ALINE ROSA MAROSTI BOBNA

**EFEITOS DA ISQUEMIA/REPERFUSÃO INTESTINAL
SOBRE O RECEPTOR P2X₂ E NEURÔNIOS
ENTÉRICOS DO ÍLEO DE RATOS**

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

ALINE ROSA MAROSTI BOBNA

**EFEITOS DA ISQUEMIA/REPERFUSÃO INTESTINAL
SOBRE O RECEPTOR P2X₂ E NEURÔNIOS
ENTÉRICOS DO ÍLEO DE RATOS**

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.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. 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

Bobna, Aline Rosa Marosti.

Efeitos da isquemia/reperfusão intestinal sobre o receptor P2X₂ e neurônios entéricos do íleo de ratos / Aline Rosa Marosti Bobna. -- 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: Effects of intestinal ischemia/reperfusion on P2X₂ receptor and enteric neurons of the rats ileum.

Descritores: 1. Isquemia intestinal 2. Plexo mientérico 3. Neurônios mioentericos 4. Sistema nervoso entérico 5. Íleo 6. Motilidade gastrointestinal I. Castelucci, Patricia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0169/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Aline Rosa Marosti Bobna.

Título da Dissertação: Efeitos da isquemia/reperfusão intestinal sobre o receptor P2X₂ e neurônios entéricos do íleo de ratos.

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 50 nas fls. 70 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Patricia Castelucci, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo da expressão dos receptores purinérgicos P2x2 e P2x7 e do código químico do sistema nervoso entérico do íleo de ratos submetidos à isquemia/reperfusão intestinal da A Mesentérica** do qual participou(aram) o(s) alunos **Aline Rosa Marosti, Erinardo Moura Araújo e o pesquisador Wothan Tavares de Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **23.04.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 24 de abril de 2009.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

Aos meus pais, esposo e familiares
Por todo incentivo, dedicação,
compreensão e apoio,
Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a *Deus*, por me mostrar sempre o melhor caminho, me guiar, me dar forças para continuar lutando sempre.

Aos meus amados pais, *Augusta Rosa Marosti* e *José dos Reis Marosti*, que sempre me apoiaram em tudo, e acima de tudo, me ensinaram honestidade, caráter e respeito. Amo muito vocês!

Ao meu amado esposo *André Bobna*, que sempre acreditou em mim, sempre esteve ao meu lado me apoiando, nunca me deixando desistir, e me ensinando sempre a pensar em tudo de uma forma positiva. Obrigado pelo seu carinho, amor e dedicação.

A minha querida avó *Ana Postai*, pelo seu amor, carinho e compreensão. A minha querida avó paterna, *Maria Marosti* (que não está mais entre nós) muito obrigada por toda a convivência, os ensinamentos, o carinho e amor, muitas saudades! E a toda minha família, muito obrigada por tudo!

Aos meus queridos sogro *Basílio Bobna*, sogra *Ivone Bobna* e cunhado *Eduardo Bobna*, pelo carinho e pelo apoio que sempre me deram. Além disso, gostaria muito de agradecer toda família do meu esposo André por me sempre me acolherem com muito carinho.

A minha Orientadora *Profa. Dra. Patrícia Castelucci*, pela enorme oportunidade, pela orientação, paciência, por ter acreditado em mim, por sua dedicação e amizade. Sem sua orientação e seus ensinamentos não teria chegado aqui!

Agradeço a minha orientadora da iniciação científica da UEM, *Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali*, por ter me iniciando na pesquisa e na extensão, por ter acreditado em mim quando estava começando, por sua dedicação, paciência, amizade e carinho.

A todos os professores do Departamento de Anatomia do ICB pela convivência, pelos ensinamentos, principalmente aos professores *Dra. Maria Luísa M. B. Chaves* (coordenadora da pós-graduação) e *Newton Sabino Canteras* pelo apoio a pesquisa.

Ao *Professor Edson A. Liberti* por fazer me apaixonar pela anatomia humana, depois da disciplina de técnicas, por sua dedicação, seus ensinamentos e carinho. A sua querida esposa *Profa. Silvia Boldrini*, que sempre será lembrada pela sua doçura, carinho, respeito, e seu sorriso.

A banca de qualificação, fundamental para a finalização desse trabalho, agradeço ao *Prof. Dr. Edson A. Liberti*, à *Profa. Dra. Laura Beatriz Mesiano Maifrino* e à *Profa. Dra. Silvia Lacchini*.

A *Profa. Dra. Silvia Lacchini* meu agradecimento especial, pela convivência diária, pelos ensinamentos e pelo seu carinho.

Ao *Prof. Wothan Tavares de Lima*, pelo modelo de Isquemia. Ao *Prof. John B. Furness* e *Prof. Geoffrey Burnstock* pelo apoio e discussão dos resultados.

Ao meu amigo *Marcos Vinícius da Silva*, meu irmão, que sempre me apoiou nos experimentos e na vida pessoal, obrigada pelo seu carinho e amizade. As minhas grandes amigas *Kelly Palombit*, *Cristina Eusébio Mendes*, *Márcia Mizuno* e *Jaqueline Jurjuk*, por toda amizade, pelos momentos de muitas risadas, e também pelo apoio nos momentos difíceis.

Aos meus amigos de laboratório, que considero também minha família: *Cíntia T. Lima*, *Kátia Viegas*, *Thais C. Souza*, *Juliane C. S. Silva*, *Nara B. Rabechi*, *Camila J. Piva*, *Álvaro M.B. Júnior*, *Tatiane* e *Isabelle*. Aos colegas que chegaram agora: *Juliana*, *Flávio*, *Lídia* e *Luciane*.

Ao meu grande amigo, lindo, *Ricardo Bandeira*, que sempre me incentivou, me apoiou nos momentos difíceis, pelas risadas, pela amizade, carinho e pelos bons conselhos.

As minhas grandes amigas do Departamento e de muitos bandejões, *Gisele e Cristiane*, pela amizade e carinho. Aos amigos da Pós-graduação: *Marília*, *Bruno*, *Bruna*, *Gabriela*, *Renata*, *Cleyton*, *Leila*, *Cristina*, *Ana Paula Takano*, *Félix*, *Vanessa*, *Priscila*, *Daniela*, *Kelly*, *Fernando*, *Hélder*, *Regina*, *João Paulo*, *Valquíria*, *Thiago*, *Adriano*, *Regina*, *Carlos*, *Pedro*, *Wilma*, *Silvia Honda*, *Eduardo*, *Simone* e *Fernando*.

Aos meus grandes amigos de Maringá, pelo carinho, grande amizade e pela torcida. À *Gislaine C. Ramires*, amiga de todas horas, de muitos anos. Ao meu vizinho e amigo, *José Luiz* e sua esposa *Elisângela*. Aos meus amigos de graduação que dividiram comigo dúvidas, alegrias, tristezas, viagens, trabalhos, enfim dedico a vocês: *Joici*, *Érica*, *Sandra*, *Simone*, *Murilo Serviuc*, *Murilo Citeli*, *Maria Alice*, *Juliane Strieder*, *Franciele*, *Eberton* (fofo), *Paulo Emílio* e a todos que não foram mencionados mais que tenho muito carinho e amizade.

As funcionárias do Laboratório de Histologia da UEM, *Maria Euride Carlos Cancino* e *Maria dos Anjos Moreira Fortunato*, que me ajudaram muito na minha

iniciação científica, e pelo carinho, dedicação e apoio. A todos os amigos laboratório de Histologia e Fisiologia UEM que de alguma forma contribuíram para essa conquista.

Aos funcionários: *Patrícia R. de Campos, Cristiane V. Pinheiro, Luciana M. Silva, Maria Cristina dos S. Fustino, Nilson S. Souza e Joelcimar M. da Silva* pela gentileza, ótimo trabalho e grande apoio prestado. Ao amigos do biotério *Fábio, Renivaldo, Rodrigo e Ricardo* pelo cuidado com os animais, pelas grandes gentilezas e amizade. As funcionárias da histologia *Martinha e Soninha*, pela grande ajuda na histologia desse trabalho. Aos funcionários do bloco didático do Departamento de Anatomia *Carlos, Everton, Adão, Milton, Edson e Giovaldo*, pelo apoio nos PAEs.

À *Rosana Prisco*, pelas análises estatísticas, pela dedicação e disponibilidade em me ajudar sempre, pela sua enorme competência, atenção, boas conversas e amizade.

Ao *Roberto Cabado*, técnico responsável pelo microscópio de confocal de varredura a laser, pelo ótimo trabalho prestado e pelas boas conversas.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* e à *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*, pelas bolsas e ajuda a pesquisa.

Aos Funcionários da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelo auxílio prestado.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho, e para meu crescimento profissional e pessoal.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”.

Charles Chaplin

Muito obrigada!

*A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu
tamanho original.*

Albert Einstein

RESUMO

BOBNA, A. R. M. Efeitos da isquemia/reperfusão-intestinal sobre o receptor P2X₂ e neurônios entéricos do íleo de ratos. 2011. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A isquemia é definida pelo fluxo arterial insuficiente para manter as funções e necessidades teciduais. As principais condições para a isquemia intestinal incluem transplante, trombose mesentérica aguda venosa ou arterial, embolismo e obstrução intestinal. No trato digestório a Isquemia/Reperfusão-intestinal (I/R-i) acarreta alterações morfológicas nos neurônios entéricos. Este projeto teve por objetivo analisar, no sistema nervoso entérico do íleo, os efeitos da I/R-i sobre a expressão do receptor purinérgico P2X₂ e caracterizar estas alterações sobre as diferentes classes neuronais nos plexos mioentéricos e células gliais entéricas, nos períodos de 24 horas e 1 semana de reperfusão. Foram analisados íleo de ratos dos seguintes grupos (n=5 por período): a) submetidos à cirurgia de isquemia com oclusão da artéria mesentérica superior (AMS) por 45 minutos, com pinça vascular, com reperfusão de 24 horas e 1 semana, b) ratos falsos operados, os ratos foram submetidos aos procedimentos da cirurgia, porém sem o pinçamento da AMS e c) animais controle, sem nenhuma intervenção cirúrgica. Os tecidos foram preparados para métodos imunohistoquímicos de duplas marcações do receptor P2X₂ com a Óxido Nítrico Sintase (NOS), a Acetilcolina transferase (ChAT), a calbindina (Calb), a calretinina (Calr), S100 (pan-glial) e do marcador pan-neuronal (anti-HuC/D). As análises qualitativas e quantitativas das contagens das colocalizações, das densidades neuronais e perfis neuronais foram obtidos dos microscópios da fluorescência e de Confocal de Varredura à Laser. Foram feitas análises estatísticas das colocalizações, densidade e perfil neuronal. O presente estudo demonstrou que os neurônios submetidos I/R-i da AMS e Shams, com períodos de 24 horas e 1 semana, respondem de maneira diferenciada. O receptor P2X₂ foi encontrado em todas as classes de neurônios do plexo mioentérico nos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 h e 1 semana. Houve diminuição na colocalização do receptor P2X₂ com a NOS no grupo I/R-i 1 semana e com a ChAT e o anti-HuC/D nos grupos I/R-i 24 h e 1 semana e um aumento com o S100 no Sham e I/R-i 1 semana. A expressão e a densidade do receptor P2X₂ no grupo I/R-i 24 h, estava diminuída, porém aumentada no grupo I/R-i 1 semana. Foi observada uma diminuição da densidade e da estimativa da ChAT e do anti-HuC/D nos grupos I/R-i 24 h e 1 semana. A área do perfil neuronal apresentou um aumento dos neurônios NOS, ChAT, Calb, Dogiel II e Calr no grupo I/R-i 1 semana. Pode-se concluir que a I/R-i induz mudanças na expressão do receptor P2X₂, neurônios entéricos e células gliais entéricas que podem resultar em mudanças na motilidade intestinal.

Palavras-chave: Isquemia/Reperfusão-intestinal. Receptor P2X₂. Plexo Mioentérico. Neurônios entéricos. Código químico.

ABSTRACT

BOBNA, A.R.M. **Effects of intestinal ischemia/reperfusion on P2X₂ receptor and enteric neurons of the rats ileum.** 2011. 138 p. Masters thesis (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Ischemia is defined by insufficient blood flow to maintain the functions and tissue needs. The main conditions for transplantation include intestinal ischemia, acute mesenteric venous thrombosis or arterial embolism and intestinal obstruction. In the digestive tract Ischemia/Reperfusion-intestinal (I/R-i) causes morphological changes in enteric neurons. This project aimed to analyze in ileum enteric nervous system, the effects of I/R-i on the purinergic P2X₂ receptor expression and characterize these changes on different neuronal classes in the myenteric plexus and enteric glial cells in a 24 hour and 1 week of reperfusion. Rats Ileum were analyzed from the following groups (n = 5 per period): a) ischemic group, the superior mesenteric artery (SMA) was occluded for 45 min with an atraumatic vascular clamp and animals were sacrificed 24 hours and 1 week, b) false-operated rats, subjected to surgery procedures, but without clamping of the SMA and c) control animals without any surgical intervention. Neurons of the myenteric plexus were evaluated for immunoreactivity against the P2X₂ receptor, nitric oxide synthase (NOS), choline acetyl transferase (ChAT), calbindin (Calb), calretinin (Calr), pan-glial (S100) and pan-neuronal (anti-HuC/D). The qualitative and quantitative analysis of the counting of colocalization, neuronal density and the profile area of cell body profile were obtained from fluorescence microscopy and confocal scanning laser. Statistical analysis was made of colocalization, density and neuronal profile. The present study show that neurons of I/R-i and Sham groups of 24 hours and 1 week, respond differently. The P2X₂ receptor was in all classes of neurons in the myenteric plexus in CT, Sham and I/R-i groups of 24 h and 1 week. There was a decrease in colocalization of P2X₂ receptor with NOS in I/R-i 1 week group, the ChAT and the anti-HuC/D in I/R-i 24 hours and one week groups, and an increase in S100 in Sham and I/R-i 1 week groups. The expression and density of P2X₂ receptor was decreased in I/R-i 24 h group, but increased in group I/R-i 1 week. Was a decrease in the density and the estimative of ChAT and anti-HuC/D in I/R-i 24 hours 1 week groups. The neuronal profile area showed an increase in ChAT, Calb, Dogiel Type II and Calr in I/R-i 1 week group, which may be a cell death process. The present study demonstrated that I/R-i induces changes in expression of the P2X₂ receptor, enteric neurons and enteric glial cells that can result in changes in intestinal motility.

Key Words: Intestinal Ischemia/Reperfusion. P2X₂ Receptor. Myenteric Plexus. Enteric Neurons. Chemical Code.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a. - Artéria

ACh - Acetilcolina

ADP - Adenosina difosfato

AMP - Adenosina monofosfato

AMS - Artéria mesentérica superior

AMI - Artéria mesentérica inferior

ATP - Adenosina trifosfato

Ca²⁺ - Cálcio

Calb - Calbindina

Calb-ir - Neurônios imunorreativos à calbindina

Calr - Calretinina

Calr-ir - Neurônios imunorreativos à calretinina

ChAT - Acetilcolina transferase

ChAT-ir - Neurônios imunorreativos à acetilcolina transferase

CT - Animais do grupo controle

DII - Doença Inflamatória Intestinal

DMáx - Diâmetro máximo

Dmín - Diâmetro mínimo

DNA - Ácido desoxirribonucléico

GABA - Ácido Gama Aminobutírico

GFAP - Proteína Glial Fibrilar Ácida

GNDF - Fator Neurotrófico Derivado de Glia

Hu-ir - Neurônios imunorreativos ao pan neuronal anti-HuC/D

I/R-i - Isquemia intestinal com reperfusão

ICC - Células intersticiais de Cajal

IGLEs - Terminações nervosas laminares intra-ganglionares

IPANs - Neurônios aferentes intrínsecos primários

K⁺ - Potássio

mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro

Na⁺ - Sódio

NaCl - Cloreto de sódio

NADH- diaforase - Nicotinamida adenina dinucleotídeo - diaforase

NANC - Neurônios não-colinérgicos e não-adrenérgicos

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

NPY - Neuropeptídeo Y

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

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

PBS - Tampão Salina Fosfato

S100 - Marcador de células gliais entéricas

Sham - Animal falso operado

SNA - Sistema Nervoso Autônomo

SNC - Sistema Nervoso Central

SNE - Sistema Nervoso Entérico

SOM - Somatostatina

TNF- α Fator de necrose tumoral

VIP - Peptídeo Intestinal Vasoativo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos anticorpos primários.....	44
Tabela 2 - Anticorpos secundários usados.....	44
Tabela 3 - Peso corporal (g) antes da cirurgia e após a reperusão intestinal e estimativa da área do intestino delgado dos grupos CT, Sham e I/R-i 24 h e 1 semana.....	50
Tabela 4 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X₂ e a NOS no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....	64
Tabela 5 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X₂ e a ChAT no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....	65
Tabela 6 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X₂ e a Calbindina no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....	66
Tabela 7 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X₂ e a Calretinina no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....	66
Tabela 8 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X₂ e ao anti-HuC/D no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....	67
Tabela 9 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao anti-HuC/D e ao S100 no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....	68

Tabela 10 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos HuC/D e a NOS, no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....69

Tabela 11 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao anti HuC/D e ao ChAT no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....69

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação do sistema nervoso entérico do intestino delgado.....	29
Figura 2 - Tipos de neurônios entéricos do intestino delgado de cobaia.....	30
Figura 3 - Distribuição das células gliais entéricas no SNE.....	33
Figura 4 - Representação da vascularização do intestino delgado de rato.....	41
Figura 5 - Procedimento Cirúrgico de oclusão da AMS de rato Wistar (A-C). (A) Laparotomia mediana com exposição do intestino delgado; (B) Local do pinçamento da AMS; (C) Aspecto do intestino delgado durante a oclusão da AMS. A seta simples indica a área hemorrágica e seta vazada demonstra o local do pinçamento da artéria; * Intestino Grosso.....	43
Figura 6 - Aspecto geral do plexo mioentérico do íleo de ratos Sham 24 h, I/R-i 24 h, Sham 1 Sem e I/R-i 1 Sem (A-P). Neurônios imunorreativos à NOS (A-D) , à ChAT (E-H), à Calb (I-L) e à Calr (M-P). Setas simples indicam neurônios colocalizados com o receptor P2X ₂ (Barra: 20 µm).....	52
Figura 7 - Neurônios imunorreativos à NOS e ao receptor P2X ₂ (A-D'') no plexo mioentérico, do íleo de ratos Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização dos neurônios NOS-ir e P2X ₂ -ir. Setas vazadas demonstram neurônios NOS-ir edemaciados no grupo I/R-i 1 Sem (Barra:10 µm).....	53
Figura 8 - Neurônios imunorreativos à ChAT e ao receptor P2X ₂ (A-D'') no plexo mioentérico do íleo de ratos Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização dos neurônios ChAT-ir e P2X ₂ -ir. Setas vazadas demonstram neurônios ChAT-ir edemaciados no grupo I/R-i 1 Sem (Barra: 10 µm).....	54

Figura 9 - Neurônios imunorreativos à Calb e ao receptor P2X₂ (A-D'') no plexo mioentérico do íleo de ratos Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização dos neurônios Calb-ir e P2X₂-ir. Setas vazadas demonstram neurônios Calb-ir edemaciados com morfologia Dogiel Tipo II (Barra: 10 µm).....56

Figura 10 - Neurônios imunorreativos à Calr e ao receptor P2X₂ (A-D'') no plexo mioentérico do íleo de ratos Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização dos neurônios Calr-ir e P2X₂-ir (Barra: 10 µm).....57

Figura 11 - Neurônios imunorreativos ao anti-HuC/D (Hu) e a NOS (A-D'') no plexo mioentérico, do íleo de ratos Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização dos neurônios Hu-ir e NOS-ir (Barra: 10 µm).....58

Figura 12 - Neurônios imunorreativos ao anti-HuC/D e a ChAT (A-D'') no plexo mioentérico do íleo de ratos: Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização dos neurônios Hu-ir e ChAT-ir (Barra: 10 µm).....59

Figura 13 - Neurônios imunorreativos ao anti-HuC/D (Hu) e ao receptor P2X₂ (A-D'') no plexo mioentérico do íleo de ratos Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização dos neurônios Hu-ir e P2X₂-ir (Barra: 10 µm).....60

Figura 14 - Células gliais entéricas imunorreativas ao receptor P2X₂ e a S100 (A-D'') no plexo mioentérico do íleo de ratos: Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização das células gliais com receptor P2X₂-ir; *indicam a localização dos neurônios entéricos; Setas vazadas indicam células gliais imunorreativas somente ao S100 (Barra: 10 µm).....61

Figura 15 - Fotomicrografia da parede do íleo dos grupos Sham (A, D, G, J), I/R-i 24 h (B, E, H, K) e I/R-i 1 semana (C, F, I, L). Aspecto geral da parede intestinal (A-C); Camadas da parede intestinal (D-F); Detalhe das vilosidades (G-I); Detalhe do plexo mioentérico (J-L); (V) Vilosidades, (GM) Glândulas da Mucosa, (SM) Plexo Submucoso, (PM) Plexo Mioentérico; Setas indicam neurônios entéricos. H.E. A-C Barra: 100 μ m; D-F Barra: 50 μ m; G-I Barra: 20 μ m; J-L Barra: 10 μ m.....63

Figura 16 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios P2X₂-ir no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana ([#]comparado ao CT; ^{β} comparado ao Sham 24 h; ^{π} comparado ao Sham 1 Sem; ^{γ} diferença entre os grupos de 24 h e 1 semana; ^{#, β , π} $p < 0,05$ e ^{γ} $p < 0,01$).....71

Figura 17 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios NOS-ir no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....72

Figura 18 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios ChAT-ir no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 h e 1 semana (^{β} comparado ao Sham 24 h; ^{π} comparado ao Sham 1 semana; ^{β , π} $p < 0,01$).....73

Figura 19 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios Calb-ir no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....74

Figura 20 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios Calb-ir com morfologia Dogiel Tipo I, no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....75

Figura 21 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios Calb-ir com morfologia Dogiel Tipo II, no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....76

Figura 22 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios Calr-ir no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana (^{γ} $p < 0,05$ diferença entre os grupos 24 h e 1 semana).....77

Figura 23 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios anti-HuC/D-ir no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas (^βcomparado ao Sham 24 h; ^πcomparado ao Sham 1 semana; ^{β, π} $p<0,05$).....78

Figura 24 - Densidade de células gliais S100-ir no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana ([#]comparado ao CT; ^βcomparado ao Sham 24 h; ^πcomparado ao respectivo Sham 1 semana; ^{γ, λ}diferença entre 1 semana e 24 h; ^{#, β, π, λ} $p<0,05$; ^γ $p<0,01$).....80

Figura 25 - Perfil de neurônios NOS-ir: (A) Área (μm^2); (B) DMáx (μm); e (C) DMín (μm) nos grupos CT, Sham e I/R-i 24 h e 1 semana ([#]comparado ao CT; ^β comparado ao Sham 24 h; ^π comparado ao Sham 1 semana; ^{#, β, π} $p<0,05$).....82

Figura 26 - Perfil de neurônios ChAT-ir: (A) Área (μm^2); (B) DMáx (μm); e (C) DMín (μm) nos grupos CT, Sham e I/R-i 24 h e 1 semana (^π comparado ao Sham 1 semana; ^α comparado ao I/R-i 24 h; ^{π, α} $p<0,05$).....83

Figura 27 - Perfil de neurônios Calb-ir: (A) Área (μm^2); (B) DMáx (μm); e (C) DMín (μm) nos grupos CT, Sham e I/R-i 24 h e 1 semana ([#]comparado ao CT; ^γdiferença entre o grupo de 1 semana e 24 h; ^{#, γ} $p<0,05$).....86

Figura 28 - Distribuição do perfil de neurônios Calb-ir com morfologia Dogiel I: (A) Área (μm^2); (B) DMáx (μm); e (C) DMín (μm) nos grupos CT, Sham e I/R-i 24 h e 1 semana.....87

Figura 29 - Perfil de neurônios Calb-ir com morfologia Dogiel II: (A) Área (μm^2); (B) DMáx (μm); e (C) DMín (μm) nos grupos CT, Sham e I/R-i 24 h e 1 semana ([#]comparado ao CT; ^βcomparado ao Sham 24 h; ^πcomparado ao Sham 1 semana; ^α comparado ao I/R-i 24 h; ^{#, β, π, α} $p<0,05$).....88

Figura 30 - Perfil de neurônios Calr-ir: Área (μm^2) (A), (B) DMáx (μm); e (C) DMín (μm) dos neurônios imunorreativos a Calretinina nos grupos CT, Sham e I/R-i 24 horas e 1

semana ([#]comparado ao CT; ^γdiferença entre o grupo de 1 semana e 24 h; [#],
^γ $p < 0,05$).....90

Figura 31 - Histograma de distribuição de frequências das áreas (μm^2) (A), DMáx. (μm) (B) e Dmín (μm) (C) dos neurônios mioentéricos imunorreativos à NOS no íleo de ratos controle, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....92

Figura 32 - Histograma de distribuição de frequências das áreas (μm^2) (A), DMáx. (μm) (B) e Dmín (μm) (C) dos neurônios mioentéricos imunorreativos à ChAT no íleo de ratos controle, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....94

Figura 33 - Histograma de distribuição de frequências das áreas (μm^2) (A), DMáx. (μm) (B) e Dmín (μm) (C) dos neurônios mioentéricos imunorreativos à Calb no íleo de ratos controle, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....96

Figura 34 - Histograma de distribuição de frequências das áreas (μm^2) (A), DMáx. (μm) (B) e Dmín (μm) (C) dos neurônios mioentéricos imunorreativos à Calb com morfologia Dogiel Tipo I no íleo de ratos controle, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....98

Figura 35 - Histograma de distribuição de frequências das áreas (μm^2) (A), DMáx. (μm) (B) e Dmín (μm) (C) dos neurônios mioentéricos imunorreativos à Calb com morfologia Dogiel Tipo II no íleo de ratos controle, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....99

Figura 36 - Histograma de distribuição de frequências das áreas (μm^2) (A), DMáx. (μm) (B) e Dmín (μm) (C) dos neurônios mioentéricos imunorreativos à Calr no íleo de ratos controle, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.....101

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
1.1 Isquemia e Reperusão Intestinal.....	25
1.2 Sistema Nervoso Entérico.....	28
<i>1.2.1 Tipos de neurônios entéricos.....</i>	<i>30</i>
<i>1.2.2 Células Gliais Entéricas.....</i>	<i>32</i>
1.3 Receptores Purinérgicos P2X e Sistema Nervoso Entérico.....	34
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo Geral.....	38
2.2 Objetivos Específicos.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 Animais e Grupos Experimentais.....	40
3.2 Procedimentos Cirúrgicos.....	40
3.3 Coleta e Preparação do Material para Imunohistoquímica.....	44
3.4 Método de Dupla Marcação do Receptor P2X₂ com a NOS, a ChAT, a Calb, a Calr, Anti-HuC/D e S100	44
3.5 Métodos para Análise Qualitativas das Duplas Marcações.....	45
3.6 Métodos para Análise Quantitativa dos Neurônios Entéricos e Células Gliais Entéricas.	46
<i>3.6.1 Identificação das Classes Neurais.....</i>	<i>46</i>
<i>3.6.2 Método para obtenção da Densidade, Estimativa e do Perfil Neuronal.....</i>	<i>46</i>
3.7 Método para Análise Morfológica pela Histologia.....	47
3.8 Análise Estatística.....	48
4 RESULTADOS.....	50
4.1 Peso dos animais e Área do Intestino Delgado.....	50
4.2 Efeitos morfológicos da I/R-i sobre o receptor P2X₂, nas classes de neurônios e células gliais entéricas.....	50
4.3 Análise qualitativa Histológica.....	62
4.4 Análise quantitativa da isquemia com reperusão intestinal sobre as classes de neurônios entéricos.....	64
<i>4.4.1 Colocalização do receptor P2X₂ com as classes neuronais e células gliais entéricas.....</i>	<i>64</i>

<i>4.4.2 Análise da densidade e estimativa de neurônios e células gliais entéricas.....</i>	<i>70</i>
<i>4.4.3 Análise do perfil neuronal.....</i>	<i>81</i>
<i>4.4.4 Análise da distribuição de frequência do perfil neuronal.....</i>	<i>91</i>
5 DISCUSSÃO.....	102
5.1 Considerações sobre o modelo de Isquemia/Reperusão intestinal.....	103
5.2 Considerações sobre o Código Químico, Receptor P2X₂ e sua Colocalização no SNE.....	104
5.3 Densidade Neuronal.....	112
5.4 Perfil Neuronal.....	117
5.5 Considerações finais.....	120
6 CONCLUSÕES.....	120
REFERÊNCIAS.....	124

1.1 Isquemia e Reperusão Intestinal

A isquemia é definida pelo fluxo arterial insuficiente para manter as funções e necessidades teciduais, que pode ser total ou parcial. Quando classificada como total, ocorre uma interrupção no suprimento de oxigênio e nutrientes para uma determinada área, em decorrência de uma deficiência no fornecimento de sangue devido à oclusão arterial, venosa ou da microcirculação intestinal, que pode acarretar em morte tecidual (KEIGHLEY, 1998; SCANNEL et al., 1995). Quando a isquemia é parcial, mantém a viabilidade celular, porém com o risco de evoluir para a morte celular dependendo do tipo de tecido lesado e do tempo da isquemia (D'ALECY; ZELENOCK, 1990).

A isquemia aguda mesentérica é uma condição de grande emergência vascular sendo fatal na população mundial em 60% a 80% dos casos (BRADBURY et al., 1995; HEYS; BRITTENDEN; CROFTS, 1993; LOCK, 2001; SITGES-SERRA et al., 1988; STONEY; CUNNINGHAM, 1993). A isquemia mesentérica compreende um grupo de processos fisiopatológicos que levam à necrose intestinal. No entanto, há dificuldades em reconhecer a condição antes do infarto intestinal ocorrer (CLARK; GERWITZ, 1998; HEYS; BRITTENDEN; CROFTS, 1993; KALEYA; BOLEY, 1992).

As principais condições para a isquemia intestinal incluem: transplante, trombose mesentérica aguda venosa ou arterial, embolismo e obstrução intestinal (HAGLUND; BERGQVIST, 1999; MASSBERG; MESSMER, 1998). Doenças intestinais inflamatórias frequentemente podem levar a episódios de isquemia, como a Doença de Crohn e a colite ulcerativa (HAGLUND; BERGQVIST, 1999; THORNTON; SOLOMON, 2002). Além disso, a isquemia e reperusão intestinal (I/R-i) de vasos intestinais são comuns em pacientes hospitalizados, especialmente aqueles que estão nas unidades de terapias intensivas (OLDENBURG et al., 2004).

A apresentação clínica é inespecífica na maioria dos casos e pode ser caracterizada por uma discrepância inicial entre dor abdominal intensa e mínimos sintomas clínicos. O exame físico não é uma análise confiável para diferenciar entre isquemia e infarto intestinal, pois outras complicações como obstrução, peritonite, pancreatite e sangramento gastrointestinal também podem mascarar os sinais iniciais e os sintomas da isquemia aguda mesentérica (BERNEY et al., 1998; CLARK; GERWITZ, 1998; KALEYA; BOLEY, 1992; WILCOX et al., 1995).

As artérias mais comprometidas por obstrução são do tronco celíaco, a. mesentérica superior (AMS) e a. mesentérica inferior (AMI) (SIMI, 2002). No entanto, as embolias arteriais são mais comumente localizadas na AMS, devido ao amplo ângulo de sua origem e seu curso paralelo à aorta. Êmbolos maiores geralmente obstruem dentro dos 3-8 cm distal à origem da AMS. Em contraste, a trombose aguda mesentérica geralmente ocorre no primeiro local de ramificação da AMS (ECKSTEIN, 2003).

A etiologia da obstrução arterial na isquemia mesentérica aguda pode ser por embolia, trombose, baixo fluxo sanguíneo, compressão extrínseca, vasoespasm induzido por drogas vasoativas. Por outro lado, a oclusão venosa pode ser causada, principalmente, por trombose venosa, processos infecciosos e inflamatórios e alteração da coagulação (RIBEIRO; YOSHIDA, 2005).

A isquemia arterial inicia-se com alterações em tecidos por bloqueio do suprimento de oxigênio com alteração no metabolismo energético aeróbico. Estes fatos determinam a depleção de ATP intracelular e aumento do ATP extracelular com distúrbio na homeostase celular. Durante o processo da isquemia, ocorre acúmulo de metabólitos que direta ou indiretamente levam a lesão celular, estes eventos podem resultar em alterações progressivas celulares culminando com a necrose e/ou apoptose (CERQUEIRA; HUSSNI; YOSHIDA, 2005; GRACE, 2004).

Estudos mostram que a lesão tecidual pode ser agravada dependendo do tempo e da intensidade da isquemia e, da reperfusão quando o oxigênio é restabelecido para os tecidos (McCORD, 1985). Essa restauração no fluxo de sangue após a isquemia (reperfusão) pode aumentar as lesões no tecido ao repor esse oxigênio, pois estimula a produção de radicais livres que promove ou acelera a necrose (BODWELL, 1989; SAHNOUN; JAMOUSI; ZEGHAL, 1998; VAJDOVICH, 2008).

Morfologicamente, a necrose diferencia-se da apoptose pois na necrose a célula intumescce e a membrana plasmática colapsa e a célula é lesada. Durante a apoptose a célula encolhe, seu núcleo condensa-se e há uma desintegração e forma-se um “corpo apoptótico”. Na apoptose são observados aspectos bioquímicos como a ativação de proteases (caspases) e a fragmentação oligonucleossomal do DNA, na necrose estes eventos usualmente não estão presentes. Vários agentes podem induzir a necrose, no entanto, uma condição clássica é a isquemia que leva a uma depleção drástica de oxigênio, glicose e outros fatores tróficos e, evoca uma massiva morte de células endoteliais e/ou células não proliferativas, como por

exemplo, em neurônios (HUPPERTZ; FRANK; KAUFMANN, 1999; PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003).

Além disso, a isquemia/reperfusão intestinal (I/R-i) no intestino delgado provoca a ruptura da barreira mucosa, translocação bacteriana e ativação de respostas inflamatórias, bem como distúrbios de equilíbrio hidroeletrolítico e ácido-alcalino, que se manifestam em órgãos distantes (JOÃO et al., 2004; TURNAGE; GUICE; OLDHAM, 1994). O processo de translocação envolve o contato inicial da bactéria com a parede do intestino, a única que pode precipitar a produção de citocinas e uma resposta inflamatória subsequente. Estudos com uso de bactérias marcadas mostraram que a translocação em ratos foi mais evidente após 24 horas de reperfusão mesentérica, indicando que o tempo é um fator significativo para translocação (JOÃO et al., 2004; TURNAGE; GUICE; OLDHAM, 1994).

Outros estudos mostram que lesões isquêmicas resultam no edemaciamento de células endoteliais, no fechamento dos capilares e redução prolongada do fluxo sanguíneo intestinal (HAGLUND; BERGQVIST, 1999; TAKADA et al., 1998).

Lindeström e Ekblad (2004) analisaram mudanças estruturais nos neurônios entéricos do íleo de ratos submetidos à I/R-i com reperfusão de 1, 24, e 72 horas e 1, 2, 4, e 10 semanas. Nesse estudo foi observado alterações nos números de neurônios acidófilos, assim como o processo de morte celular nos neurônios dos plexos submucoso e mioentérico, porém não foram estudadas as classes dos neurônios afetados e seu código químico.

Os autores Piao et al. (1999) verificaram pelas microscopia óptica e eletrônica alterações nos neurônios mioentéricos de ratos com isquemia de 4 horas, porém não foi determinada a classe neuronal.

Calcina et al. (2005) verificaram que na reperfusão de 24 horas após isquemia, havia um aumento significativo no número de neurônios mioentéricos imunorreativos ao peptídeo intestinal vasoativo (VIP-ir) e à óxido nítrico sintase (NOS-ir). Rivera et al. (2009), demonstraram em cobaias, que após 24 horas de I/R-i das aa. ileais havia edemaciamento dos neurônios NOS-ir do plexo mioentérico e uma diminuição dos neurônios Calb-ir.

Resultados do nosso laboratório têm demonstrado que a isquemia da AMS com 4 horas de reperfusão acarreta alterações morfológicas nos neurônios do plexo mioentérico que expressam o receptor P2X₂, NOS, ChAT e Calb (PAULINO et al., 2011). Resultados de isquemia de ramos da a. ileal em ratos demonstraram, com diferentes períodos de reperfusão, alterações nos neurônios que expressam receptor P2X₇, NOS e calbindina (PALOMBIT, 2010).

Milano et al. (2008) observaram que a I/R-i aumentava a expressão do mRNA dos receptores purinérgicos P2X₇ e P2Y₂ em diferentes órgãos, como os rins e pulmões. No entanto, este estudo não observou alteração com diferença significativa no intestino. Isto pode ter ocorrido porque os autores utilizaram todo o intestino delgado, sem separá-lo em regiões. Além disso, não foram analisadas a presença dos receptores nas diversas camadas da parede intestinal, como camadas musculares, vilosidades, plexos submucoso e mioentérico.

1.2 Sistema Nervoso Entérico

O sistema nervoso entérico (SNE) está contido nas paredes do trato do tubo digestório, pâncreas e sistema biliar, e consiste de dois plexos ganglionares, o plexo mioentérico e o plexo submucoso (FURNESS; COSTA, 1987; FURNESS et al., 2006). Esses plexos contêm componentes neurais, como neurônios sensoriais, interneurônios e neurônios motores que são responsáveis pelo controle de sistemas motores gastrintestinais. Dentro do plexo mioentérico, o circuito neural é predominantemente envolvido na regulação do reflexo das atividades contráteis da musculatura externa, enquanto os neurônios motores do plexo submucoso regulam a atividades secretomotora e vasomotora da mucosa (LOMAX; FURNESS, 2000).

O plexo mioentérico (de Auerbach) localiza-se entre a camada longitudinal externa e a camada do músculo circular, presente por todo trato digestório do esôfago ao reto (Fig. 1) (AUERBACH, 1864¹ apud FURNESS, 2006; SCHABADASH, 1930a², 1930b³ apud FURNESS, 2006; LI, 1940⁴ apud FURNESS, 2006). No plexo do músculo circular, existem pequenas fibras nervosas encontradas ao longo das fibras musculares. Estes ramos nervosos conectam-se com componentes preliminares e secundários do plexo mioentérico e do plexo muscular profundo no intestino delgado (FURNESS; COSTA, 1987; FURNESS, 2006).

O plexo submucoso é proeminente no intestino delgado e grosso e 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 (Fig. 1). Suas malhas são menores que o plexo mioentérico, suas fibras interconectadas são mais finas e o gânglio é menor. Este

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

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

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

⁴ 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.

plexo localiza-se ao longo do intestino, sendo que um plexo fica próximo do músculo e o outro próximo da mucosa (HENLE, 1871⁵ apud FURNESS, 2006; GONIAEW, 1875⁶ apud FURNESS, 2006).

Estudos histológicos e fisiológicos do plexo submucoso mostram seu envolvimento no controle da atividade contrátil da musculatura da mucosa e da musculatura lisa dentro das vilosidades, na coordenação da motilidade intestinal e no controle de eletrólitos e íons e no transporte através da barreira epitelial (HOYLE; BURNSTOCK, 1989).

Figura 1 - Representação do sistema nervoso entérico do intestino delgado.
FONTE: Adaptado de Furness (2006).

Essencialmente, os plexos entéricos seguem um padrão ao longo do trato digestório tubular, porém diferenças quanto à densidade e ao tamanho dos neurônios, bem como a forma dos gânglios, podem ser encontrados no mesmo segmento do trato digestório dos animais de mesma espécie e com diferentes idades (MATINI et al., 1997; MCKEOWN; CHOW; YOUNG, 2001) ou submetidos a condições experimentais, como a inflamação (BOYER et al., 2005; DE GIORGIO et al., 2004), desnutrição (CASTELUCCI et al., 2002a; GOMES et al., 2006; GREGGIO et al., 2010) e a obesidade (MIZUNO, 2010).

⁵ HENLE, J. **Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen**. Nervenlehre: F Vieweg und Sohn. Braunschweig, 1871.

⁶ GONIAEW, K. Die Nerven des Nahrungsschlauches. **Arch. Mikr. Anat.**, v. 11, p. 479-496, 1875.

1.2.1 Tipos de neurônios entéricos

Segundo Furness (2000), pode-se identificar dezessete tipos de neurônios entéricos, quatorze destes encontrados no intestino delgado de cobaia (Fig. 2). Esses neurônios são classificados quanto sua forma, suas propriedades fisiológicas e farmacológicas, diferenças quanto ao seu código químico, estruturas que inervam e conexões que recebem (FURNESS, 2006). Dependendo da região do trato gastrointestinal onde se situam, os neurônios entéricos podem controlar a motilidade, o transporte de fluidos da mucosa e do fluxo sanguíneo local (FURNESS, 2000).

Figura 2 - Tipos de neurônios entéricos do intestino delgado de cobaia. (ChAT) Acetilcolina transferase, (NOS) Óxido Nítrico Sintase, (Calb) Calbindina, (Calr) Calretinina, (VIP) Peptídeo Intestinal Vasoativo, (NPY) Neuropeptídeo Y.
FONTE: Adaptado de Furness (2006).

De acordo com essas propriedades, os neurônios entéricos podem ser classificados em: neurônios motores, interneurônios, neurônios aferentes intrínsecos primários, neurônios secretomotores e vasomotores (Fig. 2). Os neurônios motores são divididos em: *neurônios excitatórios* dos músculos da camada circular e longitudinal, que possuem em seu código químico, entre outras substâncias, ChAT; *neurônios inibitórios*, que possuem em seu código químico a NOS e VIP, e *neurônios secretomotores/vasodilatadores* que são encontrados no plexo submucoso e podem ser colinérgicos ou não colinérgicos, tendo o primeiro em seu código químico a calretinina, e o segundo parece mediar a maioria das respostas reflexas

locais utilizando VIP ou um peptídeo relacionado, como seu transmissor primário (FURNESS, 2006). Os neurônios motores e interneurônios apresentam morfologia de neurônios Dogiel Tipo I, ou seja, apresentam muitos dendritos na sua superfície (FURNESS; COSTA, 1987; FURNESS, 2000).

Os *interneurônios* são colinérgicos e possuem a enzima ChAT, ou o ligante de cálcio, a calretinina. São identificados por neurônios com projeções em direção oral (ascendente) e três tipos de neurônios com direção anal (descendentes) (Fig. 2). Os interneurônios ascendentes possuem em seu código químico, entre outras substâncias a calretinina, e os interneurônios descendentes possuem a NOS, a somatostina (SOM), o NPY, entre outras (FURNESS, 2006).

Os *neurônios aferentes intrínsecos primários* (IPANs) são neurônios sensoriais, encontrados nos plexos mioentérico e submucoso, possuem morfologia Dogiel tipo II, ou seja, neurônios grandes com superfície lisa. Os IPANs possuem em seu código químico, entre outras substâncias, a ChAT e a Calb (Fig. 2) (FURNESS, 2006).

Estudos demonstram que a acetilcolina é o principal neurotransmissor no trato gastrointestinal, pois está envolvido na regulação neural da motilidade e secreção (AMBACHE, 1951; KOSTERLITZ; LEES, 1964). Apesar de a acetilcolina desempenhar um papel importante como um neurotransmissor dentro do trato gastrointestinal, sua demonstração anatômica em neurônios colinérgicos no sistema nervoso entérico tem sido difícil. A acetilcolina é sintetizada no citoplasma dos neurônios a partir de colina e Acetil CoA pela enzima acetilcolina transferase (ChAT) e é transportada em vesículas de armazenamento por uma proteína chamada transportador de acetilcolina vesicular (VACHT) (ERICKSON; VAROQUI; USDIN et al., 1995). Dessa forma a enzima precursora ChAT tem sido mais utilizada para identificar estes neurônios.

O óxido nítrico (NO) no trato digestório atua como um mediador inibitório não-adrenérgico e não-colinérgico (NANC) para regular a motilidade intestinal, o reflexo peristáltico, eletrólitos da mucosa e secreções hormonais, e a permeabilidade epitelial (DANIEL et al., 1994; FUJIMIYA; YAMAMOTO; KUWAHARA, 1998; GRIDER, 1993; JIN et al., 1996; KUBES, 1992).

A Calb desempenha um papel primordial na regulação da concentração intracelular do Ca^{2+} e é expressa em populações específicas do sistema nervoso central (GOODMAN et al., 1993; YENARI et al., 2001) e SNE (CREMA; FRIGO; LECCHINI, 1970; FURNESS et al., 1995; LANGLEY; MAGNUS, 1905).

A Calr, assim como a Calb, é uma proteína ligante de cálcio, que tem sido utilizada como um marcador de diferentes classes funcionais de neurônios, principalmente nos interneurônios. Essa proteína não é específica de neurônios da mesma classe, está distribuída em neurônios de diferentes regiões e espécies (BELAI; BURNSTOCK, 1999; SANG; YOUNG, 1996).

Estudos demonstraram que a proteína ligante de Ca^{2+} apresenta um efeito de proteção em neurônios em processos de isquemia ou de excitotoxicidade, sendo que durante esses processos a proteína é expressa pelos neurônios e também pelos astrócitos (BAIMBRIDGE; CELIO, 1992; GOODMAN et al., 1993; TOYOSHIMA et al., 1996; YENARI et al., 2001).

Dessa forma, neste trabalho foram utilizados os anticorpos que marcam a ChAT para os neurônios excitatórios; a NOS que marca a enzima precursora do neurotransmissor NO para neurônios inibitórios; a Calr que se encontram nos interneurônios; a Calb que é uma proteína presente em neurônios sensoriais e o anti-HuC/D que é uma proteína presente em todos os neurônios, é utilizado como pan-neuronal.

1.2.2 Células Gliais Entéricas

Nos gânglios nervosos do trato gastrintestinal são encontradas as células gliais entéricas. Estes gânglios aparecem como uma estrutura compacta, circundada por uma membrana e isolada de tecido conjuntivo, onde todos os espaços são ocupados por neurônios e estruturas gliais. Essas células estão conectadas por junções ‘gap’, que dão a impressão de um entrelaçamento íntimo e complexo de neurônios e células gliais (GABELLA, 1970).

As células gliais, devido a sua proximidade com os neurônios entéricos, tem por função dar suporte a esses neurônios (Fig. 3). Recentes estudos têm demonstrado que as células gliais também tem um importante papel na homeostase neuronal, na função imune e da neurotransmissão, na motilidade gastrintestinal e em processos inflamatórios. Além disso, as células gliais entéricas se distribuem nos gânglios entéricos de maneira que um déficit de sua função poderia afetar o desenvolvimento dessa arquitetura neuronal e a coordenação da sua função (BASSOTTI et al., 2007a; 2007b; RÜHL, 2005).

Figura 3 - Distribuição das células gliais entéricas no SNE.
 FONTE: Adaptado de Bassoti (2007).

A resposta do sistema nervoso a várias lesões resulta na ativação das células gliais (ENG, 1988; LOPACHIN; ASCHNER, 1993; O'CALLAGHAN, 1993). Essa ativação tem sido sugerida como um mecanismo de sinalização precoce, responsáveis pela degeneração neuronal subsequente (GIULIAN et al., 1994). Estudos têm demonstrado que as células gliais entéricas podem ter um papel em processos inflamatórios, como na doença de Crohn, pela sua interação com linfócitos que respondem ativamente à inflamação atraindo células do sistema imunológico (CORNET, 2001; GEBOES; COLLINS, 1998; HIRATA, 1986; KORETZ, 1987; RÜHL, 2001).

Estudos destacam também a possibilidade de que assim como os astrócitos do sistema nervoso central, as células gliais, são participantes ativas na fisiologia sináptica, pois expressam receptores para neurotransmissores, enzimas biossintéticas, transportadores de recaptadores e degradação de enzimas de neurotransmissores e liberação *in vitro* de neurotransmissores (AGULHON; PETRAVICZ; MC MULLEN, 2008; BRAUN; SEVIGNY; ROBSON, 2004; JESSEN; MIRSKY, 1983; KIMBALL; MULHOLLAND, 1996; RUHL, 2005; VANDERWINDEN; TIMMERMANS; SCHIFFMANN, 2003; ZHANG; SEGURA; LIN, 2003).

Para a identificação das células gliais utiliza-se frequentemente métodos imunohistoquímicos, como a marcação de células pela expressão da vimentina e GFAP (JESSEN; MIRSKY, 1980, 1983). Outro marcador, que tem sido utilizado com mais êxito, é a proteína S100, que é encontrada exclusivamente nesse tipo de célula. Essa proteína regula a estrutura e função do citoesqueleto e a homeostase do cálcio no citoplasma das células gliais (FERRI et al., 1982; HEIZMANN, 2002; KRAMMER et al., 1994).

Com relação à marcação de receptores purinérgicos nas células gliais entéricas, foram observadas a presença de receptores purinérgicos P2X₇ e P2Y₄, em condições normais das células gliais entéricas do intestino delgado e grosso de ratos e cobaias (GULBRANSEN; SHARKEY, 2009; VANDERWINDEN; TIMMERMANS; SCHIFFMANN, 2003; VAN NASSAUW et al., 2003).

1.3 Receptores Purinérgicos P2X e Sistema Nervoso Entérico

Indício da existência da sinalização purinérgica foi primeiramente publicada por Drury e Szent-Györgyi (1929)⁷ apud Burnstock (2007), onde foram descritas as ações potentes de compostos adenina. Mais tarde, Burnstock (1972) introduziu o termo purinérgico, quando verificou que o ATP era responsável pela transmissão não-adrenérgica e não-colinérgica no intestino e bexiga. Inicialmente esse conceito de sinalização purinérgica encontrou resistência no meio científico, devido o ATP ser reconhecido primeiramente por seu importante papel intracelular em muitos processos bioquímicos, e a idéia de que um composto simples agindo como um mensageiro extracelular era considerado improvável (BURNSTOCK, 2007).

Baseado nesse conceito de neurotransmissão purinérgica, Burnstock (1976), propôs ações potentes do ATP extracelular sobre os receptores, que chamou de receptores purinérgicos, presentes nas membranas de diferentes tipos de células. Posteriormente, estudos farmacológicos definiram uma primeira divisão dos receptores purinérgicos em P1 e P2 (BURNSTOCK, 1978). Mais tarde, Abbrachio e Burnstock (1998), baseados em estrutura molecular e mecanismos de transdução, propuseram que os receptores purinérgicos deveriam pertencer a duas grandes famílias: a P2X, receptores ligados a canais iônicos; e o P2Y, receptores acoplados à proteína G.

⁷ DRURY, A. N.; SZENT-GYCRGYI, A. The hysiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. **J. Physiol.**, v. 68, p. 213-237, 1929.

Atualmente essa nomenclatura tem sido amplamente adotada, e sete subtipos de P2X têm sido reconhecidos (P2X₍₁₋₇₎), assim como oito subtipos de P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄) (ABBRACHIO et al., 2009; BURNSTOCK, 2007).

Os receptores P2X estão presentes na maioria dos neurônios do plexo mioentérico de cobaias, onde o ATP despolariza rapidamente cerca de 70 a 90% desses neurônios (BARAJAS-LÓPEZ et al, 1996; ZHOU; GALLIGAN, 1996). Após essa despolarização, os receptores P2X acoplados a canais iônicos medeiam rapidamente (dentro de 10 ms) e seletivamente a permeabilidade para cátions (Na⁺, K⁺ e Ca²⁺) (NORTH; SURPRENANT, 2000).

Por meio de drogas agonistas e antagonistas, aplicadas em partes selecionadas dos circuitos entéricos nervosos, Bian, Bertrand e Bornstein (2000) e Spencer, Walsh e Smith, (2000) demonstraram que os receptores purinérgicos estão envolvidos nas sinapses entre interneurônios descendentes e neurônios motores, e na transmissão de neurônios motores ascendentes (excitatórios). Através de métodos imunohistoquímicos a presença de receptores no SNE foram observados, assim os receptores P2X₁ e P2X₂ foram identificados por Vulchanova et al. (1996) e o receptor P2X₇ por Hu et al. (2001)

Os receptores P2X são encontrados em células musculares lisas, neurônios e células gliais, onde apresentam um papel de mediador na neurotransmissão excitatória rápida no sistema nervoso central e periférico (ABBRACHIO et al., 2009; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998).

No SNE, Castelucci et al. (2002b) demonstraram, pela primeira vez, a presença do receptor P2X₂ nos neurônios NOS-ir e Calb-ir. As varicosidades das fibras nervosas com imunorreatividade para o receptor P2X₂ foram encontradas no gânglio mioentérico gástrico. Estas fibras desapareceram após a secção do nervo vago. Desta maneira, concluiu-se que o receptor P2X₂ se expressa em neurônios motores inibitórios, neurônios secretomotores não colinérgicos, em neurônios aferentes intrínsecos primários e em terminações aferentes vagais no estômago.

No plexo submucoso de cobaias o receptor P2X₂ foi identificado em todos os neurônios imunorreativos a VIP e a Calb. No entanto esses animais não apresentaram o receptor P2X₂ nos neurônios NPY e Calr (CASTELUCCI et al., 2002b). Também, foi reportada a imunorreatividade do receptor P2X₂ nas terminações nervosas intra-ganglionares laminares (IGLEs) no trato gastrintestinal de camundongos (CASTELUCCI; ROBBINS; FURNESS, 2003).

Ao analisar outra subunidade dos receptores P2X, Poole et al. (2002) observaram o purinoreceptor P2X₃ nos neurônios motores inibitórios e nos neurônios secretomotores não-colinérgicos.

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: lesões agudas no sistema nervoso central, como isquemia, hipóxia, estresse 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. A relação entre as mudanças na expressão do receptor P2 e a resposta específica dos diferentes tipos celulares para a injúria é extremamente complexa, e pode ser relativo para efeitos nocivos e/ou benéficos (FRANKE; ILLES, 2006).

Resultados recentes do nosso laboratório têm demonstrado alterações no código químico dos receptores purinérgicos no íleo (MISAWA et al., 2010) e colo distal de animais desnutridos e renutridos (GIROTTI, 2008), no íleo de camundongos obesos (MIZUNO, 2010) e, isquemia com reperfusão intestinal (PALOMBIT, 2010; PAULINO et al., 2011).

A importância deste trabalho está em demonstrar de maneira original, no SNE do íleo os efeitos da I/R-i da AMS sobre a expressão do receptor purinérgico P2X₂ e caracterizar estas alterações sobre as diferentes classes neuronais no plexo mioentérico e células gliais entéricas do íleo de ratos, nos períodos de 24 horas e 1 semana de reperfusão.

2.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos da isquemia/reperfusão intestinal sobre a expressão do receptor P2X₂ e das diferentes classes neuronais e células gliais do plexo mioentérico do íleo de ratos Wistar.

2.2 Objetivos Específicos

Este trabalho visou analisar, com o uso de técnicas de imunohistoquímica e histologia, os neurônios do plexo mioentérico do íleo de animais submetidos à I/R-i da AMS, com períodos de 24 horas e 1 semana de reperfusão:

- a) A distribuição do receptor purinérgico P2X₂;
- b) A colocalização do receptor purinérgico P2X₂ com a NOS, a ChAT, Calb, a Calr e S100 (marcador de células gliais);
- c) A colocalização do pan-neuronal anti-HuC/D com o receptor P2X₂, a NOS e a ChAT;
- d) A densidade e estimativa de neurônios imunorreativos ao receptor P2X₂, à NOS, à ChAT, à Calb, à Calr e ao anti HuC/D e das células gliais entéricas ao S100;
- e) A morfometria e distribuição de frequência da área do perfil neuronal, diâmetro máximo e diâmetro mínimo dos neurônios imunorreativos à NOS, à ChAT, à Calb e à Calr;
- f) A morfologia do íleo pelo método da Hematoxilina-Eosina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados 25 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos (aproximadamente 2 meses de idade), machos, com peso entre 200-300 g, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do ICB da USP. Os ratos ficaram acondicionados com temperatura entre 18-22 °C, sob ciclo de claro/escuro de 12 horas sem restrições a água e alimentação, foi utilizado a ração padronizada para roedores.

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n=5/grupo): o grupo controle (CT), onde não foi realizada intervenção cirúrgica; o grupo falso operado (Sham), animais que sofreram intervenção cirúrgica, porém não houve a oclusão da artéria mesentérica superior (AMS); e o grupo isquêmico (I/R-i), que tiveram a oclusão da AMS. Todos os animais foram pesados antes dos procedimentos. A eutanásia dos animais submetidos a intervenção cirúrgica foi realizada após 24 horas e 1 semana de reperusão com dose excessiva de anestésico. Todos os ratos foram anestesiados com um coquetel de anestésicos que continha xilazina (1 mg/100 g de peso do animal), cetamina (5 mg/100 g de peso do animal) e acepromazina (0,2 mg/100 g de peso). Esse protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo com o número 50/2009, da Folha 70 do Livro 02.

3.2 Procedimentos Cirúrgicos

Depois de anestesiados, foi realizada a laparotomia mediana, nos animais submetidos à cirurgia, e a exteriorização do intestino delgado para fora da cavidade abdominal, para ter acesso a AMS (Fig. 4). Nos animais do grupo I/R-i, a AMS foi localizada, dissecada para remoção do excesso de tecido conjuntivo, e ocluída por meio de pinças vasculares por período de 45 minutos.

A escolha da oclusão da AMS baseou-se na sua importância para a irrigação do intestino delgado e, pelo fato dessa artéria ser mais suscetível a episódios de embolia intestinal, chegando a uma incidência de 50% dos casos de isquemia aguda mesentérica (GORE et al., 2008).

Figura 4 - Representação da vascularização do intestino delgado de rato.
 FONTE: Modificado de Greene, 1963.

A escolha pela oclusão da AMS por um período de 45 minutos baseou-se no pressuposto de que com 1 hora de isquemia, a mucosa intestinal apresenta alterações de sua permeabilidade microvascular caracterizadas por edema e perda de fluidos para luz intestinal e, após 1 hora, a mucosa é gravemente danificada e apresenta ulcerações e hemorragias. Em uma isquemia superior a 2 horas ocorreriam danos irreversíveis na mucosa intestinal após a reperusão. Porém, períodos menores de isquemia, poderiam não causar alterações mensuráveis, além de não simular uma condição prática verdadeira de tempo crítico de isquemia (RIBEIRO; YOSHIDA, 2005; SCHOENBERG; BERGER, 1993).

Durante todo esse período de isquemia, o intestino delgado foi umedecido com tampão salina fosfato (PBS: 0,15 M NaCl em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,2) aquecido (± 30 °C), para evitar ressecamento das vísceras e a ajudar a diminuir hipotermia do animal. Durante a cirurgia de isquemia da AMS, a região que permaneceu por 45 minutos sem fluxo sanguíneo, apresentou a coloração hemorrágica, indicando que o tecido sofreu isquemia (Fig. 5). Após a retirada das pinças, com o retorno de sangue ao órgão, o tecido voltou a sua coloração rosada normal e a artéria voltou a pulsar. Em seguida, o intestino delgado foi recolocado na cavidade abdominal e a incisão mediana fechada com sutura contínua com fio de *nylon* monofilamentar ou algodão, em dois planos, muscular e pele.

Os animais dos grupos I/R-i e Sham voltaram da anestesia normalmente após de 3 horas. Esses animais não apresentaram sinais de estresse e suas fezes encontravam-se normais sem sinais de diarreia ou hemorragias aparentes. Após 24 horas e 1 semana, os mesmos, foram eutanasiados com uma superdose do coquetel de anestésico (LINDESTRÖN; EKBLAD, 2004).

Figura 5 - Procedimento Cirúrgico de oclusão da AMS de rato Wistar (A-C). (A) Laparotomia mediana com exposição do intestino delgado; (B) Local do pinçamento da AMS; (C) Aspecto do intestino delgado durante a oclusão da AMS. A seta simples indica a área hemorrágica e seta vazada demonstra o local do pinçamento da artéria; * Intestino Grosso.

3.3 Coleta e Preparação do Material para Imunohistoquímica

Antes da eutanásia, os animais foram pesados, e depois anestesiados. Em seguida, os animais foram submetidos à laparotomia mediana e exposição do intestino delgado. Depois, foi retirado todo o intestino delgado, do íleo até o duodeno, que foi limpo de seu conteúdo com a injeção de PBS na luz intestinal e colocado sobre folha de papel para ter sua área decalcada e posterior mensuração. Os tecidos dos animais Sham e I/R-i foram examinados macroscopicamente e não apresentaram alterações macroscópicas de lesão.

Após, um segmento de cerca de 8 cm do íleo distal foi coletado para análises imunohistoquímicas e 2 cm foram coletados para análise histológica (n=2/grupo). Os segmentos destinados a imunohistoquímica foram abertos pela sua borda mesentérica, e posteriormente, 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 dimetil sulfoxido, 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.

Após a fixação e o clareamento do tecido, com auxílio do Microscópio estereoscópico ZM800 (Nikon), o íleo de cada grupo (CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana) foram dissecados. O tecido foi colocado sobre uma placa de petri, foi seccionado e obtida uma parte com cerca de 1 cm². Em seguida, com o auxílio de pinças de ponta fina, foi destacado do restante do tecido, a mucosa e o plexo submucoso obtendo dessa forma uma membrana contendo as camadas de músculo longitudinal e circular e entre elas o plexo mioentérico. Após, foram retiradas delicadamente as fibras da musculatura circular, e obteve-se o preparado de membrana, que contém o plexo mioentérico e a musculatura longitudinal.

3.4 Método de Dupla Marcação do Receptor P2X₂ com a NOS, a ChAT, a Calb, a Calr, Anti-HuC/D e S100

Os preparados de membrana do plexo mioentérico de todos os grupos foram imersos em uma solução contendo 10% de solução soro normal de cavalo, 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 48 horas, a 4 °C e depois foram lavados em PBS por três vezes de 10 minutos cada.

Tabela 1 - Características dos anticorpos primários.

Antígeno	Hospedeiro	Diluição	Referência
Receptor P2X ₂	Coelho	1:120	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

As duplas marcações foram obtidas, usando as combinações do receptor purinérgico P2X₂ com anticorpos primários NOS, ChAT, Calb, Calr e S-100 (Tabela 1) e do anticorpo pan-neuronal (anti-HuC/D) com P2X₂, NOS e ChAT (Tabela 1).

A escolha destes marcadores é baseada segundo Furness (2000, 2006) para demonstrar o código químico das principais classes de neurônios entéricos: a NOS, um marcador para neurônios inibitórios, a ChAT para neurônios excitatórios, a Calb para IPAN, a Calr para interneurônios, o S100 para células gliais entérica, e o pan-neuronal anti-HuC/D.

Após a incubação do anticorpo primário, o tecido foi lavado 3 vezes por 10 min cada em PBS e incubado em anticorpos secundários, por uma hora, à temperatura ambiente (Tabela 2). Após, os tecidos foram lavados novamente em PBS por 3 vezes de 10 minutos cada, 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 Alexa 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

3.5 Métodos para Análise Qualitativas das Duplas Marcações

As análises qualitativas dos neurônios imunorreativos (ir) ao receptor P2X₂, à NOS, à ChAT, à Calb, à Calr, ao anti-HuC/D e à S-100 do plexo mioentérico, foram realizadas em microscópio de fluorescência Nikon 80i equipado com filtros para discriminar entre a fluorescência 488 e Alexa 594. O mesmo microscópio também foi acoplado ao analisador de imagem, que utilizou 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 preparações foram analisadas também pelo microscópio Confocal de Varredura a Laser do Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento do ICB/USP. O LSM 510 da Zeiss está 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 Alexa 594. As imagens estarão em 512x512 pixels em uma espessura de secção óptica de 0.5 μ m e serão processadas usando os programas de software LSM 5.0 (Zeiss) Corel PhotPaint e Corel.

3.6 Métodos para Análise Quantitativa dos Neurônios Entéricos e Células Gliais Entéricas

3.6.1 Identificação das Classes Neurais

As análises quantitativas do código químico dos neurônios foram realizadas dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X₂ colocalizados com a NOS, a ChAT, a Calb, a Calr, o S-100 e anti-HuC/D com P2X₂, NOS e ChAT do plexo mioentérico do íleo dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana. Primeiro, os neurônios foram localizados pela presença do fluoróforo que marca um antígeno, então o filtro foi mudado para determinar se o neurônio era ou não marcado por um segundo antígeno, localizado por um segundo fluoróforo de diferente cor. Foram analisados 100 neurônios de dois preparados de membrana por animal de cada colocalização, totalizando 200 neurônios por animal/grupo para cada classe neuronal (um total de 8 tipos de colocalização). Dessa forma foram analisados a colocalização de 1600

neurônios por animal. Os dados das colocalizações estão expressos com média $\pm$ desvio padrão, n= número de preparações (MISAWA et al., 2010; PAULINO et al., 2011).

3.6.2 Método para Obtenção da Densidade, Estimativa e do Perfil Neuronal

As obtenções das densidades (neurônios/cm²) dos neurônios imunorreativos foram feitas em objetiva de 100x no microscópio de fluorescência Nikon 80i (área do campo microscópico 0,000379 cm²) acoplados com filtros para discriminar entre as fluorescências 488 e 594.

Foram realizadas contagens do número dos neurônios em 20 campos microscópicos por preparado de membrana, totalizando 40 campos microscópicos para cada classe neuronal: P2X₂, NOS, ChAT, Calbindina, Calretinina, anti-HuC/D e S-100 para cada animal dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana. Dessa forma, foram analisados 280 campos/animal (MISAWA et al., 2010; PAULINO et al., 2011).

A estimativa do número de neurônios do intestino delgado foi calculada multiplicando a densidade (neurônios/cm²) de todas as classes neuronais pela área do intestino delgado (MISAWA et al., 2010).

Para a obtenção das áreas dos perfis neuronais, foram fotografados 100 neurônios de cada classe de neurônios imunorreativos a NOS, a ChAT, a Calb e a Calr para cada animal de todos os grupos, pelo programa NIS-elements AR3.1 (Nikon). A Calb também foi mensurada dividindo-a em morfologia Dogiel Tipo I e Dogiel Tipo II. As análises da área do perfil neuronal (μm^2), diâmetro máximo (μm) e mínimo (μm) foram feitas com o programa Image Pró Plus (Versão 5) (MISAWA et al., 2010; PAULINO et al., 2011).

A análise do perfil neuronal é utilizada para determinar possíveis alterações no tamanho dos neurônios, indicando processos patológicos como a necrose e/ou apoptose. A análise do diâmetro máximo e mínimo permite identificar alterações na morfologia dos neurônios.

3.7 Método para Análise Morfológica pela Histologia

Amostras de cerca de 2 cm do íleo de 2 animais por grupo foram lavadas em PBS, abertas pela borda mesentérica, e colocadas sob balsas de madeira com a mucosa voltada para cima, presos com a ajuda de alfinetes sem esticá-las e fixadas em formol a 10% a 4 °C por

uma noite. As amostras passaram por uma série de concentrações crescentes de álcool, depois foram diafanizadas em xilol e incluídas em Paraplast (Sigma). Depois desse processo, os tecidos foram cortados transversalmente em micrótomo, com uma espessura de 5 μm e corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE).

Os cortes histológicos foram utilizados para a análise morfológica qualitativa das vilosidades, área da mucosa, plexo submucoso, camada circular, plexo mioentérico e camada longitudinal entre todos os grupos experimentais.

As imagens foram obtidas pelo Microscópio Nikon 80i acoplado a uma câmera com software NIS-elements AR3.5 (Nikon).

3.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com comparação dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana de reperfusão. Foram analisados os dados das variáveis das colocalizações, densidades (neurônio/ cm^2), estimativa, perfil neuronal (μm^2), diâmetro máximo (μm) e mínimo (μm) dos grupos, através análise de variância ANOVA “Two-Way” seguido pelo teste de Tukey, com nível de significância $p < 0,05$.

4.1 Peso dos animais e Área do Intestino Delgado

A tabela 3 demonstra a média dos pesos nos grupos CT, Sham e I/R-i 24 h e 1 semana (antes e após a cirurgia). Os animais dos grupos Sham e I/R-i de 24 horas apresentaram uma perda de peso após a cirurgia e os grupos de 1 semana apresentaram, um aumento de peso corporal.

A área do intestino delgado, foi obtida, a partir da mensuração de sua largura e comprimento, e apresentaram valores entre 81,09 cm² e 97,94 cm². Os resultados não indicaram diferença estatística entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3 - Peso corporal (g) antes da cirurgia e após a reperfusão intestinal e estimativa da área do intestino delgado dos grupos CT, Sham e I/R-i 24 h e 1 semana

Grupo	Peso Antes/Cirurgia (g)	Peso Pós/Reperusão (g)	Área do Intestino (cm ²)
CT	-	245,08 ± 19,07	97,94 ± 5,06
Sham 24 h	247,32 ± 17,21	229,78 ± 14,65	95,63 ± 17
I/R-i 24 h	250,55 ± 34,64	234,89 ± 31,88	81,09 ± 12,48
Sham 1 semana	280,13 ± 6,41	289,46 ± 8,62	81,72 ± 10,55
I/R-i 1 semana	251,62 ± 3,65	250,32 ± 21,19	81,59 ± 5

Dados expressos em Média ± desvio padrão

4.2 Efeitos morfológicos da I/R-i sobre o receptor P2X₂, nas classes de neurônios e células gliais entéricas

A Figura 6 demonstra uma visão geral dos gânglios do plexo mioentérico do íleo dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

Os neurônios imunorreativos ao receptor P2X₂ apresentaram uma diminuição em sua expressão no grupo de I/R-i 24 horas quando comparados aos grupos CT e Sham 24 horas (Fig. 7-C'). No entanto, essa diminuição aparentemente não foi observada nos animais Sham e I/R-i de 1 semana. A análise qualitativa mostra colocalização do P2X₂-ir com neurônios NOS-ir, ChAT-ir, Calb-ir, Calr-ir, anti-HuC/D-ir e S-100-ir (Fig. 7-14).

Os neurônios NOS-ir apresentaram imunomarcagem nos neurônios inibitórios do plexo mioentérico, e sua intensidade se manteve inalterada entre os grupos estudados. Os neurônios

dos grupos CT, Sham de 24 horas e 1 semana apresentaram morfologia Dogiel tipo I (Fig. 7-A-D''). Aparentemente, não houve alteração da morfologia Dogiel Tipo I dos neurônios do grupo I/R-i (Fig. 7- B, D). Os neurônios NOS-ir do grupo I/R-i de 24 horas e 1 semana apresentaram uma tendência a um aumento de seu perfil quando comparados aos animais dos grupos controle (Fig. 7-B, D), alguns neurônios pareceram edemaciados.

Os neurônios ChAT-ir apresentaram marcação de neurônios excitatórios do plexo mioentérico (Fig. 8-A - D''). Foi observada uma diferença em relação a imunorreatividade desses neurônios, onde alguns neurônios estavam fortemente marcados e alguns fracamente em todos os grupos analisados. O padrão de distribuição dos neurônios ChAT-ir no gânglio entérico foi abundante. Os animais do grupo Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana, apresentaram morfologia Dogiel I semelhante aos animais CT (Fig 8-A, D). Os neurônios ChAT-ir do grupo I/R-i, principalmente do grupo de 1 semana, apresentaram um aparente edemaciamento do citoplasma, além da presença de varicosidades (Fig. 8-B, D).

Figura 6 - Aspecto geral do plexo mioentérico do íleo de ratos Sham 24 h, I/R-i 24 h, Sham 1 Sem e I/R-i 1 Sem (A-P). Neurônios imunorreativos à NOS (A-D), à ChAT (E-H), à Calb (I-L) e à Calr (M-P). Setas simples indicam neurônios colocalizados com o receptor P2X₂ (Barra: 20 μm).

Figura 7 - Neurônios imunorreativos à NOS e ao receptor P2X₂ (A-D'') no plexo mioentérico, do íleo de ratos Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização dos neurônios NOS-ir e P2X₂-ir. Setas vazadas demonstram neurônios NOS-ir edemaciados no grupo I/R-i 1 Sem (Barra: 10 μm).

Figura 8 - Neurônios imunorreativos à ChAT e ao receptor P2X₂ (A-D'') no plexo mioentérico do íleo de ratos Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização dos neurônios ChAT-ir e P2X₂-ir. Setas vazadas demonstram neurônios ChAT-ir edemaciados no grupo I/R-i 1 Sem (Barra: 10 μm).

Os neurônios Calb-ir apresentaram imunorreatividade para a proteína em todos os grupos analisados e colocalizaram com o receptor $P2X_2$ (Fig. 9- A-D’’). Foram observados neurônios de tamanhos e formas variáveis, com morfologias Dogiel Tipo I (neurônios com muitos dendritos) e Dogiel Tipo II (neurônios grandes com corpo celular liso). No entanto, a maioria dos neurônios Dogiel Tipo II apresentou-se fracamente imunorreativos a calbindina em todos os grupos analisados. Não houve alteração na morfologia dos neurônios nos grupos estudados. (Fig. 9-A-D’’).

Os neurônios Calr-ir colocalizaram com o receptor $P2X_2$ em todos os grupos analisados (Fig. 10- A-D’’). Esses neurônios apresentaram morfologia Dogiel Tipo I em todos os grupos estudados.

A figura 11 (A-D’’) apresenta a colocalização do anti-HuC/D com a NOS. O anti-HuC/D apresentou colocalização também a ChAT (Fig. 12-A-D’’), o que demonstra serem neurônios entéricos. O receptor $P2X_2$ foi imunorreativo ao pan neuronal, no entanto, algumas células eram imunorreativas somente ao receptor, portanto não eram neurônios, podendo ser outro tipo celular (Fig. 13-A-D’’).

De posse destes resultados, foi averiguada a colocalização do receptor com as células gliais entéricas, para tanto, foi utilizado o marcador S-100 (Fig. 14-A-D’’). Com a dupla marcação do receptor $P2X_2$ com o S-100, foi possível confirmar que essas células expressavam o receptor nos grupos analisados (Fig. 14-A-D’’).

Figura 9 - Neurônios imunorreativos à Calb e ao receptor $P2X_2$ (A-D'') no plexo mioentérico do íleo de ratos Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização dos neurônios Calb-ir e $P2X_2$ -ir. Setas vazadas demonstram neurônios Calb-ir edemaciados com morfologia Dogiel Tipo II (Barra: 10 μ m).

Figura 10 - Neurônios imunorreativos à Calr e ao receptor P2X₂ (A-D'') no plexo mioentérico do íleo de ratos Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização dos neurônios Calr-ir e P2X₂-ir (Barra: 10 μm).

Figura 11 - Neurônios imunorreativos ao anti-HuC/D (Hu) e a NOS (A-D'') no plexo mioentérico, do íleo de ratos Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização dos neurônios Hu-ir e NOS-ir (Barra: 10 μm).

Figura 12 - Neurônios imunorreativos ao anti-HuC/D e a ChAT (A-D'') no plexo mioentérico do íleo de ratos: Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização dos neurônios Hu-ir e ChAT-ir (Barra: 10 µm).

Figura 13 - Neurônios imunorreativos ao anti-HuC/D (Hu) e ao receptor P2X₂ (A-D'') no plexo mioentérico do íleo de ratos Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização dos neurônios Hu-ir e P2X₂-ir (Barra: 10 μm).

Figura 14 - Células glias entéricas imunorreativas ao receptor $P2X_2$ e a S100 (A-D'') no plexo mioentérico do íleo de ratos: Sham 24 h (A-A''), I/R-i 24 h (B-B''), Sham 1 Sem (C-C'') e I/R-i 1 Sem (D-D''). Setas simples indicam colocalização das células glias com receptor $P2X_2$ -ir; *indicam a localização dos neurônios entéricos; Setas vazadas indicam células glias imunorreativas somente ao S100 (Barra:10 µm).

4.3 Análise Qualitativa Histológica

A Figura 15 (A-L) apresenta a parede intestinal corada pelo método Hematoxilina-Eosina. Os animais do grupo CT e Sham de 24 h e 1 semana não apresentaram alterações morfológicas aparentes. A parede intestinal apresentou-se com a mucosa revestida por epitélio com a presença de vilosidades em todos os grupos analisados, com as células caliciformes. As criptas ou glândulas intestinais foram características em todos os grupos analisados (Fig. 15-A-C).

No grupo I/R-i 24 h, a região das glândulas intestinais pareceram estar edemaciadas quando comparadas com outros grupos (Fig. 15-D-F). Nas vilosidades estavam presentes as células caliciformes, no grupo I/R-i 24 h aparentemente estavam em maior quantidade quando comparado com o Sham e o I/R-i 1 semana. Não houve diferenças aparente nas vilosidades entre os grupos estudados (Fig. 15 - G-I).

A parede intestinal apresentou a região submucosa onde foi possível observar o plexo submucoso. Logo abaixo está situada a musculatura circular interna e a musculatura longitudinal externa, e entre as duas o plexo mioentérico (Fig. 15-J-L). A musculatura circular parece estar mais espessa no grupo I/R-i 24 h. Além disso, o plexo mioentérico parece estar com a presença de mais vacúolos no I/R-i 24 h quando comparados com os outros grupos. Não foram observados eosinófilos ao redor do plexo mioentérico em todos os grupos analisados.

Figura 15 - Fotomicrografia da parede do íleo dos grupos Sham (A, D, G, J), I/R-i 24 h (B, E, H, K) e I/R-i 1 semana (C, F, I, L). Aspecto geral da parede intestinal (A-C); Camadas da parede intestinal (D-F); Detalhe das vilosidades (G-I); Detalhe do plexo mioentérico (J-L); (V) Vilosidades, (GM) Glândulas da Mucosa, (SM) Plexo Submucoso, (PM) Plexo Mioentérico; Setas indicam neurônios entéricos. H.E. A-C Barra: 100 μ m; D-F Barra: 50 μ m; G-I Barra: 20 μ m; J-L Barra: 10 μ m

4.4 Análise quantitativa da isquemia com reperfusão intestinal sobre as classes de neurônios entéricos

4.4.1 Colocalização do receptor P2X₂ com as classes neuronais e células gliais entéricas

A tabela 4 apresenta a porcentagem de colocalização dos neurônios NOS-ir com o receptor P2X₂ e a análise inversa, da porcentagem de neurônios imunorreativos ao P2X₂ que colocalizam com a NOS. Houve 100% de colocalização dos neurônios NOS-ir com o receptor.

A análise inversa da colocalização do receptor com a NOS, demonstrou diferença significativa, quando comparados os animais CT e os Sham de 24 h e 1 semana (^β). Não houve diferença estatística entre os grupos Sham e o I/R-i de 24 h. No grupo de 1 semana, houve diminuição significativa da colocalização do receptor com neurônios NOS-ir de 22,14% no I/R-i quando comparado com seu Sham. Ao analisar os tempos de reperfusão, houve uma diminuição significativa de 61,37% nos neurônios do I/R-i de 1 semana quando comparado com o I/R-i 24 horas. Esses resultados indicam efeito de interação Tempo x Tratamento.

Tabela 4 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X₂ e a NOS no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

Grupos	NOS/P2X ₂ (%)	P2X ₂ /NOS (%)
<i>CT</i>	99,7 ± 0,6	27,7 ± 4,9
<i>Sham 24 h</i>	100	31,8 ± 3,8
<i>I/R -i 24 h</i>	99,9 ± 0,2	32,1 ± 3,1
<i>Sham 1 semana</i>	100	25,3 ± 2,2 ^β
<i>I/R-i 1 semana</i>	100	19,7 ± 1,1 ^{πα}

Dados expressos em Média ± desvio padrão. ^βcomparado ao Sham 24 horas; ^πcomparado Sham 1 semana; ^αcomparado ao I/R-i 24 h; ^{β, π, α}p<0,05.

A tabela 5 demonstra que a maioria dos neurônios ChAT-ir colocalizaram com o receptor P2X₂. A análise estatística comparativa entre CT e dos Shams de 24 horas e 1 semana não detectou diferenças. O grupo I/R-i de 24 h apresentou diminuição de 3,37% quando comparado com o seu Sham. Os grupos de 1 semana não apresentaram diferenças entre Sham e I/R-i. Porém, o I/R-i 1 Sem apresentou um aumento de 4,02% quando comparado ao I/R-i 24 horas, indicando efeito de interação entre Tempo x Tratamento.

A análise inversa, mostrou uma diminuição significativa de 22,34% dos neurônios P2X₂-ir com relação ao ChAT no grupo Sham 1 semana em relação ao CT e uma diminuição de 17,44% em relação ao Sham 24 h ([#]). O grupo de 24 horas não apresentou diferença estatística. O grupo de I/R-i 1 semana apresentou uma diminuição de 18,35% em relação ao I/R-i 24 h, indicando que o tempo e o tratamento influenciam na cirurgia.

Tabela 5 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X₂ e a ChAT no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

Grupos	ChAT/P2X₂ (%)	P2X₂/ChAT(%)
<i>CT</i>	97,5 ± 1,2	79,2 ± 4,1
<i>Sham 24 h</i>	97,7 ± 1,3	74,5 ± 1,6
<i>I/R –i 24 h</i>	94,4 ± 2,7 ^β	74,1 ± 3,4
<i>Sham 1 semana</i>	98,4 ± 0,6	61,5 ± 3,2 ^{#β}
<i>I/R-i 1 semana</i>	98,2 ± 0,5 ^α	60,5 ± 2,3 ^γ

[#]comparado ao CT; ^βcomparado ao Sham 24 h; ^αcomparado ao I/R-i 24 h; ^γcomparado ao I/R-i 24 h; ^{#, β, α} $p < 0,05$ e ^γ $p < 0,01$.

Resultados dos neurônios Calb-ir indicam colocalização com o receptor P2X₂ em todos os grupos (Tabela 6). Essa colocalização não apresentou diferença significativa entre os animais do grupo CT, Sham de 24 h e 1 semana. No entanto, o grupo I/R-i 1 semana apresentou aumento significativo da colocalização, da Calb com o receptor, de 1,5% em relação ao I/R-24 h. A análise inversa, do receptor colocalizado com a Calb, não indicou diferenças significativas entre os grupos analisados.

Tabela 6 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X₂ e a Calb no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

Grupos	Calb/P2X ₂ (%)	P2X ₂ /Calb (%)
<i>CT</i>	93,8 ± 1	7,2 ± 1,5
<i>Sham 24 h</i>	94,7 ± 1,3	6,6 ± 1,1
<i>I/R -i 24 h</i>	93,8 ± 0,9	6,1 ± 1,3
<i>Sham 1 semana</i>	94,1 ± 0,6	6,5 ± 1,2
<i>I/R-i 1 semana</i>	95,2 ± 0,4 ^a	6,7 ± 0,9

^ap < 0,05 comparado ao I/R-i 24 h

A análise dos neurônios Calr-ir demonstrou 100% de colocalização com o receptor P2X₂ em todos os grupos analisados (Tabela 7). A análise inversa, da colocalização dos neurônios P2X₂-ir com os Calr-ir, demonstrou uma diminuição significativa de 10,45% do Sham 24 h em relação ao CT. O I/R-i 24 h também apresentou uma diminuição de 8,57% em relação ao CT. O I/R-i 1 semana também apresentou um aumento significativo de sua colocalização de 12,5% em relação ao I/R-i 24 h, porém não foi detectado efeito de interação entre Tempo x Tratamento.

Tabela 7 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X₂ e a Calr no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

Grupos	Calr/P2X ₂ (%)	P2X ₂ /Calr (%)
<i>CT</i>	100	21 ± 1,1
<i>Sham 24 h</i>	100	18,8 ± 1,2 [#]
<i>I/R-i 24 h</i>	100	19,2 ± 1 [#]
<i>Sham 1 semana</i>	100	19,2 ± 1,1
<i>I/R-i 1 semana</i>	100	21,6 ± 1,1 ^{π α}

[#] comparado ao CT; ^π comparado ao Sham 1 semana; ^α comparado ao I/R-i 24 h, ^{#, π, α} p < 0,05.

Resultados da colocalização dos neurônios HuC/D-ir, indicam cerca de 99% de colocalização com o receptor P2X₂ em todos os grupos (Tabela 8). A análise inversa mostrou que o Sham 1 semana apresenta uma diminuição significativa dos neurônios P2X₂-ir em relação ao anti-HuC/D de 11,8% em relação ao CT, e 11%, em relação ao Sham 24 h. O I/R-i 24 h apresentou uma diminuição significativa de 2,9% quando comparado com o Sham 24 h e o I/R-i 1 semana uma diminuição de 8,9% em relação ao Sham 1 semana. O I/R-i 1 semana apresentou uma diminuição de 20,3% em relação ao I/R-i 24 h. Esses resultados indicam efeito de interação entre Tempo x Tratamento. Os resultados complementares, de células que são imunorreativas somente ao receptor P2X₂, mostram as mesmas diferenças, porém apresentam uma porcentagem de células que não são imunorreativas ao anti-HuC/D.

Tabela 8 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X₂ e ao anti-HuC/D no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

Grupos	HuC/D/P2X ₂ (%)	HuC/D/- (%)	P2X ₂ / HuC/D (%)	P2X ₂ / - (%)
<i>CT</i>	99,4 ± 0,4	0,6 ± 0,4	87,9 ± 1,2	12,1 ± 1,2
<i>Sham 24 h</i>	99,6 ± 0,4	0,4 ± 0,4	87,1 ± 1	12,9 ± 1
<i>I/R-i 24 h</i>	99,4 ± 0,4	0,6 ± 0,4	84,6 ± 1,9 ^b	15,4 ± 1,9 ^b
<i>Sham 1 semana</i>	99,2 ± 0,2	0,8 ± 0,2	77,5 ± 0,7 ^{#β}	22,5 ± 0,7 ^{#β}
<i>I/R-i 1 semana</i>	99,4 ± 0,4	0,6 ± 0,4	70,6 ± 1,1 ^{πα}	29,4 ± 1,1 ^{πα}

[#]comparado com o CT; ^βcomparado com o Sham 24 h; ^πcomparado com o Sham 1 semana;

^αcomparado com o I/R-i 24 h; ^{#, β, π, α}p<0,05.

A tabela 9 apresenta a colocalização do S100 com o receptor P2X₂-ir. A análise estatística mostrou que as células imunorreativas ao S100 no grupo Sham 24 h aumentaram 2,6% em relação ao CT. O Sham 1 semana apresentou uma diminuição significativa de 2,8% em relação ao Sham 24 h. O grupo I/R-i 24 h apresentou um aumento de 2,3% em relação ao Sham 24 h. O grupo I/R-i 1 semana apresentou uma diminuição de 4,6% em relação do I/R-i 24 h.

Os neurônios imunorreativos ao P2X₂ colocalizaram com o S100 entre 38 a 63% entre os grupos estudados. O grupo Sham 1 semana apresentou um aumento significativo de 65% em relação ao CT, e, de 55,4% em relação ao Sham 24 h. O grupo I/R-i de 1 semana apresentou um aumento de 46,6% em relação ao I/R-i 24 h.

Tabela 9 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao anti-HuC/D e ao S100 no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

Grupos	S100/P2X ₂ (%)	S100/- (%)	P2X ₂ /S100 (%)	P2X ₂ / - (%)
<i>CT</i>	87,8 ± 1,6	12,2 ± 1,6	38,2 ± 2,9	61,8 ± 2,9
<i>Sham 24 h</i>	90,1 ± 0,5 [#]	9,9 ± 0,5 [#]	40,6 ± 4,3	59,4 ± 4,3
<i>I/R-i 24 h</i>	92,2 ± 1,6 ^β	7,8 ± 1,6 ^β	42,3 ± 3,5	57,7 ± 3,5
<i>Sham 1 semana</i>	87,5 ± 1 ^β	12,5 ± 1 ^β	63,1 ± 3 ^{#β}	36,9 ± 3 ^{#β}
<i>I/R-i 1 semana</i>	87,9 ± 2,1 ^α	12,1 ± 2,1 ^α	62 ± 1,8 ^α	38 ± 1,8 ^α

[#]comparado com o CT; ^βcomparado com o Sham 24 h; ^αcomparado com I/R-i 24 h; [#], ^βp<0,05; ^αp<0,01

A tabela 10 demonstra os resultados da colocalização dos neurônios anti-HuC/D-ir com a NOS-ir, indicando a população de neurônios inibitórios. A análise estatística detectou um aumento nos neurônios anti-HuC/D colocalizados com a NOS-ir de 18% do grupo Sham 24 h em relação ao CT. No Sham 1 semana esse aumento foi de 15,3% em relação ao CT. Foi observado um efeito de interação entre Tempo x Tratamento, o I/R-i 1 semana apresentou um aumento significativo de 14% em relação ao I/R-i 24 h. A análise inversa demonstra que 100% de colocalização dos neurônios NOS-ir com o anti-HuC/D-ir, demonstrou que a NOS-ir são realmente neurônios.

Tabela 10 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao HuC/D e a NOS, no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

Grupos	HuC/D/NOS (%)	NOS/ HuC/D (%)
<i>CT</i>	20,2 ± 2,8	100
<i>Sham 24 h</i>	23,9 ± 2,3 [#]	100
<i>I/R-i 24 h</i>	24,9 ± 1,4	100
<i>Sham 1 semana</i>	23,3 ± 1,1 [#]	100
<i>I/R-i 1 semana</i>	28,4 ± 1,2 ^{πα}	100

[#]comparado com o CT; ^πcomparado com o Sham 1 semana; ^αcomparado com o I/R-i 24 h; ^{#, π, α}*p*<0,05.

A análise da colocalização dos neurônios anti-HuC/D-ir com a ChAT-ir indicam a população total de neurônios excitatórios no plexo mioentérico (Tabela 11). A análise estatística detectou um aumento significativo de neurônios anti-HuC/D colocalizados com a ChAT, de 7,2% do grupo I/R-i 1 semana quando comparado com seu Sham. A análise inversa demonstra 100% de colocalização da ChAT com o anti-HuC/D nos grupos analisados, indicando que são realmente neurônios.

Tabela 11 - Colocalização dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao anti-HuC/D e ao ChAT no íleo de animais dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

Grupos	HuC/D/ChAT (%)	ChAT/ HuC/D (%)
<i>CT</i>	75,3 ± 2,4	100
<i>Sham 24 h</i>	72,1 ± 2,9	100
<i>I/R-i 24 h</i>	75 ± 3	100
<i>Sham 1 semana</i>	72,2 ± 1,6	100
<i>I/R-i 1 semana</i>	77,4 ± 1,5 ^π	100

^π*p*<0,05 comparado com o Sham 1 semana.

4.4.2 Análise da densidade e estimativa de neurônios e células gliais entéricas

A densidade neuronal (neurônios/cm²) foi obtida pela contagem de 40 campos (0,00038 cm²/campo microscópico) de neurônios imunorreativos ao receptor P2X₂, à NOS, à ChAT, à Calb, à Calr, ao anti-HuC/D e à S100.

Foram avaliados dois fatores tempo (24 h e 1 semana) e o tratamento (animais que sofreram isquemia ou sham). O cruzamento dos dados permitiu identificar possíveis diferenças significativas entre os grupos.

A densidade de células P2X₂-ir apresentou diferença significativa entre os grupos CT, Sham de 24 h e 1 semana (Fig. 16-A). O grupo Sham 1 semana apresentou um aumento significativo de 40,2% em relação ao CT([#]) e de 56% em comparação ao Sham 24 h (^β).

Quando comparados os grupos individualmente foi possível identificar diferença entre os I/R-i e seus respectivos Shams, em 24 h houve diminuição de células P2X₂-ir de 13,43% (^β) e em 1 semana de 8,54% (^π). Além disso, foi possível detectar uma diferença entre os isquêmicos (^γ), no grupo I/R-i 1 semana que apresentou um aumento de 64,8% em comparação ao I/R-i 24 h, isto indica o tempo de isquemia pode ser um fator agravante.

Quando cruzado os resultados da densidade com a área do intestino delgado, foi possível observar a estimativa relativa de neurônios de cada classe e sua proporção em todo o intestino.

Nas análises da estimativa das células imunorreativas ao receptor P2X₂ foram encontrados valores entre 905.699,89 a 1.668.176, 46 células em todo intestino delgado (Fig. 16-B). Entre os grupos CT, Sham de 24 h e 1 semana não foi observada diferença significativa. Porém, quando analisados o tempo de reperfusão e a cirurgia, foi observada diferença significativa entre os grupos de 1 semana e 24 horas, resultados semelhantes foram encontrados na densidade do receptor. Os grupos I/R-i de 24 h e 1 semana apresentaram diminuição em relação ao seus Shams, de 27,2% e 9,06%, respectivamente. Entre os isquêmicos, foi observado um aumento de 67,49% do I/R-i 1 semana em comparação ao I/R-i 24 h.

Figura 16 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios P2X₂-ir no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana ([#]comparado ao CT; ^βcomparado ao Sham 24 h; ^πcomparado ao Sham 1 Sem; ^γdiferença entre os grupos de 24 h e 1 semana; ^{*, π} $p < 0,05$ e ^γ $p < 0,01$).

Resultados da densidade de neurônios NOS-ir não mostraram alterações significativas entre os grupos analisados, indicando que essa classe neuronal não é susceptível ao tempo e tratamento nesse modelo experimental (Fig. 17-A).

A estimativa relativa do número de neurônios NOS no intestino não apresentou diferenças significativas entre os grupos. O número estimado de neurônios inibitórios no intestino delgado está entre 272.033-410.389,0 nos grupos analisados (Fig. 17-B).

Figura 17 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios NOS-ir no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

Os neurônios ChAT-ir representam a maior classe de neurônios e apresentaram densidade entre 9184,21-13065,8 No/cm² nos grupos estudados (Fig. 18-A). A análise da densidade de neurônios ChAT-ir não detectou diferença significativa entre os animais CT, Sham 24 h e 1 semana. Quando comparados o fator tratamento foi possível observar uma diminuição de 11,60% do I/R-i 24 h em comparação ao Sham 24 h (^β), e 29,7% no I/R-i 1 semana quando comparado ao Sham 1 semana (^π). Esses resultados demonstram que não houve interação entre tempo e tratamento, indicando que somente a isquemia pode levar a uma diminuição na densidade dos neurônios ChAT-ir.

A estimativa do número de neurônios ChAT-ir no intestino delgado, apresentou valores entre 753.715,98 a 1.215.316,98 (Fig. 18-B). Esses resultados apresentaram diferenças

estatísticas semelhantes ao encontrado na densidade. Não houve diferença entre os grupos CT, Sham de 24 h e 1 semana. O I/R-i de 24 h apresentou uma diminuição de 26,4% em comparação ao Sham 24 h, e o I/R-i 1 semana uma diminuição de 29,77% em comparação ao Sham 1 semana. Esses resultados indicam somente o efeito da oclusão da AMS sobre essa classe neuronal.

Figura 18 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios ChAT-ir no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 h e 1 semana (^βcomparado ao Sham 24 h; ^πcomparado ao Sham 1 semana; ^{β, π} $p < 0,01$).

Os neurônios Calb-ir foram encontrados em uma pequena parte da população neuronal. Os valores encontrados para a densidade desses neurônios estavam entre 1024,32 a 1223,68 No/cm² em todos os grupos estudados (Fig. 19-A). A análise dos neurônios Calb-ir

não detectou diferença significativa entre os grupos analisados, o que indica que a densidade dessa classe neuronal não é alterada em função do tempo e tratamento nesse modelo experimental.

A estimativa da Calb também não apresentou diferença entre os grupos. Essa classe neuronal está distribuída em menor quantidade no intestino delgado, entre 83.644,4 a 120.077,0 (Fig. 19-B).

Figura 19 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios Calb-ir no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

Devido a existência de morfologias distintas evidenciadas pelo anticorpo calbindina, foi feito a separação dos neurônios no plexo mioentérico, segundo a morfologia Dogiel Tipo I e a Dogiel Tipo II.

A densidade dos neurônios Calb-ir com morfologia Dogiel Tipo I estava entre 1105,26 - 1236,83 No/cm² (Fig. 20-A). A estimativa do número de neurônios apresentou valores para Dogiel Tipo I, entre 89.413,05 a 121.133,63 (Fig. 20-B). Não foi detectada diferença estatística entre esses dois parâmetros.

Figura 20 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios Calb-ir com morfologia Dogiel Tipo I, no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

Os neurônios Calb-ir com morfologia Dogiel Tipo II, demonstraram valores para a densidade entre 473,68-578,94 No/cm², sem diferença estatística (Fig. 21-A). Na estimativa neuronal, não foi detectada diferença entre os grupos, que apresentaram valores para Dogiel Tipo II, entre 38.784,81 a 51.374,63 (Fig. 21-B).

Figura 21 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios Calb-ir com morfologia Dogiel Tipo II, no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

A densidade dos neurônios Calb-ir apresentaram valores entre 4342,11- 5710,53 No/cm² (Fig. 22-A). A análise estatística dos dados não detectou diferença entre os grupos CT, Sham de 24 h e 1 semana. Quando analisados os tratamentos não foi possível detectar

diferenças significativas entre Sham e I/R-i, indicando que a cirurgia e/ou isquemia mantém o mesmo comportamento desses neurônios. No entanto, foi observada diferença no fator Tempo, o grupo de 1 semana apresentou um aumento de aproximadamente 31,5% em relação ao grupo de 24 h ($\gamma p < 0,05$).

A estimativa da Calr apresentou valores entre 346.522-481.566 neurônios no intestino delgado (Fig. 22-B). Ao contrário da densidade, a estimativa neuronal não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados.

Figura 22 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios Calr-ir no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana ($\gamma p < 0,05$ diferença entre os grupos 24 h e 1 semana).

A figura 23-A apresenta a análise da densidade da população total neurônios anti-HuC/D-ir. A análise estatística não detectou diferença significativa entre CT, Sham 24 h e 1 semana. A análise do fator Tratamento identificou uma diminuição significativa de 7,87% do I/R-i 24 h em relação ao Sham 24 h e 16,97% do I/R-i 1 semana em relação ao Sham 1 semana. No entanto, quando analisados o fator Tempo não foi observada diferença entre os grupos, indicando que somente a isquemia pode ser responsável por essas alterações.

A estimativa total de neurônios apresentou valores entre 1.345.149,60-1.924.609,36. A análise entre os grupos CT e Sham 24 h e 1 semana não detectou diferenças estatísticas (Fig. 23-B). Os grupos I/R-24 h e I/R-i 1 semana apresentaram diminuição da estimativa em relação aos seus Shams de 23,7% e 16,81%, respectivamente.

Figura 23 - Densidade (A) e Estimativa (B) de neurônios anti-HuC/D-ir no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana (^βcomparado ao Sham 24 h; ^πcomparado ao Sham 1 semana; ^{β, π} $p < 0,05$).

A figura 24-A apresenta a densidade das células S100-ir, que apresentam valores entre 18684,2 - 34802,6 No/cm² nos grupos estudados. Houve aumento significativo no grupo Sham 1 semana de 30,36% em comparação ao CT, e um aumento de 40% em comparação ao Sham 24 h. Quando analisados o fator Tratamento detectou-se diferença entre os grupos: o I/R-i 24 h apresentou um aumento de 40,8% em comparação ao Sham 24 h e o I/R-i 1 semana um aumento de 33,04% em comparação ao Sham 1 semana. Quando analisados o fator Tempo, houve aumento de 32,25% no grupo I/R-i de 1 semana em relação ao I/R-i 24 h. Esses resultados mostram uma interação do fator Tempo e Tratamento.

Por meio desses resultados foi possível observar relações entre neurônios e células gliais: foi observado que o CT e o Sham 24 h apresentam 1,02 célula glial/1 neurônio; o Sham

1 semana 1,30 célula glial/1 neurônio; o I/R-i 24 h 1,56 célula glial/1 neurônio; e o I/R-i 1 semana 2,08 célula glial/1 neurônio.

A estimativa relativa do número de células S100-ir apresentou os valores entre 1.799.766,46 – 2.836.024,40 (Fig. 24-B). A análise da estimativa não apresentou diferença entre os grupos CT, Sham de 24 h e 1 semana. Porém, quando analisados o tempo de reperfusão e a cirurgia, foi observada diferença significativa entre 1 semana e 24 horas. Os grupos I/R-24 h e I/R-i 1 semana apresentaram aumento da estimativa em relação aos seus Shams de 18,30% e 32,04%, respectivamente.

Figura 24 - Densidade de células gliais S100-ir no plexo mioentérico de ratos dos grupos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana ($\#$ comparado ao CT; β comparado ao Sham 24 h; π comparado ao respectivo Sham 1 semana; γ, λ diferença entre 1 semana e 24 h; $\#, \beta, \pi, \lambda$ $p < 0,05$; γ $p < 0,01$)

4.4.3 Análise do perfil neuronal

A análise do perfil, área, diâmetro máximo (DMáx) e mínimo (DMín) dos neurônios NOS, ChAT, Calb e Calr foi realizada para determinar possíveis alterações nas áreas dos perfis dessas classes neuronais.

A análise do perfil dos neurônios NOS-ir demonstrou os valores entre 610,81 μm^2 a 761,69 μm^2 nos grupos analisados. Ao comparar os grupos controle, foi observado uma diminuição significativa de 13,16% no grupo Sham 1 semana em comparação ao Sham 24 h (Fig. 25-A). Quando analisados o Tempo x Tratamento, foi possível detectar um aumento de 24,7% da área do I/R-i 1 semana em relação ao Sham 1 semana indicando um efeito de interação entre esses dois parâmetros (π).

O DMáx dos neurônios NOS-ir apresentaram valores entre 44 μm e 51 μm (Fig. 25-B). Foi observada diminuição de 13,75% do Sham 1 semana em comparação ao CT. Quando analisados o Tempo x Tratamento, detectou-se aumento de 13,67% do DMáx do I/R-i 1 semana em comparação ao Sham 1 semana (π).

Os valores do DMín dos neurônios NOS-ir ficaram entre 17,31 μm e 19,35 μm nos grupos estudados (Fig. 25-C). Não houve diferença significativa entre os grupos CT, Sham 24 h e 1 semana. No entanto, quando analisados os Tratamentos em função do Tempo foi possível observar: um aumento de 2,03% do I/R-i 24 h em comparação ao Sham 24 h; e um aumento de 9,69% do I/R-i 1 semana em comparação ao Sham 1 semana (π).

As áreas dos perfis dos neurônios ChAT-ir apresentou valores para o perfil neuronal variando entre 502,41 μm^2 e 583,68 μm^2 (Fig. 26-A). A análise comparativa não detectou diferença estatística entre os grupos CT, Sham 24 h e 1 semana. Foi observado um aumento de 14,64% do I/R-i de 1 semana em relação ao Sham de 1 semana (π). Os resultados mostram ainda um aumento de 16,06% do I/R-i 1 semana em comparação ao I/R-i 24 h (α). Esses resultados indicam interação entre Tempo x Tratamento.

O DMáx dos neurônios ChAT-ir apresentaram resultados semelhantes a área, onde não foi possível detectar diferença estatística entre o CT, Sham 24 h e 1 semana (Fig. 26-B). Da mesma forma que na área, houve efeito de interação entre Tempo x Tratamento: foi observado um aumento de 11,58% nos neurônios ChAT-ir do grupo I/R-i 1 semana em comparação ao grupo I/R-i 24 h (α). Porém, ao analisar o DMín não foi possível detectar diferença significativa entre os grupos estudados (Fig. 26-C), indicando que as alterações encontradas na área do perfil se devem somente a alteração no DMáx dos neurônios.

Figura 25 - Perfil de neurônios NOS-ir: (A) Área (μm^2); (B) DMáx (μm); e (C) DMín (μm) nos grupos CT, Sham e I/R-i 24 h e 1 semana ($\#$ comparado ao CT; β comparado ao Sham 24 h; π comparado ao Sham 1 semana; $\#$, β , π $p < 0,05$).

Figura 26 - Perfil de neurônios ChAT-ir: (A) Área (μm^2); (B) DMáx (μm); e (C) DMín (μm) nos grupos CT, Sham e I/R-i 24 h e 1 semana (^{π} comparado ao Sham 1 semana; ^{α} comparado ao I/R-i 24 h; ^{π , α} $p < 0,05$).

A análise do perfil dos neurônios Calb-ir demonstrou os valores entre $522,056 \mu\text{m}^2$ a $613,86 \mu\text{m}^2$ nos grupos analisados (Fig. 27-A). Ao comparar os grupos controle, foi observado um aumento significativo nos grupos Sham 24 h e 1 semana em comparação ao CT, de 15,03% e 17,57%, respectivamente. Quando analisados o Tempo x Tratamento, foi possível detectar diferença entre os grupos de 24 h e 1 semana, o I/R-i 1 semana apresentou um aumento de 22,64% da área em relação ao I/R-i 24 h indicando um efeito do tempo entre esses dois parâmetros (^γ).

O DMáx dos neurônios Calb-ir apresentaram valores entre 40,63 μm e 44 μm (Fig. 27-B). Não foi observada entre os grupos CT, Sham 24 h e 1 semana. Os I/R-i não diferiram dos seus Shams, porém houve diferença entre 24 horas e 1 semana. O I/R-i 1 semana apresentou um aumento de 8,29% em comparação ao I/R-i 24 h (^γ).

Os valores do DMín dos neurônios Calb-ir ficaram entre 16,20 μm e 19,44 μm nos grupos estudados (Fig. 27-C). Foi observado um aumento significativo nos grupos Sham 24 h e 1 semana em comparação ao CT, de 13,70% e 13,76%, respectivamente. No entanto, não foi observada diferença entre tempo e tratamento.

Além dessa análise, os neurônios foram divididos em Dogiel Tipo I (corpo celular com muitos dendritos) e Dogiel Tipo II (corpo celular grande com superfície lisa). Essa análise foi realizada, pois o anticorpo calbindina é observado em neurônios com essas duas morfologias.

A mensuração das áreas dos neurônios Dogiel I, apesar de apresentaram grandes variações no perfil, apresentaram áreas entre $466,57 \mu\text{m}^2$ e $560,83 \mu\text{m}^2$ (Fig. 28-A). A análise estatística dos dados não detectou diferenças estatísticas entre os grupos estudados. O DMáx e o DMín também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Fig. 28-B,C).

Os neurônios calbindina com morfologia Dogiel Tipo II apresentaram valores entre $662,87 \mu\text{m}^2$ a $904,69 \mu\text{m}^2$ (Fig. 29-A). Os neurônios Calb-ir com Dogiel Tipo II, do grupo Sham 1 semana diminuem significativamente sua área em 8,47% quando comparados ao grupo Sham 24 h (^β $p < 0,05$). Além disso, houve diminuição significativa de 14,52% do grupo I/R-i 24 h em comparação ao Sham 24 h (^β $p < 0,05$), o que indica efeito da isquemia sobre esses neurônios. Os resultados invertem-se em 1 semana, ocorreu um aumento significativo de 27,45% do grupo I/R-i em comparação ao Sham (^π $p < 0,05$), isto indica que o Tempo piora os efeitos da isquemia. Dessa forma, houve efeito de interação entre Tempo x Tratamento, onde pois houve um aumento de 36,48% do grupo I/R-i 1 semana em comparação ao I/R-i 24 h (^d $p < 0,05$).

O DMáx dos neurônios Calb-ir com morfologia Dogiel Tipo II apresentaram valores entre 44,73 μm e 50 μm (Fig. 29-B). Não foram detectadas diferenças significativas entre CT, Sham 24 h e 1 semana. No entanto, foi observado um aumento de 10,61% do I/R-i 1 semana em comparação ao Sham 1 semana. O I/R-i 1 semana também apresentou um aumento de 13,53% em comparação ao I/R-i 24 h.

O DMín desses neurônios Calb-ir, apresentaram valores entre 19,24 μm a 23,92 μm , (Fig. 29-C). Houve um aumento significativo de 13,25% do Sham 24 h em comparação ao CT. Ocorreu também, um efeito de interação do Tempo x Tratamento, pois ocorreu um aumento de 21,85% do I/R-i 1 semana em relação ao I/R-i 24 h.

Figura 27 - Perfil de neurônios Calb-ir: (A) Área (μm^2); (B) DMáx (μm); e (C) DMín (μm) nos grupos CT, Sham e I/R-i 24 h e 1 semana ([#]comparado ao CT; ^{γ} diferença entre o grupo de 1 semana e 24 h; ^{#, γ} $p < 0,05$).

Figura 28 - Distribuição do perfil de neurônios Calb-ir com morfologia Dogiel I: (A) Área (μm^2); (B) DMáx (μm); e (C) DMín (μm) nos grupos CT, Sham e I/R-i 24 h e 1 semana.

Figura 29 - Perfil de neurônios Calb-ir com morfologia Dogiel II: (A) Área (μm^2); (B) DMáx (μm); e (C) DMín (μm) nos grupos CT, Sham e I/R-i 24 h e 1 semana (^{$\#$} comparado ao CT; ^{β} comparado ao Sham 24 h; ^{π} comparado ao Sham 1 semana; ^{α} comparado ao I/R-i 24 h; ^{$\#$} , ^{β} , ^{π} , ^{α} $p < 0,05$).

As áreas dos perfis dos neurônios Calr-ir apresentaram valores entre 547,33 μm^2 e 723,47 μm^2 (Fig. 30-A). Foi observado um aumento de 32,18% do Sham 1 semana em comparação ao CT. Não houve diferença entre I/R-i e Sham de 24 h e 1 semana. Foi observado um aumento de 4,95% do Sham 24 h e 14,71% do Sham 1 semana em comparação ao CT. No entanto, não ocorreu interação entre Tempo x Tratamento.

O DMáx apresentaram valores entre 39,22-45,61 μm entre os grupos analisados (Fig. 30-B). Foi observado um aumento significativo nos grupos Sham 24 h e 1 semana em comparação ao CT, de 14,91% e 16,29%, respectivamente. Não foi observada diferença entre tempo e tratamento. O DMín desses neurônios apresentou um aumento de 12,92% do Sham 1 semana comparado ao CT (Fig. 30-C). Da mesma forma que ocorreu com a área, não foi detectado efeito de interação entre Tempo x Tratamento. O I/R-i 1 semana apresentou um aumento de 11,46% em comparação ao I/R-i 24 h.

Figura 30 - Perfil de neurônios Calr-ir: Área (μm^2) (A), (B) DMáx (μm); e (C) DMín (μm) dos neurônios imunorreativos a Calretinina nos grupos CT, Sham e I/R-i 24 horas e 1 semana ([#]comparado ao CT; ^γdiferença entre o grupo de 1 semana e 24 h; ^{#,γ} $p < 0,05$).

4.4.4 Análise da distribuição de frequência do perfil neuronal

A análise do histograma de distribuição de frequências das áreas mostrou uma variação na área dos neurônios NOS-ir entre $115 \mu\text{m}^2$ a $1118 \mu\text{m}^2$ no grupo CT, $185 \mu\text{m}^2$ a $1843 \mu\text{m}^2$ no grupo Sham 24 h, de $122 \mu\text{m}^2$ a $1652 \mu\text{m}^2$ no grupo I/R-i 24 h, de $225 \mu\text{m}^2$ a $1391 \mu\text{m}^2$ no grupo Sham 1 semana e $213 \mu\text{m}^2$ a $1893 \mu\text{m}^2$ no I/R-i 1 semana. A análise permitiu observar a proporção maior de neurônios NOS-ir possuem uma área entre 400-800 μm^2 em todos os grupos analisados (Fig. 31-A).

No entanto, a maioria dos neurônios NOS (21,4%) do grupo controle e do Sham 1 semana (24,8%) possui uma área de 500-600 μm^2 , nos grupos Sham, I/R-i de 24 horas e I/R-i 1 semana, possuem a maioria dos neurônios, 22%, 24%, 19,4%, respectivamente, entre as áreas dos perfis entre 600-700 μm^2 .

O histograma do DMáx apresentou a maioria dos neurônios situados na faixa de 30-60 μm , em todos os grupos analisados. O entre 40-50 μm foi verificado entre os grupos CT, Sham 24 h e I/R-i 24 h e 1 semana, porém o Sham 1 semana apresenta uma frequência maior de neurônios com 30-40 μm (Fig. 31-B). O DMín. apresentou a maioria dos neurônios situados na faixa de 12-24 μm , sendo o mais frequente 15-18 μm nos grupos CT, Sham 24 h e 1 semana, porém o I/R-i 1 semana apresenta uma frequência maior de DMín entre 18-21 μm (Fig. 31-C).

Figura 31 - Histograma de distribuição de frequências das áreas (μm^2) (A), DMáx. (μm) (B) e Dmín (μm) (C) dos neurônios mioentéricos imunorreativos à NOS no íleo de ratos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

A análise do histograma de distribuição de frequências das áreas mostrou uma variação na área dos neurônios ChAT-ir entre $111 \mu\text{m}^2$ e $1427 \mu\text{m}^2$ no CT, de $146 \mu\text{m}^2$ a $1672 \mu\text{m}^2$ no grupo Sham 24 h, de $140 \mu\text{m}^2$ a $1241 \mu\text{m}^2$ no I/R-i 24 h, de $125 \mu\text{m}^2$ a $1641 \mu\text{m}^2$ no Sham 1 semana e de $160 \mu\text{m}^2$ a $1543 \mu\text{m}^2$ no I/R-i 1 semana (Fig. 32-A).

Por meio da análise do histograma de distribuição de frequências das áreas foi possível verificar que a maior proporção de neurônios ChAT-ir possui uma área entre $300\text{-}700 \mu\text{m}^2$ em todos grupos analisados (Fig. 32-A). Sendo, a maioria dos neurônios ChAT-ir (25,2%) do grupo controle apresenta uma área situada entre $400\text{-}500 \mu\text{m}^2$. Nos grupos Sham e I/R-i de 24 h e Sham 1 semana a maioria dos neurônios, 19,8%, 25,6% e 21,4%, respectivamente, apresentando uma área do perfil situado entre $300\text{-}400 \mu\text{m}^2$, porém o I/R-i 1 semana 19% dos neurônios apresentaram área entre $500\text{-}600 \mu\text{m}^2$.

O histograma do DMáx dos neurônios ChAT-ir apresentou a maioria dos neurônios situados na faixa de $20\text{-}50 \mu\text{m}$, nos três grupos analisados, sendo a o valor entre $30\text{-}40 \mu\text{m}$ o mais encontrado em todos os grupos (Fig. 32-B). O Dmín. apresentou a maioria dos neurônios situados na faixa de $12\text{-}24 \mu\text{m}$, sendo o mais frequente $15\text{-}18 \mu\text{m}$ em todos os grupos (Fig. 32-C).

Figura 32 - Histograma de distribuição de frequências das áreas (μm^2) (A), DMáx. (μm) (B) e Dmín (μm) (C) dos neurônios mioentéricos imunorreativos à ChAT no íleo de ratos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

Os neurônios Calb-ir apresentaram variação no perfil da área, apresentando valores entre $100\ \mu\text{m}^2$ e $2200\ \mu\text{m}^2$ nos grupos estudados (Fig. 33-A). A análise do histograma de distribuição de frequências das áreas demonstra que a maior proporção de neurônios Calb está entre $200\text{-}800\ \mu\text{m}^2$ em todos os grupos analisados (Fig. 33-A). As maiores áreas estão situadas entre $300\text{-}400\ \mu\text{m}^2$ para o CT (22,51%), o Sham 24 h (17,19%), entre $300\text{-}400\ \mu\text{m}^2$ (19,44%) e $500\text{-}600\ \mu\text{m}^2$ (19,44%) para o I/R-i 24 h; entre $400\text{-}500\ \mu\text{m}^2$ (16,84%) e $500\text{-}600\ \mu\text{m}^2$ (16,49 μm^2) para o Sham 1 semana e entre $400\text{-}500\ \mu\text{m}^2$ para o I/R-i 1 semana (17,22%).

O histograma do DMáx de neurônios Calb apresentou a maioria dos valores entre $30\text{-}40\ \mu\text{m}$ no CT (39,60%), Sham 24 h (42,71%), I/R-i 24 h (40,44%), Sham 1 semana (35,74%) e i/R-i 1 semana (34,44%) (Fig. 33-B).

O Dmín apresentou valores mais encontrados entre $15\text{-}18\ \mu\text{m}$ no CT (26,21%) e Sham 24 h (25,26%), Sham 1 semana (25,43%) e I/R-i 1 semana (22,85%) e entre $12\text{-}15\ \mu\text{m}$ no I/R-i 24 h (26,65%) (Fig. 33-C).

Figura 33 - Histograma de distribuição de frequências das áreas (μm^2) (A), DMáx. (μm) (B) e Dmín (μm) (C) dos neurônios mioentéricos imunorreativos à Calb no fíleo de ratos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

Os neurônios Calb-ir com morfologia Dogiel Tipo I apresentaram grande variação em tamanho, com valores do perfil da área entre $172 \mu\text{m}^2$ e $1666 \mu\text{m}^2$ para o CT, $125 \mu\text{m}^2$ a $1909 \mu\text{m}^2$ para o Sham 24 h, de $151 \mu\text{m}^2$ a $2184 \mu\text{m}^2$ I/R-i 24 h, de $194 \mu\text{m}^2$ a $1809 \mu\text{m}^2$ para o Sham 1 semana e de $175 \mu\text{m}^2$ a $1707 \mu\text{m}^2$ para o I/R-i 1 semana (Fig. 34-A).

A análise do histograma de distribuição de frequências das áreas demonstra que a maior proporção de neurônios Dogiel Tipo I esta entre $200\text{-}800 \mu\text{m}^2$ em todos os grupos analisados (Fig. 34-A). Desses neurônios as maiores áreas estão situadas entre $300\text{-}400 \mu\text{m}^2$ para o CT (28,93%), o Sham 24 h (25,68%), o I/R-i 24 h (27,31%), o Sham 1 semana (25,26%) e entre $400\text{-}500 \mu\text{m}^2$ para o I/R-i 1 semana (25,5%).

O histograma do DMáx de neurônios Dogiel Tipo I apresentou a maioria dos neurônios entre $30\text{-}40 \mu\text{m}$ no CT (45%), Sham 24 h (44,74%), I/R-i 24 h (38,73%), Sham 1 semana (36,85%) e i/R-i 1 semana (41,5%) (Fig. 34-B). O Dmín apresentou valores variados com os valores mais encontrados entre $12\text{-}15 \mu\text{m}$ no CT (31,86%) e I/R-i 24 h (31,71%), e entre $15\text{-}18 \mu\text{m}$ no Sham 24 h (30,73%), Sham 1 semana (31,72%) e I/R-i 1 semana (32%) (Fig. 34-C).

A morfologia Dogiel Tipo II apresentou menor variação em tamanho, porém maiores, com valores de mínimo e máximo de $518 \mu\text{m}^2$ a $1465 \mu\text{m}^2$ para o CT, de $445 \mu\text{m}^2$ a $1467 \mu\text{m}^2$ para o Sham 24 h, $422 \mu\text{m}^2$ a $1701 \mu\text{m}^2$ para o I/R-i 24 h, de $403 \mu\text{m}^2$ a $1164 \mu\text{m}^2$ para o Sham 1 semana e $454 \mu\text{m}^2$ a $2034 \mu\text{m}^2$ para o I/R-i 1 semana (Fig. 35-A).

A análise das frequências dos neurônios Dogiel Tipo II permitiu identificar quais as faixas da área estão mais presentes nessa classe neuronal, pois entre $600\text{-}700 \mu\text{m}^2$ estão 33,33% dos neurônios CT e 24,76% do Sham 1 semana, entre $700\text{-}800 \mu\text{m}^2$ estão 25,19% no Sham 24 h; entre $500\text{-}600 \mu\text{m}^2$ estão 31,52% do I/R-i 24 h; e entre $800\text{-}900 \mu\text{m}^2$ estão 23,52% do I/R-i 1 semana. (Fig. 35-A).

O DMáx desses neurônios foi observado mais frequentemente com $30\text{-}60 \mu\text{m}$ em todas as classes neuronais (Fig. 35-B). O grupo CT apresentou a maioria de seus neurônios (42,30%) com $40\text{-}50 \mu\text{m}$, o Sham 24 h e o I/R-i 24 h apresentaram 38,58% e 44,56% respectivamente, entre $30\text{-}40 \mu\text{m}$, o Sham 1 semana com 43,80% e o I/R-i 1 semana com 40,19% entre $40\text{-}50 \mu\text{m}$. O Dmín apresentou a maioria dos neurônios situados na faixa de $9\text{-}24 \mu\text{m}$ em todos os grupos, sendo o mais frequente entre $18\text{-}21 \mu\text{m}$ no CT, $21\text{-}24 \mu\text{m}$ no Sham e I/R-i 24 h e 1 semana (Fig. 35-C).

Figura 34 - Histograma de distribuição de frequências das áreas (μm^2) (A), DMáx. (μm) (B) e Dmín (μm) (C) dos neurônios mioentéricos imunorreativos à Calb com morfologia Dogiel Tipo I no íleo de ratos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

Figura 35 - Histograma de distribuição de frequências das áreas (μm^2) (A), DMáx. (μm) (B) e Dmín (μm) (C) dos neurônios mioentéricos imunorreativos à Calb com morfologia Dogiel Tipo II no íleo de ratos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

A análise do histograma de distribuição de frequências das áreas demonstra que a maior proporção de neurônios Calr-ir possui uma área entre 300-800 μm^2 em todos os grupos analisados (Fig. 36-A). Sendo, a maioria dos neurônios Calr-ir do grupo CT (24,6%) e I/R-i 24 h (19%) apresentando uma área situada entre 500-600 μm^2 , Sham 24 h (19,4%) apresentando uma área situada entre 600-700 μm^2 , Sham 1 semana (17,6%) situado entre 700-800 μm e I/R-i 1 semana (18,4%) situado entre 500-600 μm .

O histograma do DMáx dos neurônios Calr-ir apresentou a maioria dos neurônios situados na faixa de 20-55 μm , em todos grupos analisados, sendo o valor entre 30-40 μm o mais encontrado nos grupos CT, Sham 24 h, I/R-i 24 h e 1 semana, porém o Sham 1 semana apresentou a maioria dos neurônios com 40-50 μm (Fig. 36-B). O Dmín apresentou a maioria dos neurônios situados na faixa de 12-24 μm , sendo o mais frequente de 18-21 μm no CT, Sham 24 h e 1 semana, I/R-i 1 semana e entre 15-18 μm no I/R-i 24 h (Fig. 36-C).

Figura 36 - Histograma de distribuição de frequências das áreas (μm^2) (A), DMáx. (μm) (B) e Dmín (μm) (C) dos neurônios mioentéricos imunorreativos à Calr no íleo de ratos CT, Sham e I/R-i de 24 horas e 1 semana.

5.1 Considerações sobre o modelo de Isquemia/Reperusão intestinal

A escolha da oclusão da artéria mesentérica foi devido a sua importância na prática clínica, a AMS é mais suscetível a episódios de embolia intestinal, chegando a uma incidência de 50% dos casos de isquemia aguda mesentérica (GORE et al., 2008). Isso ocorre devido ao amplo ângulo de origem da AMS e seu curso paralelo à aorta. Êmbolos maiores geralmente obstruem dentro dos 3-8 cm distal à origem AMS. Em contraste, a trombose aguda mesentérica geralmente ocorre no primeiro local de ramificação da AMS (ECKSTEIN, 2003). Além da AMS, as artérias mais comprometidas por obstrução são do tronco celíaco e mesentérica inferior (SIMI, 2002).

Apesar dessa grande incidência de obstrução arterial, a isquemia mesentérica aguda pode ter também etiologia venosa, e resulta da redução do fluxo sanguíneo causado por uma trombose da veia mesentérica. Porém, essa obstrução é menos comum do que oclusão arterial e oferece um menor risco de necrose intestinal e, portanto, redução da mortalidade (BERLAND; OLDENBURG, 2008; MENON et al., 2005; SREENARASIMHAIAH, 2003).

No entanto outros estudos mostram que a oclusão venosa parece para causar dano tecidual mais grave e diminuição nos níveis de P-selectina e ATIII em comparação com a oclusão arterial. Isto sugere que estas moléculas são sensíveis a mudanças na intensidade de lesões histológicas e, portanto, podem ser parcialmente responsáveis pelas diferenças fisiopatológicas entre a oclusão venosa e arterial. A oclusão arteriovenosa demonstra maior dano tecidual e maiores níveis de TNF- α em comparação à oclusão arterial. As menores lesões foram atribuídas à oclusão arterial. (KIMURA et al., 2003; GUZMÁN-DE LA GARZA et al., 2009). Estudos com a oclusão de artérias e veias ileais apresentaram danos mais pronunciados aos plexos entéricos (LINDESTROM; EKBLAD, 2004; PALOMBIT, 2010; PIAO et al., 1999; RIVERA et al., 2009; VENTURA-MARTINEZ, 2008).

No presente trabalho foi realizada a oclusão somente da AMS, as artérias colaterais não foram obstruídas. Trabalhos como o de Calcina et al. (2005), Rivera et al. (2009) e Palombit (2010), ocluíram os ramos colaterais, além dos ramos principais, nestes casos, os efeitos da isquemia sobre neurônios do intestino são agravados nas primeiras horas de reperusão. A análise dos nossos resultados demonstraram que ao ocluir somente a AMS, os danos aos neurônios são observados nos períodos tardios de reperusão.

Apesar das alterações ocasionadas pela isquemia, estudos demonstram que o ato da cirurgia e da manipulação podem levar alterações no trato gastrointestinal. No presente estudo

foi observado alterações na densidade, colocalização e perfil neuronal dos grupos Sham de 24 h e 1 semana. Simmy et al. (2001) observaram que ratos Wistar submetidos a cirurgia abdominal com manipulação intestinal, apresentavam alterações no epitélio intestinal com diminuição da viabilidade celular e o rendimento nas células da cripta, com alterações na fisiologia gastrintestinal.

A barreira intestinal pode sofrer alterações em certas condições patológicas, como choque, trauma ou estresse cirúrgico, que leva a liberação de radicais livres de oxigênio, resultando em translocações bacterianas ou de endotoxinas do lúmen intestinal para a circulação sistêmica (MARSHALL; CHRISTO; MEAKINS, 1993).

Para avaliar os efeitos da isquemia intestinal sobre a morfologia do plexo mioentérico, foi escolhido rato Wistar. O rato apresenta facilidade no manejo, adequabilidade ao protocolo e disponibilidade do trabalho. Além disso, é um animal resistente à anestesia tanto inalatória quanto intravenosa, apresenta porte pequeno, de fácil manuseio cirúrgico para abordagem das artérias e, ainda, baixo custo (RIBEIRO; YOSHIDA, 2005). Outro fator importante é que esse animal simula alterações bioquímicas e estruturais, além de provocar distúrbio hemodinâmico e fisiopatológico da restauração vascular pós-isquemia no intestino (AOKI, 1988; MYERS E HERNANDEZ, 1992).

5.2 Considerações sobre a Morfologia, Código Químico, Receptor P2X₂ e sua Colocalização no SNE

A demonstração imunohistoquímica da presença ou ausência de substâncias neuronais dentro de células nervosas (código químico) tem sido um dos principais métodos para identificar diferentes tipos de neurônios no sistema nervoso entérico (BECK et al., 2009; FURNESS, 2006).

Esse trabalho utilizou marcadores neuronais, descritos pelos autores Castelucci et al. (2002a); Furness, (2006, 2000) e Poole et al. (2002). No plexo mioentérico foi utilizado os seguintes imunomarcadores: a NOS para os neurônios motores inibitórios, para IPANs a Calb, para neurônios motores excitatórios a ChAT, para os interneurônios a Calr, como pan-neuronal foi utilizado o marcador anti-HuC/D, e para as células gliais o S-100.

Na análise qualitativa não foram observadas diferenças nos grupos CT, Sham e I/R-i 24 h e 1 semana com relação a imunorreatividade dos neurônios imunorreativos à NOS, à ChAT, à Calb, à Calr, ao anti-HuC/D e ao S-100.

Os neurônios do plexo mieontérico, de maneira geral, apresentaram morfologias similares em todos os grupos estudados conforme Gabella (1971). Segundo o estudo, os neurônios entéricos do íleo apresentam uma grande variabilidade em sua forma, estrutura e tamanho. As células nervosas têm um núcleo grande, redondo ou oval, muitas vezes disposto excêntricamente, com um ou dois nucléolos proeminentes (GABELLA, 1971). As células gliais entéricas dos grupos estudados, apresentaram-se numerosas e situadas ao redor dos neurônios do plexo mioentérico e, próximas as fibras nervosas. Essas células apresentam corpos celulares menores que os dos neurônios, conforme descrito por Gabella (1971).

Segundo DOGIEL, 1899⁸ (apud BREHMER; SCHRÖDL; NEUHUBER, 2002), os neurônios apresentam duas morfologias distintas: Dogiel Tipo I, são neurônios menores com dendritos na superfície, e Dogiel Tipo II que são neurônios grandes com superfície lisa. De maneira geral, os neurônios NOS-ir, ChAT-ir e Calr-ir possuem a Dogiel Tipo I. No entanto, a Calb-ir possui duas morfologias distintas, a Dogiel Tipo I e II (FURNESS, 2006; SAYEGH; RITTER, 2003).

Em relação ao receptor P2X₂, foi encontrado na membrana citoplasmática e citoplasma em todas as classes neuronais e em todos os grupos analisados. Esses resultados estão de acordo com a literatura (CASTELUCCI et al., 2002b, MISAWA et al., 2010, PAULINO et al., 2011, XIANG; BURNSTOCK, 2004). Porém, no presente estudo, foi observada que a intensidade da imunorreatividade estava diminuída em alguns neurônios no grupo I/R-i de 24 horas em relação aos outros grupos. Estes dados concordam com Paulino et al. (2011) que observaram diminuição da expressão do receptor P2X₂ após 4 horas de reperfusão, e com Palombit (2010) que observou diminuição do receptor P2X₇ na reperfusão de I/R-i das aa. ileais. Outros protocolos do laboratório têm demonstrado alterações na expressão do receptor P2X₂ no plexo mioentérico na desnutrição e renutrição do intestino delgado (MISAWA et al., 2010) e dos receptores P2X₂ e P2X₇ no intestino grosso (GIROTTI, 2008) e na obesidade (MIZUNO, 2010). Essas alterações na imunorreatividade foram também observadas nos trabalhos de Xiang e Burnstock (2004), que verificaram cerca de 20% de células com baixa marcação para o P2X₂, o que indica a formação de heteromultímeros com o receptor P2X₃.

Estudos mostram que efeitos prolongados de estimulação por um agonista, podem resultar em mudanças na localização e quantidade de receptores P2 de superfície celular. O

⁸ Dogiel, A.S., 1899. Ueber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugethiere. **Arch. Anat. Physiol. Anat. Abt.** (Leipzig), 130– 158.

ciclo de receptores para dentro e para fora da membrana plasmática fornece um meio de modulação da densidade do receptor por regulação da internalização ou avaliação da inserção (BURRONE; MURTHY, 2001).

Possíveis mecanismos que levam esse acionamento da internalização do receptor podem incluir fluxo de íons ou mudanças conformacionais do canal iônico, que levam ao seu aumento, devido à dessensibilização em resposta ao ATP. Inicialmente, pensava-se que a dilatação dos poros era uma característica distintiva do P2X₇ (SURPRENANT et al., 1996), mas outros estudos têm sugerido que, sob certas condições, os receptores P2X₂, P2X₄, e P2X_{2/3} também podem aumentar (BOBANOVIC; ROYLE; MURRELL-LAGNADO, 2002; KHAKH et al, 1999; VIRGINIO et al, 1999).

No entanto, Bobanovic, Royle e Murrell-Lagnado (2002) demonstraram por meio da marcação com anticorpos específicos para receptores, em cultura de células, que o receptor P2X₄ são submetidos a uma rápida internalização constitutiva e subsequente reinserção da membrana plasmática, enquanto P2X₂ se mantém estável. Segundo esses autores essa relativa estabilidade do P2X₂ pode ser devido a uma interação com outras proteínas, que não foram analisadas nesse estudo.

As mudanças na expressão dos receptores purinérgicos P2X₁₋₇ nos neurônios, são frequentemente observadas não somente como uma consequência da maturação neuronal e diferenciação, mas também após diferentes espécies de injúrias agudas no SNC como isquemia, hipóxia, estresse mecânico, axoniotomia e inflamação. Os mecanismos purinérgicos podem estar envolvidos nas etiopatogenias de muitas condições neurodegenerativas, especialmente por causa da grande liberação extracelular de ATP, adenosina e outros neurotransmissores (FRANKE; ILLES, 2006; FRANKE; KRÜGEL; ILLES, 2006). Em situações como a doença intestinal inflamatória (DII), Yiangou et al. (2001) verificaram aumento da expressão do receptor purinérgico P2X₃, sugerindo que mudanças no receptor possam ocasionar alterações na motilidade e na dor.

Na análise da parede intestinal pelo método Hematoxilina-Eosina, não foi observada alterações na vilosidades em todos os grupos analisados. Esses resultados concordam com Pontell et al. (2011), que observaram que oclusão de 60 minutos das aa. ileais, de camundongos, a mucosa era mais severamente danificada após 1 a 3 horas depois da isquemia, após um dia de reperfusão os vilos voltavam ao normal, porém mais curtos que os controles, com 1 semana já encontravam-se normais. O aparente aumento das células

caliciformes, também foi observado no trabalho de Lindeström e Ekblad (2004), em isquemia de ramos da AMS com uma reperfusão de 24 horas.

No presente trabalho, as criptas ou glândulas intestinais também foram características em todos os grupos analisados. No entanto, grupo I/R-i 24 h, a região das glândulas intestinais pareceram estar aumentadas e as células caliciformes em maior quantidade quando comparados com os outros grupos. Além disso, a musculatura circular parece estar mais espessa no grupo I/R-i 24 h. Pontell et al. (2011) também observaram danos nas camadas musculares, com a presença de núcleos picnóticos, e corpos apoptóticos, a camada da serosa estava comumente interrompida. Além disso, neste estudo, foi observada a presença de vacúolos ao redor do plexo mieontérico, que foi maior em 24 horas e, com 1 semana desaparecem (PONTELL et al., 2011). No presente trabalho foi observado efeitos similares, o plexo mioentérico parece estar com a presença de mais vacúolos no I/R-i 24 h quando comparados com os outros grupos. No entanto, ao contrário desse estudo, não foram observados eosinófilos ao redor do plexo mioentérico em todos os grupos analisados, que pode ter ocorrido pela diferença do protocolo utilizado e pela espécie do animal.

Em trabalhos realizados com mesmo protocolo de isquemia da AMS com 45 min de oclusão, com período de 3 semanas de reperfusão, foram observadas alterações nas células ganglionares do plexo mioentérico, que estavam com aparência esponjosa ou espumoso, com a presença de muitos vacúolos e o núcleo neuronal estava irregular, com sinais degenerativos (SILVA; MEIRELLES; BUSTORFF-SILVA, 2007). Em outros trabalhos com a AMS, foram observadas poucas alterações histológicas com 24 h de reperfusão, sendo maior com 3 dias (KOTANI et al., 2009). Estudos realizados com isquemia de 15, 30, 60 e 90 minutos da AMS, seguidas de reperfusão de 15, 30, 45, 60 e 75 minutos, demonstrou ter maiores danos na mucosa nos períodos iniciais de isquemia intestinal (IKEDA et al., 1998).

A análise quantitativa da colocalização desse estudo foi observado que os neurônios NOS-ir colocalizaram com o receptor $P2X_2$ em 100%, não diferindo nos grupos analisados. Castelucci et al (2002b) observaram que 91% dos neurônios NOS-ir, do plexo mioentérico, eram também imunorreativos ao receptor no íleo $P2X_2$ de cobaias. Essa diferença pode ser devido a variações entre espécies de animais (FURNESS, 2006). Misawa et al. (2010) também observaram colocalização dos neurônios NOS-ir com o receptor em cerca de 99%, no plexo mioentérico de ratos desnutridos e renutridos. No entanto, Paulino et al. (2011) observaram 57% de colocalização de neurônios NOS-ir com o receptor $P2X_2$ em animais do grupo I/R-i com 4 horas de reperfusão.

Na análise inversa, células P2X₂-ir que colocalizam com neurônios NOS-ir, mostraram uma diminuição significativa dos neurônios do I/R-i de 1 semana quando comparado com o I/R-i 24 horas, indicando efeito da isquemia com influência do tempo sobre esses animais. Esses resultados estão de acordo com Paulino et al. (2011), que observaram uma diminuição da colocalização do P2X₂ com a NOS na I/R-i. No entanto, esses autores verificaram que pode ter ocorrido essa diminuição em decorrência da diminuição da expressão do receptor.

Os neurônios ChAT-ir colocalizaram com o receptor P2X₂ ao redor de 98% de maneira geral, como observado em Misawa et al. (2010). O receptor P2X₂ apresentou uma diminuição na colocalização com os neurônios ChAT-ir no I/R-i 1 semana. Provavelmente essa alteração se deve a um aumento na colocalização do receptor com outro tipo de celular. Resultados do laboratório tem demonstrado alterações nos neurônios ChAT-ir com tempo de reperusão de 4 horas, no grupo I/R-i houve uma grande redução do número de neurônios colocalizados com o receptor P2X₂ (PAULINO et al., 2011).

O presente trabalho demonstrou que os neurônios Calb-ir colocalizaram com o receptor P2X₂, nos grupos isquêmicos quando comparados aos controles. Esses neurônios, também chamados de IPANs, colocalizaram com o receptor P2X₂ entre 93% a 95% em todos os grupos analisados, resultados similares foram encontrados por Misawa et al. (2010) em protocolo de desnutrição e renutrição. Castelucci et al. (2002b) encontraram uma proporção semelhante em cobaias, cerca de 90% dos neurônios Calb-ir eram imunorreativos também ao receptor P2X₂.

Estudos demonstram que a calbindina apresenta um efeito de proteção em neurônios em processos de isquemia ou de excitotoxicidade, nestes processos, ela é expressa pelos neurônios e em astrócitos (BAIMBRIDGE; CELIO, 1992; GOODMAN et al., 1993; TOYOSHIMA et al., 1996; YENARI et al., 2001). Isso se deve também ao seu papel de regulação da concentração intracelular do Ca²⁺, que é expressa em populações específicas do SNC (GOODMAN et al., 1993; YENARI et al., 2001) e sistema nervoso entérico (CREMA; FRIGO; LECCHINI, 1970; LANGLEY; MAGNUS, 1905; FURNESS et al., 1995).

Os números relativos de neurônios IPANs parecem depender da espécie e em relação ao tamanho do animal (QU et al., 2008). No intestino delgado de camundongos e cobaias, representam cerca de 25% dos neurônios IPANs, enquanto que em humanos, eles compreendem cerca de 10% da população (WEIDMANN et al., 2007), no intestino delgado de suínos de cerca de 8% (BREHMER; SCHRÖDL; NEUHUBER, 2002) e em ovinos cerca de 6% (CHIOCCHETTI et al., 2006).

Xiang e Burnstock (2004) verificaram que a maioria dos neurônios Calb-ir estavam fracamente imunorreativos ao receptor P2X₂, embora houvesse neurônios fortemente imunorreativos ao receptor. Nesse estudo, o receptor P2X₂ colocalizaram com a calbindina em 10% do total de neurônios. Nossos resultados foram semelhantes, entre 6-7%, dos receptores P2X₂ eram Calb-ir, que não se alteraram com o protocolo de isquemia. No entanto, Paulino et al. (2011) observaram que com 4 horas de reperfusão não havia imunomarcagem para neurônios calbindina, o que sugere que esses neurônios são mais susceptíveis a períodos iniciais de reperfusão.

No presente trabalho, foi observado que todos os neurônios Calr-ir colocalizam com o receptor P2X₂. Esses resultados também foram obtidos por Paulino et al. (2011) e Palombit (2010) com o receptor P2X₇, e não se alteraram com a isquemia com reperfusão intestinal. Essa proporção se mantém nos animais submetidos a desnutrição e renutrição protéica (MISAWA et al., 2010) e obesidade (MIZUNO, 2010). Em trabalhos realizados em cobaias, não foi possível observar neurônios Calr que também são imunorreativos ao receptor (CASTELUCCI et al., 2002b), possivelmente, isto varia de acordo com a espécie.

A análise inversa mostrou que 19-21% dos neurônios P2X₂-ir eram também Calr-ir no íleo. Esse valor encontrado está situado dentro da proporção de neurônios ChAT-ir, já que esses neurônios são colinérgicos. Xiang e Burnstock (2004) observaram que 25% do número total de células imunorreativas ao receptor P2X₂ também eram Calr-ir, proporção semelhante ao encontrado no nosso trabalho. No entanto, esses autores observaram que 56% dos neurônios Calr-ir eram também P2X₂-ir. Qu et al (2008), por meio de dupla marcação com pan-neuronal anti-HuC/D em camundongos, observaram que $52,0 \pm 1,7\%$ dos neurônios são imunorreativos a calretinina. Destes, $30,3 \pm 4,2\%$ eram neurônios Dogiel Tipo II e $42,7 \pm 6,0\%$ foram do Dogiel Tipo I.

Os neurônios NOS-ir apresentaram 100% de colocalização com o anti-HuC/D, marcador pan-neuronal. Isso comprova que todas as células NOS-ir são neurônios. A análise inversa mostra que a população de neurônios inibitórios no plexo mioentérico do íleo varia entre 20 a 28% nos grupos estudados. Essa proporção foi semelhante ao encontrado em outros estudos, Qu et al. (2008) observaram 26% de neurônios NOS-ir no intestino delgado de camundongos. No entanto, houve um aumento de neurônios NOS-ir na colocalização com o pan neuronal dos grupos Sham 24 h e 1 semana em relação ao CT. Além disso, foi observado um aumento do I/R-i de 1 semana em comparação ao de 24 h. Esses resultados indicam que os dois fatores a cirurgia de oclusão e o tempo de reperfusão influenciam esses resultados.

A presença de neurônios NOS-ir no plexo mioentérico foram verificados por Sang e Young (1996) em camundongos, por meio de dupla marcação com outro marcador pan neuronal o NSE (enolase específica neuronal), o NOS-ir foi observado em 26% de todos os neurônios do plexo mioentérico do íleo. No estômago e no intestino delgado de cobaia, os neurônios NOS que contém VIP $\pm$ NPY compreendem 20-28% do total de neurônios mioentéricos (COSTA et al. 1992a; COSTA et al, 1992b; FURNESS et al. 1994; SCHEMANN; SCHAAF; MÄDER, 1995; UEMURA; POMPOLO; FURNESS, 1995).

Essas porcentagens mudam um pouco em humanos, no intestino delgado, Beck et al. (2009), verificaram que 38% de todos os neurônios são NOS-ir contra 52% que são imunorreativos ao ChAT. Nesse mesmo estudo, quando observado o cólon, foi encontrado menos neurônios ChAT-ir (36%) do que NOS-ir (51%). No entanto, Murphy et al. (2007) relatou a relação inversa, mais neurônios ChAT-ir (48%) do que neurônios NOS-ir (43%).

A imunomarcação do ChAT com o pan-neuronal anti-HuC/D demonstrou que essa classe são neurônios. A análise demonstra ainda que, possivelmente esses neurônios não alteraram o seu código químico em decorrência da isquemia. Sendo assim a proporção de neurônios ChAT-ir foi aproximadamente 75% da população de todos os neurônios anti-HuC/D, estes dados são semelhantes aos da literatura (MANN; FURNESS; SOUTHWELL, 1999; PALOMBIT, 2010). Furness et al. (2004) observaram em cobaias, uma proporção de 79% de neurônios colinérgicos no intestino delgado. Qu et al. (2008) observaram uma proporção de cerca de 72% de neurônios no intestino delgado de camundongos.

A análise do pan neuronal anti-HuC/D mostrou que quase a totalidade desses neurônios (99%) possuem o receptor P2X₂. A análise inversa mostrou um aumento de neurônios que eram imunorreativos somente ao receptor P2X₂, nos animais Sham 1 semana e I/R-i 24 h e 1 semana. Provavelmente essa alteração se deve a um aumento na colocalização do receptor com outro tipo de célula, possivelmente células gliais entéricas. Trabalhos do laboratório de dupla marcação do receptor P2X₂ com o pan-neuronal anti-HuC/D, tem demonstrado que aproximadamente 6% das células imunorreativas ao P2X₂ não são neurônios e a dupla marcação deste receptor com a proteína S-100 (marcador de célula glial entérica) demonstra que aproximadamente 5% das células gliais são imunorreativas ao receptor (MENDES et al., 2011).

Com relação as células gliais entéricas imunomarcadas com S100 nos grupos analisados, apresentaram colocalização com o receptor P2X₂ em 87 a 92% e a análise inversa mostrou colocalização em 38 a 63% das células. Resultados do nosso laboratório demonstram

que a dupla marcação deste receptor com a proteína S-100 apresenta 30% de colocalização (MENDES et al., 2011).

A colocalização das células imunorreativas ao S100-ir com o receptor P2X₂ apresentou um aumento em 24 horas, e com 1 semana essas células voltam a ter colocalização conforme o grupo controle. No entanto, a proporção de células P2X₂-ir que são S100-ir aumenta em 1 semana. Ao analisar a densidade de células P2X₂-ir e de células S100-ir, que será discutida posteriormente, verificamos que houve um aumento desse parâmetro, indicando que essa alteração na proporção pode ser devido a esse aumento de células/cm².

Abbrachio et al. (2009) tem demonstrado a presença de receptor P2X nas células gliais. Estudos mostram que a sinalização purinérgica facilita a intervenção glial na transmissão sináptica, através da comunicação intercelular mediada pelo ATP, e o envolvimento do ATP, na regulação da transmissão sináptica através de receptores purinérgicos nas membranas pré e pós-sináptica. Essa sinalização interage com outras moléculas de sinalização intercelular (neurotransmissores e fatores tróficos), e sistemas de segundo mensageiro (cálcio e cAMP), que são reguladores chave da função sináptica e da plasticidade (FIELDS; BURNSTOCK, 2006).

No SNC, a adenosina e o ATP induzem a proliferação celular astrogliar e a formação de astrócitos reativos, como demonstrado pelo aumento da expressão do marcador GFAP e do alongamento de processos GFAP-positivos (ABBRACCHIO et al., 1996).

A liberação de citocinas e fatores de crescimento podem ser afetados por receptores purinérgicos, e podem influenciar a proliferação celular (FIELDS; BURNSTOCK, 2006). Danos celulares podem resultar na liberação de grandes quantidades de ATP para o meio extracelular, que levam ao desencadeamento de respostas celulares ao trauma e isquemia (ZIMMERMANN, 1996). Nucleosídeos e nucleotídeos liberados a partir de células em processo de morte celular poderiam induzir astrogliose reativa, que envolve alterações marcantes na morfologia e proliferação de astrócitos (NEARY et al., 1999; HINDLEY et al., 1994). O ATP estimula proliferação de microglia e atua como um poderoso atrativo químico para o local da lesão cerebral (DAVALOS et al., 2005).

5.3 Densidade Neuronal

Alterações na densidade de neurônios tem sido observados em várias regiões do trato gastrointestinal e em vários tipos de protocolos como a desnutrição (BRANDÃO et al., 2003;

CASTELUCCI et al., 2002b; GIROTTI, 2008; GOMES et al., 2006; MISAWA et al., 2010; SANT'ANA et al., 1997), na obesidade (MIZUNO, 2010), na isquemia intestinal (CALCINA et al., 2005; PALOMBIT, 2010; PAULINO et al., 2011; RIVERA et al., 2009).

Em relação a densidade do receptor P2X₂, foi encontrado uma diminuição no grupo I/R-i 24 h, resultados semelhantes foram observados no estudo de I/R por Paulino et al. (2011). Isto pode ser uma resposta a liberação de ATP para o meio extracelular causado por processos fisiopatológicos em eventos como isquemia, inflamação, lesões como consequência de dano celular ou morte celular aguda, e estresse metabólicos (FRANKE; ILLES, 2006). No entanto, os neurônios P2X₂-ir apresentaram um aumento nos grupos Sham 24 h e 1 semana, que pode ser em decorrência da manipulação e o estresse cirúrgico. O grupo I/R-i 1 semana também apresentou um aumento em sua densidade. Em relação as estimativas, foi observado um aumento significativo nos grupos de 1 semana, porém os isquêmicos apresentaram uma diminuição em relação aos seus Shams. Esse aumento também pode ter ocorrido devido a um aumento na densidade do S100.

Resultados da densidade de neurônios NOS-ir não mostraram alterações significativas entre os grupos analisados, houve uma tendência a diminuição no grupo de 1 semana, isto indica que essa classe neuronal não é susceptível ao tempo e tratamento nesse modelo experimental. A estimativa relativa do número de neurônios NOS no intestino também não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Esses resultados estão de acordo com Rivera et al (2009), que também observaram uma tendência a uma diminuição no número de neurônios NOS-ir após 24 horas e 7 dias de reperfusão, apesar do protocolo de isquemia ser mais agressivo.

Resultados opostos foram encontrados por Calcina et al. (2005) que observaram um aumento significativo no número de neurônios NOS no plexo mioentérico de ratos submetidos a uma isquemia da AMS por 60 minutos, seguidas por uma reperfusão de 24 horas. Esses resultados mais pronunciados do estudo de Calcina et al. (2005) podem ser devido a oclusão de ramos da artéria cólica direita e da artéria ileocólica, a fim de interromper o fluxo sanguíneo colateral. Outra explicação pode ser devido a maneira de contagem como foi feita, no trabalho de Calcina et al. (2005), a contagem foi realizada em 2,1 mm² áreas de tecido como representativa de todo o tecido. Se ocorresse uma redução do comprimento ou contração do intestino após a I/R-i em seus experimentos, este método de contagem de células resultaria em maior número de neurônios por área, mesmo que os números absolutos não se alterassem.

Em outros protocolos de isquemia realizados no nosso laboratório, foram observados uma diminuição significativa na densidade de neurônios NOS-ir em ratos submetidos à isquemia/reperfusão das artérias ileais, onde a maior diminuição dos neurônios nitrérgicos foi no grupo de reperfusão de 6 horas (PALOMBIT, 2010). Em um mesmo protocolo de isquemia com oclusão da AMS, Paulino et al. (2011) observaram uma diminuição de 26% na densidade de neurônios NOS-ir, com 4 horas de reperfusão.

A Acetilcolina é o neurotransmissor primário de neurônios excitatórios no trato gastrointestinal, e está envolvido na regulação neural da motilidade e secreção (AMBACHE, 1951; FURNESS, 2006). Por isso, problemas em sua densidade poderiam levar a problemas na motilidade intestinal. Nossos resultados mostraram uma diminuição significativa no número de neurônios ChAT-ir do grupo I/R-i de 24 h e 1 semana. Esses resultados mostram que não houve interação entre tempo e tratamento, indicando que somente a isquemia pode levar a uma diminuição na densidade dos neurônios ChAT-ir. Esses resultados também foram encontrados por Paulino et al. (2011), que observaram uma diminuição de 26% na densidade de neurônios colinérgicos animais submetidos ao mesmo protocolo, porém com 4 horas de reperfusão.

Em relação a estimativa, o grupo I/R-i de 24 h apresentou uma diminuição em comparação ao Sham 24 h, e o I/R-i 1 semana uma diminuição em comparação ao Sham 1 semana. Esses resultados indicam somente o efeito da oclusão da AMS sobre essa classe neuronal. A densidade dos neurônios anti-HuC/D também apresentaram uma diminuição, o que indica que pode ter ocorrido uma morte de neurônios colinérgicos. Porém, para comprovação de morte celular seria necessária a utilização de outras técnicas como a marcação pelo TUNEL. PALOMBIT (2010) demonstrou na isquemia de aa. ileais uma diminuição significativa da população total de neurônios nos grupos I/R-i com diferentes períodos de reperfusão. Outros trabalhos têm demonstrado diminuição no número total de neurônios entéricos (LINDESTROUN; EKBLAD, 2004) as diferenças entre os trabalhos podem ser devidas ao protocolo utilizado de isquemia.

Estudos realizados com diferentes protocolos mostram perdas neuronais. Em ratos albinos, Gabella (1971) mostrou uma diminuição do número de neurônios em ratos adultos quando comparados com recém-nascidos. Cowen et al. (2000) observaram uma diminuição do número de neurônios colinérgicos e da população total de neurônios, em ratos com o envelhecimento, e a redução dessa perda através de uma dieta controlada. Na obesidade, em

animais *ob/ob*, foi verificada diminuição na densidade dos neurônios NOS-ir e ChAT-ir (MIZUNO, 2010).

Outros tipos de protocolos podem levar a um aumento na densidade neuronal. Em protocolos de desnutrição e renutrição foram encontrados um aumento na densidade de neurônios P2X₂-ir, ChAT-ir, NOS-ir e Calr-ir em ratos desnutridos (GIROTTI, 2008; MISAWA et al., 2010).

Os neurônios Calb-ir e as divisões em Dogiel Tipo I e Dogiel Tipo II não apresentaram alterações na densidade e estimativa neuronais em todos os grupos analisados. No entanto, Paulino et al. (2011) não observaram a presença de neurônios Calb-ir em protocolos com tempos iniciais de reperfusão. Em outros protocolos de desnutrição e renutrição protéica não houve alterações na densidade de neurônios Calb-ir (MISAWA et al., 2010).

Com relação aos neurônios Calr-ir, houve aumento na densidade do grupo I/R-i 1 semana, estes resultados divergem de Paulino et al. (2011) e Palombit (2010) que observaram diminuição na densidade de neurônios Calr-ir, esta diferença pode ser em decorrência do fato do tempo de reperfusão ser menor nesse último trabalho. No entanto, protocolos de desnutrição e renutrição protéica tem demonstrado aumento na densidade da calretinina no íleo (MISAWA et al., 2010) e intestino grosso (GIROTTI, 2008).

Além da hipótese de morte neuronal, esses neurônios poderiam ter sofrido uma plasticidade neuronal (LOMAX; FERNÁNDEZ; SHARKEY, 2005). Alguns estudos demonstram que os neurônios entéricos podem responder mudando sua estrutura, seu fenótipo químico ou funcional em resposta adaptativa a diferentes estímulos, para manter a homeostase do intestino (GIARONI et al., 1999; LOMAX; FERNÁNDEZ; SHARKEY, 2005). Essa capacidade de adaptação ou reparação do ENS pode ser visto como uma tentativa para melhorar a função intestinal perturbada e melhorar os sintomas de doenças intestinais (VASINA et al., 2006).

Essas mudanças estruturais SNE, são frequentemente acompanhadas por degeneração de células ganglionares e processos nervosos e necrose (DVORAK et al., 1993). Esses achados têm sido confirmados pela avaliação ultra-estruturais de tecido de pacientes com Doença de Crohn e colite ulcerativa, que mostram neurônios edemaciados, axônios vazios, grandes vacúolos ligados à membrana, mitocôndrias inchadas e concentração de neurofibrilas.

É amplamente conhecida que as células gliais no sistema nervoso central reagem a insultos inflamatórios com proliferação, o aumento da secreção de citocinas e expressão de

proteína ácida fibrilar glial (GFAP). No entanto, a expressão de GFAP foi relatada ser mais elevada no SNE, em comparação com glia do SNC, pois o trato gastrointestinal está mais exposto a uma variedade de estímulos, tais como antígenos bacterianos e alimentos (RUHL et al., 2004). As células gliais entéricas S100-ir demonstraram aumento na densidade e estimativa nos grupos Sham de 24 h e 1 semana quando comparado ao grupo controle e aumento dos grupos I/R-i em relação aos respectivos Shams. Resultados do nosso laboratório demonstram que a isquemia das a. ileais leva a um aumento de 13,6% da densidade das células gliais entéricas S100-ir (MENDES et al., 2011).

Bradley, Parr e Sharkey (1997) observaram uma proliferação de células gliais entéricas, no íleo de cobaias submetidas a inflamação por TNBS. Rühl e Collins (1995) demonstraram que as células gliais entéricas produzem interleucina-6, uma potente citocina pró-inflamatória, que pode contribuir para o processo estabelecido por um insulto na mucosa.

Von Boyen et al. (2011) observaram aumento na expressão do GFAP em humanos com colite ulcerativa e com colite infecciosa. Além disso, observaram um aumento de fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), que poderia agir como proteção as células epiteliais intestinais de apoptose induzida por citocinas.

Em pacientes com constipação idiopática grave idiopática, as gliais entéricas, neurônios e células intersticiais de cajal (ICC) estão significativamente reduzidos (BASSOTTI et al., 2006a). As glias entéricas diminuem (mas não o ICC e neurônios entéricos) no intestino delgado (íleo terminal) dos mesmos pacientes, sugerindo que as glias podem ter algum papel na atividade motora anormal descrita nestes pacientes (BASSOTTI et al., 2006b). Resultados semelhantes têm sido relatados em pacientes com trânsito intestinal lento por doença de Chagas e megacólon (IANTORNO et al., 2007).

Os autores Thacker et al. (2011) observaram na isquemia intestinal, diminuição no número de neurônios (apoptose), do plexo mioentérico com células gliais distorcidas. No presente trabalho, encontramos resultados similares, com diminuição na densidade de algumas classes neuronais e aumento da densidade das células gliais. O aumento das células gliais poderia ser explicado pelas funções que a glia desenvolve nos gânglios entéricos. Além disso, essas células são importantes para o controle das funções gastrointestinais, proporcionando estabilidade ao SNE (RÜHL et al., 2004; 2005), liberação de fatores tróficos, como por exemplo o fator neurotrófico derivado de célula glial (GDNF) (SAVIDGE et al., 2007), poderiam participar na síntese ou inativação do neurotransmissor ou poderiam

responder a sinalização de moléculas ou participar diretamente na transmissão sináptica (COLLINS, 1996; FLETCHER; CLARK; FURNESS, 2002; BASSOTI et al., 2007).

No entanto, as células gliais poderiam contribuir para anormalidades estruturais ou bioquímicas nas desordens gastrintestinais, pois essas células interagem com células imunes, células endoteliais e epiteliais, qualquer problema nessa interação poderiam levar a uma neurodegeneração, contribuir para a etiopatogenia de doenças intestinais inflamatórias intestinais (CABARROCAS; SAVIDGE; LIBLAU, 2003; DE GIORGIO et al., 2004; SAVIDGE et al., 2007; VASINA et al., 2006).

Hoff et al. (2008) quantificaram com marcador anti-Sox8/9/10 e S-100 as células gliais entéricas no sistema nervoso entérico de humano e cobaias e, observaram em humano a razão de 1,3-1,9 de célula glial para 1 neurônio (plexo submucoso) e 5,9-7,0 células gliais para 1 neurônio (plexo mioentérico), em cobaias relataram as razões de 0,8-1,0 e 1,7 de células gliais, nos plexos submucoso e mioentérico, respectivamente. No presente estudo, foi observada uma alteração da relação do número de células gliais responsáveis por cada neurônio, nos animais isquêmicos chegaram a uma razão de 2,08 glia/neurônio.

5.4 Perfil Neuronal

A análise do perfil neuronal permite analisar alterações morfológicas dos neurônios que poderiam indicar processos patológicos. Alterações nas áreas dos perfis neuronais tem sido estudados 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). A obesidade promoveu aumento nos neurônios imunorreativos à ChAT e à Calr em camundongos obesos fêmeas (MIZUNO, 2010).

Poucos estudos têm focado as diferentes classes neuronais em insultos isquêmicos (PALOMBIT, 2010; PAULINO et al., 2011; RIVERA et al., 2009).

No presente trabalho, os neurônios NOS apresentaram corpo celular grande e área do perfil bem variada. A frequência de distribuição dos perfis mostra que os neurônios dos grupos Sham e I/R-24 h e I/R-i 1 semana apresentaram grande quantidade de neurônios com

maior perfil celular entre 500-800 μm^2 . Quando observado o DMáx. desses neurônios foi possível verificar que esses grupos tem maior diâmetro quando comparado ao Sham 1 semana. O Dmín do grupo I/R-i de 1 semana apresentou os maiores valores para esse parâmetro. Esse aumento no Dmín. pode refletir em um aumento na área do perfil, já que esses neurônios apresentaram aumento na área do perfil no I/R-i 1 semana em relação ao respectivo Sham, indicando que a cirurgia agravada pelo tempo leva a essas alterações. O grupo I/R-i 1 semana teve variação em DMáx e Dmín, porém o Sham 1 semana apresenta uma diminuição apenas no DMáx. Nossos resultados corroboram com Rivera et al. (2009) que observaram que uma isquemia das artérias ileais, com reperfusão de 24 horas, 2 e 4 semanas levaram a um aumento da área dos neurônios NOS-ir. Resultados semelhantes foram encontrados por Palombit (2010) que observou um aumento significativo das áreas dos neurônios NOS-ir nos grupos I/R-i em relação aos respectivos Shams. Paulino et al. (2011) observaram uma diminuição da área do perfil dos neurônios NOS-ir. Essas diferenças em relação ao tempo de reperfusão no presente trabalho podem ser em decorrência do tipo de protocolo (PALOMBIT, 2010) e o tempo de isquemia (PAULINO et al., 2010). Assim, o aumento número de neurônios nNOS em animais que foram submetidos à isquemia e reperfusão, que é susceptível de resultar em aumento da liberação de NOS o que poderia, pelo menos em parte, contribuir para o atraso no trânsito gastrointestinal (CALCINA et al., 2005).

No entanto, o papel do NO na isquemia intestinal ainda não está claro. Numerosos estudos sugerem um papel protetor do NO (AOKI et al., 1990; GUO et al., 2000; KANWAR et al., 1994; KAWATA et al., 2001; KUBES, 1993), enquanto outros estudos, propõem um efeito tóxico do NO na lesão isquemia intestinal/reperfusão (DURAKBASA et al., 1998; HASSOUN et al., 2001; SUZUKI et al., 2000; XIA et al., 2001). No modelo experimental de Calcina et al. (2005) de I/R-i, a administração de um inibidor da enzima NOS não seletivo L-NAME impediu as alterações induzidas pela isquemia/reperfusão, apoiando a hipótese de um papel neurotóxico do NO.

No presente trabalho, análise do histograma de distribuição de frequências das áreas dos neurônios ChAT, demonstrou que a maioria dos neurônios do grupo I/R-i 1 semana dos neurônios apresentaram maior concentração de neurônios com área relativamente maiores que os outros grupos, entre 400-500 μm^2 . Isso pode ser demonstrado quando analisado a área dos neurônios colinérgicos, também apresentaram aumento na área no grupo I/R-i 1 semana. Essas alterações foram acompanhadas por um aumento do DMáx. Resultados semelhantes

foram obtidos por Palombit (2010) que observou alterações nos perfis dos neurônios ChAT-ir após 1 semana de reperfusão em um protocolo de oclusão de artérias ileais.

Os neurônios Calb-ir apresentaram variação no perfil da área, apresentando grandes valores, entre $100 \mu\text{m}^2$ e $2200 \mu\text{m}^2$. Quando analisados o perfil neuronal foi possível verificar um aumento dos Shams em relação ao controle, que pode ter sido provocado pela manipulação e estresse cirúrgico, e dos grupos de I/R-i, que podem sugerir uma mudança na morfologia desses neurônios. Quando separados as duas morfologias dos neurônios Calb, Dogiel Tipo I e Dogiel Tipo II foi observada uma maior incidência do primeiro. Apesar disso, esses neurônios não apresentaram alterações na área, porém a morfologia Dogiel Tipo II, que apresentam maiores valores para o perfil neuronal, foi observada diferenças significativas entre os Shams e o CT, e entre os Shams e I/R-i. As alterações do grupo Sham sugerem novamente o efeito da manipulação cirúrgica.

Os neurônios Calr-ir também apresentaram um aumento na área do perfil no grupo I/R-i 1 semana, que foi observado devido a um aumento do Dmín. Quando analisados o histograma de distribuição de frequências, a maioria dos neurônios dos grupos de 1 semana apresentaram as maiores áreas, assim como uma maior abrangência de maiores valores para Dmín, demonstrando o aumento e o formato mais arredondado do perfil dos neurônios Calr-ir. Rivera et al. (2009) a isquemia/reperfusão intestinal não observou alteração na área dos neurônios Calr-ir. Esta diferença pode ter ocorrido devido a espécies utilizadas.

Estudos demonstraram que a proteína ligante de Ca^{2+} , presentes na Calb e Calr, apresenta efeito protetor em neurônios em processos de isquemia ou de excitotoxicidade (BAIMBRIDGE; CELIO, 1992; GOODMAN et al., 1993; TOYOSHIMA et al., 1996; YENARI et al., 2001).

Yano, Hosokawa e Hata (1997) mostraram uma diminuição no tamanho dos neurônios mioentéricos do jejuno após 2-6 horas de isquemia seguida por 2 dias de reperfusão, mas não mostraram nenhuma mudança no número de neurônios. Piao et al. (1999) observaram que após 4 horas de isquemia muitos neurônios mioentéricos do intestino delgado de ratos se degeneravam dentro de 4 semanas e sugeriram que a isquemia intestinal causava a morte neuronal tardia. Os resultados de Rodriguez et al. (2006) indicaram que a isquemia *in situ* seguida pela superfusão *in vitro* alterava a resposta da estimulação química e elétrica e causava mudança estrutural no SNE.

Em protocolos de desnutrição pode ser verificado um aumento da área do perfil celular de aproximadamente 34% de neurônios Calr e 35% de neurônios Calb nos animais desnutridos (MISAWA et al., 2010).

Em ratos submetidos a carência de proteínas e vitaminas do complexo B, o perfil neuronal variou entre 200 a 1600 μm^2 , não apresentaram alterações entre os grupos estudados (MELLO et al., 2004). Gomes et al. (2006) também não observaram alterações na área do perfil de neurônios submetidos a privação de proteínas antes e depois do nascimento. Esse trabalho observou que a maioria dos neurônios da três regiões do intestino delgado apresentavam áreas entre 250 a 400 μm^2 (GOMES et al., 2006).

Essas alterações encontradas nos neurônios do presente estudos, podem ser devido a processo de necrose ou apoptose. Segundo Proskuryakov, Konoplyannikov e Gabai, (2003) na necrose ocorre um intumescimento das células, a membrana colapsa e ocorre uma lise celular. Na apoptose, a célula encolhe, seu núcleo condensa e há uma desintegração e forma-se um “corpo apoptótico” (MAJNO; JORIS, 1995).

Segundo Fujise et al. (2006) demonstraram que a isquemia da AMS por 60 min seguidas de reperfusão por 60 min de reperfusão apresentaram apoptose das células intestinais. Ikeda et al. (2011) verificou que a apoptose é a principal forma de morte celular que ocorre após a isquemia/reperfusão da AMS no intestino delgado de ratos.

5.5 Considerações finais

A importância deste trabalho está em demonstrar as alterações da Isquemia/Reperfusão intestinal no SNE. O modelo experimental foi de suma importância, uma vez que a oclusão da AMS é a que tem maior incidência na prática clínica. Portanto, o modelo foi efetivo pois conseguiu mimetizar possíveis alterações que poderiam ser submetidos pacientes com essa condição clínica.

As alterações observadas no receptor P2X₂, nos neurônios entéricos e células gliais entéricas, com relação à densidade, à colocalização e o perfil neuronal podem levar a processos neuropatológicos no SNE causando disfunções gastrintestinais, como por exemplo problemas na motilidade intestinal, que são controladas em grande parte pelo SNE.

Com base nos resultados obtidos conclui-se que:

1. O modelo de isquemia/reperfusão intestinal de oclusão da AMS demonstrou ser um modelo eficiente, pois provoca alterações nos neurônios e células gliais entéricas no SNE;
2. O receptor P2X₂ foi encontrado em todas as classes neuronais e células gliais entéricas dos grupos estudados, porém a I/R-i afetou a colocalização do receptor com os neurônios NOS-ir, ChAT-ir e anti-HuC/D no grupo de 1 semana;
3. A I/R-i afetou a densidade e estimativa dos neurônios ChAT-ir, Calr-ir e Anti-HuC/D nos grupos de 24 horas e 1 semana;
4. A Isquemia/Reperfusão levou a um aumento na quantidade de células gliais entéricas nos grupos I/R-i 24 h e 1 semana, que eram imunorreativas ao receptor P2X₂;
5. Por meio da I/R-i foi constatado o edemaciamento dos neurônios NOS-ir, ChAT-ir, Calb-ir, Dogiel II-ir e Calr-ir no grupo I/R-i 1 semana.
6. O grupo Sham apresentou alterações nas colocalizações, densidades e estimativas, como provável consequência da manipulação visceral;
7. A parede do íleo apresentou poucas alterações qualitativas no grupo I/R-i 24 h, ao ser analisada pelo método H.E.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- ABBACHIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 78, p. 113-143, 1998. doi:10.1254/jjp.78.113.
- ABBACHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; VERKHURATSKY, A.; ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling in the nervous system: an overview. **Trends of Neuroscience**, v. 32, n. 1, p. 19-29, 2009. doi:10.1016/j.tins.2008.10.001.
- ABBACHIO, M. P.; CERUTI, S.; BOLEGO, C.; PUGLISI, L.; BURNSTOCK, G.; CATTABENI, F. Trophic roles of P2-purinoceptors in central nervous system astroglial cells. **Ciba Found Symp.**, v. 198, p. 142-148, 1996.
- AGULHON, C.; PETRAVICZ, J.; MCMULLEN, A. B. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? **Neuron**, v. 59, p. 932-946, 2008. doi:10.1016/j.neuron.2008.09.004.
- 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.
- AOKI, N.; SIEGFRIED, M.; TSAO, P.; LENTO, P.; LEGER, A. Beneficial mechanisms of action of a prostacyclin enhancing agent in splanchnic artery occlusion shock. **Chem. Pathol. Pharm.**, v. 60, p. 775-789, 1988.
- BAIMBRIDGE, K. G.; CELIO, M. R. Calcium-binding proteins in the nervous system. **Trends Neurosci.**, v. 15, n. 8, p. 303-308, 1992. doi:10.1016/0166-2236(92)90081-I.
- BARAJAS-LÓPEZ, C.; HUIZINGA, J. D.; COLLINS, S. M.; GERZANICH, V.; ESPINOSA, R.; PERES, A. L. P2X- Purinoreceptors of myenteric neurons from the guinea-pig ileum and their unusual pharmacological properties. **Br. J. Pharmacol.**, v. 119, p. 1541-1548, 1996.
- BASSOTTI, G. et al. Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? **Lab. Invest.**, v. 87, n. 7, p. 628-632, 2007a. doi:10.1038/labinvest.3700564.
- BASSOTTI, G. et al. Enteric neuropathology of the terminal ileum in patients with intractable slow transit constipation. **Hum. Pathol.**, v. 37, p. 1252-1258, 2006b. doi:10.1016/j.humpath.2006.04.027.
- BASSOTTI, G. et al. Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: introducing the neuro-gliopathies. **World J. Gastroenterol.**, v. 13, n. 30, p. 4035-4041, 2007b.

*De acordo com:

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

BASSOTTI, G. et al. The role of glial cells and apoptosis of enteric neurones in the neuropathology of intractable slow transit constipation. **Gut**, v. 55, p. 41-46, 2006a. doi: 10.1136/gut.2005.073197.

BECK, M.; SCHLABRAKOWSKI, A.; SCHRÖDL, F.; NEUHUBER, W.; BREHMER, A. ChAT and NOS in human myenteric neurons: co-existence and co-absence. **Cell Tissue Res.**, v. 338, p. 37-51, 2009. doi 10.1007/s00441-009-0852-4.

BELAI, A.; BURNSTOCK, G. Distribution and colocalization of nitric oxide synthase and calretinin in myenteric neurons of developing, aging, and Crohn's disease human small intestine. **Dig. Dis. Sci.**, v. 44, n. 8, p. 1579-1587, 1999.

BERLAND, T.; OLDENBURG, W. A. Acute mesenteric ischemia. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, v. 10, p. 341-346, 2008.

BERNEY, T.; MORALES, M.; BROQUET, P. E.; MENTHA, G.; MOREL, P. Risk factors influencing the outcome of portal and mesenteric vein thrombosis. **Hepatogastroenterology**, v. 45, p. 2275-2281, 1998.

BIAN, X.; BERTRAND, P. P.; BORNSTEIN, J. C. Descending inhibitory reflexes involve P2X receptor-mediated transmission from interneurons to motor neurons in guinea-pig ileum. **J. Physiol.**, v. 528, p. 551-560, 2000.

BODWELL, W. Ischemia, reperfusion, and reperfusion injury: role of oxygen free radicals and oxygen free radical scavengers. **J. Cardiovasc. Nurs.**, v. 4, p. 25-32, 1989.

BOYER, L.; GHOREISHI, M.; TEMPLEMAN, V.; VALLENCE, 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. doi:10.1016/j.autneu.2004.10.006.

BRADBURY, A. W.; BRITTENDEN, J.; MCBRIDE, K.; RUCKLEY, C. V. Mesenteric ischaemia: a multidisciplinary approach. **Br. J. Surg.**, v. 82, p. 1446-1459, 1995. doi: 10.1002/bjs.1800821105.

BRADLEY, J. S.; PARR, E. J.; SHARKEY, K. A. Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. **Cell Tissue Res.**, v. 289, n. 3, p. 455-61, 1997.

BRANDÃO, M. C. S.; DE ANGELIS, R. C.; DE-SOUZA, R. R.; FROES, L. B.; LIBERTI, E. A.; Effects of pre- and postnatal protein energy deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric study in weanling rats. **Nutrition Research**, v. 23, n. 2, p. 215-223, 2003. doi:10.1016/S0271-5317(02)00459-1.

BRAUN, N.; SEVIGNY, J.; ROBSON, S. C. Association of the ecto- ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system. **Glia**, v. 45, p. 124-132, 2004. doi: 10.1002/glia.10309.

BREHMER, A.; SCHRÖDL, F.; NEUHUBER, W. Morphological phenotyping of enteric neurons using neurofilament immunohistochemis - Cell Tissue Res try renders chemical

phenotyping more precise in porcine ileum. **Histochem Cell Biol.**, v. 117, p. 257-263, 2002. doi:10.1007/s00418-001-0373-z.

BOBANOVIC, L. K.; ROYLE, S. J.; MURRELL-LAGNADO, R. D. P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 12, p. 4814-4824, 2002.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 659-797, 2007. doi:10.1152/physrev.00043.2006.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors Cell. Mol. **Life Sci.**, v. 64, p. 1471-1483, 2007. doi: 10.1007/s00018-007-6497-0.

Burnstock, G. Purinergic nerves. **Pharmacol. Rev.**, v. 24, p. 509-58, 1972.

BURNSTOCK, G. Purinergic receptors. **J. Theor. Biol.**, v. 62, p. 491, 1976. doi:10.1016/0022-5193(76)90133-8.

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

BURRONE, J.; MURTHY, V. N. Synaptic plasticity: rush hour traffic in the AMPA lanes. **Curr. Biol.**, v. 11, n. 7, p. 274-277, 2001. doi:10.1016/S0960-9822(01)00137-3.

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

CALCINA, F.; BAROCELLI, E.; BERTONI, S.; FUKUKAWA, O.; KAUNITZ, J.; IMPICCIATORE, M.; STERNINI, C. Effect of *n*-methyl-d-aspartate receptor blockade on neuronal plasticity and gastrointestinal transit delay induced by ischemia/reperfusion in rats. **Neuroscience**, v. 134, p. 39-49, 2005. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.03.052.

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, n. 1, p. 1-7, 2002a. doi:10.1007/s00441-002-0615-y.

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, 2002b. doi:10.1007/s00418-002-0404-4.

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.

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

CHIOCCHETTI, R.; GRANDIS, A.; BOMBARDI, C.; LUCCHI, M. L.; DAL LARGO,

D. T.; BORTOLAMI, R.; FURNESS, J. B. Extrinsic and intrinsic sources of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the lamb ileum: a morphometric and neurochemical investigation. **Cell Tissue Res.**, v. 323, p. 183-196, 2006. doi:10.1007/s00441-005-0075-2.

CLARK, E. T.; GERWITZ, B. L. Mesenteric ischemia. In: HALL, J. B.; SCHMIDT, G. A.; WOOD, L. D. (Ed.). **Principles of Critical Care**. New York: McGraw-Hill Co, 1998. p. 1279-1286.

COLLINS, S. M. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. **Gastroenterology**, v. 111, n. 6, p. 1683-99, 1996.

CORNET, A.; SAVIDGE, T. C.; CABARROCAS, J.; DENG, W. L.; COLOMBEL, J. F.; LASSMANN, H.; DESREUMAUX, P.; LIBLAU, R. S. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, p. 13306-13311, 2001. doi:10.1073/pnas.231474098.

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

COSTA, M.; BROOKES, S. J. H.; WATERMAN, S.; MAYO, R. Enteric neuronal circuitry and transmitters controlling intestinal motor function. In: HOLLE, G. E.; WOOD, J. P. (Ed.) **Advances in the innervations of the gastrointestinal tract**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992b. p. 115-121.

COWEN, T.; JOHNSON, R. J. R.; SOUBEYRE, V.; SANTER, R. M. Restricted diet rescues rat enteric motor neurons from age related cell death. **Gut**, v. 47, p. 653-660, 2000.

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

DANIEL, E. E.; HAUGH, C.; WOSKOWSKA, Z.; CIPRIS, S.; JURY, J.; FOX-THRELKELD, J. E. T. Role of nitric oxide-related inhibition in intestinal function: relation to vasoactive intestinal polypeptide. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. 31-39, 1994.

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

DAVALOS, D.; GRUTZENDLER, J.; YANG, G.; KIM, J. V.; ZUO, Y.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R.; DUSTIN, M. L.; GAN, W. B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nature Neurosci.**, v. 8, p. 752-758, 2005.

DE GIORGIO, R. et al. Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system. **Gastroenterology**, v. 126, p. 1872-1883, 2004.

DURAKBASA, C. U.; DAGLI, T. E.; MOUNI, H.; HAKLAR, G.; BILSEL, A. S.; YUKSEL, M.; AKTAN, A. O. Nitric oxide and endothelin relationship in intestinal ischemia/reperfusion injury. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 59, p. 379-383, 1998.

DVORAK, A. M.; ONDERDONK, A. B.; MCLEOD, R. S.; MONAHAN-EARLEY, R. A.; CULLEN, J.; ANTONIOLI, D. A.; BLAIR, J. E.; MORGAN, E. S.; CISNEROS, R. L.; ESTRELLA, P. Axonal necrosis of enteric autonomic nerves in continent ileal pouches. Possible implications for pathogenesis of Crohn's disease. **Ann. Surg.**, v. 217, p. 260- 271, 1993.

ECKSTEIN, H. H. Acute mesenteric ischemia. Resection or reconstruction? **Chirurg.**, v. 74, n. 5, p. 419-431, 2003. doi:10.1007/s00104-003-0630-x.

ENG, L. F. Astrocytic response to injury. In: REIER, R.; BUNGE, R.; SEIL, F. (Ed.) **Current Issues in Neural Regeneration Research**. New York: Alan R Liss, 1988. p. 247-255.

ERICKSON, J. D.; VAROQUI, R. T. I.; USDIN, T. B. Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 21929-21932, 1994.

FERRI, G. L.; PROBERT, L.; COCCHIA, D.; MICHETTI, F.; MARANGOS, P. J.; POLAK, J. M. Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. **Nature**, v. 297, p. 409-410, 1982. doi:10.1038/297409a0.

FIELDS, R. D.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 6, p. 423-436, 2006.

FLETCHER, E. L.; CLARK, M. J.; FURNESS, J. B. Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus. **Cell Tissue Res.**, v. 308, n. 3, p. 339-346, 2002.

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. **Pflugers Arch.**, v. 452, p. 622-644, 2006. doi:10.1007/s00424-006-0071-8.

FUJIMIYA, M.; YAMAMOTO, H.; KUWAHARA, A. Effect of VIP and PACAP on basal release of serotonin from isolated vascularly and lumenally perfused rat duodenum. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. 731-739, 1998.

FUJISE, T.; IWAKIRI, R.; WU, B.; AMEMORI, S.; KAKIMOTO, T.; YOKOYAMA, F.; SAKATA, Y.; TSUNADA, S.; FUJIMOTO, K. Apoptotic pathway in the rat small intestinal mucosa is different between fasting and ischemia-reperfusion. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, v. 291, p. G110-G116, 2006.

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

FURNESS, J. B.; JONES, C.; NURGALI, K.; CLERC, N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. **Progress in Neurobiology**, v. 72, p. 143–164, 2004.

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

FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **J. Autonom. Nerv. Syst.**, v. 81, p. 87-96, 2000. doi:10.1016/S0165-1838(00)00127-26.

FURNESS, J. B. **The enteric nervous system**. Austrália: Blackwell Publishing, 2006.

GABELLA, G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. **J. Anat.**, v. 109, n. 1, p. 81-95, 1971.

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

GEBUES, K.; COLLINS, S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Neurogastroenterol Motil.**, 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 calretinina, a calbindina e a colina acetil transferase (ChAT) do colo distal de ratos submetidos à desnutrição protéica e à renutrição protéica**. 2008. 145 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GIARONI, C.; DE PONTI, F.; COSENTINO, M.; LECCHINI, S.; FRIGO, G. Plasticity in the Enteric Nervous System. **Gastroenterology**, v. 117, p. 1438-1458, 1999.

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

GOMES, A. O.; 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. 126, p. 277-284, 2006. doi:10.1016/j.autneu.2006.03.003.

GORE, R. M.; YAGHMAI, V.; THAKRAR, K. H.; BERLIN, J. W.; MEHTA, U. K.; NEWMARK, G. M.; MILLER, F. H. Imaging in Intestinal Ischemic Disorders. **Radiol. Clin. N. Am.**, v. 46, p. 845-875, 2008. doi:10.1016/j.rcl.2008.05.004 0033-8389/08.

GOODMAN, J. H. et al. Calbindin-D28k immunoreactivity and selective vulnerability to ischemia in the dentate gyrus of the developing rat. **Brain Res.**, v. 606, n. 2, p. 309-314, 1993. doi:10.1016/0006-8993(93)90999-4.

GRACE, P. A. Ischemia-reperfusion injury. **Br. J. Surg.**, v. 81, p. 849-853, 2004.

GREGGIO, F. M.; FONTES, R. B. V.; MAIFRINO, L. B. M.; CASTELUCCI, P.; SOUZA R. R.; LIBERTI, E. A. Effects of perinatal protein deprivation and recovery on esophageal myenteric plexus. **World J. Gastroenterology**, v. 16, n. 5, p. 563-570, 2010. doi:10.3748/wjg.v16.i5.563.

GREENE, E. C. **Anatomy of the Rat**. New York, London: Hafner, 1963.

GRIDER, J. R. Interplay of VIP and nitric oxide in regulation of the descending relaxation phase of peristalsis. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. 334-340, 1993.

GULBRANSEN, B. D.; SHARKEY, K. A. Purinergic neuron-to-glia signaling in the enteric nervous system. **Gastroenterology**, v. 136, p. 1349-1358, 2009. doi:10.1053/j.gastro.2008.12.058.

GUO, W. H.; CHAN, K. L.; FUNG, P. P.; CHAN, K. W.; TAM, P. K. Nitric oxide protects segmental intestinal grafts from ischemia and reperfusion injury. **Transplant Proc.**, v. 32, p. 1297-1298, 2000.

GUZMÁN-DE LA GARZA, F. J.; CÁMARA-LEMARROY, C. R.; ALARCÓN-GALVÁN, G.; CORDERO-PÉREZ, P.; MUÑOZ-ESPINOSA, L. E.; FERNÁNDEZ-GARZA, N. E. Different patterns of intestinal response to injury after arterial, venous or arteriovenous occlusion in rats. **World J. Gastroenterol.**, v. 15, n. 31, p. 3901-3907, 2009.

HAGLUND, U.; BERGQVIST, D. Intestinal ischemia - the basics. **Langenbeck's Arch Surg.**, v. 384, p. 233-238, 1999: doi:10.1007/s004230050197.

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

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

HEYS, S. D.; BRITTENDEN, J.; CROFTS, T. J. Acute mesenteric ischaemia: the continuing difficulty in early diagnosis. **Postgrad. Med. J.**, v. 69, p. 48-51, 1993. doi:10.1136/pgmj.69.807.48.

HINDLEY, S.; HERMAN, M. A.; RATHBONE, M. P. Stimulation of reactive astrogliosis in vivo by extracellular adenosine diphosphate or an adenosine A2 receptor agonist. **J. Neurosci. Res.**, v. 38, p. 399-406, 1994.

HIRATA, I.; AUSTIN, L. L.; BLACKWELL, W. H.; WEBER, J. R.; DOBBINS, W. O. Immunoelectron microscopic localization of HLADR antigen in control small intestine and colon and in inflammatory bowel disease. **Dig. Dis. Sci.**, v. 31, p. 1317-1330, 1986.

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. 509, n. 4, p. 356-371, 2008.

HOYLE, C. H. V.; BURNSTOCK, G. Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. **Journal of Anatomy**, v. 166, p. 22-27, 1989.

HU, H. Z.; GAO, N.; LIN, Z.; GAO, C.; LIU, S.; REN, J.; XIA, Y.; WOOD, J. D. P2X(7) receptors in the enteric nervous system of guinea-pig small intestine. **J. Comp. Neurol.**, v. 440, n. 3, p. 299-310, 2001.

HUPPERTZ, B.; FRANK, H-P.; KAUFMANN, P. The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization. **Ana. Embriol.**, v. 200, p. 1-18, 1999. doi:10.1007/s004290050254.

LIANTORNO, G. et al. The enteric nervous system in chagasic and idiopathic megacolon. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 31, p. 460-468, 2007.

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

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. **J. Neurosci.**, v. 3, p. 2206-2218, 1983.

JIN, J. G.; MURPHY, K. S.; GRIDER, J. R.; MAKHLOUF, G. M. Stoichiometry of neurally induced VIP release, NO formation, and relaxation in rabbit and rat gastric mucosa. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. 357-369, 1996.

JOÃO, A. S.; ALENCAR, S. S. S.; MEDEIROS, A. C.; DINIZ, S. O. F.; CARDOSO, V. N.; BRANDT, C. T. Translocation of 99mTc labelled bacteria after intestinal ischemia and reperfusion. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, p. 328-333, 2004. doi: 10.1590/S0102-86502004000400002.

KALEYA, R. N.; BOLEY, S. J. Acute mesenteric ischemia: an aggressive diagnostic and therapeutic approach: Roussel Lecture. **Can. J. Surg.**, v. 35, p. 613-623, 1992.

KANWAR, S.; TEPPERMAN, B. L.; PAYNE, D.; SUTHERLAND, L. R.; KUBES, P. Time course of nitric oxide production and epithelial dysfunction during ischemia/reperfusion of the feline small intestine. **Circ. Shock.**, v. 42, p. 135-140, 1994.

KAWATA, K.; TAKEYOSHI, I.; IWANAMI, K.; SUNOSE, Y.; AIBA, M.; OHWADA, S.; MATSUMOTO, K.; MORISHITA, Y. A spontaneous nitric oxide donor ameliorates small bowel ischemia-reperfusion injury in dogs. **Dig. Dis. Sci.**, v. 46, p. 1748-1756, 2001.

KEIGHLEY, M. R. B. Isquemia do colo e colite isquêmica. In: KEIGHLEY, M. R. B.; WILLIAMS, N. S. (Ed.). **Cirurgia do ânus, reto e colo**. São Paulo: Manole, 1998. p. 1846-1866.

KHAKH, B. S.; BAO, X. R.; LABARCA, C.; LESTER, H. A. Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. **Nat. Neurosci.**, v. 2, n.4, p. 322-330, 1999. doi:10.1038/7233.

KIMBALL, B. C.; MULHOLLAND, M. W. Enteric glia exhibit P2U receptors that increase cytosolic calcium by a phospholipase C-dependent mechanism. **J. Neurochem.**, v. 66, p. 604-612, 1996.

KIMURA, M.; KATAOKA, M.; KUWABARA, Y.; SATO, A.; SUGIURA, M.; FUJII, Y. Real-time energy metabolism of intestine during arterial versus venous occlusion in the rat. **J. Gastroenterol.**, v. 38, p. 849-853, 2003.

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

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

KOTANI, T.; KOMATSU, Y.; NAKAMORI, Y.; TAKEUCHI, K.; A novel model of ischemic enteritis induced in rats by stenosis of the superior mesenteric artery. **Life Sciences**, v. 84, p. 615-621, 2009.

KRAMMER, H. J.; KARAHAN, S. T.; SIGGE, W.; KUHNEL W. Immunohistochemistry of markers of the enteric nervous system in whole-mount preparations of the human colon. **Eur. J. Pediatr. Surg.**, v. 4, p. 274-278, 1994. doi.org/10.1055/s-2008-1066117.

KUBES, P. Ischemia-reperfusion in feline small intestine: a role for nitric oxide. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. G143-G149, 1993.

KUBES P. Nitric oxide modulates epithelial permeability in the feline small intestine. **Gastroenterology**, v. 102, p. A219, 1992.

LANGLEY, J. N.; MAGNUS, R. Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves. **J. Physiol.**, v. 33, n. 1, p. 34-51, 1905.

LINDESTRÖM, L.; EKBLAD, E. Structural and Neuronal Changes in Rat Ileum After Ischemia with Reperfusion. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 49, n. 7, p. 1212-1222, 2004.

LOCK, G. Acute intestinal ischaemia. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 15, p. 83-98, 2001. doi.org/10.1053/bega.2000.0157.

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. doi: 10.1007/s004410000260.

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

LOPACHIN JR, R. M.; ASCHNER, M. Glial-neuronal interactions: relevance to neurotoxic mechanisms. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 118, p. 141-158, 1993.

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, 1999.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. **Am. J. Pathol.**, v. 146, p. 13-15, 1995.

MARSHALL, J. C.; CHRISTO, N. V.; MEAKINS, J. L. The gastrointestinal tract. The 'undrained abscess' of multiple-organ failure. **Ann. Surg.**, v. 218, p. 111, 1993.

MASSBERG, S.; MESSMER, K. The nature of ischemia/reperfusion injury. **Transplant. Proc.**, v. 30, p. 4217-4223, 1998. doi.org/10.1016/S0041-1345(98)01397-9.

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

MCCORD, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **N. Engl. J. Med.**, v. 312, p. 159-163, 1985. doi.org/10.1056/NEJM198501173120305.

MCKEOWN, S. J.; CHOW, C. W.; YOUNG, H. M. Development of the submucous plexus in the large intestine of the mouse. **Cell Tissue Res.**, v. 303, p. 301-305, 2001. doi.org/10.1007/s004410000303.

MELLO, S. T.; LIBERTI, E. A.; SANT'ANA, D. M. G.; MOLINARI, S. L.; MIRANDA NETO, M. H. Estudo morfoquantitativo do plexo mioentérico do duodeno de ratos submetidos a carência de proteínas e vitaminas do complexo B. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 251-256, 2004.

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 Joing Meeting of the international Society for autonomic Neuroscience and the American Autonomic Society (ISAN/ASS), 2011, Búzios **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, 163. Resumos... Búzios: Elsevier, 2011. p. 62.

MENON, N. J.; AMIN, A. M.; MOHAMMED, A.; HAMILTON, G. Acute mesenteric ischaemia. **Acta Chir. Belg.**, v. 105, p. 344-354, 2005.

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

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

MIZUNO, M. S. **Análises morfoquantitativa e do código químico do receptor purinérgico P2X₂ no plexo mioentérico de camundongos obesos fêmeas e machos (*ob/ob*)**. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais), 2010. 142 f. - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MURPHY, E. M.; 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.

MYERS, S. L.; HERNANDEZ, R. Oxygen free radical regulation of rat splanchnic blood flow. **Surgery**, v. 112, n. 347-354, 1992.

NEARY, J. T.; KANG, Y.; BU, Y.; YU, E.; AKONG, K.; PETERS, C. M. Mitogenic signaling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of a calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 4211-4220, 1999.

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

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

O'CALLAGHAN, J. P. Quantitative features of reactive gliosis following toxicant-induced damage of the CNS. **Acad. Sci.**, v. 679, p. 195-210, 1993. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb18299.x.

PALOMBIT, K. **Estudo do receptor P2X₇ nas classes neuronais do íleo de ratos submetidos à isquemia intestinal com reperfusão**. 2010. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PAULINO, A. S.; PALOMBIT, K.; CAVRIANI, G.; DE LIMA, W.; MIZUNO, M. S.; MAROSTI, A. M. B.; DA SILVA, M.; LIBERTI, E.; CASTELUCCI, P. Effects of ischemia and reperfusion on P2X₂ receptor expressing neurons of the rat ileum enteric nervous system. **Dig. Dis. Sci.**, v. 56, n. 8, p. 2262-2275, 2011. doi 10.1007/s10620-011-1588-z.

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. doi:10.1016/S1566-0702(02)00179-0.

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. Methods.**, v. 133, n. 1, p. 99-107, 2004.

PIAO, D. X.; JIANG, H. C.; KOSAKA, M.; SHIBATA, T.; OHTSUKA, A.; MURAKAMI, T. Cytoplasmic delayed neuronal death in the myenteric plexus of the rat small intestine after ischemia. **Arc. Histol. Cytol.**, v. 62, n. 4, p. 383-393, 1999. doi: 10.1679/aohc.62.383.

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.

PROSKURYAKOV, S. Y.; KONOPLYANNIKOV, A. G.; GABAI, V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Exper. Cell Res.**, v. 283, p. 1-16, 2003. doi: 10.1016/S0014-4827(02)00027-7.

QU, Z.; THACKER, M.; CASTELUCCI, P.; BAGYÁNSZKI, M.; EPSTEIN, M. L.; FURNESS, J.B. Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. **Cell Tissue Res.**, v. 334, p. 147-161, 2008. doi:10.1007/s00441-008-0684-7.

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

RIBEIRO, M. E.; YOSHIDA, B. Lesões intestinais decorrentes de isquemia e reperfusão: fisiopatologia e modelos experimentais. **Vasc. Br.**, v. 4, n. 2, p. 183-194, 2005.

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. doi: 10.1007/s00401-009-0549-5.

RODRIGUEZ, R.; VENTURA-MARTINEZ, R.; SANTIAGO-MEJIA, J.; AVILA-COSTA, M. R.; FORTOUL, T. I. Altered responsiveness of the guinea-pig isolated ileum to smooth muscle stimulants and to electrical stimulation after in situ ischemia. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 371-378, 2006. doi: 10.1038/sj.bjp.0706618.

RUHL, A. Glial cells in the gut. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 17, n. 6, p. 777-790, 2005. doi:10.1111/j.1365-2982.2005.00687.x.

RÜHL, A.; COLLINS, S. M. Enteroglia cells (EGC) are an integral part of the neuroimmune axis in the enteric nervous system (ENS). **Gastroenterology**, v. 108, p. 860, 1995.

RUHL, A.; FRANZKE, S.; COLLINS, S. M.; STREMMEL, W. Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 280, p. G1163-G1171, 2001.

SAHNOUN, Z.; JAMOSSI, K.; ZEGHAL, K. M. Free radicals and antioxidants: physiology, human pathology and therapeutic aspects (part II). **Therapie.**, v. 3, p. 315-339, 1998.

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. doi: 10.1007/s004410050565.

SANT'ANA, M.; MIRANDA NETO, 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. doi:10.1590/S0004-282X1997000500003.

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

SAYEGH, A.; RITTER, R. C. Morphology and Distribution of Nitric Oxide Synthase-, Neurokinin-1 Receptor-, Calretinin-, Calbindin-, and Neurofilament-MImmunoreactive Neurons in the Myenteric and Submucosal Plexuses of the Rat Small Intestine. **The Anatomical Record Part.**, v. 271, p. 209–216, 2003. doi:10.1002/ar.a.10024.

SCANNEL, G.; WAXMAN, K.; VAZIRI, N. D.; ZHANG, J.; KAUPKE, C. J.; JALALI, M.; HECHT, C. C. Hypoxia-induced alterations of neutrophil membrane receptors. **J. Surg. Res.**, v. 59, p. 141-145, 1995. doi:10.1006/jsre.1995.1145.

SCHEMANN, M.; SCHAAF, C.; MÄDER, M. Neutransmitter coding of enteric neurones in the guinea pig stomach. **J. Comp. Neurol.**, v. 353, p. 161-178, 1995.

SCHOENBERG, M. H.; BERGER, H. G. Reperfusion injury after intestinal ischemia. **Crit. Care Med.**, v. 21, p. 1376-86, 1993. doi:10.1097/00003246-199309000-00023.

SILVA, M. A. C. P.; MEIRELLES, L. R.; BUSTORFF-SILVA, J. M. Changes in intestinal motility and in the myenteric plexus in a rat model of intestinal ischemia–reperfusion. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 42, p. 1062– 1065, 2007.

SIMI, A. C. Isquemia intestinal. In: MAFFEI, F. H. A. (Ed.) **Doenças vasculares periféricas**. Rio de Janeiro: Medsi, 2002. p. 1239-1257.

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

SITGES-SERRA, A.; MAS, X.; ROQUETA, F.; FIGUERAS, J.; SANZ, F. Mesenteric infarction: an analysis of 83 patients with prognostic studies in 44 cases undergoing a massive small-bowel resection. **Br. J. Surg.**, v. 75, p. 544-548, 1988. doi: 10.1002/bjs.1800750614.

SPENCER, N. J.; WALSH, M.; SMITH, T. K. Purinergic and cholinergic neuro-neuronal transmission underlying reflexes activated by mucosal stimulation in the isolated guinea-pig ileum. **J. Physiol.**, v. 522, n. 2, p. 321-31, 2000.

SREENARASIMHAIAH, J. Diagnosis and management of intestinal ischaemic disorders. **B. M. J.**, v. 326, p. 1372-1376, 2003. doi: 10.1136/bmj.326.7403.1372.

STONEY, R. J.; CUNNINGHAM, C. G. Acute mesenteric ischemia. **Surgery**, v. 114, p. 489-490, 1993.

SURPRENANT, A.; RASSENDREN, F.; KAWASHIMA, E.; NORTH, R. A.; BUELL, G. The cytosolic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X₇). **Science**, v. 272, n. 5262, p. 735-738, 1996.

SUZUKI, Y.; DEITCH, E. A.; MISHIMA, S.; LU, Q.; XU, D. Inducible nitric oxide synthase gene knockout mice have increased resistance to gut injury and bacterial translocation after an intestinal ischemiareperfusion injury. **Crit. Care Med.**, v. 28, p. 3692-3696, 2000.

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

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

THORNTON, M.; SOLOMON, M. J. Crohn's disease: in defense of microvascular aetiology. **Int. J. Colorectal Dis.**, v. 17, p. 287-297, 2002. doi:10.1007/s00384-002-0408-5.

TOYOSHIMA, T. et al. Expression of calbindin-D28K by reactive astrocytes in gerbil hippocampus after ischaemia. **Neuroreport**, v. 7, n. 13, p. 2087-91. 1996. doi:10.1097/00001756-199609020-00006.

TURNAGE, R. H.; GUICE, K. S.; OLDHAM, K. T. Endotoxemia and remote organ injury following intestinal reperfusion. **J. Surg. Res.**, v. 56, p. 571-8, 1994. doi: 10.1006/jsre.1994.1091.

VAJDOVICH, P. Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-reperfusion injury. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 38, p. 31-123, 2008.

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, p. 149-154, 2003.

VAN NASSAUW, L.; BROUNS, I.; ADRAENSEN, D.; BURNSTOCK, G.;TIMMERMANS, J. P. Neurochemical identification of enteric neurons expressing P2X (3) receptors in the guinea-pig ileum. **Histochem. J.**, v. 118, n. 3, p. 193-203, 2003. doi: 10.1007/s00418-002-0447-6.

VASINA, V.; BARBARA, B. G.; TALAMONTI, B. L.; STANGHELLINI, B.V.; CORINALDESI, R.B.; TONINI, C.M.; DE PONTI, A.F.; DE GIORGIO, R.; Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 126, p. 264-272, 2006. doi:10.1016/j.autneu.2006.02.025.

VENTURA-MARTINEZ, R.; SANTIAGO-MEJIA, J.; GOMEZ, C.; RODRIGUEZA, R.; FORTOUL, T. I - Acute morphological changes in guinea-pig ileum myenteric neurons after ischemia in situ with superfusion in vitro. **Pathology Research and Practice**, v. 204, p. 121-127, 2008. doi:10.1016/j.prp.2007.10.011.

VIRGINIO, C.; MACKENZIE, A.; RASSENDREN, F. A.; NORTH, R. A.; SURPRENANT, A. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. **Nat. Neurosci.**, v. 2, n. 4, p. 315-321, 1999. doi:10.1038/7225.

VON BOYEN, G. B.; SCHULTE, N.; PFLÜGER, C.; SPANIOL, U.; HARTMANN, C.; STEINKAMP, M. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. **BMC Gastroenterol.**, v. 14, p. 3-8, 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. 93, n. 15, p. 8063-8067, 1996.

UEMURA, S.; POMPOLO, S.; FURNESS, J. B. Colocalization of neuropeptide Y with other neurochemical markers in the guinea pig small intestine. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 58, n. 5, p. 523-536, 1995.

USDIN, T. B.; EIDEN, L. E.; BONNER, T. I.; ERICKSON, J. D. Molecular biology of the vesicular ACh transporter. **Trends Neurosci.**, v. 18, p. 218-224, 1995. doi:10.1016/0166-2236(95)93906-E.

WEIDMANN, S.; SCHRÖDL, F.; NEUHUBER, W.; BREHMER, A. Quantitative estimation of putative primary afferent neurons in the myenteric plexus of human small intestine. **Histochem. Cell Biol.**, v. 128, p. 399-407, 2007. doi: 10.1007/s00418-007-0335-1.

WILCOX, M. G.; HOWARD, T. J.; PLASKON, L. A.; UNTHANK, J. L.; MADURA, J.A. Current theories of pathogenesis and treatment of nonocclusive mesenteric ischemia. **Dig. Dis. Sci.**, v. 40, p. 709-716, 1995. doi:10.1007/BF02064966.

XIA, G.; LARA-MARQUEZ, M.; LUQUETTE, M. H.; GLENN, S.; HAQUE, A.; BESNER, G. E. Heparin-binding EGF-like growth factor decreases inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production after intestinal ischemia/reperfusion injury. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 3, p. 919-930, 2001. doi:10.1089/15230860152665073.

XIANG, Z.; BURNSTOCK, G. Distribution of P2Y₂ receptors in the guinea pig enteric nervous system and its coexistence with P2X₂ and P2X₃ receptors, neuropeptide Y, nitric oxide synthase and calretinin. **Histochem. Cell Biol.**, v. 124, p. 379-390, 2005. doi 10.1007/s00418-005-0043-7.

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.

YENARI, M. A. et al. Calbindin d28k overexpression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 32, n. 4, p. 1028-1035, 2001. doi:10.1161/01.STR.32.4.1028.

YIANGOU, Y.; FACER, P.; BAECKER, P. A.; FORD, A. P.; KNOWLES, C. H.; CHAN, C. L.; WILLIAMS, N. S.; ANAND, P. ATP-gated ion channel P2X(3) is increased in human inflammatory bowel disease. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 4, p. 365-369, 2001.

ZHANG, W.; SEGURA, B. J.; LIN, T. R. Intercellular calcium waves in cultured enteric glia from neonatal guinea pig. **Glia**, v. 42, p. 252-262, 2003. doi:10.1002/glia.10215.

ZHOU, X.; GALLIGAN, J. J. P2X purinoreceptores in cultured myenteric neurons of guinea-pig small intestine. **J. Physiol.**, v. 496, p. 719-729, 1996.

ZIMMERMANN, H. Signalling via ATP in the nervous system. **Trends Neurosci.**, v. 17, p. 420-426, 1994.