

HENRIQUE INHAUSER RICETI MAGALHÃES

**Estudo dos mecanismos de ação da colite ulcerativa experimental
nos neurônios entéricos em camundongos deficientes para o gene
do receptor P2X7**

São Paulo

2022

HENRIQUE INHAUSER RICETI MAGALHÃES

Estudo dos mecanismos de ação da colite ulcerativa experimental nos neurônios entéricos em camundongos deficientes para o gene do receptor P2X7

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Patricia Castelucci

São Paulo

2022

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

4253
FMVZ

Magalhães, Henrique Inhauser Riceti
Estudo dos mecanismos de ação da colite ulcerativa experimental nos neurônios entéricos em camundongos deficientes para o gene do receptor P2X7 / Henrique Inhauser Riceti Magalhães. – 2022.
154 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2022.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Castelucci.

1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Gastroenterologia. 3. Receptores purinérgicos. 4. Sistema nervoso entérico. I. Título.

RESUMO

MAGALHÃES, H. I. R. **Estudo dos mecanismos de ação da colite ulcerativa experimental nos neurônios entéricos em camundongos deficientes para o gene do receptor P2X7**. 2022. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A literatura demonstra que o sistema nervoso entérico é afetado pelas doenças inflamatórias intestinais (DII), e que o receptor P2X7 pode induzir a morte neuronal. Apesar disso, pouco se sabe sobre os mecanismos de perda de neurônios entéricos ligada às DII. Este trabalho teve como objetivo estudar os mecanismos de ação pelos quais a colite ulcerativa experimental afeta os neurônios mioentéricos do colo distal em camundongos deficientes para o gene do receptor P2X7 (P2X7 KO). Quarenta camundongos C57BL/6 machos *wild type* (WT) e KO foram submetidos à eutanásia 24 horas (24h) ou quatro dias (4d) após a indução da colite por injeção intra-retal de TNBS (grupos colite). Nos grupos *sham* apenas o veículo (etanol 35%) foi injetado. Foram utilizados oito grupos (n=5): WT-*sham* 24h e 4d, WT-colite 24h e 4d, KO-*sham* 24h e 4d, e KO-colite 24h e 4d. O índice de atividade da doença (IAD) foi observado, e o colo distal coletado para análises de imuno-histoquímica, microscopia eletrônica de transmissão, e histologia. A técnica de imunofluorescência foi realizada para identificação de neurônios imunorreativos à (-ir) calretinina, receptor P2X7, caspase-3 clivada e total, e NF-κB fosforilado e total. Foram analisados o número de neurônios por gânglio, a área dos perfis neuronal, nuclear e citoplasmático, e a fluorescência celular total corrigida. A dupla marcação da calretinina com receptor P2X7, caspase-3 e NF-κB foi observada nos grupos WT-colite 24h e 4d. O número de neurônios calretinina-ir por gânglio diminuiu nos grupos WT-colite 24h e 4d, e não houve diferença significativa entre os grupos KO. A área do perfil neuronal aumentou nos grupos WT-colite 24h e KO-colite 24h, e a área do perfil nuclear diminuiu no grupo WT-colite 4d. O número de neurônios receptor P2X7-ir por gânglio diminuiu nos grupos WT-colite 24h e 4d. Não foram visualizados neurônios receptor P2X7-ir nos grupos KO. A intensidade da expressão fluorescente do receptor P2X7 aumentou no grupo WT-colite 24h, e da caspase-3 clivada aumentou nos grupos WT-colite 24h e 4d. Não houve diferença na intensidade da expressão fluorescente da caspase-3 total, do NF-κB fosforilado e do NF-κB total nos grupos WT e KO. Os neurônios mioentéricos demonstraram alterações

ultraestruturais compatíveis com necrose nos grupos WT-colite 24h e KO-colite 24h, e compatíveis com apoptose no grupo WT-colite 4d. A análise histológica do colo distal demonstrou que a ausência do receptor P2X7 e a passagem do tempo de 24 horas até quatro dias atenuou a infiltração de células inflamatórias, os danos teciduais, a deposição de fibras colágenas e a perda de células caliciformes, sendo compatível com a melhora sintomatológica e recuperação no IAD. Em conclusão, a colite ulcerativa experimental afetou os neurônios mioentéricos nos grupos WT, e os grupos KO foram menos afetados. Além disso, a morte neuronal parece estar associada à ativação da caspase-3 mediada pelo receptor P2X7, demonstrando que o seu estudo e modulação devem ser considerados em futuras abordagens terapêuticas aplicadas às DII.

Palavras-chave: Doenças inflamatórias intestinais. Gastroenterologia. Receptores purinérgicos. Sistema nervoso entérico.

ABSTRACT

MAGALHÃES, H. I. R. **Study of the mechanisms of action of experimental ulcerative colitis in enteric neurons in P2X7 receptor knockout mice.** 2022. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Literature demonstrates that the enteric nervous system is affected by inflammatory bowel diseases (IBDs), and that the P2X7 receptor can induce neuronal death. Despite this, little is known about the mechanisms of enteric neurons loss linked to IBDs. This work aimed to study the mechanisms of action by which experimental ulcerative colitis affects myenteric neurons of distal colon in P2X7 receptor knockout mice (P2X7 KO). Forty male C57BL/6 wild type (WT) and KO mice were euthanized 24 hours (24h) or four days (4d) after colitis induction by intra-rectal injection of TNBS (colitis groups). Sham groups were injected with vehicle (35% ethanol). Eight groups (n=5) were used: WT-sham 24h and 4d, WT-colitis 24h and 4d, KO-sham 24h and 4d, and KO-colitis 24h and 4d. The disease activity index (DAI) was noted, and the distal colon collected for immunohistochemistry, transmission electronic microscopy, and histological analyses. Immunofluorescence technique was performed to identify neurons immunoreactive to (-ir) calretinin, P2X7 receptor, cleaved and total caspase-3, and phosphorylated and total NF- κ B. The number of neurons per ganglia, neuronal, nuclear, and cytoplasmic profile area, and corrected total cell fluorescence (CTCF) were analyzed. Double labeling of calretinin with P2X7 receptor, caspase-3 and NF- κ B was observed in WT-colitis 24h and 4d groups. The number of calretinin-ir neurons per ganglia decreased in the WT-colitis 24h and 4d groups, and there were no significant differences between the KO groups. The neuronal profile area increased in the WT-colitis 24h and KO-colitis 24h groups, and the nuclear profile area decreased in the WT-colitis 4d group. The number of P2X7 receptor-ir neurons per ganglia decreased in the WT-colitis 24h and 4d groups. No P2X7 receptor-ir neurons were visualized in the KO groups. The P2X7 receptor CTCF increased in the WT-colitis 24h group, and cleaved caspase-3 CTCF increased in the WT-colitis 24h and 4d groups. There were no differences in the total caspase-3 CTCF, phosphorylated NF- κ B CTCF, and total NF- κ B CTCF in the WT and KO groups. Myenteric neurons showed ultrastructural changes consistent with necrosis in the WT-colitis 24h and KO-colitis 24h groups, and consistent with apoptosis in the WT-

colitis 4d group. Histological analysis of the distal colon demonstrated that the absence of the P2X7 receptor and the passage of time from 24 hours to four days attenuated inflammatory cell infiltration, tissue damage, collagen fiber deposition, and loss of goblet cells, and was compatible with symptomatic improvement and recovery in DAI. In conclusion, experimental ulcerative colitis affected myenteric neurons in the WT groups, and the KO groups were less affected. Moreover, neuronal death seems to be associated with P2X7 receptor-mediated caspase-3 activation, demonstrating that its study and modulation should be considered in future therapeutic approaches applied to IBDs.

Keywords: Enteric nervous system. Gastroenterology. Inflammatory bowel diseases. Purinergic receptors.