse estudo, a reconstituição do epitélio mostrou-se com limpeza de fragmentos celulares do tecido conjuntivo da lâmina própria durante uma semana e houve, em conjunto, um aumento da excitabilidade dos neurônios, persistindo por 8 semanas devido a inflamação da mucosa.

Em humanos, as inflamações na mucosa foram associadas com alterações da motilidade e percepção de dores, e houve aumento de linfócitos na lâmina própria (CHADWICK et al., 2002).

1.2 Considerações sobre o SNE

O SNE está contido nas paredes do trato digestório, pâncreas e sistema biliar. Consiste de dois plexos ganglionares, o plexo mioentérico e o plexo submucoso (FURNESS et al., 1995, 1999; FURNESS; COSTA, 1987). O SNE é responsável pela motilidade intestinal e pela troca de fluidos da mucosa (GERSHON, 2005; FURNESS, 2006).

O plexo mioentérico (de Auerbach) localiza-se entre a camada longitudinal externa e a camada do músculo circular, presente por todo trato digestório, desde o esôfago ao reto (AUERBACH, 1864¹ apud FURNESS, 2006; LI, 1940; SCHABADASCH, 1930a², b³ apud FURNESS, 2006; STÖHR, 1930⁴ apud FURNESS, 2006). O plexo mioentérico apresenta três componentes: um plexo primário, um plexo secundário e um plexo terciário (FURNESS; COSTA, 1987; FURNESS, 2006) (Figura 1).

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 Nervenengeflechte 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.

O plexo submucoso é encontrado no intestino delgado e no intestino grosso, com pouca predominância no esôfago e estômago. Divide-se em plexo submucoso interno (plexo de Meissner) adjacente à mucosa, plexo submucoso externo (plexo de Schabadash ou de Henle) junto à camada muscular circular e o plexo intermediário posicionado entre os plexos submucosos interno e externo. Suas malhas são menores que as do plexo mioentérico com fibras mais finas interconectadas e os gânglios são menores.

Os plexos entéricos seguem um padrão ao longo do trato digestório, porém são encontradas diferenças quanto à densidade, a morfologia dos neurônios e a forma dos gânglios (FURNESS, 2006). Alterações morfológicas no SNE podem ser observadas em diferentes animais como ratos ou camundongos com diferentes idades (MATINI et al., 1997; MCKEOWN et al., 2001; QU et al., 2008), ou submetidos à condições experimentais, como na inflamação (BOYER et al., 2005; DE GIORGIO et al., 2004; PAULINO et al., 2011), desnutrição e renutrição (CASTELUCCI et al., 2002b; GOMES et al., 2006; GREGGIO et al., 2010; MISAWA et al., 2010) e obesidade (MIZUNO, 2010).

Figura 1 - Ilustração do íleo com suas camadas.
Fonte: Modificado de Furness, 2006.

Segundo Furness (2006), através de estudos funcionais, farmacológicos, neuroquímicos e morfológicos, pode-se identificar dezessete tipos de neurônios entéricos, quatorze destes encontrados no intestino delgado de cobaia. Os neurônios motores são

divididos em cinco tipos: neurônios motores excitatórios, neurônios motores inibitórios, neurônios secretomotores/vasodilatadores não-colinérgicos, neurônios secretomotores/vasodilatadores colinérgicos e neurônios secretomotores não vasodilatadores colinérgicos (FURNESS, 2006; FURNESS et al., 2000, 1998) (Figura 2). Dependendo da região do trato gastrointestinal onde se situam, esses neurônios podem controlar a motilidade, o transporte de fluidos da mucosa e o fluxo sanguíneo local (FURNESS, 2006).

Figura 2 - Tipos de neurônios entéricos.

Fonte: Modificado de Furness, 2006.

Outro subgrupo de neurônios são os aferentes intrínsecos primários (IPANs) com corpos celulares de longas projeções anais (FURNESS et al., 2000). Os IPANs são neurônios sensoriais, com morfologia Dogiel Tipo II (neurônios grandes e com superfície lisa), com propriedades eletrofisiológicas de neurônios tipo AH, enquanto os neurônios motores e interneurônios apresentam morfologia de neurônios Dogiel Tipo I (neurônios com muitos dendritos na superfície) e com padrão eletrofisiológico de neurônios S (FURNESS; COSTA, 1987; FURNESS, 2006).

Através de investigações farmacológicas caracterizadas por uma combinação histoquímica ou imunohistoquímica específica de marcadores neuronais como enzimas, proteínas do citoesqueleto, neurotransmissores e receptores, possibilitou a divisão desses neurônios em nitrérgicos, colinérgicos e sensoriais (FURNESS et al., 1990, 1989, 1988b; COSTA et al., 1996).

Os neurônios marcados com a enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS), apresentam a função motora inibitória do intestino, liberam óxido nítrico (NO) promovendo relaxamento da musculatura lisa, além desses serem adrenérgicos e não colinérgicos (AIMI et al., 1993; NICHOLS et al., 1995).

A acetilcolina (ACh) é um outro neurotransmissor importante do trato gastrointestinal e está envolvido na regulação neural da motilidade e secreção, sendo sua enzima catalisadora da colina acetil transferase (ChAT) (AMBACHE, 1951; KOSTERLITZ; LEES, 1964). Por ser de populações distintas de neurônios motores mioentéricos inibitórios e excitatórios, os neurônios ChAT raramente colocalizam com neurônios imunorreativos à NOS. No entanto, trabalhos realizados em cobaias sugerem que neurônios NOS podem também ser imunorreativos à ChAT. Segundo Neunlist et al. (2003) a proporção da ChAT na população total diminuiu 41% em áreas não-inflamadas e até 30% em áreas inflamadas em comparação com o tecido controle.

A calbindina (Calb) e a calretinina (Calr) ocorrem principalmente nos neurônios intrínsecos sensoriais de ratos e cobaias. Eles apresentam morfologias Dogiel Tipo II com corpos celulares grandes e axônios com projeções para mucosa (FURNESS et al., 1988b, 1998; IYER et al., 1988; KUNZE et al., 1995, 1998; MANN et al., 1997, 1999a; SAYEGH; RITTER, 2003; SONG et al., 1994a). No íleo, os terminais Calb-ir são imunorreativos para o transportador vesicular de ACh, que é um marcador específico de axônios colinérgicos (LI; FURNESS, 1998). Os neurônios Calr-ir também apresentam morfologia Dogiel Tipo I nos plexos mioentérico e submucoso (BROOKES et al., 1991, 1995; MANN et al., 1999; SAYEGH; RITTER, 2003). No plexo submucoso do colo distal, a grande população de neurônios é imunorreativa à Calr e a segunda à Calb (AYMAN et al., 2003; MITSUI, 2010).

Os neurônios secretomotores e vasomotores do plexo submucoso controlam diretamente o circuito reflexo local. Os dois tipos de neurônios secretomotores intestinais são os neurônios colinérgicos e os não-colinérgicos (FURNESS, 2000, 2006). Os neurônios não-colinérgicos parecem mediar a maioria das respostas reflexas locais

utilizando o Peptídio Intestinal Vasoativo (VIP) ou um peptídeo relacionado como seu transmissor primário (FURNESS, 2006).

1.3 Considerações sobre as Células Gliais Entéricas

Glias entéricas são células satélites nucleadas encontradas em torno dos corpos celulares de células nervosas e de gânglios entéricos. O citoplasma contém retículo endoplasmático, numerosos ribossomos livres, mitocôndrias, lisossomos e microtúbulos (FURNESS, 2006).

Dentro da mucosa intestinal, as glias entéricas estão na proximidade da camada epitelial e capilares sanguíneos da lâmina própria (FURNESS, 2006; SAVIDGE et al., 2007). Nos plexos do intestino essas células estão nos gânglios fazendo a interligação de filamentos nervosos dos gânglios de cada plexo (mioentérico e submucoso) (RUHL, 2005). Suas marcações principais são feitas através da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) ou S100, proteína ligante de Ca^{2+} (FERRI et al., 1982b). Essa última tem como papel principal transmitir o aumento dos teores de Ca^{2+} e em glia cultivada medeia o ATP extracelular na comunicação intercelular (ZHANG et al., 2003; HANANI, 1994).

O receptor P2X_7 está expresso predominantemente nas células de Schwann, células gliais (astrócitos) e epiteliais (COLLO et al., 1997; DI VIRGILIO et al., 2001; SPERLAGH et al., 2006; SURPRENANT et al., 1996) e no SNE foi descrito nos gânglios entéricos (VANDERWINDEN et al., 2007).

Estudos de microscopia eletrônica demonstraram que células satélites entéricas lembram células gliais ou astrócitos do sistema nervoso central (SNC) (COOK; BURNSTOCK, 1981b; GABELLA, 1971, 1972a, 1976b, 1981; KOMURO et al., 1982b). Em outro estudo através de biópsias dos intestinos delgado e grosso foi identificado pela imunohistoquímica com GFAP e Fator Neurotrófico Derivado da Glia (GDNF), a glia entérica no plexo submucoso. Também em biópsias de intestinos inflamados de pacientes com colite ulcerativa houve um aumento na glia de GFAP e GDNF-positivos (VON BOYEN et al., 2011).

Em um estudo utilizando íleos e cecos de cobaias fêmeas, o GFAP marcou corpos celulares de glias entéricas nos gânglios pertencentes ao plexo submucoso interno e externo e no plexo mioentérico (DI GIANCAMILLO et al., 2010).

1.4 Considerações sobre os Receptores Purinérgicos P2X no SNE

Holton (1959) demonstrou que o 5'-adenosina trifosfato (ATP) pode ser liberado dos nervos sensoriais durante uma estimulação antidrômica. Burnstock et al. (1963) propuseram a existência de nervos autonômicos que não eram adrenérgicos, nem colinérgicos e que supriam o trato gastrointestinal. Nos anos subsequentes, foi identificado o transmissor não-adrenérgico e não-colinérgico dos nervos que supriam o intestino e a bexiga urinária, sendo o ATP a substância que mais satisfaz este critério (BURNSTOCK et al., 1963).

Em seus experimentos, Burnstock et al. (1970) concluíram que o ATP poderia mediar diferentes funções, agindo como co-transmissor. Em 1972, Burnstock propôs a existência do termo “nervos purinérgicos” e por consequência a existência de receptor para ATP na membrana pós-sináptica. Em 1976, consagrou-se o termo receptor purinérgico. Diferente dos demais neurotransmissores clássicos, o ATP é liberado não só pelos terminais pré-sinápticos dos neurônios, mas também pelos terminais pós-sinápticos. Com o tempo, detectou-se a presença destes receptores em vários fenótipos não-neuronais, nos mais diversos tecidos. Estudos atuais comprovam que a sinalização purinérgica está envolvida em muitos mecanismos, incluindo secreção endócrina e exócrina, resposta imune, dor, inflamação, agregação de plaquetas, vasodilatação, proliferação e diferenciação celular (ABBRACCHIO et al., 2009; BATISTA et al., 2008; BURNSTOCK et al., 2007b).

Os receptores purinérgicos estão envolvidos nas sinapses neuro-neuronais de trajetos ascendentes e descendentes, para isto utilizaram drogas agonistas e antagonistas que foram aplicadas em pequenas dosagens e selecionadas dos circuitos entéricos nervosos (BIAN et al., 2000; SPENCER et al., 2000). Estudos farmacológicos através do uso de antagonistas específicos, como o suramin e o ácido disulfônico piridoxal fosfato-6-azophenil-2,4 (PPADS), definiram uma primeira divisão dos receptores purinérgicos em P1 e P2 (BURNSTOCK, 1978) e logo após, a subdivisão dos subtipos P2 em P2X e P2Y (BURNSTOCK; KENNEDDY, 1985).

Atualmente têm sido clonados, caracterizados farmacologicamente e aceitos como válidos os membros da família de receptores P2X: P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆ e P2X₇ (P2X₁₋₇) e P2Y: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄ (ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 1998; COLLO et al., 1996; BURNSTOCK, 2007a).

Os receptores P2X são encontrados em células musculares lisas, neurônios, células gliais e apresentam papel de mediador na neurotransmissão excitatória rápida no SNE e periférico (SNP) (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Os receptores P2X estão acoplados a canais iônicos que medeiam rapidamente (dentro de 10ms) e seletivamente a permeabilidade de cátions (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) e participam na transmissão entre interneurônios descendentes e neurônios motores (NORTH; SURPRENANT, 2000; ZHOU; GALLIGAN, 1996).

No SNE, os resultados dos autores Castelucci et al. (2002a) demonstraram, originalmente, que o receptor P2X₂ está presente nos neurônios imuno-reativos à NOS e nos neurônios imuno-reativos à Calb. Desta maneira, concluiu-se que a subunidade do receptor P2X₂ se expressa em subtipos dos neurônios entéricos, incluindo neurônios motores inibitórios, neurônios secretomotores não colinérgicos e em IPANs.

Castelucci et al. (2003) reportaram a imuno-reatividade do receptor P2X₂ nas terminações nervosas intra-ganglionares laminares (IGLEs) no trato gastrointestinal de camundongos. Ao analisar outra subunidade dos receptores P2X, os autores Poole et al. (2002) observaram o purinoreceptor P2X₃ nos neurônios motores inibitórios e nos neurônios secretomotores não-colinérgicos.

Resultados do laboratório têm demonstrado alterações no código químico do receptor P2X₂ no íleo (MISAWA et al., 2010) e colo distal (GIROTTI, 2008) de animais desnutridos e renutridos, e em camundongos *ob/ob* também tem sido observados alterações neste receptor (MIZUNO, 2010). Além disso, foram observados efeitos dos protocolos de isquemia seguida de reperfusão (I/R-i) sobre os receptores P2X₂ (PAULINO et al., 2011) e P2X₇ (PALOMBIT, 2010).

No SNE a presença do receptor P2X₇ tem sido reportada através de técnicas imunohistoquímicas e propriedades farmacológicas em neurônios que expressam funcionalmente este receptor (HU et al., 2001). No entanto, não foi verificado quantitativamente em qual classe neuronal este receptor estava presente. Os resultados de Girotti (2008) demonstraram nos plexos mioentérico e submucoso do colo distal, a expressão e o código químico do receptor P2X₇. Estudos têm demonstrado envolvimento do ATP no mecanismo da dor (DONNELLY-ROBERTS et al., 2008). A administração do antagonista seletivo ao receptor P2X₃, A317491, tem sido eficaz no bloqueio em diferentes modelos patológicos de dor na inflamação (JARVIS et al., 2002).

Os autores Yiangou et al. (2001) observaram aumento 128% na densidade de células marcadas com P2X₃ e a expressão desse receptor nos plexos submucoso e mioentérico, houve diminuição no grupo da colite ulcerativa em humanos.

O receptor P2X₇ foi primeiramente descrito por Buisman et al. (1988) e, mais tarde chamado de receptor P2Z (DI VIRGILIO, 1995), até sua identificação molecular (FERRARI et al., 2006). Sua subunidade é uma proteína AA 595, que reúne na membrana plasmática para formar complexos multiméricos. Esse receptor difere dos outros receptores P2X pelo seu domínio aminoterminal que dota este receptor com a capacidade de formar grandes poros permeáveis na membrana plasmática através de pequenas moléculas hidrofílicas (FERRARI et al., 2000).

O receptor P2X₇ afeta diversas funções comuns das células epiteliais, incluindo o transporte de íons transcelular, secreção e morte celular. Além disso, esse receptor tem a capacidade de iniciar mudanças morfológicas, tais como edemaciamento da célula e ativação de caspases intracelulares (FERRARI et al., 2006; KING, 2007).

O receptor P2X₇ está ausente em monócitos isolados, mas aparece durante a diferenciação de macrófagos e é até regulado pelo interferon γ (IFN γ) ou pelo fator de necrose tumoral (TNF- α). Esse receptor aciona interleucina-6 (IL-6) podendo a partir disso promover a intervenção farmacológica em um número de doenças em que os fibroblastos estão implicados, tais como aterosclerose, infartos, insultos imunes, doenças degenerativas das articulações e diabéticas angiopáticas (FERRARI et al., 2006).

A presença desse receptor P2X₇ foi visto na uretra, próstata, em epitélios estratificados da pele, bexiga urinária humana (O'REILLY et al., 2001; 2007), nos órgãos genitais masculinos de humanos e de ratos (LEE et al., 2000), nas células acinares e células do ducto da glândula parótida (LI 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 injúrias agudas no SNC: isquemia, hipóxia, stress mecânico, axôtiotomia 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 (FRANKE; ILLES, 2006).

Tem sido investigado, também, o papel de bloqueadores dos receptores P2X não seletivos como o suramin, PPADS e Brilliant Blue G (BBG), um bloqueador seletivo para o receptor P2X₇ (CARROLL et al., 2009). Além disso, tem-se observado o efeito

neuroprotetivo do antagonista do receptor P2X₇ (RYU; McLARNON, 2008) e a regulação diminuída deste receptor em oligodendrócitos após a hipóxia (WANG et al., 2009).

A importância deste trabalho está em analisar de maneira original, pelos métodos imunohistoquímicos e morfoquantitativos, os efeitos da colite ulcerativa experimental sobre o receptor P2X₇, o código químico dos neurônios dos plexos mioentérico e submucoso e as células gliais entéricas.

2.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos da colite ulcerativa experimental causada pelo TNBS, nos plexos mioentérico e submucoso do colo distal de ratos Wistar.

2.2 Objetivos Específicos

Este trabalho visa analisar no SNE do colo distal dos animais submetidos à colite ulcerativa experimental causada pelo TNBS:

- a) a distribuição e a expressão do receptor purinérgico P2X₇;
- b) a dupla marcação do receptor purinérgico P2X₇, com os neurônios NOS, ChAT, Calb, Calr, HuC/D, S100 no plexo mioentérico; e no plexo submucoso com os neurônios Calb, Calr, HuC/D e S100;
- c) a dupla marcação dos neurônios imunorreativos ao pan-neuronal anti-HuC/D com a NOS e a ChAT no plexo mioentérico;
- d) a densidade dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X₇, à NOS, à ChAT, à Calb, à Calr, ao HuC/D e à S100, no plexo mioentérico; e no plexo submucoso densidades do neurônios imunorreativos ao receptor P2X₇, à Calb, à Calr, ao HuC/D e à S100;
- e) os perfis neuronais, diâmetro máximo (DM_{ax}) e diâmetro mínimo (DM_{ín}) dos neurônios imunorreativos à NOS, à ChAT, à Calb, à Calr no plexo mioentérico; e no plexo submucoso neurônios imunorreativos à Calb e à Calr;
- f) analisar na colite ulcerativa a morfologia, distribuição de neutrófilos, células caliciformes e as fibras colágenas.

3.1 Indução da Colite Ulcerativa

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), os animais ficaram alojados no Biotério do Departamento de Anatomia do ICB da USP, com peso entre 250-300g com idade 2 meses. Os animais ficaram em ciclo de claro/escuro de 12 horas e receberam alimentação e água *Ad libitum*.

Os ratos foram anestesiados com coquetel contendo xilazina (1mg/100g de peso do animal), cetamina (5mg/100g de peso do animal) e acepromazina (0,2mg/100g de peso do animal) e a inflamação foi induzida com auxílio de uma cânula de polipropileno de 8 cm com acesso intra-retal. Foi injetado ácido TNBS (Sigma, USA), na quantidade de 30 mg/kg em 1 mL com 30% etanol no lúmen do intestino grosso. Os animais sham (n= 5 por cada período) foram injetados tampão salina fosfato (PBS; 0,15M NaCl 0.01 M tampão fosfato de sódio, pH 7,2) da mesma maneira dos animais injetados com o TNBS e os animais controles não sofreram nenhum tipo de intervenção. Os animais foram sacrificados após 24 horas da aplicação de TNBS ou PBS. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo com nº 121 nas fls.75 do livro 02.

3.2 Preparação do Material para Imunohistoquímica

Foram coletados os intestinos grossos e divididos em colos proximais, médios e distais, dos animais submetidos aos tratamentos descritos nos itens 3.1. Os segmentos foram colocados em PBS, abertos, limpos de seus conteúdos e colocados em balsas de madeira (9 cm de comprimento e 2 cm de largura) com a mucosa para baixo e esticados por meio de alfinetes. Após, foram imersos no fixador com 4% de paraformaldeído em 0,1 M tampão fosfato de sódio pH 7,0, a 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, seguido por 3 lavagens de 10 minutos em PBS. Após, os tecidos foram estocados em PBS contendo sódio-azida (0,1%), em 4 °C, para sua conservação.

3.3 Método de Dupla Marcação para Imunofluorescência Indireta do Receptor P2X₇ com a NOS, a ChAT, a Calb, a Calr, o anti-HuC/D e S100

Após a fixação e o clareamento do tecido com auxílio do Microscópio estereoscópico ZM800 (Nikon), os tecidos de cada animal foram seccionados em cerca de 1 cm² com uma lâmina de bisturi n.15 em placa de Petri. Para a obtenção dos preparados de membrana, foram removidas as camadas mucosa, submucosa e as camadas circulares, mantendo somente a camada muscular longitudinal com o plexo mioentérico e o plexo submucoso. O preparado de membrana foi cortado ao meio (0,5 cm²), ou seja, de cada animal de cada grupo foi obtido dois preparados de membrana (0,5 cm²). Como foram utilizados 5 animais para cada grupo, ao final, foram analisados 10 preparados de membrana para cada um dos três grupos de cada imunorreatividade. Antes das preparações serem incubadas em anticorpos primários, elas foram imersas em 10% de solução soro normal de cavalo em 1,5% de Triton-X (Sigma) em PBS, por 45 minutos, em temperatura ambiente. Após, foram incubados em anticorpos primários descritos na Tabela 1 e permaneceram por 24 horas, a 4 °C e depois foram lavados em PBS por três vezes de 10 minutos cada.

As duplas marcações foram obtidas, usando as combinações do receptor purinérgico P2X₇ com anticorpos primários NOS, ChAT, Calb, Calr, anti-HuC/D (pan-neuronal) e S100 (marcador de células gliais) (Tabela 1). A escolha destes marcadores é baseada segundo Furness (2000, 2006) para demonstrar o código químico dos neurônios entéricos: a NOS, um marcador para neurônios inibitórios, a Calr, para neurônios sensoriais e excitatórios, a Calb, para IPANs e a ChAT, para neurônios excitatórios. Foi utilizado o S100 como marcador de célula glial entérica.

Tabela 1 - Características dos anticorpos primários.

Antígeno	Hospedeiro	Diluição	Referência
Receptor P2X ₇	Coelho	1:200	Chemicon
NOS	Carneiro	1:2000	EMSO
ChAT	Cabra	1:50	Chemicon
Calb	Camundongo	1:500	Swant
Calr	Cabra	1:100	Swant
Anti-HuC/D	Camundongo	1:100	Molecular Probes
S100	Camundongo	1:300	Chemicon

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

Tabela 2 - Anticorpos secundários usados.

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

3.4 Análises Qualitativas

3.4.1 Avaliação da Colite Ulcerativa

A classificação do grau da lesão da colite ulcerativa foi feita segundo os autores Bell, Gall e Wallace, (1995) (Tabela 3).

Tabela 3 - Grau de lesão no colo distal com colite ulcerativa.

Tipo de Lesão	Pontuação
Ausência de lesão.	sem pontos
Hiperemia, não úlceras.	1 ponto
Úlcera linear, sem inflamação significativa.	2 pontos
Úlcera linear com uma inflamação em um local.	3 pontos
Dois ou mais locais de ulceração/inflamação.	4 pontos
Dois ou mais locais maiores de ulceração e inflamação ou um local de ulceração/inflamação a se estender 1 cm do comprimento no colo distal.	5 pontos
Se o dano abranger 2 cm ao longo do comprimento do colo distal, a pontuação é aumentada 1 ponto por cada cm adicional de lesão.	6-10 pontos

3.4.2 Análise da Imunofluorescência Indireta nos Neurônios Entéricos

As análises qualitativas dos neurônios imunorreativos ao receptor purinérgico P2X₇, NOS, ChAT, Calb, Calr, anti-HuC/D e S100, dos plexos mioentérico e submucoso, foram realizadas em microscópio de fluorescência Nikon 80i equipado com filtros para discriminar entre a fluorescência 488 e Alexa 594. 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 Alexa 594 (530-585 nm de filtro de excitação e 615 nm de filtro para emissão). As imagens foram capturadas pelo analisador de imagem do programa NIS-elements AR 3.1 (Nikon).

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 estiveram 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 Phot Paint e Corel.

3.5 Análises Quantitativas

3.5.1 Análise do Código Químico dos Neurônios Entéricos

As análises quantitativas, do código químico dos neurônios, foram feitas dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X₇ colocalizados com a NOS, a ChAT a Calb, a Calr, o anti-HuC/D e das células gliais entéricas. As análises foram feitas da marcação fluorescente através da dupla marcação dos preparados de membranas. 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 dos preparados de membrana de cada colocalização, de cada animal de todos os grupos. Os dados das colocalizações foram expressos com média $\pm$ desvio padrão, n= número de preparações.

3.5.2 Análise da Densidade Neuronal, da Área do Perfil Neuronal, DMáx e DMín

A obtenção das densidades dos neurônios imunorreativos (neurônios/cm²) ao receptor P2X₇, a NOS, a ChAT, a Calb, a Calr, ao anti-HuC/D e ao S100 foram feitas em aumento de 100x no microscópio de fluorescência Nikon 80i (área do campo microscópico 0,000379 cm²).

Para obtenção da densidade neuronal (neurônio/cm²), foram feitas contagens do número de neurônios em 40 campos, em dois preparados de membrana dos plexos mioentérico e submucoso de cada um dos 5 animais dos grupos estudados de cada imunorreatividade. Nesse trabalho foi realizado as contagens de neurônios NOS-ir, ChAT-ir, Calb-ir, Calr-ir, anti-HuC/D-ir e células gliais entéricas (MISAWA et al., 2010; PAULINO et al., 2011).

Para a obtenção das áreas dos perfis neuronais, foram fotografados 100 neurônios imunorreativos ao receptor P2X₇, à NOS, à ChAT, à Calb, à Calr e à célula glial entérica de cada animal de cada grupo. As imagens foram obtidas pelo programa NIS-elements AR 3.1 (Nikon) e as análises da área do perfil neuronal (μm²), DMáx (μm) e DMín (μm) foram feitas com o programa Image Pró Plus (Versão 5) (MISAWA et al., 2010; PAULINO et al., 2011).

3.6 Técnica de Histoquímica para Mieloperixodase (MPO)

Os segmentos do colo distal foram abertos ao longo da borda mesentérica e presos em balsas de madeira. Foram fixados em Etanol 100% por 10 minutos, lavados em PBS (3×10 minutos), e armazenados em PBS-sacarose (PBS contendo 30% de sacarose) por uma noite a 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. Após, os tecidos foram imersos em OCT, congelados em isopentano, resfriados em nitrogênio líquido e armazenados a -20 °C. Os tecidos foram cortados em criostato (12 μm de espessura), coletados em lâminas, deixados à temperatura ambiente por 1 hora. 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 de MPO nos neutrófilos (KALFF et al., 1998). Em seguida, os tecidos foram lavados em PBS (3×5 minutos), contrastados com verde de metila a 2% por 30",

desidratados através da bateria de etanol, diafanizados em Xilol e montados em meio de montagem permanente (DPX mounting medium) (BDH, Dorset, UK). Após, foram realizadas análises qualitativas da localização dos neutrófilos nas camadas longitudinal, circular, plexo mioentérico, plexo submucoso e lâmina própria do colo distal nos grupos Controle, PBS e Colite.

3.7 Método para Análise Histológica

Foram coletados 1,5 cm de colo distal de 3 animais por grupo para análise histológica. Os tecidos foram lavados em PBS, abertos pela borda mesentérica, colocados em balsas de madeira e fixados em paraformaldeído a 4% por 24 horas. Os tecidos passaram por uma série de concentrações crescentes de alcoóis, após foram diafanizadas em séries de xilóis e incluídas em Paraplast®plus (Sigma). Após, os tecidos foram cortados transversalmente em micrótomo, com uma espessura de 5 μm e corados pelos métodos de Hematoxilina-Eosina (HE), o método Ácido Periódico de Schiff (PAS) para evidenciar células caliciformes e pelo método de Masson e Picrosirius para análise de fibras colágenas.

Foram feitas análises qualitativas das camadas do colo entre os grupos experimentais para verificar possíveis alterações provocadas pela colite. As imagens foram obtidas pelo Microscópio Nikon 80i acoplado a uma câmera com software NIS-elements AR 3.1 (Nikon).

3.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada nos grupos Controle, PBS e Colite. Foram verificadas as variáveis das colocalizações (%), densidade neuronal (neurônios/ cm^2), perfil neuronal (μm^2), DMáx (μm) e DMín (μm). Os dados foram comparados estatisticamente através da análise de variância ANOVA de dois fatores, após foi utilizado o Teste de Tukey. Os testes foram realizados ao nível de significância $p < 0,05$.

Os resultados apresentados são dos grupos Controle, PBS e Colite. A figura 3 demonstra a indução de colite experimental, observa-se a região do colo distal do intestino grosso com coloração hemorrágica.

Figura 3 - Porção do colo distal após 24 h da aplicação de TNBS (A-B). (A) colo distal inflamado e com hiperemia (seta). (B) Intestino grosso aberto (colos proximal e distal) com a região do colo distal hiperemiada (seta).

4.1 Análise Qualitativa

A análise qualitativa e macroscópica permitiu observar que os tecidos dos animais dos grupos Controle e PBS não apresentaram lesões, hiperemias e formações de úlceras. Os tecidos do grupo Colite apresentaram lesões, hiperemias, com inflamação e presenças de úlceras com extensão de lesão de 2 a 4 cm.

Pela classificação dos autores Bell, Gall e Wallace, (1995) da Colite permitiu-se pontuar o grau de lesão encontrado no colo distal, de zero (0) a dez (10). A figura 4 demonstra as pontuações dos grupos estudados. O grupo de maior pontuação foi Colite e os grupos Controle e PBS obtiveram a pontuação zero (0), ou seja, não foi observado lesões nos colos distais.

Figura 4 - Pontuação da lesão de colite após 24 horas, segundo Bell, Gall e Wallace (1995).

4.1.1 Análise Qualitativa no Plexo Mioentérico

A imunorreatividade do receptor P2X₇ nos neurônios do plexo mioentérico foi similar aos grupos Controle e PBS, no grupo Colite houve redução da imunorreatividade ao receptor após 24 h da injeção do TNBS (Figuras 5, 6, 7 e 8).

Os neurônios imunorreativos (ir) à NOS apresentaram classificação morfológica Dogiel Tipo I nos grupos Controle, PBS e Colite e, foi observado redução no tamanho dos neurônios do grupo Colite (Figura 5).

Os neurônios ChAT-ir apresentaram classificação morfológica Dogiel Tipo I nos grupos Controle, PBS e Colite. Houve redução no tamanho dos neurônios do grupo Colite quando comparado aos grupos Controle e PBS (Figura 6).

Os neurônios imunorreativos à Calb pareceram edemaciados no grupo Colite. Eles apresentaram classificação morfológica Dogiel Tipo I (com dendritos) e II (neurônios grandes com superfície lisa) nos grupos estudados (Figura 7).

Os neurônios imunorreativos à Calr apresentaram classificação morfológica Dogiel Tipo II nos grupos Controle, PBS e Colite e, foram observados neurônios edemaciados no grupo Colite (Figura 8).

Os neurônios P2X₇-ir, NOS-ir e ChAT-ir foram imunorreativos ao pan-neuronal anti-HuC/D nos grupos Controle, PBS e Colite (Figura 9, 10 e 11)

As células gliais entéricas foram imunorreativas à S100 e colocalizaram com o receptor P2X₇ nos grupos estudados (Figura 12).

Figura 5 - Neurônios imunorreativos à NOS e ao receptor P2X₇ (A - C'') no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas preenchidas demonstram neurônios NOS-ir colocalizados com o receptor P2X₇ (Barra:10µm).

Figura 6 - Neurônios imunorreativos à ChAT e ao receptor P2X₇ (A - C'') no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas preenchidas demonstram neurônios ChAT-ir colocalizados com o receptor P2X₇ (Barra: 10μm).

Figura 7 - Neurônios imunorreativos à Calb e ao receptor P2X₇ (A - C'') no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas preenchidas demonstram neurônios Calb-ir colocalizados com o receptor P2X₇ (Barra: 10 μm).

Figura 8 - Neurônios imunorreativos à Calr e ao receptor P2X₇ (A - C'') no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas preenchidas demonstram neurônios Calr-ir colocalizados com o receptor P2X₇ (Barra: 10μm).

Figura 9 - Neurônios do plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A- A''), PBS (B-B'') e Colite (C-C''). Evidencia neurônios imunorreativos ao anti-HuC/D (A, B, C) colocalizados com o receptor P2X₇ (A'', B'', C''). Setas simples demonstram neurônios colocalizados. Setas vazadas indicam células não colocalizadas com anti - HuC/D (Barra 10µm).

Figura 10 - Neurônios imunorreativos à HuC/D e a NOS (A - C'') no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas preenchidas demonstram neurônios imunorreativos ao HuC/D e colocalizados com a NOS. Setas vazadas demonstram neurônios imunorreativos somente ao HuC/D (Barra 10μm).

Figura 11 - Neurônios imunorreativos ao HuC/D e a ChAT (A - C'') no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas demonstram neurônios imunorreativos ao HuC/D e colocalizados com a ChAT (Barra: 10μm).

Figura 12 - Células gliais entéricas imunorreativas à S100 e ao receptor P2X₇ (A - C'') no plexo mioentérico do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas preenchidas demonstram células marcadas com S100-ir colocalizadas com o receptor P2X₇ (Barra: 10μm).

4.1.2 Análise Qualitativa no Plexo Submucoso

A presença e a intensidade do receptor P2X₇ nos neurônios do plexo submucoso foram semelhantes aos grupos Controle e PBS. No grupo Colite houve redução da imunorreatividade ao receptor (Figuras 13, 15, 16, 17 e 18).

Os neurônios imunorreativos à Calb apresentaram morfologia predominante de neurônios Dogiel Tipo II nos grupos Controle, PBS e Colite, neste grupo apareceram edemaciados (Figura 13).

A análise do receptor no vaso do plexo submucoso demonstrou diminuição da imunorreatividade do receptor no grupo Colite (Figura 14). Não foi possível verificar a imunorreatividade à Calb na parede do vaso dos grupos estudados.

Os neurônios imunorreativos à Calr apresentaram-se edemaciados no grupo Colite; nos grupos Controle e PBS não houve alteração da imunorreatividade. Esses neurônios apresentaram morfologia Dogiel Tipo II nos grupos Controle, PBS e Colite (Figura 15).

No plexo submucoso foi verificado a imunorreatividade ao receptor P2X₇ e à Calr na parede do vaso dos grupos estudados. No grupo Colite houve diminuição da imunorreatividade do receptor no vaso (Figura 16).

O receptor P2X₇-ir foi imunorreativo ao pan-neuronal nos grupos Controle, PBS e Colite (Figura 17).

As células gliais entéricas foram imunorreativas à S100 e colocalizaram com o receptor P2X₇ nos grupos estudados (Figura 18).

Figura 13 - Neurônios imunorreativos à Calb e ao receptor P2X₇ (A - C'') no plexo submucoso do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas demonstram neurônios Calb-ir colocalizados com o receptor P2X₇ (Barra: 10μm).

Figura 14 - Vasos imunorreativos somente ao receptor P2X₇ (A' - C'') do plexo submucoso do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas vazadas demonstram paredes dos vasos marcadas com o receptor P2X₇. * demonstra a luz do vaso (Barra: 20μm).

Figura 15 - Neurônios imunorreativos à Calr e ao receptor P2X₇ (A - C'') no plexo submucoso do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas demonstram neurônios Calr-ir colocalizados com o receptor P2X₇ (Barra 10μm).

Figura 16 - Vasos imunorreativos à Calr e ao receptor P2X₇ (A - C'') no plexo submucoso do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas vazadas demonstram terminações nervosas e vasos marcados com Calr-ir colocalizados com o receptor P2X₇. * demonstra luz do vaso (Barra: 20µm).

Figura 17 - Neurônios imunorreativos ao HuC/D e ao receptor P2X₇ (A - C'') no plexo submucoso do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas demonstram neurônios imunorreativos ao HuC/D colocalizados com o receptor P2X₇. Setas vazadas são células que expressam somente ao receptor P2X₇. * demonstra espaços vazios no gânglio (Barra 10µm).

Figura 18 - Células gliais entéricas imunorreativas a S100 e ao receptor P2X₇ (A - C'') do plexo submucoso do colo distal de ratos dos grupos Controle (A, A''), PBS (B, B'') e Colite (C, C''). Setas demonstram células imunorreativas ao S100 colocalizadas com o receptor P2X₇. *indicam espaços onde localizam neurônios (Barra 10μm).

4.2 Análise da Distribuição de Neutrófilos na Colite Ulcerativa

Os neutrófilos foram revelados pela reação de MPO nos grupos Controle, PBS e Colite.

Nos grupos Controle e PBS não foram encontrados neutrófilos próximos as camadas longitudinal, circular, plexos mioentérico e submucoso e, lâmina própria do colo distal. Um grande número de neutrófilos foi encontrado na submucosa e lâmina própria do colo distal do grupo Colite.

Nas áreas inflamadas através da Colite Ulcerativa, os neutrófilos foram numerosos na área da mucosa e lâmina própria (Figura 19).

Figura 19 - Fotomicrografia com neutrófilos revelados por histoquímica de mieloperoxidase do colo distal de ratos os grupos controle (A, D, G, J), PBS (B, E, H, L) e Colite (C, F, I, M). LP lâmina própria; GM glândula da mucosa; PM plexo Mioentérico. Setas simples neutrófilos marcados em marrom. Barras (A-C) 100µm, (D-F) 50µm, (G-I) 20µm e (J-M) 10µm.

4.3 Análise Qualitativa Histológica na Colite Ulcerativa

Através da coloração de HE pode-se verificar alterações morfológicas nos tecidos dos grupos Controle, PBS e Colite. As secções do colo distal do grupo Controle e PBS apresentaram a mucosa, criptas e camadas musculares circular e da submucosa assim como lâmina própria intactas. Nas secções do grupo Colite apresentaram em microscopia mucosa e criptas desestruturadas, lâmina própria espessada, inúmeros focos hemorrágicos e aumento da área e da espessura da lâmina própria.

Nessas secções do grupo Colite foram observadas células inflamatórias, especialmente na mucosa, mas também na submucosa e na camada muscular, e os gânglios mioentéricos apresentaram-se espessos (Figura 20).

Figura 20 - Fotomicrografia demonstrando secções coradas com hematoxilina e eosina, do colo distal, de ratos dos grupos controle (A, D, G, J), PBS (B, E, H, L) e Colite (C, F, I, M). CM camada circular; LP lâmina própria; GM glândula da mucosa; PM plexo Mioentérico. Barras (A-C) 100µm, (D-F) 50µm, (G-I) 20µm e (J-M) 10µm.

4.4 Análise Qualitativa da Distribuição do Colágeno na Colite Ulcerativa

Através da coloração com Picrosirius, marcaram fibras colágenas nos tecidos dos grupos Controle, PBS e Colite. O grupo Controle apresentou fibras colágenas espessas, possivelmente tipo I (vermelha), concentradas na lâmina própria e em torno dos gânglios mioentéricos. No epitélio apresentaram fibras finas, possivelmente tipo III (verdes), e apresentaram-se poucas fibras espessas e raras fibras mescladas possivelmente tipo I e tipo III (amarelas). No grupo PBS apresentaram fibras espessas, finas e mescladas de forma uniforme na lâmina própria. O epitélio apresentou fibras semelhantes aos tecidos do grupo controle, assim como os colágenos em torno dos gânglios.

Nos tecidos do grupo Colite houve redução de fibras finas, espessas e mescladas, distribuídas em zonas na lâmina própria espessada devido à colite. No epitélio prevaleceu em maior quantidade fibras finas, possivelmente tipo III e nos gânglios mioentéricos apresentaram-se reduzidas fibras finas e espessas (Figuras 21 e 22).

Figura 21 - Cortes histológicos, do colo distal, de ratos corados com picrosirius nos grupos controle (A-B'), PBS (C- D') e Colite (E- F'). LP lâmina própria; Luz polarizada (A-E'e'B'-F'), setas simples gânglio mioentérico, fibras colágenas: finas (verdes), espessas (vermelhas) e finas e espessas (amarelas). Barras (A-E, A'-E') 100 μ m, (B-F, B'-F') 20 μ m.

Figura 22 - Cortes histológicos, do colo distal de ratos, corados com picrosirius nos grupos controle (A, A'), PBS (B, B') e Colite (C, C') . LP lâmina própria; Luz polarizada (A' - C'), setas vazadas gânglio mioentérico, fibras colágenas: finas (verdes), espessas (vermelhas) e finas e espessas (amarelas) (Barra: 10μm).

4.5 Análise Qualitativa das Células Caliciformes na Colite Ulcerativa

Através do PAS foi marcado células caliciformes do epitélio nos tecidos dos grupos Controle, PBS e Colite, com intuito de verificar alterações dessas células após indução de colite. Nos tecidos controles, as células caliciformes aparecem regularmente no epitélio, apresentando-se numerosas em formas circulares com muco em seu interior.

Nos tecidos do grupo PBS, as células caliciformes apresentaram-se também regularmente numerosas com formas circulares e aparentemente intumescidas, com muco em seu interior.

Nos tecidos do grupo Colite, as células caliciformes apresentaram-se raras, com espaços nas glândulas da mucosa devido a desintegração dessas células. Também foi possível verificar a desestruturação do epitélio com coloração amarelada, mostrando destruição da mucosa (Figura 23).

Figura 23 - Fotomicrografia demonstrando secções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) do colo distal de ratos dos grupos controle (A, D, G), PBS (B, E, H) e Colite (C, F, I). LP lâmina própria. Setas simples células caliciformes. Barras (D-F) 50 μ m, (G-I) 20 μ m e (J-M) 10 μ m.

4.6 Análise Quantitativa dos Plexo Mioentérico e Plexo Submucoso

4.6.1 Colocalização no Plexo Mioentérico

Foi realizado o estudo de dupla marcação dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X₇ com a NOS, a ChAT, Calr e a Calb no colo distal dos animais Controle, PBS e submetidos à colite experimental. Os resultados são demonstrados nas Tabelas 4, 5, 6 e 7. Os neurônios NOS-ir colocalizaram 100% com neurônios receptor P2X₇-ir nos grupos Controle, PBS e Colite. Por outro lado, os neurônios P2X₇-ir colocalizaram ao redor de 23,7% no Controle, 26,9% no grupo PBS e 19% no grupo colite. Na análise estatística o grupo Colite foi estatisticamente diferente dos grupos Controle e PBS e o grupo PBS do grupo Controle (Tabela 4).

Tabela 4 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X₇ e à NOS no colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e Colite.

<i>Grupos</i>	<i>NOS/P2X₇</i>	<i>P2X₇/NOS</i>
Controle	100%	23,7 ± 1,3%
PBS	100%	26,9 ± 5,5%#
Colite	100%	19,1 ± 1,7%*

Dados expressos em Média±desvio padrão. *, # $p < 0,05$ (* Colite comparado ao Controle e # PBS comparado ao Controle).

Os neurônios ChAT-ir colocalizaram 100% com o receptor P2X₇ nos grupos PBS e Colite. Por outro lado, os neurônios P2X₇-ir colocalizaram ao redor 35,3% no Controle, 32,3% no grupo PBS e 25,6% no grupo Colite. Na análise estatística o grupo Colite foi estatisticamente diferente dos grupos Controle e PBS. O grupo PBS comparado ao Controle não houve diferença significativa (Tabela 5).

Tabela 5 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X₇ e à ChAT no colo distal de animais dos grupos PBS e Colite.

<i>Grupos</i>	<i>ChAT/P2X₇</i>	<i>P2X₇/ChAT</i>
Controle	100%	35,3 ± 3,1%
PBS	100%	32,3 ± 2,3%
Colite	100%	25,6 ± 1,4%*#

Dados expressos em Média±desvio padrão. *, # $p < 0,05$ (* Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS) .

Os neurônios Calb-ir colocalizaram 100% com o receptor P2X₇ nos grupos PBS e Colite. Inversamente, os neurônios P2X₇-ir colocalizaram ao redor de 19,3% no Controle, 15,5% no grupo PBS e 9,3% no grupo Colite. Na análise estatística houve diferença estatística do grupo Colite com o grupo Controle e PBS, e do grupo PBS com o grupo Controle (Tabela 6).

Tabela 6 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X₇ e à Calb no colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e Colite.

<i>Grupos</i>	<i>Calb/P2X₇</i>	<i>P2X₇/Calb</i>
Controle	100%	19,3 ± 2,4%
PBS	100%	15,5 ± 1,8% π
Colite	100%	9,3 ± 0,2%*#

Dados expressos em Média±desvio padrão. *, #, π $p < 0,05$ (* Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e π PBS comparado ao Controle).

Houve colocalização dos neurônios Calb-ir de 100% com o receptor P2X₇ nos grupos Controle, PBS e Colite. Por outro lado, os neurônios P2X₇-ir colocalizaram ao redor de 15,8% no Controle, 19,6% no grupo PBS e 12,4% no grupo Colite. Na análise estatística, o grupo Colite comparado ao Controle houve diferença significativa. Ao

comparar o grupo Colite ao PBS e o grupo PBS ao Controle não houve diferença significativa (Tabela 7).

Tabela 7 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X₇ e à Calr no colo distal de animais dos grupos controle, PBS e Colite.

<i>Grupos</i>	<i>Calr/P2X₇</i>	<i>P2X₇/Calr</i>
Controle	100%	15,8 ± 3,3%
PBS	100%	19,6 ± 3,5%
Colite	100%	12,4 ± 1,9%#

Dados expressos em Média±desvio padrão. # < 0,05 (# Colite comparado ao controle).

Foram realizadas análises das duplas marcações dos neurônios imunorreativos ao pan-neuronal anti-HuC/D com neurônios P2X₇-ir, NOS-ir e ChAT-ir no colo distal dos animais dos grupos Controle, PBS e Colite. Os resultados são demonstrados nas tabelas 8, 9, e 10.

Os neurônios P2X₇-ir colocalizaram 100% com anti-HuC/D nos grupos PBS e Colite. Por outro lado, os neurônios marcados com anti-HuC/D colocalizaram ao redor de 82,2% no Controle, 71,6% no grupo PBS e 89% no grupo Colite. Houve diferença significativa entre o grupo Colite quando comparados aos grupos Controle e ao PBS. O grupo PBS apresentou diferença estatística quando comparado ao Controle (Tabela 8).

Tabela 8 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X₇ e ao pan neuronal anti-HuC/D no colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e Colite.

<i>Grupos</i>	<i>HuC/D /P2X₇</i>	<i>P2X₇/ HuC/D</i>	<i>P2X₇/ -</i>
Controle	100%	82,2 ± 1,0%	17,8 ± 1,0%
PBS	100%	71,6 ± 1,4% π	28,4 ± 1,4%
Colite	100%	89,0 ± 0,8*#	11,0 ± 0,8%

Dados expressos em Média±desvio padrão. *, #, π $p < 0,05$ (* Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e π PBS comparado ao Controle).

Os neurônios NOS-ir colocalizaram 100% com anti-HuC/D nos grupos Controle, PBS e Colite. Por outro lado, os neurônios marcados com anti-HuC/D colocalizaram ao redor de 33,9% no Controle, 35,4% no grupo PBS e 24,8% no grupo Colite. Na análise estatística, o grupo Colite apresentou diferença estatística quando comparado com os grupos PBS e Controle (Tabela 9).

Tabela 9 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao anti-HuC/D e à NOS no colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e Colite.

<i>Grupos</i>	<i>NOS/HuC/D</i>	<i>HuC/D /NOS</i>	<i>HuC/D / -</i>
Controle	100%	33,9 ± 1,78%	66,1 ± 1,8%
PBS	100%	35,4 ± 2,7%	66,6 ± 6,1%
Colite	100%	24,8 ± 1,0%*#	75,1 ± 1,0%

Dados expressos em Média±desvio padrão. *, # $p < 0,05$ (* Colite comparado ao Controle e # PBS comparado ao Controle).

Os neurônios ChAT-ir colocalizaram 100% com o anti-HuC/D nos grupos PBS e Colite. Por outro lado, os neurônios marcados com anti-HuC/D colocalizaram ao redor 34,6% no Controle, 39,2% no grupo PBS e 30,6% no grupo Colite. Na análise estatística houve diferença no grupo Colite quando comparado com PBS e Controle (Tabela 10).

Tabela 10 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao anti-HuC/D e à ChAT no colo distal de animais dos grupos PBS e Colite.

<i>Grupos</i>	<i>ChAT/ HuC/D</i>	<i>HuC/D/ChAT</i>
Controle	100%	34,6 ± 1,5%
PBS	100%	39,2 ± 3,5%
Colite	100%	30,6 ± 3,5%*#

Dados expressos em Média±desvio padrão. *, # $p < 0,05$ (* Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS).

As células gliais marcadas com S100 colocalizaram 100% com o receptor P2X₇ nos grupos Controle, PBS e Colite. Por outro lado, as células que expressam P2X₇-ir

colocalizaram com o S100 em 53,5% no grupo Controle, 54,5% no grupo PBS e 44% no grupo Colite (Tabela 11).

Tabela 11 - Colocalização das células gliais mioentéricas imunorreativas ao S100 e ao P2X₇ no colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e Colite.

<i>Grupos</i>	<i>S100/ P2X₇</i>	<i>P2X₇/ S100</i>
Controle	100%	53,5±4,6%
PBS	100%	54,5±3,1%
Colite	100%	44,0±3,0%*#

Dados expressos em Média±desvio padrão. *, # $p < 0,05$ (* Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS).

4.6.2 Colocalização no Plexo Submucoso

Os neurônios Calb-ir colocalizaram 100% o receptor P2X₇ nos grupos PBS e Colite. Inversamente, os neurônios P2X₇-ir colocalizaram 29% no Controle, 38% no grupo PBS e 35% no grupo Colite. Houve diferença estatística do grupo Colite com o grupo Controle e PBS, e do grupo PBS com o grupo Controle (Tabela 12).

Tabela 12 - Colocalização dos neurônios submucosos imunorreativos ao receptor P2X₇ e à Calb no colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e Colite.

<i>Grupos</i>	<i>Calb/P2X₇</i>	<i>P2X₇/Calb</i>
Controle	100%	29,0 ± 1,6%
PBS	100%	38,0 ± 1,1%
Colite	100%	35,0 ± 2,2%*#

Dados expressos em Média±desvio padrão. *, #, $\pi p < 0,05$ (* Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e π PBS comparado ao Controle).

Os neurônios Calr-ir colocalizaram 100% com o receptor P2X₇ nos grupos Controle, PBS e Colite. Inversamente, os neurônios P2X₇-ir colocalizaram 26% no grupo

Controle, 44,5% no grupo PBS e 39,5% no grupo Colite. Houve diferença estatística do grupo Colite comparado ao Controle. Não houve diferença significativa ao comparar o grupo Colite ao PBS e o grupo PBS ao Controle (Tabela 13).

Tabela 13 - Colocalização dos neurônios submucosos imunorreativos ao receptor P2X₇ e à Calr no colo distal de animais dos grupos controle, PBS e Colite.

<i>Grupos</i>	<i>Calr/P2X₇</i>	<i>P2X₇/Calr</i>
Controle	100%	26,0 ± 3,4%
PBS	100%	44,5 ± 1,6%
Colite	100%	39,5 ± 2,7%#

Dados expressos em Média±desvio padrão. #*p*< 0,05 (# Colite comparado ao controle).

Foram realizadas análises das duplas marcações dos neurônios do plexo submucoso imunorreativos ao anti-HuC/D com neurônios P2X₇-ir, Calb-ir e Calr-ir e, no colo distal dos animais dos grupos Controle, PBS e Colite. Os resultados são demonstrados nas tabelas 14, 15, e 16.

Os neurônios P2X₇-ir colocalizaram 100% com anti-HuC/D nos grupos Controle PBS e Colite. Por outro lado, os neurônios marcados com anti-HuC/D colocalizaram ao redor de 26% no Controle, 44,5% no grupo PBS e 36,5% no grupo Colite. Na análise estatística apresentou diferenças significativas entre o grupo Colite quando comparados aos grupos Controle e ao PBS. O grupo PBS apresentou diferença estatística quando comparado ao Controle (Tabela 14)

Tabela 14 - Colocalização dos neurônios submucosos imunorreativos ao receptor P2X₇ e ao pan neuronal anti-HuC/D no colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e Colite.

<i>Grupos</i>	<i>HuC/D /P2X₇</i>	<i>P2X₇/ HuC/D</i>	<i>P2X₇/ -</i>
Controle	100%	44,5 ± 3,2%	55,5 ± 3,2%
PBS	100%	36,5 ± 1,5%*#π	63,5 ± 1,5%
Colite	100%	26,0 ± 2,3%	74,0 ± 2,3%

Dados expressos em Média±desvio padrão. *, #, π $p < 0,05$ (* Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e π PBS comparado ao Controle).

As células gliais marcadas com S100 colocalizaram 100% com o receptor P2X₇ nos grupos Controle, PBS e Colite. Por outro lado, as células P2X₇-ir colocalizaram com S100 ao redor 36,5% no Controle, 48,0% no grupo PBS e 57,5% no grupo Colite. (Tabela 15).

Tabela 15 - Colocalização das células gliais submucosas imunorreativas ao S100 e ao P2X₇ no colo distal de animais dos grupos Controle, PBS e Colite.

<i>Grupos</i>	<i>S100/ P2X₇</i>	<i>P2X₇/ S100</i>
Controle	100%	36,5 ± 3,3%
PBS	100%	48,0 ± 2,2% π
Colite	100%	57,5 ± 2,6%*#

Dados expressos em Média±desvio padrão. *, #, π $p < 0,05$ (* Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e π PBS comparado ao Controle).

4.7 Densidade Neuronal do Plexo Mioentérico

Ao analisar a densidade neuronal, foi observada nos neurônios P2X₇-ir uma redução de 6,7%, no grupo PBS e no grupo Colite reduziu 2,1% quando comparado ao grupo Controle. Na análise estatística houve diferença significativa do grupo Colite comparada ao Controle e PBS. O grupo PBS comparado ao Controle não houve diferença significativa (Figura 24).

Figura 24 - Densidade (neurônios/cm²) dos neurônios imunorreativos ao P2X₇ nos grupos Controle, PBS e Colite, * $p < 0,05$ Colite comparado ao Controle, # $p < 0,05$ Colite comparado ao PBS.

Os neurônios NOS-ir no grupo PBS houve uma redução de 14,3%, no grupo Colite a redução foi de 42,3% quando comparado ao grupo Controle. Houve diferença significativa do grupo Colite quando comparado aos grupos Controle e ao PBS. O grupo PBS apresentou diferença significativa quando comparado ao Controle. (Figura 25).

Figura 25 - Densidade (neurônios/cm²) dos imunorreativos à NOS nos grupos Controle, PBS e Colite (*Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e π PBS comparado ao Controle; *, #, π $p < 0,05$).

Os neurônios ChAT-ir apresentaram redução de 46,5% no grupo PBS, e de 34,9% do grupo quando comparado ao grupo Controle. Não houve diferença significativa entre os grupos Colite e PBS quando comparados ao controle, entre os grupos Colite e PBS (Figura 26).

Figura 26 - Densidade (neurônios/cm²) dos neurônios imunorreativos à ChAT nos grupos Controle, PBS e Colite (* Colite comparado ao Controle, π PBS comparado ao Controle; *, π $p < 0,05$).

Houve redução na densidade dos neurônios Calb-ir de 2,1% no grupo PBS e de 22,9% no Colite quando comparado ao grupo Controle. Houve diferença significativa do grupo Colite em relação ao Controle, e do Colite com o PBS. Não houve diferença entre os grupos Controle e PBS (Figura 27).

Figura 27 - Densidade (neurônios/cm²) dos neurônios imunorreativos à Calb nos grupos Controle, PBS e Colite (*Colite comparado ao Controle, #Colite comparado ao PBS; *, # $p < 0,05$).

Ao analisar a densidade neuronal, foi observado nos neurônios Calr-ir reduções de 25,8% no grupo PBS e 60,6% no grupo Colite quando comparados ao grupo Controle. Houve diferença significativa do grupo PBS quando comparado ao Controle (Figura 28).

Figura 28 - Densidade (neurônios/cm²) dos neurônios imunorreativos à Calr no grupo Controle, PBS e Colite, *Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e πPBS comparado ao Controle; *, #, π $p < 0,05$).

Houve redução de 14,7% na densidade neuronal do anti-HuC/D no grupo PBS e 33,3% no grupo Colite quando comparado ao Controle. O grupo PBS apresentou diferença significativa quando comparado ao Controle e ao Colite (Figura 29).

Figura 29 - Densidade (neurônios/cm²) dos neurônios imunorreativos ao Pan-Neuronal (HuC/D) no grupo Controle, PBS e Colite, *Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e πPBS comparado ao Controle; *, #, π $p < 0,05$).

Ao analisar a densidade das células gliais entéricas, foi observado um aumento significativo de 3,0% no grupo PBS e no grupo Colite redução significativa de 29,2% quando comparado ao grupo Controle. O grupo PBS apresentou diferença estatística quando comparado ao Controle e ao Colite (Figura 30).

Figura 30 - Densidade de células gliais entéricas (células/cm²) imuno-reativas ao S100 no grupo Controle, PBS e Colite, *Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e π PBS comparado ao Controle; *, #, π $p < 0,05$).

4.8 Densidade Neuronal do Plexo Submucoso

Ao analisar a densidade neuronal no plexo submucoso, foi observada nos neurônios P2X₇-ir reduções de 11,1% no grupo PBS e de 23,4% no grupo Colite quando comparado ao grupo Controle. Na análise estatística, houve diferença significativa do grupo Colite comparada ao Controle e PBS. O grupo PBS comparado ao controle não houve diferença significativa (Figura 31).

Figura 31 - Densidade (neurônios/cm²) dos neurônios imunorreativos ao P2X₇ nos grupos Controle, PBS e Colite,* $p < 0,05$ Colite comparado ao Controle, # $p < 0,05$ Colite comparado ao PBS.

Houve uma redução na densidade neuronal da Calb-ir de 6,4% no grupo PBS e de 34,7% no grupo colite quando comparado ao grupo Controle. Houve diferença significativa entre os grupos Colite e PBS. O grupo PBS comparado ao Controle não apresentou diferença significativa (Figura 32).

Figura 32 - Densidade (neurônios/cm²) dos neurônios imunorreativos à Calb nos grupos Controle, PBS e Colite (*Colite comparado ao Controle, #Colite comparado ao PBS; *, # $p < 0,05$).

Nos neurônios Calr-ir houve reduções de 3,7% no grupo PBS e 11,7% no grupo Colite quando comparado ao Controle. A análise estatística apresentou diferença significativa entre o Colite comparado ao Controle e PBS e o grupo PBS comparado ao Controle (Figura 33).

Figura 33 - Densidade (neurônios/cm²) dos neurônios imunorreativos à Calr no grupo Controle, PBS e Colite (*Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e π PBS comparado ao Controle; *, #, $p < 0,05$).

O pan-neuronal anti-HuC/D demonstrou uma redução de 6,9% no grupo PBS e 33,4% no grupo Colite ao ser comparado ao grupo Controle. A análise estatística apresentou diferenças entre o grupo Colite quando comparado aos grupos Controle e ao PBS. O grupo PBS apresentou diferença estatística quando comparado ao Controle (Figura 34).

Figura 34 - Densidade (neurônios/cm²) dos neurônios imunorreativos ao Pan-Neuronal (HuCD) no grupo Controle, PBS e Colite (*Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e πPBS comparado ao Controle; *, #, π $p < 0,05$).

Ao analisar a densidade das células gliais entéricas (S100) no plexo submucoso, foi observada uma redução de 16% no grupo PBS e 44,2% no grupo Colite quando comparado ao grupo Controle. A análise estatística apresentou diferença significativa entre o grupo Colite quando comparados aos grupos Controle e ao PBS. Houve diferença significativa entre o grupo PBS e Controle (Figura 35).

Figura 35- Densidade de células glias entéricas (células/cm²) imunorreativas ao S100 no grupo Controle, PBS e Colite (*Colite comparado ao Controle, # Colite comparado ao PBS e πPBS comparado ao Controle; *, #, π $p < 0,05$).

4.9 Áreas dos Perfis dos Neurônios Mioentéricos

A análise do perfil, DMáx e DMín dos neurônios NOS, ChAT, Calb e Calr foi realizada para determinar alterações nas áreas dos perfis dessas classes neuronais.

A análise das áreas dos neurônios NOS-ir no grupo Controle apresentou uma média de 511,4 μm^2 , no grupo PBS a média foi de 539,7 μm^2 , e no grupo Colite 476,5 μm^2 . Houve diferença significativa somente entre no grupo Colite em relação ao PBS. Quando analisados do DMáx e DMín foi encontrado os valores foi de 39,5 μm e 16,7 μm , respectivamente, no grupo controle, 38,9 μm e 17,1 μm no grupo PBS e 37,8 μm e 16,9 μm no Colite, respectivamente ($p > 0,05$) (Figura 36).

Os neurônios ChAT-ir no grupo controle apresentaram uma média de 458,9 μm^2 , no grupo PBS foi de 458,2 μm^2 , e no grupo Colite 361,2 μm^2 . Houve diferença entre os grupos PBS e Colite. Quando analisados do DMáx e DMín foi encontrado um valor de 32,6 μm e 17,0 μm , no grupo Controle, 32,4 μm e 17,2 μm no grupo PBS e 28,7 μm e 16,02 μm no Colite, respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 37).

A análise das áreas dos neurônios Calb-ir no grupo Controle apresentou uma média de 558,3 μm^2 , no grupo PBS foi de 433,4 μm^2 e no grupo Colite 668,5 μm^2 . A análise

estatística indicou diferença significativa no grupo Colite em relação ao PBS e ao Controle. Quando analisados do DMáx e DMín foi encontrado um valor de 38,3 μm e 17,9 μm , no grupo Controle, 35,1 μm e 15,2 μm no grupo PBS e 46,2 μm e 18,9 μm no Colite, respectivamente. As diferenças no DMáx e DMín foram significativas no grupo Colite quando comparadas aos grupos Controle e PBS (Figura 38).

A análise das áreas dos neurônios Calr-ir no grupo controle apresentou uma média de 648,4 μm^2 , no grupo PBS foi de 718,3 μm^2 , e no grupo Colite 637,6 μm^2 . Houve diferença significativa no grupo Colite em relação ao PBS. Não houve diferença significativa entre os grupos PBS e Controle. Ao analisar o DMáx e DMín foi encontrado um valor de 39,9 μm e 20,3 μm , no grupo Controle, 42,3 μm e 21,4 μm no grupo PBS e 40,7 μm e 20,4 μm no Colite, respectivamente. As diferenças no DMáx e DMín não foram significativas em todos os grupos ($p>0,05$) (Figura 39).

Figura 36 - Área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à NOS nos grupos Controle, PBS e Colite (* diferença significativa do Colite em relação ao Controle e PBS, * $p < 0,05$).

Figura 37 - Área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à ChAT nos grupos Controle, PBS e Colite. * diferença significativa do Colite em relação ao Controle e PBS (* $p < 0,05$).

Figura 38 - Área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calb nos grupos Controle, PBS e Colite (# Indica diferença significativa do PBS em relação ao Controle; * diferença significativa do Colite em relação ao PBS, *, # $p < 0,05$).

Figura 39 - Área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calr nos grupos Controle, PBS e Colite (* diferença significativa do PBS em relação ao colite, * $p < 0,05$).

4.10 Perfil Neuronal do Plexo Submucoso

A análise do perfil, DMáx e DMín dos neurônios Calb e Calr do plexo submucoso foi realizada para determinar alterações nas áreas dos perfis dessas classes neuronais.

A análise das áreas dos neurônios Calb-ir no grupo Controle apresentou uma média de $388,04 \mu\text{m}^2$, no grupo PBS a média foi de $411,1 \mu\text{m}^2$, e no grupo Colite $296,03 \mu\text{m}^2$ (Figura 40 A). Houve diferença significativa somente entre os grupos Colite e PBS. Quando analisados do DMáx e DMín foi encontrado um valor foi de $29,2 \mu\text{m}$ e $15,5 \mu\text{m}$, respectivamente, no grupo Controle, $30,3 \mu\text{m}$ e $16,1 \mu\text{m}$ no grupo PBS e $24,3 \mu\text{m}$ e $14,2 \mu\text{m}$ no Colite ($p>0,05$) (Figura 40 B, C).

A análise das áreas dos neurônios Calr-ir no grupo Controle apresentou uma média de $473,16 \mu\text{m}^2$, no grupo PBS a média foi de $580,57 \mu\text{m}^2$, e no grupo Colite $514,24 \mu\text{m}^2$ (Figura 41 A). Os grupos Colite e PBS. Quando analisados do DMáx e DMín foi encontrado um valor foi de $33,4 \mu\text{m}$ e $17,6 \mu\text{m}$, respectivamente, no grupo Controle, $34,7 \mu\text{m}$ e $19,2 \mu\text{m}$ no grupo PBS e $35,17 \mu\text{m}$ e $17,74 \mu\text{m}$ no Colite ($p>0,05$) (Figura 41 B, C).

Figura 40 - Área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calb, do plexo submucoso, nos grupos Controle, PBS e Colite (* diferença significativa do PBS em relação ao colite, * $p < 0,05$).

Figura 41 - Área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calr, do plexo submucoso, nos grupos Controle, PBS e Colite (* diferença significativa do PBS em relação ao colite, * $p < 0,05$).

4.11 Distribuição de Frequências dos Neurônios Mioentéricos

O histograma de distribuição de frequências das áreas mostrou que a maior proporção de neurônios NOS-ir está entre 100 e 1000 μm^2 nos três grupos analisados (Figura 42). A maioria dos neurônios NOS do grupo Controle apresentaram uma área situada entre 300-400 μm^2 , os grupos PBS e Colite apresentaram a área do perfil entre 450-550 μm^2 (Figura 42A). O DMáx variou de 10 e 40 μm nos três grupos estudados (Figura 42B). A maioria dos neurônios NOS dos grupos Controle, PBS e Colite apresentaram um DMáx entre 30 e 40 μm . Nos três grupos estudados DMín variou entre 3 a 39 e a maioria dos neurônios NOS variou entre 15 a 18 μm (Figura 42 C).

O histograma de distribuição de frequências das áreas mostrou que a maior proporção de neurônios ChAT-ir possuem uma área entre 100 e 850 μm^2 nos três grupos analisados (Figura 43). No entanto, a maioria dos neurônios ChAT do grupo Controle apresentaram uma área situada entre 150-200 μm^2 , nos grupos PBS e Colite de 24 horas a maioria dos neurônios, apresentaram a área do perfil entre 300-350 μm^2 (Figura 43A). O DMáx variou de 10 e 80 nos três grupos estudados (Figura 43B). A maioria dos neurônios ChAT do grupo Controle apresentaram um DMáx entre 30 e 40 μm , nos grupos PBS e Colite apresentaram 20 a 30 μm . Nos três grupos estudados DMín variou entre 3 a 39 e a maioria dos neurônios ChAT variou entre 15 a 18 μm nos três grupos (Figura 43 C).

O histograma de distribuição de frequências das áreas mostrou que a maior proporção de neurônios Calb-ir possuem uma área entre 100 e 1600 μm^2 nos três grupos analisados (Figura 44). No entanto, a maioria dos neurônios Calb do grupo Controle apresentaram uma área situada entre 150-300 μm^2 , já nos grupos PBS entre 200-300 μm^2 e Colite a maioria dos neurônios, apresentaram a área do perfil entre 500-700 μm^2 (Figura 44A). O DMáx variou de 10 e 110 nos três grupos estudados (Figura 44B). A maioria dos neurônios Calb do grupo Controle apresentaram um DMáx entre 30 e 40 μm , no grupo PBS variaram entre 20 e 30 μm e o grupo Colite apresentaram 40 a 50 μm . No grupo Controle o DMín dos neurônios Calb variou entre 12 a 15 μm , no grupo PBS variou 9 a 12 μm e no grupo Colite o DMín variou entre 15 a 18 μm (Figura 44C).

O histograma de distribuição de frequências das áreas mostrou que a maior proporção de neurônios Calr-ir possuem uma área entre 400 e 600 μm^2 nos três grupos analisados (Figura 45). No entanto, a maioria dos neurônios Calr do grupo Controle apresentaram uma área situada entre 400-500 μm^2 , já nos grupos PBS e Colite entre 500-650 μm^2 e Colite (Figura 45A). O DMáx variou de 10 e 90 μm nos três grupos estudados

(Figura 45B). A maioria dos neurônios Calr dos grupos Controle, PBS e Colite apresentaram um DMáx entre 30 e 40 μm . Nos três grupos estudados DMín variou entre 3 a 39 e a maioria dos neurônios Calr variou entre 18 a 21 μm (Figura 45C).

Figura 42 - Distribuição da área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à NOS nos grupos controle, PBS e Colite (* diferença significativa do Colite em relação ao Controle, * $p < 0,05$).

Figura 43 - Distribuição da área do perfil (μm^2) (A), $DM_{\text{Máx}}$ (μm) (B) e $DM_{\text{Mín}}$ (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à ChAT nos grupos controle, PBS e Colite (* diferença significativa do Colite em relação ao Controle, * $p < 0,05$).

Figura 44 - Distribuição da área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calb nos grupos Controle, PBS e Colite (* diferença significativa do Colite em relação ao Controle, * $p < 0,05$).

Figura 45 - Distribuição da Área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calr nos grupos Controle, PBS e Colite (* diferença significativa do Colite em relação ao Controle, * $p < 0,05$).

4.12 Distribuição de Frequências dos Neurônios Submucosos quanto à Área do Perfil

O histograma de distribuição de frequências das áreas mostrou que a maior proporção de neurônios Calb-ir está entre 100 e 600 μm^2 nos três grupos analisados (Figura 46). A maioria dos neurônios Calb-ir do grupo Controle apresentaram uma área situada entre 200-400 μm^2 , os grupos PBS e Colite apresentaram a área do perfil entre 250-400 μm^2 (Figura 46A). O DMáx variou de 10 e 50 μm nos três grupos estudados (Figura 46B). A maioria dos neurônios Calb-ir dos grupos Controle, PBS e Colite apresentaram um DMáx entre 30 e 40 μm . Nos três grupos estudados DMín variou entre 3 a 39 e a maioria dos neurônios Calb-ir entre 18 a 35 μm (Figura 46C).

O histograma de distribuição de frequências das áreas mostrou que a maior proporção de neurônios Calr-ir está entre 200 e 800 μm^2 nos três grupos analisados (Figura 47). A maioria dos neurônios Calr-ir do grupo Controle apresentaram uma área situada entre 300-500 μm^2 , os grupos PBS e Colite apresentaram a área do perfil entre 350-550 μm^2 (Figura 47A). O DMáx variou de 20 e 70 μm nos três grupos estudados (Figura 47B). A maioria dos neurônios Calr-ir dos grupos Controle, PBS e Colite apresentaram um DMáx entre 20 e 50 μm . Nos três grupos estudados DMín variou entre 3 a 33 e a maioria dos neurônios Calr-ir entre 12 a 21 μm (Figura 47C).

Figura 46 - Distribuição da área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calb do plexo submucoso nos grupos controle, PBS e Colite (* diferença significativa do Colite em relação ao Controle, * $p < 0,05$).

Figura 47 - Distribuição da área do perfil (μm^2) (A), DMáx (μm) (B) e DMín (μm) (C) dos neurônios imunorreativos à Calr do plexo submucoso nos grupos Controle, PBS e Colite (* diferença significativa do Colite em relação ao Controle, * $p < 0,05$).

5.1 Considerações sobre o Modelo de Colite Experimental

O 2, 4, 6 Trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) tem sido amplamente utilizado como substância indutora de colite ulcerativa e da doença de Crohn em modelos experimentais (ELSON et al., 1996; MATSUURA et al., 2005; MORRIS et al., 1989). Em nosso trabalho a colite ulcerativa foi efetiva pelo TNBS na dosagem de 30 mg/kg em 1 mL com 30% etanol no lúmen do intestino grosso porção intrarretal. Morris et al. (1989) definiram a dosagem do TNBS com etanol, a 30% de volume, como a mais adequada em promover a inflamação intestinal compatível com a inflamação semelhante a inflamações intestinais em humanos como a Doença de Crohn e Colite Ulcerativa. No presente trabalho, o uso da diluição a 30% de álcool em TNBS foi eficiente para promover colite ulcerativa em ratos. Outras substâncias têm sido utilizadas para promover a inflamação intestinal semelhante à de humanos. Dentre elas destacam-se: o ácido acético, o sulfato dextran imunocomplexo, a indometacina, o tamarin, o HLA-B27 (VAN LIEROP et al., 2010; MIAMPAMBA; SHARKEYM, 1999; MORRIS et al., 1989; NEUNLIST et al., 2003; POLI et al., 2001; VARGA et al., 2009).

Em nosso estudo, os tecidos após 24 h da indução da colite apresentaram hiperemia, inflamação regional com presença de ulcerações, edema e aumento da lâmina própria, estes resultados concordam com a literatura (ELSON et al., 1995; LINDEN et al., 2005; SNAPE et al. 1988). Estudos com colite, também, têm apresentado alterações na população neuronal (BECK et al. 2009; LINDEN et al., 2005; NEUNLIST et al., 2003; POLI et al., 2001). Outro estudo ressaltou que os danos no colo foram maiores após 12 h do que 24 h da administração de TNBS, com retorno a níveis similares ao grupo controle com 1 semana de colite (LINDEN et al., 2005).

Diversas escalas de lesão tecidual têm sido utilizadas para avaliações (GEBOES et al., 1998; MCCAFFERTY et al., 1999; NEURATH et al., 1995; TSUNE et al., 2003). A escala que utilizamos foi a escala de lesão de Bell, Gall e Wallace (1989), por ser a escala com maiores detalhes, para pontuação da lesão tecidual (SARNELLI et al., 2009).

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

O presente trabalho utilizou marcadores neuronais no plexo mioentérico: para neurônios motores inibitórios usou a NOS; para IPANs, a Calb; a ChAT para neurônios motores excitatórios e/ou Calr; para o pan-neuronal foi utilizado o marcador anti-HuC/D e para o pan-glial foi utilizado a proteína S100 (FURNESS 2006, 2000).

Diversos pesquisadores detectaram no plexo mioentérico de ratos, neurônios NOS-ir (AIMI et al., 1993; EKBLAD et al., 1994; NICHOLS et al., 1992), e a maioria, se não a totalidade desses neurônios, apresentam morfologia de neurônios Dogiel Tipo I (AIMI et al., 1993; JARVINEN et al., 1999). Neurônios nitrérgicos em animais e humanos podem existir em pelo menos duas diferentes populações entéricas, por exemplo, motor e interneurônios (BECK et al., 2009; FURNESS, 2006; PORTER et al., 1997, 2002; QU et al., 2008). Os nossos resultados evidenciaram neurônios NOS-ir com morfologia Dogiel Tipo I em todos os grupos analisados, e não houve alteração nos grupos PBS e Colite.

O presente estudo mostrou neurônios intensamente e fracamente imunorreativos à ChAT, com marcação homogênea do citoplasma. Marcações semelhantes foram verificadas no SNE de cobaias (CHIOCCHETTI et al., 2003; LI; FURNESS, 1998) e de equinos (FREYTAG et al., 2008).

Estudo feito em colo humano foi verificado que a maior população de neurônios era colinérgica com uma proporção de 64% (PORTER et al., 2002). Em intestino delgado de humanos foi identificado neurônios imunorreativos à ChAT com uma proporção de 52%, no intestino grosso a população de ChAT foi em torno de 38% (BECK et al., 2009).

Em todos os grupos estudados, os neurônios marcados pela Calb, apresentaram morfologia Dogiel Tipo II e alguns neurônios Dogiel Tipo I. Estes dados são confirmados pelos autores Sayegh e Ritter (2003), que demonstraram que os neurônios Calb-ir apresentam quatro morfologias distintas: neurônios Dogiel Tipo II pequenos e grandes, neurônios Dogiel Tipo I e neurônios pequenos alongados. Também nesse estudo, foi verificado no plexo submucoso neurônios IPANs marcados pela Calb apresentando morfologia Dogiel Tipo I e Tipo II.

A presença dos receptores P2X nos neurônios entéricos foi 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).

No colo distal, em nosso trabalho, foi constatado a presença do receptor P2X₇ nos neurônios dos plexos mioentérico e submucoso com diminuição da expressão no grupo Colite, semelhantes aos resultados vistos na isquemia e reperfusão (PALOMBIT, 2010; PAULINO et al., 2011).

A presença destes receptores na superfície dos corpos celulares dos neurônios sugere que eles poderiam ser ativados pelo ATP, esses receptores estão presentes nos locais pós-sinápticos, isto é consistente com o envolvimento dele na neurotransmissão rápida do SNE (GALLIGAN; BERTRAND, 1994; GALLIGAN et al., 2000).

Em locais pré-sinápticos permanece obscura a função do receptor P2X₇, como um ligante de canal iônico, o receptor P2X₇ tem função semelhante aos receptores nicotínicos de acetilcolina do plexo mioentérico (GALLIGAN, 1999).

Trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório têm demonstrado alterações na expressão do receptor P2X₂ nos protocolos de desnutrição e renutrição (MISAWA et al., 2010) e na obesidade (MIZUNO, 2010) e, dos receptores P2X₂ e P2X₇ no intestino grosso (GIROTTI, 2008) e na isquemia/reperfusão (PALOMBIT, 2010; PAULINO et al., 2011).

Mudanças na expressão do receptor purinérgico são frequentemente observadas em diferentes tipos de células e tecidos, variando em condições patológicas devida a produção de ATP, adenosina e outros neurotransmissores (FRANKE; ILLES, 2006; FRANKE et al., 2006). Na doença inflamatória intestinal (DII), os autores Yiangou et al. (2001) estudaram o aumento da expressão do receptor purinérgico P2X₃.

A estimulação do receptor P2X₇ pode levar à morte celular por fosforilação e ativação de quinases específicas, liberação de citocinas, a ativação de fatores de transcrição e de caspase-1 e de caspase-3. Assim, esse receptor medeia a apoptose de vários tipos celulares, inclusive nos neurônios através da formação de poro na membrana celular e regula a permeabilidade celular (COUTINHO-SILVA et al., 1999, FRANKE et al., 2006; SLATER et al., 2000a, b; SURPRENANT et al., 1996).

No plexo submucoso o receptor P2X₇ colocalizou com os neurônios Calb, Calr e HuC/D. Foi verificada alteração da expressão desse receptor principalmente nos neurônios imunorreativos à Calb e à Calr, estes dados concordam com trabalhos de Misawa et al. (2010) e Paulino et al. (2011)

As observações do plexo submucoso demonstraram, de maneira original, a presença do receptor P2X₇ colocalizado com a Calr na parede do vaso sanguíneo e, com diminuição no grupo Colite. No entanto, verificou-se que a Calb não estava presente na parede do vaso nos grupos estudados.

Em nosso trabalho através da análise pela técnica de histoquímica da mieloperoxidase (MPO) pode-se constatar a presença de neutrófilos, na camada muscular da mucosa, ao redor do plexo submucoso, na lâmina própria e na extensão da mucosa do grupo Colite. Concordando com esses resultados, um estudo realizado em camundongos após 1 h de isquemia foi verificado neutrófilos em áreas na lâmina própria e gânglios entéricos por sete dias (PONTELL et al., 2011). Foi identificado o aumento do nível de infiltrado de neutrófilos nos tecidos inflamados (SARDELLI et al., 2008; SAUNDERS et al., 2005). Em outros protocolos como de isquemia e reperfusão foi visto o aumento de infiltrado de neutrófilos no pulmão (CAVRIANI et al., 2004).

Na análise histológica, o tecido da Colite ulcerativa apresentou aumento da lâmina própria, destruição das criptas, infiltrado inflamatório e extravasamento de hemácias. Características semelhantes foram observadas na ileíte e na isquemia e reperfusão em camundongos (PONTELL et al., 2009; 2011).

Em nosso trabalho, através do ácido periódico de Shiff, verificou-se que no grupo PBS as células caliciformes aparentaram-se túrgidas com grande quantidade de muco, e no grupo Colite apresentaram-se raras, e as existentes estavam intumescidas. Resultado semelhante foi observado em um estudo realizado em cobaias no protocolo de ileíte, onde as células caliciformes apresentaram-se raras nas primeiras 6 h e começando a reestruturação no terceiro dia (PONTELL et al., 2009). Pela análise do Picrosirius houve diminuição de colágeno tipo I, e o tipo II apresentou-se disperso na lâmina própria e ao redor dos gânglios entéricos, no grupo Colite. Resultados de alterações do colágeno foram observados também na desnutrição (GOMES et al., 2006).

Com relação ao estudo das duplas marcações, no presente trabalho foi feito a colocalização de neurônios imunorreativos à NOS, à ChAT, à Calb, à Calr e ao anti-HuC/D com o receptor P2X₇, nos plexos mioentérico e submucoso. Os resultados demonstraram que o receptor P2X₇ estava presente em 100% dos neurônios mioentéricos e submucosos nos grupos estudados, apesar da intensidade da expressão do receptor P2X₇ estar diminuída no grupo Colite. Alguns resultados do laboratório têm demonstrado alterações quantitativas nas duplas marcações do receptor P2X₂ no íleo de animais desnutridos e renutridos (MISAWA et al., 2010) e nos receptores P2X₂ e P2X₇ no colo distal de animais desnutridos e renutridos (GIROTTI, 2008).

Diversos estudos em animais e humanos têm mostrado que o anti-HuC/D é um marcador pan-neuronal (GANNS et al., 2006; HEINICKE et al., 1987; MURPHY et al., 2007; PHILLIPS et al., 2004), resultados semelhantes foram descritos no SNE de equinos

(FREYTAG, 2008) e de camundongos (QU et al., 2008). Com relação aos neurônios nitrérgicos, nosso estudo identificou que 33,9% de todos os neurônios do plexo mioentérico do colo distal de ratos, correspondem a essa classe neuronal, havendo variação de 35,4% no grupo PBS e 24,8% no grupo Colite.

Em nosso trabalho verificou-se que neurônios imunorreativos à NOS, no colo distal marcaram em torno de 25% da população total de neurônios. De acordo com a espécie utilizada pode ocorrer variação dos neurônios NOS no intestino grosso, sendo em camundongos em torno de 35% (SANG; YOUNG, 1996), em cobaias 39% (LOMAX; FURNESS, 2000) e no colo de humanos 43% de neurônios entéricos eram nitrérgicos (MURPHY et al., 2007).

Nosso estudo mostra que aproximadamente 68% de todos os neurônios são colinérgicos no plexo mioentérico do colo de ratos, e houve diferença significativa entre os grupos PBS e Colite. Na colite as populações neuronais mais atingidas em ordem crescente das classes neuronais estudadas foi a ChAT, NOS, Calr e Calb.

No nosso estudo a população de ChAT foi de 34,6% no controle, 39,2% no grupo PBS e 30,6% no grupo colite. No entanto, no intestino grosso de cobaias 57% de todos os neurônios entéricos eram ChAT-ir e em humanos esse valor é de 63% (PORTER et al., 1996; LOMAX; FURNESS, 2000). Semelhante aos nossos resultados foi verificado no trabalho de Neunlist et al. (2003) no grupo controle a população do ChAT era de 35% e na Colite 33,6%.

Ao analisar marcações com anti-HuC/D com o receptor P2X₇ verificou-se que o receptor não estava presente somente nos neurônios. Com objetivo de identificar qual tipo celular o receptor P2X₇-ir se encontrava, foi feito uma dupla marcação do receptor com o S100 (marcador de célula glial). A análise da proporção de S100-ir que eram positivas ao receptor P2X₇ foi de 100% nos grupos estudados. Um trabalho do laboratório de dupla marcação do receptor P2X₂ demonstrou que aproximadamente 6% das células imunorreativas ao P2X₂ não eram neurônios e a dupla marcação deste receptor com a proteína S100 demonstrou que aproximadamente 70% das células gliais eram imunorreativas ao receptor (MENDES et al., 2011).

No plexo submucoso foi feita colocalização dos neurônios Calb-ir, Calr-ir, com HuC/D e S100 e, a presença do receptor P2X₇ foi ao redor de 100% nestas classes neuronais e nas células gliais entéricas nos grupos estudados. A presença do receptor P2X₂ foi encontrado no plexo submucoso de animais desnutridos (MISAWA et al., 2010) e na isquemia e reperfusão (PAULINO et al., 2011).

5.3 Considerações sobre a Densidade Neuronal nos Plexos Entéricos

Diversos protocolos têm determinado alterações na densidade neuronal, como os experimentos de desnutrição/renutrição (CASTELUCCI et al., 2002b; BRANDÃO et al., 2003; GOMES et al., 2006; GIROTTI, 2008; GREGGIO et al., 2010; MISAWA et al., 2010; SANT'ANA et al., 1997), na obesidade, em animais *ob/ob*, foi verificada diminuição na densidade dos neurônios NOS-ir e ChAT-ir (MIZUNO, 2010) e na isquemia/reperfusão (PALOMBIT, 2010; PAULINO et al., 2011).

Alterações foram verificadas nos neurônios de camundongos (EL-SALHY; SANDSTROM, 1999; EL-SALHY et al., 1999) e em cobaias (GABELLA, 1989). No entanto, a perda acentuada dos neurônios entéricos acontece no envelhecimento apresentando redução de 30 a 60% no intestino de cobaias (ABALO et al., 2005; GABELLA, 1989), de ratos (COWEN et al., 2000; PHILLIPS et al., 2003; 2007; PHILLIP; POWLEY, 2001; SANTER; BAKER, 1988; THRASIVOULOU et al., 2006; WU et al., 2003) e de humanos (DE SOUZA et al., 1993; GOMES et al., 1997; MECIANO et al., 1995).

Concordando com essa diminuição em relação ao envelhecimento, realizado no plexo submucoso de cobaias verificou-se que a densidade de neurônios em animais jovens era 5011 neurônios/cm² e nos animais velhos 2.918 neurônios/cm² (ZANESCO; DE SOUZA, 2011).

Com relação às doenças inflamatórias, a secreção e a motilidade intestinal são dependentes da atividade dos neurônios entéricos e a perda desses neurônios pode resultar em uma disfunção intestinal (YANO et al., 1997). Também tem sido sugerido que a DII, nos episódios que ocorram I/R, pode estar associada com alterações na motilidade gastrintestinal (THORNTON; SOLOMON, 2002).

No presente trabalho foi observada na densidade neuronal do NOS-ir no grupo PBS uma redução de 14,3% e no grupo Colite a redução de 42,3% quando comparado ao grupo Controle, resultado semelhante foi encontrado por Paulino et al. (2011) em animais com isquemia de 45 min e reperfusão de 4 horas com redução dos neurônios NOS-ir.

Nos neurônios ChAT-ir foi observada uma redução de 46,5% no grupo PBS, e no grupo Colite a redução foi de 34,9% quando comparado ao grupo Controle, resultados semelhantes a essa diminuição foram observados por outros autores, embora com o uso de outros protocolos (PALOMBIT, 2010; PAULINO et al., 2011).

Nos neurônios Calb houve uma redução de 2,1% no grupo PBS, e no grupo Colite a redução foi de 22,9% quando comparado ao grupo Controle. No entanto, em outro estudo de Colite feito com etanol, foi observado que não houve perda de neurônios por gânglio quando comparado ao Controle (LINDEN et al., 2005).

Os neurônios Calr-ir mostraram uma diminuição significativa (60,6%) no grupo Colite ao ser comparada ao Controle e PBS, e o grupo PBS quando comparado ao Controle, resultados semelhantes foram encontrados no protocolo de isquemia e reperfusão (PALOMBIT, 2010; PAULINO et al., 2011).

Em nosso estudo foi identificado em ambos os plexos mioentérico e submucoso, neurônios imunorreativos à Calr com morfologia Dogiel Tipo II, corroborando com esse achado, em um estudo feito em intestino de humanos, os neurônios imunorreativos à Calr apresentaram a mesma morfologia em ambos os plexos (BREHMER et al., 2004; MITSUI et al., 2009).

O marcador pan-neuronal anti-HuC/D foi usado para quantificar o número total de neurônios do plexo mioentérico do colo distal de ratos. Quando avaliada a população total de neurônios do plexo mioentérico do colo distal com anti HuC/D, observou-se 60.000 neurônios/cm², houve redução de 14,7% no grupo PBS e 33,4% no grupo Colite, similar ao nosso resultado. Em outro estudo em Colite experimental com TNBS houve redução de 15% de neurônios/gânglio em animais com períodos de 12 h e 24 h (LINDEN et al., 2005).

Um dos eventos do processo da morte celular pode ser a necrose que apresenta como características aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Promovendo, com isso, um grande insulto celular com extravasamento de conteúdo celular danificando células adjacentes (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

Em nosso estudo, outro processo que poderia explicar a morte dos neurônios, seria a apoptose, por ser um fenômeno rápido, ocorre retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

No grupo PBS, do nosso estudo, houve diferenças significativas na densidade dos plexos mioentérico (NOS, ChAT, Calr, HuC/D, S100) e submucoso (P2X₇, Calb, Calr, HuC/D, S100). Supomos a partir disso que somente colocar um objeto estranho, no caso uma cânula intrarretal pode ter efeito sobre os plexos mioentérico e submucoso, por consequência promove alterações intestinais. Corroborando com esse achado, o procedimento de um exame rotineiro como a Colonoscopia pode promover alterações no intestino sendo as mais frequentes hemorragias, perfurações, ampliando sintomatologia da Colite e síndrome pós-polidectomia, sendo necessários cuidados intensos (ARMED et al., 1997; SCHWESINGER et al., 1979).

5.4 Considerações sobre Células Gliais Entéricas

Analisando a população de células gliais do grupo Colite marcadas com S100 no plexo mioentérico houve uma perda de 29,2% e no plexo submucoso redução de 44,2%. Concordando com estes achados, um estudo realizado a partir de biópsias de intestinos humanos com Doença de Crohn, marcados com marcador glial o GDNF (fator neurotrófico derivado de glia) também foi verificado diminuição de células gliais (VON BOYEN et al., 2011). A perda glial no grupo Colite no plexo mioentérico foi de aproximadamente 29,2% e no plexo submucoso de aproximadamente 44,2%.

Em nosso trabalho a proporção de glia em ambos os plexos mantiveram-se com a proporção de aproximadamente 1,28 glias para 1 neurônio. Hoff et al. (2008) quantificaram com o marcador anti-Sox8/9/10 e S100 as células gliais entéricas no SNE de humanos e cobaias e, verificaram que em humanos no plexo mioentérico a razão de 5,9-7,0 de células gliais para 1 neurônio. No plexo submucoso a proporção era de 1,3-1,9 células gliais para 1 neurônio, em cobaias relataram as razões de 0,8-1,0 e 1,7 de células gliais, nos plexos submucoso e mioentérico, respectivamente.

No presente trabalho, foi observado que todas as células gliais marcadas com S100 também eram imunorreativas ao receptor P2X₇ em ambos os plexos entéricos em todos os grupos estudados. No SNC receptores purinérgicos estão presentes em células gliais (IRNICH et al., 2001). Os autores Vanderwinden et al. (2003) foram os primeiros a mostrar a presença de um receptor purinérgico em células gliais entéricas.

5.5 Considerações sobre o Perfil Neuronal

Mudanças nas áreas dos perfis neuronais têm sido estudadas em diversos protocolos experimentais. Na 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). A diminuição na área do perfil das diferentes classes neuronais nos plexos mioentérico e submucoso foi encontrada em protocolos de desnutrição (GIROTTI, 2008; MISAWA et al., 2010) e de I/R-i (PALOMBIT, 2010; PAULINO et al., 2011). A obesidade promoveu aumento nos neurônios imunorreativos à ChAT e à Calr em camundongos obesos fêmeas (MIZUNO, 2010).

No presente trabalho a análise da área e do DMáx dos neurônios nitrérgicos indicou uma redução no tamanho dos neurônios no grupo Colite e tendência a aumento da área no grupo PBS diferindo estatisticamente do grupo Colite. Não houve trabalhos que verificassem mudanças em áreas dos neurônios na Colite experimental, mas em outros protocolos podemos ter uma idéia de possíveis alterações da morfometria, como por exemplo, Palombit (2010) observou um aumento significativo das áreas dos neurônios NOS-ir nos grupos I/R-i 6 e 24 horas em relação aos seus respectivos grupos sham.

Essas alterações na morfologia desses neurônios podem ser explicadas na regulação de cálcio, o aumento de cálcio intracelular pode ativar vários processos celulares destrutivos, incluindo enzimas de degradação (caspase-3), aumento de citocinas e destruição de K^+ (DONG et al., 2006; FRANKE et al., 2006; FRANKE; ILLES, 2006; KRISTIÁN; SIESJÖ, 1998).

Em nosso trabalho, os neurônios NOS-ir e ChAT-ir tiveram uma redução na área de 6,8% e 21,3% respectivamente, no grupo Colite. Corroborando com esse resultado em um estudo realizado com isquemia e reperfusão houve uma redução de 49,7% e 42% nos neurônios NOS-ir e ChAT-ir respectivamente (PAULINO et al., 2011) e no protocolo de obesidade (MIZUNO, 2010)

Nos neurônios imunorreativos à Calb houve diferença significativa na área do perfil do corpo celular, entre os grupos estudados. O DMín também apresentou diferenças significativas entre o PBS e Controle. Os neurônios imunorreativos à Calr também apresentaram alterações, na área de perfil do corpo celular nos grupos Colite e PBS quando comparado ao Controle. Na literatura não tem sido encontrado trabalhos que verifiquem as alterações nas diferentes classes neuronais. Protocolos do laboratório de

isquemia/reperfusão, desnutrição e obesidade têm demonstrado alterações no perfil neuronal (GIROTTI, 2008; MIZUNO, 2010; PALOMBIT, 2010).

Com relação ao plexo submucoso houve reduções da área do perfil nos neurônios Calb-ir e Calr-ir, alterações nas áreas têm sido vistas no plexo submucoso de animais nutridos e desnutridos (GIROTTI, 2008; MISAWA et al., 2010) e no protocolo de I/R (PALOMBIT, 2010; PAULINO et al., 2011).

Em nosso estudo no colo distal, no plexo mioentérico nos três grupos estudados a área do perfil neuronal variou nos grupos de 150 a 650 μm^2 e média de 266,6 μm^2 . No plexo submucoso nos três grupos estudados a área variou de 110,17 a 954 μm^2 com uma média de 388,2 μm^2 , no grupo colite foi de 131,42 a 765 μm^2 com média de 296,53 μm^2 .

Com base no exposto, este trabalho contribuiu de maneira importante no entendimento dos efeitos da colite ulcerativa, pela técnica de imunohistoquímica, sobre as classes neuronais dos plexos mioentérico e submucoso, sobre o receptor P2X₇ e as estruturas da parede do colo distal evidenciadas pelas técnicas histoquímicas e histológicas.

1. O TNBS foi efetivo para produzir a Colite Ulcerativa, no qual apresentou, no colo distal hiperemia, aumento da lâmina própria e formação de úlceras;
2. A colite experimental alterou a colocalização do receptor P2X₇ com os neurônios do SNE;
3. Houve diminuição da expressão do receptor P2X₇ nos neurônios no grupo Colite, que pode indicar participação deste receptor na perda neuronal;
4. A colite provocou perdas neuronais dos plexos mioentérico e submucoso;
5. A colite afetou de maneira diferenciada o plexo mioentérico quando comparado ao submucoso;
6. A colite provocou perda de células gliais entéricas;
7. Evidenciou-se pela colite, alterações na parede do colo distal com relação às células caliciformes, as fibras colágenas e a presença de neutrófilos;

REFERÊNCIAS

- ABBACHIO, M.; BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: pathological roles. **Jpn J Pharmacol.**, v. 78, p. 113-145, 1998.
- ABBACHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A.; ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling in the nervous system: an overview. **Trends Neuroscience**.32 (1):p 19-29, 2009.
- AIMI, Y.; KIMURA, H.; KINOSHITA, T.; MINAMI, Y.; FUJIMURA, M.; VINCENT, S. R. Histochemical localization of nitric oxide synthase in rat enteric nervous system. **Neuroscience**, v. 53, p. 553-560, 1993. doi:10.1016/0306-4522(93)90220-A
- AMBACHE, N. Unmasking, after cholinergic paralysis by botulinum toxin, of a reversed action of nicotine on the mammalian intestine, revealing the probable presence of local inhibitory ganglion cells in the enteric plexuses. **Br. J. Pharmacol.**, v. 6, p. 51-67, 1951.
- ANNESE, V.; BASSOTI, G.; NAPOLITANO, G.; FRUSCIANTE, V.; BRUNO, M.; CONSCITORE, P.; GEMANI, U.; MORELLI, A.; ANDRIULLI, A. Gastric emptying of solids in patients with non-obstructive Cohn's disease is sometimes delayed. **J. Clin. Gastroenterol.** V. 21, p. 279–282, 1995.
- AUERBACH, L. Fernere vorlaufige Mitteilung uber den Nervenapparat des Darmes. **Arch Pathol Anat Physiol.**, v.30, p.457-460, 1864.
- BELAI, A.; BURNSTOCK, G. Distribution and colocalization of nitric oxide synthase and calretinin in myenteric neurons of developing, aging, and Crohn's disease huma. n small intestine. **Dig. Dis. Sci.**, v. 44, p. 1579-1587, 1999. doi:10.1023/A:1026658826010
- BECK, M.; SCHABRAKOWSSKI, A; SCHRODL, F.; NEUHUBER, W.; BREHMER, A. Chat and NOS “In Human myenteric neurons: co-existence and co-absence. **Cell Tissue** v, 338 p. 37-51,2009. doi 10.10071500441
- BELL, C. J., GALL, D.G., WALLACE, J. L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **Am J Physiol** 1995; v. 268 p.622–630.
- BOYER, L.; GHOREISHI, M.; TEMPLEMAN, V.; VALLANCE B.,A., BUCHAN, A.,M., JEVON, G.; JACOBSON. K. Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. **Auton Neurosc.**, v. 117, p. 41-53, 2005.
- 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. doi:10.1016/S0-271-5317(02)00459-1
- BROOKES, S. J.; STEELE, P. A.; COSTA, M. Calretinin immunoreactivity in cholinergic motor neurones, interneurons and vasomotor neurones in the guinea-pig small intestine. **Cell Tissue Res.**, v. 263, p. 471-481, 1991. doi:10.1007/BF00327280

BROOKES, S. J.; SONG, Z. M.; RAMSAY, G. A.; COSTA, M. Long aboral projections of Dogiel type II, AH neurons within the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 4013-4022, 1995.

BUCHAN, A. M.; BAIMBRIDGE, K. G. Distribution and co-localization of Calbindin D28k with VIP and neuropeptide Y but not somatostatin, galanin and substance P in the enteric nervous system of the rat. **Peptides**, v. 9 p. 333-338, 1988. doi:10.1016/01969781(88)902690.

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.

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

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

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

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

CARROL W. A.; DONNELLY-ROBERTS D.; JARVIS M.F. Selective P2X₇ receptor antagonists for chronic inflammation and pain. **Purinergic signal**. v. 5, p.:63-73, 2009.

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.

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.

CHADWICK, V. S.; CHEN, W., SHUD, D. Activation of the 478 mucosal immune system in irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**-v. 122, p.1778–1783, 2002.

COLLINS, S. M. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: Implications for motility and inflammatory disorders. **Gastroenterology** v.111, p.1683–1699, 1996.

CHIOCCHETTI, R.; POOLE, D. P.; KIMURA, H.; AIMI, Y.; ROBBINS, H. L.; CASTELUCCI, P.; FURNESS, J. B. Evidence that two forms of choline acetyltransferase

are differentially expressed in subclasses of enteric neurons. **Cell Tissue Res.**, v. 311, p. 11-22, 2003.

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.

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.

COSTA, M.; BROOKES, S. J.; STEELE, P. A.; GIBBINS, I.; BURCHER, E.; KANDIAH, C. J. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. **Neuroscience**, v. 75, p. 949-967, 1996. doi:10.1016/0306-4522(96)00275-8

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. 28 n. 2-3 p.241-249, 2004.

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.

DE SOUZA, R. R.; MORATELLI, H. B.; BORGES, N.; LIBERTI, E. A. Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. **Gerontology**, v. 39, p. 183-8, 1993. doi:10.1159/000213532

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

DONG, P.; XIAN, F.; ZHAO, H.L.; LI, H.Y.; XI, B.A.O.; YU, F.E.N. Apoptin-induced apoptosis of human melanoma cells A375 via activation of **caspase-3**. v.; 22 n.3, p. :293-295, 2006.

DONNELLY-ROBERTS D.; McGARAUGHTY, S.; SHIEH, C.C.; HONORE, P.; JARVIS, M.F. Painful Purinergic receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 5, p. 187, 2007.

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

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

ELSON C.O.; **BEAGLEY**, K.W.; **SHARMANOV**, A.T.; **FUJIIHASHI**, K.; **KIYONO**, H.; **TENNYSON**, G.S.; **CONG**, Y.; **BLACK**, C.A., **RIDWAN** BW, **MCGHEE JR.** Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance. **J Immunol.**; v.157 n.5, p.2174-2185,1996.

FERRARI, D.; **LOS**, M.; **BAUER**, MK.; **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.

FIOCCHI, C. Intestinal inflammation: A complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. **Am. J. Physiol.** .v. 36:p. G769–G775 1997.

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

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

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

FURNESS, J.B.; **COSTA**, M. The Enteric nervous system. **England:Churchill Livingstone.**, p. 290 1987.

FURNESS, J. B.; **KEAST**, J. R.; **POMPOLO**, S.; **BORNSTEIN**, J. C.; **COSTA**, M.; **EMSON**, P. C.; **LAWSON**, D. E. Immunohistochemical evidence for the presence of calcium-binding proteins in enteric neurons. **Cell Tissue Res.**, v. 252, p. 79-87, 1988b.

FURNESS, J. B.; **MORRIS**, J. L.; **GIBBINS**, I. L.; **COSTA**, M. Chemical coding of neurons and plurichemical transmission. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 29, p. 289-306, 1989. doi:10.1146/annurev.pa.29.040189.001445

FURNESS, J. B.; **KURAMOTO**, H.; **MESSINGER**, J. P. Morphological and chemical identification of neurons that project from the colon to the inferior mesenteric ganglia in the guinea-pig. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 31, p. 203-210, 1990. doi:10.1016/01651838(90)90186-M

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

FURNESS, J.B.; **CLERC**, M.; **KUNZE**, W.A.; **CLERC**, N. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine and immune responses. **Am J Physiol.**, v. 277,p. G922-G928, 1999b.

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

FURNESS, J.B. **The Enteric Nervous System**. Austrália: Blackwell Publishing., p 287 2006.

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

GABELLA G. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. **Gastroenterology**, v. 96, p. 1487-1493, 1989.

GALEAZZI, F.; HAAPALA, E. M.; VAN ROOJEN, N.; VALLANCE, B., Collins, S. M.. Inflammation-induced impairment of nerve function in nematode-infected mice is macrophage-dependent. **Am. J. Physiol.** v.278, p. G259–G265, 2000.

GALLIGAN, J.J. Nerve terminal nicotinic cholinergic receptors on excitatory motoneurons in the myenteric plexus of guinea pig intestine. **J Pharmacol Exp Ther.** v.291, n.1, p.92-98, 1999.

GALLIGAN, J.J.; BERTRAND, PP.J ATP mediates fast synaptic potentials in enteric neurons **Neurosci.** v.14, n.12, p.7563-7571, 1994.

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, 2000.

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. PMid:16267786

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

GIROTTI P. A. Análise morfoquantitativa dos neurônios mioentéricos e submucosos imunorreativos aos receptores purinérgicos P2X₂ e P2X₇, ao óxido nítrico sintase, a Calr, a Calb e a colina acetil transferase (ChAT) do colo distal de ratos submetidos à desnutrição protéica e à renutrição protéica. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GOMES, O.A.; CASTELUCCI, P.; DE VASCONCELLOS FONTES, R.B.; 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 Neurosci.** v.30; n.126-127, p.277-284 2006.

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

HEINICKE, E.A.; KIERNAN, J.A.; WIJSMAN, J.; Specific, selective, and complete staining of neurons of the myenteric plexus, using cuprolinic blue.**J Neurosci Methods**. v.21 n.1p.45-54,1987.

HOFF, S.; ZELLER,F; VON WEYHERN, C.W.; WEGNER, M; SCHEMANN, M.; MICHEL, K, RÜHL, A. Quantitative assessment of **glial** cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody.**J Comp Neurol**.v.1;509, n.4, p.356-71, 2008.

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

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. doi: 10.1002/cne.1387

IYER, V.; BORNSTEIN, J. C.; COSTA, M.; FURNESS, J. B.; TAKAHASHI, Y.; IWANAGA, T. Electrophysiology of guinea-pig myenteric neurons correlated with immunoreactivity for calcium binding proteins. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 22, p. 141-150, 1988. doi:10.1016/0165-1838(88)90087-2

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

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

JURJUS, A.R.; KHOURY, N.N.; REIMUND, J-M. Animals models of inflammatory bowel disease. **Jour. Pharmacol Toxicol Methods**. V.50, p. 81-92, 2004.

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

KAWADA, M.; ARIHIRO, A.; MIZOGUCHI, E. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v 13, n.42, p. 5581-5593, 2007.

KRISTIÁN, T.; SIESJÖ, B.K. Calcium in ischemic cell death. **Stroke**Mar;;v.29, n.3 p.705-718,1998

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

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.

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

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

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

LI, 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.47554-61, 2003.

VAN LIEROP PP, DE HAAR C, LINDENBERGH-KORTLEVE DJ, SIMONS-OOSTERHUIS Y, VAN RIJT LS, LAMBRECHT BN, ESCHER JC, SAMSOM JN, NIEUWENHUIS EE. T-cell regulation of neutrophil infiltrate at the early stages of a murine colitis model. **Infl. Bowel Dis.** Mar;16(3):442-512010.

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

LOMAX , A.E.; FERNANDEZ, E.; SHARKEY, K.A. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. **Neurogastroenterol. Motil.** V.17 p. 4-15, 2005.

MANN, P. T.; SOUTHWELL, B. R.; DING, Y. Q.; SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N.; FURNESS, J. B. Localisation of neurokinin 3 (NK3) receptor immunoreactivity in the rat gastrointestinal tract. **Cell Tissue Res.**, v. 289, p. 1-9, 1997.

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

MANUOSOS, O.N.; SALEN, S.N. Abnormal motility of the small intestine in ulcerative colitis. **Gastroenterology** v.104, p. 249– 257,1965.

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.

MATSUURA M, OKAZAKI K, NISHIO A, NAKASE H, TAMAKI H, UCHIDA K, NISHI T, ASADA M, KAWASAKI K, FUKUI T, YOSHIKAWA H, OHASHI S, INOUE S, KAWANAMI C, HIAI H, TABATA Y, CHIBA T. Therapeutic effects of rectal administration of basic fibroblast growth factor on experimental murine colitis. **Gastroenterology**;v.12,n.4 p.975-86,2005.

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

MCCAFFERTY, D.M.; SMITH, C.W.; GRANGER, D.N.; KUBES P. Intestinal inflammation in adhesion molecule-deficient mice: an assessment of P-selectin alone and in combination with ICAM-1 or E-selectin. **Leukoc Biol**. V. 66 n.1 p.67-74. **1999**

MECIANO FILHO, J.; CARVALHO, V. C.; DE SOUZA, R. R. Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age: A preliminary investigation. **Gerontology**, v. 41, n. 1, p. 18-21, 1995.

MENDES, C. E.; PALOMBIT, K.; TAVARES DE LIMA, W.; CASTELUCCI, P. Study of P2X₂ receptor in enteric neurons and enteric glial cell of the ileum rats subjected of ischemia and reperfusion. In: 1st Joint Meeting of the international Society for autonomic Neuroscience and the American Autonomic Society (ISAN/ASS), 2011, Búzios **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, p.163. **Resumos...** Búzios: Elsevier, 2011. p. 62.

MIAMPAMBA, M.; SHARKEY, A.K.; C-Fos expression in the myenteric plexus, spinal cord and brainstem following injection of formalin in the rat colonic wall. *Auton Nerv Syst*. 1999 v.77, n.2-3 p.140-151.

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. Gastroenterology*, v.16, n. 29, p. 3651-3663, 2010.

MIZUNO, M. S. Análises morfoquantitativa e do código químico do receptor purinérgico P2X₂ no plexo mioentérico de camundongos obesos (*ob/ob*) fêmeas e machos. p 144. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MURPHY, E. M. A., DEFONTGALLAND, D., COSTA, M., BROOKES, S. J., WATTCHOW, D. A. Quantification of subclasses of human colonic myenteric neurons by immunoreactivity to HU, choline acetyltransferase and nitric oxide synthase. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 19, p. 126-134, 2007. doi:10.1111/j.1365-2982.2006.00843.x

MORRIS, G.P.; BECK, P. L.; HERRIDGE, M. S.; DEPEW, W. T.; SZEWCZUK, M. R.; WALLACE, J. L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. **Gastroenterology**, v. 96, p.795–803,1989.

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

NICHOLAS, R. A. Identification of the P2Y₁₂ receptor: a novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides. **Mol. Pharmacol.**, v. 60, n. 3, p. 416-20, 2001. PMID:11502870

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

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

NEURATH, M.F.; FUSS, I.; KELSALL, B.L.; STÜBER, E.; STROBER, W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **Exp Med.** V.1,182 n.5 p. 1281-1290, 1995.

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

O'REILLY, BA.; KOSAKA, AH.; CHANG, TK et al. A quantitative analysis of purinoceptor expression in human fetal and adult bladders. **J Urol** v.165, p.1730-734, 2001a.

O'REILLY, B.A.; KOSAKA, A.H.; CHANG, T.K. A quantitative analysis of purinoceptor expression in human fetal and adult bladders of patients with symptomatic outlet obstruction. **BJU Int.** v. 87, p.617-622, 2001b.

PALOMBIT, K. Estudo do receptor P2X₇ nas classes neuronais do íleo de ratos submetidos à isquemia intestinal com reperfusão. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfocelulares) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PAULINO, A.S.; GIROTTI, P.A.; TAVARES DE LIMA, W.; LIBERTI, E.A.; CASTELUCCI, P. Efeito da isquemia/reperfusão intestinal (I/R-i) sobre a expressão do receptor P2X₂ nos neurônios mioentéricos do íleo de ratos. **FESBE**, 2008.

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 EA, 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.

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, 2004.

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

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

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. **Autonom. Neurosc.** v.101, p. 39-47, 2002.

PONTELL, L.; CASTELUCCI, P.; BAGYÁNSZKI,M.; JOVIC, T.; THACKER, M.; NURGALI, K.; BRON , R.; FURNESS, J.B. Structural changes in the epithelium of the small intestine and immune cell infiltration of enteric ganglia following acute mucosal damage and local inflammation. **Virchows Archi.**, v. 454, p. 1-11, 2009.

PONTELL, L.; SHARMA, P.; RIVERA, L.R.; THACKER, M.; TAN, Y.H.; BROCK, J.A.; FURNESS, J.B. Damaging effects of ischemia/reperfusion on intestinal muscle. **Cell Tissue Res.** v.343, n.2 p.411-419, 2011.

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

PROSKURYAKOV, S.Ya.; 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. 147-61, 2008.

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

RAO, S. S. C.; READ, N. W.; BROWN, C.; BRUCE, C.; HOLDWORTH, C. D. Studies on the mechanism of bowel disturbance in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 93, p. 934–940 1987a.

RAO, S.S.; READ, N.W., DAVISON, P.A.,; BANNISTER, J.J.; HOLDSWORTH, C.D. Anorectal sensitivity and responses to rectal distension in patients with ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 93, p. 1270–1275, 1987b.

RESIBOIS, A.; VIENNE, G.; POCHET, R. Calbindin-D28K and the peptidergic neuroendocrine system in rat gut: an immunohistochemical study. **Biol. Cell**, v. 63, n. 1, p. 67-75, 1988.

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 Neuropathologica*, v. 24, p. 1-10, 2009.

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, n.17: p.1715-1719, 2005

SANG, Q.; YOUNG, H. M. Chemical coding of neurons in the myenteric plexus and external muscle of the small and large intestine of the mouse. *Cell Tissue Res.*, v. 284, p. 39-53, 1996

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

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. 687-95, 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. doi:10.1016/0165-1838(88)90008-2

SARNELLI, G.; DE GIORGIO, R.; GENTILE, F.; CALÌ, G.; GRANDONE, I.; ROCCO, A.; COSENZA, V.; CUOMO, R.; D'ARGENIO, G. Myenteric neuronal loss in rats with experimental colitis: role of tissue transglutaminase-induced apoptosis. *Dig Liver Dis.* v.41 n.3 p.185-193, 2009.

SAUNDERS, B.M.; TRAN, S; RUULS, S.; SEDGWICK, J.D., BRISCOE, H.; BRITTON, W.J. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol.*, v.17, n.8 p.4852-4859, 2005.

SAYEGH, A. I.; RITTER, R. C. Morphology and distribution of nitric oxide synthase, neurokinin-1 receptor-, calretinin-, Calbindin-, and neurofilament-M- immunoreactive neurons in the myenteric and submucosal plexuses of the rat small intestine. *Anat. Rec.*, v. 271, p. 209-216, 2003.

SNAPPE, W. J. Jr.; WILLIAMS, R.; HYMAN, P. E. Defect in colonic smooth muscle contraction in patients with ulcerative colitis. *Am. J. Physiol.* v.261, p.G987–G991, 1991.

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, 1994.

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

SCHEMANN, M.; SCHAAF, C. Differential projection of cholinergic and nitroxydergic neurons in the myenteric plexus of guinea pig stomach. *Am. J. Physiol.*, v. 269, p. G186-G195, 1995.

SCHEMANN, M.; SCHAAF, C.; MADER, M. Neurochemical coding of enteric neurons in the guinea pig stomach. **J. Comp. Neurol.**, v. 353, p. 161-178, 1995. doi:10.1002/cne.90-3530202

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.

SCHWESINGER, W.H.; LEVINE, B.A.; MCFEE, A.S. A simplified technique for loop colostomy closure. **Am J Surg**.v.138, n.2 p.330-331, 1979.

SHARKEY, K.A., KROESE, A.B.A. Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators. **Anat. Rec.** v.262, p.79– 90, 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.; MURPH, C. R. The purinergic calcium channels P2X_{1,2,5,7} are down-regulated while P2X_{3,4,6} are up-regulated during apoptosis in the ageing rat prostate. **Histochem. J.**, v. 32, p. 571-580, 2000.

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

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

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

STEIN, J.; RIES, J.; BARRETT, K. E. Disruption of intestinal barrier function associated with experimental colitis: Possible role of mast cells. **Am. J. Physiol.** 274:G203–G209, 1998.

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.

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

THRASIVOULOU, C.; SOUBEYRE, V.; RIDHA, H.; GIULIANI, D.; GIARONI, C.; MICHAEL, G. J.; SAFFREY, M. J.; COWEN, T. Reactive oxygen species, dietary

restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. **Aging Cell**, v. 5, p. 247-57, 2006.

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

TSUNE, I.; IKEJIMA, K.; HIROSE, M.; YOSHIKAWA, M.; ENOMOTO, N.; TAKEI, Y.; SATO, N. Dietary glycine prevents chemical-induced experimental colitis in the rat. **Gastroenterology** v.125 n.3, p.775-785, 2003.

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.

VASINA, V.; BARBARA, B.; TALAMINTI, L.; STANGHELLINI, V.; CORINALDESI, R.; TONINI, M.; DE PONTI, F.; DE GIORGIO, R. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. **Anatomic Neuroscience: Basic and clinical** p.126-127/264-272, 2006.

VARGA, G.; ERCES, D.; FAZEKAS, B.; FÜLÖP, M.; KOVÁCS, T.; KASZAKI, J.; FÜLÖP, F.; VÉCSEI, L.; BOROS, M. N-Methyl-D-aspartate receptor antagonism decreases motility and inflammatory activation in the early phase of acute experimental colitis in the rat. **Neurogastroenterol Motil.** v.22, n.2, p.217-225, 2009.

VON BOYEN, G.; STEINKAMP, M. The role of enteric glia in gut inflammation. **Neuron Glia Biol.** V.21:, p.1-6, 2011.

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

WANG, L.Y.; CAI, W.Q.; CHEN, P.H.; DENG, Q.Y.; ZHAO, C.M. Downregulation of P2X₇ receptor expression in rat oligodendrocyte precursor cells after hypoxia ischemia. **Glia** v.57, n.3, p. 307-319, 2009.

WU, M.; VAN NASSAUW, L.; KROESE, A. B.; ADRIAENSEN, D.; TIMMERMANS, J. P. Myenteric nitrergic neurons along the rat esophagus: evidence for regional and strain differences in age related changes. **Histochem. Cell Biol.**, v. 119, p. 395-403, 2003.

YIANGOU, Y.; FACER, P.; BAECKER, P. A.; FORD, A. P.; KNOWLES, C. H.; CHAN, C. L.; WILLIAMS, N. S.; ANAND, P. ATP-gated ion channel P2X₃ is increased in human inflammatory bowel disease. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 13, n. 4, p. 365-9, 2001.

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. doi:10.1055/s-2007-1000239

ZANESCO, M.C., SOUZA, R.R.. Morphoquantitative study of the submucous plexus (of Meissner) of the jejunum-ileum of young and old guinea pigs. **Arq Neuropsiquiatr** v.69, n.1p.85-90, **2011**.

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

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