

Marcos Vinicius da Silva

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

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

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

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

Versão Original

**São Paulo
2011**

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Inflamatórias Intestinais: Colite Ulcerativa e Doença de Crohn

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

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

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

Para a indução de colite experimental em animais têm sido utilizadas substâncias ácidas como: o 2, 4-ácido dinitrobenzeno sulfônico (DNBS) e 2, 4, 6 ácido

Trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Com o uso destas substâncias pode-se promover uma colite semelhante à de humanos (BOYER et al., 2005; JACOBSON et al., 1997; LINDEN et al., 2005; POLI et al., 2001; SANOVIC et al., 1999).

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

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

1.2 Considerações sobre o SNE

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

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

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

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

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

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

secundário e um plexo terciário (FURNESS; COSTA, 1987; FURNESS, 2006) (Figura 1).

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

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

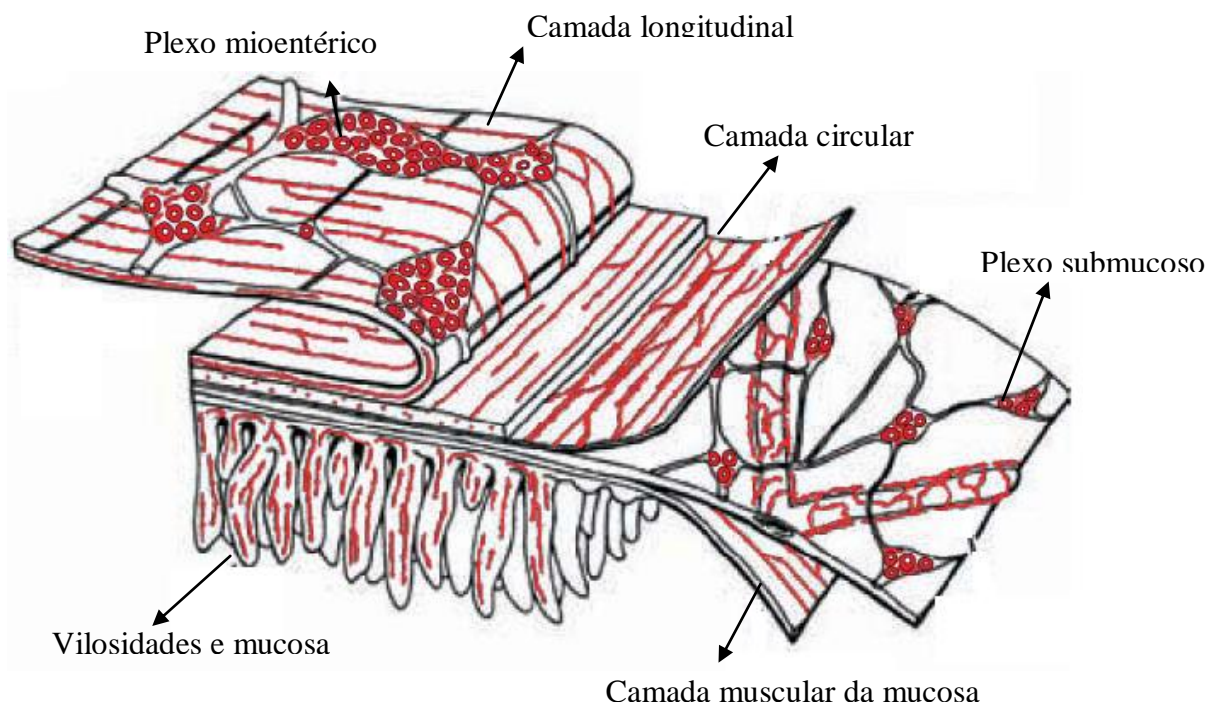


Figura 1 - Ilustração do íleo com suas camadas.
Fonte: Modificado de Furness, 2006.

Segundo Furness (2006), através de estudos funcionais, farmacológicos, neuroquímicos e morfológicos, pode-se identificar dezessete tipos de neurônios entéricos, quatorze destes encontrados no intestino delgado de cobaia. Os neurônios motores são divididos em cinco tipos: neurônios motores excitatórios, neurônios motores inibitórios, neurônios secretomotores/vasodilatadores não-colinérgicos, neurônios secretomotores/vasodilatadores colinérgicos e neurônios secretomotores não vasodilatadores colinérgicos (FURNESS, 2006; FURNESS et al., 2000, 1998) (Figura 2). Dependendo da região do trato gastrointestinal onde se situam, esses neurônios podem controlar a motilidade, o transporte de fluidos da mucosa e o fluxo sanguíneo local (FURNESS, 2006).

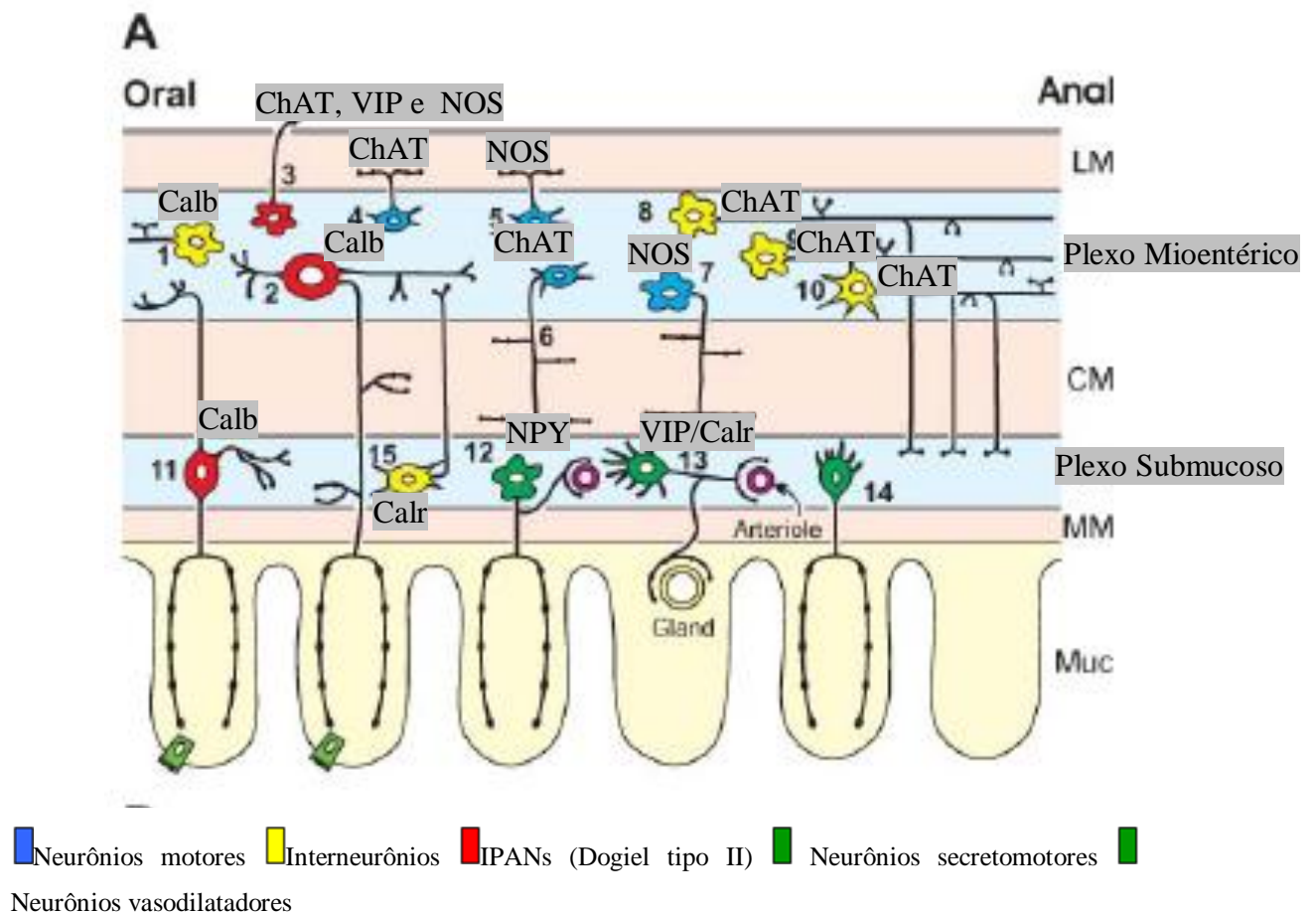


Figura 2 - Tipos de neurônios entéricos.

Fonte: Modificado de Furness, 2006.

Outro subgrupo de neurônios são os aferentes intrínsecos primários (IPANs) com corpos celulares de longas projeções anais (FURNESS et al., 2000). Os IPANs são

neurônios sensoriais, com morfologia Dogiel Tipo II (neurônios grandes e com superfície lisa), com propriedades eletrofisiológicas de neurônios tipo AH, enquanto os neurônios motores e interneurônios apresentam morfologia de neurônios Dogiel Tipo I (neurônios com muitos dendritos na superfície) e com padrão eletrofisiológico de neurônios S (FURNESS; COSTA, 1987; FURNESS, 2006).

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

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

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

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

Os neurônios secretomotores e vasomotores do plexo submucoso controlam diretamente o circuito reflexo local. Os dois tipos de neurônios secretomotores intestinais são os neurônios colinérgicos e os não-colinérgicos (FURNESS, 2000, 2006). Os neurônios não-colinérgicos parecem mediar a maioria das respostas reflexas locais utilizando o Peptídio Intestinal Vasoativo (VIP) ou um peptídeo relacionado como seu transmissor primário (FURNESS, 2006).

1.3 Considerações sobre as Células Gliais Entéricas

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

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

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

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

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

1.4 Considerações sobre os Receptores Purinérgicos P2X no SNE

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

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

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

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

Os receptores P2X são encontrados em células musculares lisas, neurônios, células gliais e apresentam papel de mediador na neurotransmissão excitatória rápida no SNE e periférico (SNP) (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Os receptores P2X estão acoplados a canais iônicos que medeiam rapidamente (dentro de 10ms) e seletivamente a permeabilidade de cátions (Na⁺, K⁺ e Ca²⁺) e participam na transmissão entre interneurônios descendentes e neurônios motores (NORTH; SURPRENANT, 2000; ZHOU; GALLIGAN, 1996).

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

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

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

No SNE a presença do receptor P2X₇ tem sido reportada através de técnicas imunohistoquímicas e propriedades farmacológicas em neurônios que expressam funcionalmente este receptor (HU et al., 2001). No entanto, não foi verificado quantitativamente em qual classe neuronal este receptor estava presente. Os resultados de Girotti (2008) demonstraram nos plexos mioentérico e submucoso do colo distal, a expressão e o código químico do receptor P2X₇. Estudos têm demonstrado

envolvimento do ATP no mecanismo da dor (DONNELLY-ROBERTS et al., 2008). A administração do antagonista seletivo ao receptor P2X₃, A317491, tem sido eficaz no bloqueio em diferentes modelos patológicos de dor na inflamação (JARVIS et al., 2002).

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

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

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

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

A presença desse receptor P2X₇ foi visto na uretra, próstata, em epitélios estratificados da pele, bexiga urinária humana (O'REILLY et al., 2001; 2007), nos órgãos genitais masculinos de humanos e de ratos (LEE et al., 2000), nas células acinares e células do ducto da glândula parótida (LI et al., 2003).

As mudanças na expressão dos receptores purinérgicos P2X₁₋₇ são frequentemente observados nos diferentes tipos celulares e tecidos, não somente como uma consequência da maturação neuronal e diferenciação, mas também das várias condições patológicas como após injúrias agudas no SNC: isquemia, hipóxia, stress mecânico, axôtiomia e inflamação. Os mecanismos purinérgicos podem estar

envolvidos nas etiopatogênias de muitas condições neurodegenerativas, especialmente por causa da grande liberação extracelular de ATP, adenosina e outros neurotransmissores (FRANKE; ILLES, 2006).

Tem sido investigado, também, o papel de bloqueadores dos receptores P2X não seletivos como o suramin, PPADS e Brilliant Blue G (BBG), um bloqueador seletivo para o receptor P2X₇ (CARROLL et al., 2009). Além disso, tem-se observado o efeito neuroprotetivo do antagonista do receptor P2X₇ (RYU; McLARNON, 2008) e a regulação diminuída deste receptor em oligodendrócitos após a hipóxia (WANG et al., 2009).

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

6 CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABBRACHIO, M.; BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: pathological roles. **Jpn J. Pharmacol.**, v. 78, p. 113-145, 1998.

ABBRACHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A.; ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling in the nervous system: an overview. **Trends Neuroscience**.32 (1):p 19-29, 2009.

AIMI, Y.; KIMURA, H.; KINOSHITA, T.; MINAMI, Y.; FUJIMURA, M.; VINCENT, S. R. Histochemical localization of nitric oxide synthase in rat enteric nervous system. **Neuroscience**, v. 53, p. 553-560, 1993. [doi:10.1016/0306-4522\(93\)90220-A](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90220-A)

AMBACHE, N. Unmasking, after cholinergic paralysis by botulinum toxin, of a reversed action of nicotine on the mammalian intestine, revealing the probable presence of local inhibitory ganglion cells in the enteric plexuses. **Br. J. Pharmacol.**, v. 6, p. 51-67, 1951.

ANNESE, V.; BASSOTI, G.; NAPOLITANO, G.; FRUSCIANTE, V.; BRUNO, M.; CONSCITORE, P.; GEMANI, U.; MORELLI, A.; ANDRIULLI, A. Gastric emptying of solids in patients with non-obstructive Cohn's disease is sometimes delayed. **J. Clin. Gastroenterol.** V. 21, p. 279–282, 1995.

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

BELAI, A.; BURNSTOCK, G. Distribution and colocalization of nitric oxide synthase and calretinin in myenteric neurons of developing, aging, and Crohn's disease huma. n small intestine. **Dig. Dis. Sci.**, v. 44, p. 1579-1587, 1999. [doi:10.1023/A:1026658826010](https://doi.org/10.1023/A:1026658826010)

BECK, M.; SCHABRAKOWSSKI, A; SCHRODL, F.; NEUHUBER, W.; BREHMER, A. Chat and NOS “In Human myenteric neurons: co-existence and co-absence. **Cell Tissue** v, 338 p. 37-51,2009. [doi 10.10071500441](https://doi.org/10.10071500441)

BELL., C. J., GALL, D.G., WALLACE, J. L. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. **Am J Physiol** 1995; v. 268 p.622–630.

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

BRANDÃO, M. C. S.; DE ANGELIS, R. C.; DE SOUZA, R. R.; LIBERTI, E. A. Effects of pre-and postnatal protein deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric study in weaning rats. **Nutr. Res.**, v. 23, p. 215-223, 2003. [doi:10.1016/S0-271-5317\(02\)00459-1](https://doi.org/10.1016/S0-271-5317(02)00459-1)

BROOKES, S. J.; STEELE, P. A.; COSTA, M. Calretinin immunoreactivity in cholinergic motor neurones, interneurons and vasomotor neurones in the guinea-pig small intestine. **Cell Tissue Res.**, v. 263, p. 471-481, 1991. [doi:10.1007/BF00327280](https://doi.org/10.1007/BF00327280)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CAVRIANI, G.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; TREZENA, A.G.; DA SILVA, Z.L.; DOMINGOS, H.V.; DE ARRUDA, M.J.; JANCAR, S.; TAVARES DE LIMA, W. Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion. **Eur J Pharmacol.**, v. 28 n. 2-3 p.241-249,2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GALLIGAN, J. J.; FURNESS, J. B.; COSTA, M. Effects of cholinergic blockade and sympathetic denervation on gastrointestinal myoelectric activity in guinea-pig. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 238, p. 1114-1125, 2000.

GANN, D.; SCHRÖDL, F.; NEUHUBER, W.; BREHMER, A. Investigation of general and cytoskeletal markers to estimate numbers and proportions of neurons in human intestine. **Histol. Histopathol.**, v. 21, p. 41-51, 2006. PMID:16267786

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

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

GOMES, O.A.; CASTELUCCI, P.; DE VASCONCELLOS FONTES, R.B.; LIBERTI, E.A. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on

myenteric neurons of the rat small intestine: a quantitative morphological study. **Auton Neurosci.** v.30; n.126-127, p.277-284 **2006**.

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

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

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

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

HU, H. Z.; GAO, N.; LIN, Z.; GAO, C.; LIU, S.; REN, J.; XIA, Y.; WOOD, J. D. P2X₇ receptors in the enteric nervous system of guinea-pig small intestine. **J. Comp. Neurol.**, v.440, p.299-310, 2001. doi: 10.1002/cne.1387

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

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

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

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

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

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

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

KUNZE, W. A. A.; BORNSTEIN, J. C.; FURNESS, J. B. Identification of sensory nerve cells in a peripheral organ the intestine of a mammal. **Neuroscience**, v. 66, p. 1-4, 1995. doi:10.10-16/0306-4522(95)00067-S

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

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

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

LI, P-L. The intramural nervous system of the small intestine with special reference to the innervation of the inner subdivision of its circular muscle. **J. Anat.**, v. 74, p.348-359, 1940.

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

LI, Q.; LUO X.; ZENG, W.; MUALLEN S. Cell-specific behavior of P2X7 receptors in mouse parotid acinar and duct cells. **J Biol Chem**; v.278, p.47554-61, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NICHOLAS, R. A. Identification of the P2Y(12) receptor: a novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides. **Mol. Pharmacol.**, v. 60, n. 3, p. 416-20, 2001. PMID:11502870

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CASTELUCCI P. Effects of ischemia and reperfusion on P2X₂ receptor expressing neurons of the rat ileum enteric nervous system. **Dig Dis Sci.** v.56, n.8 p.2262-2275, 2011.

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

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

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

POOLE, D.P.; CASTELUCCI, P.; ROBBINS, H.L.; CHIOCCHETTI, R.; FURNESS J.B. The distribution of P2X₃ purine receptor subunits in the guinea-pig enteric nervous system. **Autonom. Neurosc.** v.101, p. 39-47, 2002.

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

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

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

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

QU, Z. D.; THACKER, M.; CASTELUCCI, P.; BAGYÁNSZKI, M.; EPSTEIN, M. L.; FURNESS, J. B. Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. **Cell Tissue Res.**, v. 334, p. 147-61, 2008.

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

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

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

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

RIVERA, L.R.; THACKER, M.; CASTELUCCI, P.; BRON, R.; FURNESS, J.B. The reactions of specific neuron types to intestinal ischemia in the guinea-pig enteric nervous. **Acta Neuropathologica**, v. 24, p. 1-10, 2009.

RYU, J.K; MCLARNON, J.G. Block of purinergic p2x(7) receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. **Neuroreport** v.19, n.17: p.1715-1719, 2005

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

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

SANT'ANA, M.; MIRANDA, N. M. H.; DE SOUZA, R. R.; MOLINARI, S. L. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon of rats subjected to proteic desnutrition. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 55, n.4, p. 687-95, 1997.

SANTER, R. M.; BAKER, D. M. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 25, p. 59-67, 1988. [doi:10.1016/0165-1838\(88\)90008-2](https://doi.org/10.1016/0165-1838(88)90008-2)

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

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

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

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

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

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

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

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

SCHULZE-LOHOFF, E.; HUGO, C.; ROST, S.; ARNOLD, S. GRUBER, A; BRUNE, B.; STERZEL, R.B. Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X₇ receptors. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p.F962-F971, 1998.

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

SHARKEY, K.A., KROESE, A.B.A. Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators. **Anat. Rec.** v.262, p.79– 90, 2001.

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

SLATER, M.; BARDEN, J. A.; MURPH, C. R. The purinergic calcium channels P2X_{1,2,5,7} are down-regulated while P2X_{3,4,6} are up-regulated during apoptosis in the ageing rat prostate. **Histochem. J.**, v. 32, p. 571-580, 2000.

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

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

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

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

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

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

THRASIVOULOU, C.; SOUBEYRE, V.; RIDHA, H.; GIULIANI, D.; GIARONI, C.; MICHAEL, G. J.; SAFFREY, M. J.; COWEN, T. Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. **Aging Cell**, v. 5, p. 247-57, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

YIANGOU, Y.; FACER, P.; BAECKER, P. A.; FORD, A. P.; KNOWLES, C. H.; CHAN, C. L.; WILLIAMS, N. S.; ANAND, P. ATP-gated ion channel P2X(3) is increased in human inflammatory bowel disease. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 13, n. 4, p. 365-9, 2001.

YANO, K.; HOSOKAWA, K.; HATA, Y. Quantitative morphology of Auerbach's plexus in rat intestinal wall undergoing ischemia. **J. Reconstr. Microsurg.**, v. 13, n.4, p. 297-301, 1997. [doi:10.1055/s-2007-1000239](https://doi.org/10.1055/s-2007-1000239)

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

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

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